



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Estudios ecotoxicológicos utilizando gasterópodos nativos  
como herramienta para evaluar la toxicidad de clorpirifos y la  
calidad de agua (Cuenca del Río Reconquista)**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Química Biológica

**Lic. Karina Alesia Bianco**

**Directora de Tesis:** Dra. Gisela Kristoff

**Co-Directora de Tesis:** Dra. Fabiana Lo Nstro

**Consejera de Estudios:** Dra. Gabriela Chaufan

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Evaluación Ecotoxicológica del Agua: Invertebrados Nativos y otros Modelos (EEAINM), Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA & IQUIBICEN, UBA-CONICET.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

## Resumen

El gasterópodo dulceacuícola *Biomphalaria straminea*, nativo de Argentina, ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio en ensayos de toxicidad controlados con plaguicidas. El clorpirifos es un insecticida organofosforado (OF) cuyo mecanismo de acción primario consiste en la inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Se utiliza en agricultura en formulados comerciales (FCs), los cuales contienen al principio activo (PA) más excipientes, y ha sido detectado en numerosos cuerpos de agua de Argentina, entre ellos, el Arroyo Las Catonas (Cuenca del Río Reconquista). El objetivo de la presente tesis fue evaluar efectos a distintos niveles de organización (bioquímico, histológico, reproductivo, comportamental) en *B. straminea* luego de la exposición al clorpirifos PA y FC, y a muestras de agua de sitios afectados por actividades antrópicas del Arroyo Las Catonas. Como parte del primer capítulo, se utilizó un FC y el PA de clorpirifos en exposiciones agudas (48 h) para evaluar letalidad, en exposiciones subcrónicas de 14 días para evaluar letalidad, parámetros bioquímicos y reproductivos, calidad de la descendencia y parámetros histológicos de la glándula digestiva y las gónadas, y de 28 días para estudiar daño a nivel histológico en la glándula digestiva y las gónadas. Luego de las exposiciones agudas, fue posible estimar la concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ), la máxima concentración que no produjo efecto (NOEC), la menor concentración que produjo efecto (LOEC) y el cociente de riesgo (CR), los cuales no fueron significativamente diferentes entre el FC y el PA. La exposición por 14 días al FC y al PA, disminuyó la actividad de la enzima AChE y la supervivencia de los juveniles. El FC, además, disminuyó la actividad de las enzimas carboxilesteras (CEs) y catalasa (CAT), aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y causó embriotoxicidad indicada por el aumento del tiempo de eclosión y la disminución del porcentaje de eclosión. De forma preliminar, el PA disminuyó la altura media de los epitelios (MET) de los túbulos digestivos luego de 14 días de exposición. El objetivo del segundo capítulo fue evaluar el impacto del agua del Arroyo Las Catonas en la especie. Para ello se realizaron cuatro muestreos (primavera del año 2019 y verano de los años 2021, 2022 y 2023) en diferentes sitios del arroyo. En todos los muestreos se determinaron *in situ* la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la conductividad de las muestras de agua. En el laboratorio se realizaron exposiciones por 48 h para evaluar letalidad y parámetros

bioquímicos, y en los últimos dos muestreos se incorporaron exposiciones por 7 días para estudiar, además, efectos sobre la reproducción y la calidad de la descendencia. La mayoría de los parámetros fisicoquímicos determinados presentaron valores adecuados para la protección de la vida acuática. La exposición por 48 h al agua del sitio ZH, ubicado aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales y de huertas de uso intensivo, en el año 2019 no causó variaciones en los biomarcadores bioquímicos determinados. Sin embargo, en el año 2021 produjo un 60% de letalidad e inhibición de la enzima AChE en comparación al sitio R, ubicado aguas arriba de fuentes puntuales conocidas de contaminación. En 2021, el agua del sitio ZP ubicado aguas abajo de la planta de tratamiento de desechos industriales, inhibió la actividad de la enzima ácido δ-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D). Desde el año 2022, el sitio R experimentó falta de caudal por lo que se incorporó un control de agua declorada en los bioensayos. La exposición por 48 h a ZP en 2022 aumentó la actividad de las enzimas CEs, mientras que en 2023 el agua de ZH aumentó la actividad de la enzima AChE. Luego de las exposiciones por 7 días, se observó en 2022 un aumento de la actividad de la enzima AChE por exposición a ZP, e inhibición de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR), malformaciones en los embriones y disminución del porcentaje de eclosión y de la supervivencia de los juveniles en el grupo ZH. Por otro lado, en 2023 se inhibió la actividad de la enzima CAT por exposición a ZH y disminuyó el porcentaje de eclosión por exposición a las muestras de agua de ZP.

Se concluye que el FC resultó más tóxico que el PA. Los niveles de contaminación del Arroyo Las Catonas, produjeron diversos efectos negativos en *B. straminea* según la campaña de muestreo. La actividad de AChE y los parámetros determinados en la descendencia (porcentaje y tiempo de eclosión, y la supervivencia de los juveniles) son los biomarcadores que respondieron tanto a la exposición al PA de clorpirifos, al FC de clorpirifos, como a las muestras de agua del Arroyo Las Catonas. Los resultados obtenidos permiten concluir que *B. straminea* es una especie útil tanto como bioindicadora de contaminación ambiental, como en bioensayos de toxicidad de plaguicidas OFs. Se recomienda incluir los FCs de plaguicidas, utilizar una amplia gama de biomarcadores, incluir estadios tempranos de desarrollo y especies nativas en la evaluación de la toxicidad de contaminantes y en monitoreos de calidad del agua.

**Palabras claves:** insecticida organofosforado, principio activo, formulado comercial, ambiente acuático, contaminación acuática, invertebrados, biomarcadores, B-esterasas, defensas antioxidantes, embriotoxicidad, estadios tempranos, supervivencia, histología, glándula digestiva, *Biomphalaria straminea*

# **Ecotoxicological studies using native gastropods as a tool to evaluate the toxicity of chlorpyrifos and the water quality (Río Reconquista Basin)**

## **Abstract**

The freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*, native to Argentina, has previously been used in controlled laboratory toxicity tests with pesticides by our group. Chlorpyrifos is an organophosphate (OP) insecticide, whose primary mechanism of action consists of the inhibition of the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). In agriculture, chlorpyrifos is used as commercial formulations (CFs), which contain the active ingredient (AI) plus excipients, and has been detected in several water bodies in Argentina, including Las Catonas Stream (Reconquista River Basin). This thesis, aimed to evaluate effects at different levels of organization (biochemical, histological, reproductive, behavioral) in *B. straminea* of chlorpyrifos (PA and FC), and water samples from anthropogenically impacted sites in Las Catonas Stream. As part of the first chapter, a CF and the AI of chlorpyrifos were used in acute exposures (48 h) to evaluate lethality, in subchronic exposures of 14 days to evaluate lethality, biochemical and reproductive parameters, offspring quality and histological parameters on the digestive gland and the gonads, and 28-day exposures to study histological damage on the digestive gland and the gonads. After acute exposures, it was possible to estimate the lethal concentration 50 ( $LC_{50}$ ), the maximum no effect concentration (NOEC), the lowest effect concentration (LOEC) and the risk ratio (CR), which were not significantly different between CF and AI. The 14-day exposure to CF and AI decreased AChE activity and juvenile survival. The CF also decreased the activity of carboxylesterases (CEs) and catalase (CAT) and increased the activity of superoxide dismutase (SOD). It caused embryotoxicity, indicated by increased hatching time and decreased hatching percentage. Preliminarily, the PA reduced the mean epithelial height (MET) of the digestive tubules after 14 days of exposure. The aim of the second chapter was to evaluate the impact of water from Las Catonas Stream on the species. To this end, four samplings were carried out (spring of 2019 and summers of 2021, 2022 and 2023) in different sites along Las Catonas Stream. At each sampling site, temperature, pH,

dissolved oxygen and conductivity were determined *in situ*. In the laboratory, water samples from all campaigns were used to carry out 48-h exposures, during which lethality and biochemical parameters were evaluated. In the last two campaigns, 7-day exposures were added to evaluate reproductive parameters and offspring quality. Most of the physicochemical parameters presented values consistent with water quality guidelines for the protection of aquatic life. The 48-h exposure to water from site ZH, located downstream an industrial waste treatment plant and intensively used fruit and vegetable orchards, in 2019 did not cause variations in the determined biochemical biomarkers. However, in 2021, it produced 60% lethality and inhibition of AChE activity compared to reference site R, located upstream known punctual sources of contamination. In 2021, water from the ZP site, located downstream the industrial waste treatment plant, inhibited the activity of the enzyme  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrase (ALA-D). Since 2022, site R had no flow, therefore a dechlorinated water control was incorporated. A 48-h exposure to ZP water in 2022 increased CE activity, whereas in 2023, water from ZH increased AChE activity. After 7-day exposures in 2022, an increase AChE activity was observed due to exposure to ZP water, while and inhibition of glutathione reductase (GR) activity, malformations in embryos and decrease in the hatching percentage and survival of juveniles due to exposure to water from ZH. Meanwhile, in 2023, CAT activity was inhibited by exposure to ZH and the hatching percentage decreased with ZP.

It is concluded that CF was more toxic than AI. The contamination levels of Las Catonas Stream produced various negative effects on *B. straminea* depending on the sampling campaign. AChE activity and parameters determined in the offspring (percentage and time of hatching, and survival of juveniles) are the biomarkers that responded to both exposure to chlorpyrifos AI, chlorpyrifos CF and to water samples from Las Catonas Stream. These results allow us to conclude that *B. straminea* is a useful species both as a bioindicator of environmental contamination and in bioassays of toxicity of OPs pesticides. It is recommended to include pesticide CFs, use a wide range of biomarkers, include early stages of development and native species in the evaluation of contaminant toxicity and in water quality monitoring.

**Key words:** Organophosphate insecticide, active ingredient, commercial formulation, environment, aquatic pollution, invertebrates, biomarkers, B-esterases, antioxidant defenses, embryotoxicity, early stages, histology, digestive gland, *Biomphalaria straminea*

## Agradecimientos

Gracias a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales donde pude realizar mis carreras de grado y de posgrado, ambas de calidad y gratuitas. Mis años de carrera fueron de gran crecimiento en muchos aspectos y todos los docentes que conocí en el camino mostraron una gran pasión tanto por la docencia como por la investigación.

Gracias al Departamento de Química Biológica y al Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (IQUIBICEN) por el lugar de trabajo, los equipos departamentales y al personal administrativo siempre dispuesto.

Gracias al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por los subsidios otorgados.

Gracias a todos los no docentes y bedeles del departamento de QB por la ayuda cuando solicité algo, por lo valioso de su tarea y la responsabilidad y compromiso con la que trabajan, por la buena onda, las sonrisas y las charlas cariñosas de pasillo.

Gracias a la secretaría de QB, Aye, gran persona que siempre respondió con una sonrisa mis preguntas, a pesar de que a veces eran repetidas o ansiosas. Gracias por las palabras lindas y los buenos consejos siempre que hablamos.

Gracias a mi consejera de estudio, la Dra. Gabriela Chaufan, y además JTP en mi primer cargo docente. Gracias por la buena predisposición cuando necesité algo, los buenos deseos y el trato cariñoso.

Gracias a las miembros del comité de seguimiento, la Dra. Anahí Magdaleno y la Dra. Juliana Gimenez por los consejos, la responsabilidad y el compromiso en las reuniones de seguimiento.

Un reconocimiento más que especial a la Dra. Gimenez, gracias Juli por permitirme utilizar los equipos para sacar fotos de los preparados histológicos y sobre todo por las horas de charlas, consejos y enseñanzas sobre histología, moluscos y mucho más.

A todos con quienes compartí el laboratorio, quienes estuvieron al principio de mi tesis: Majo y Gaby, y quienes estuvieron más tarde: Gime, Daira, Alan, Caro y Nacho. Trabajar con ustedes fue hermoso, compartir tanto conocimientos como lo cotidiano.

Gracias a la Dra. Martini (Clau) por compartir tu experiencia, ayudarme con la olorosa determinación de ALA-D y por tus aportes en la escritura y orden de esta tesis.

Un gracias especial a Gime que fuiste mi compa becaria la mayor parte de mi tesis. Me escuchaste, me aconsejaste, me entendiste y me ayudaste más veces de las que crees. Sos una gran compañera y nunca me voy a olvidar como me cambiaste la vida al presentarme el Canva y el ChatGPT.

A mis directoras de tesis, la Dra. Gisela Kristoff y la Dra. Fabiana Lo Nostro. Gracias por sus inmensos aportes, experiencia y dirección durante estos años. Gracias Gise por confiar por segunda vez en mí para realizar, esta vez, mi doctorado. Valoro mucho la gran oportunidad que me dieron y lo que me permitieron crecer.

A mi familia y amigos, gracias por acompañarme e interesarse en lo que hacía.

Gracias a mis hermanas Mel y Agus, y a mis padres Graciela y Oscar porque siempre hablan de mí con orgullo; aunque no se los reconozca, me alegra que se sientan así. Soy una gran consecuencia de ustedes 4.

Gracias a mi pareja Román y a mis hijos Jere y Eze por entender que esta era mi prioridad, por apoyarme siempre, por ser mi sostén y compartir la vida conmigo que es mucho más hermosa con ustedes. Su amor es mi motor, los amo.

*A MIS PADRES,  
GRACIELA Y OSCAR*

*A MI GRAN COMPAÑERO,  
ROMÁN*

## Publicaciones

### -Artículos científicos con referato

\***Bianco, K.A., Martini, C.N., Tejedor, M.J., Paredes, M.G., Kristoff, G., 2024.** Multi-biomarker approach to evaluate the responses of the snail *Biomphalaria straminea* at environmentally relevant concentrations of chlorpyrifos (active ingredient and commercial formulation). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology, 281, 109923. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109923>

\***Bianco, K.A., Bernal Rey, D.L., Menendez Helman, R.J., Kristoff, G., 2023.** Lethality and acetylcholinesterase inhibition in a native invertebrate species exposed to water samples of an impact stream (Reconquista River basin, Argentina). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 110, 108. <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03742-4>

### -Resúmenes presentados en congresos

\*IX Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental, SETAC. 21, 22 y 23 de octubre de 2024, Santa Fe.

Trabajo presentado en modalidad póster: Principio activo y formulado comercial de clorpirifos: caracterización histológica y efectos sobre la glándula digestiva de *Biomphalaria straminea*.

**Bianco, Karina A.; Giménez, Juliana; Battista Ariadna; Lo Nostro, Fabiana; Kristoff, Gisela.**

\*XXIII Congreso Argentino de Toxicología - XL Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, ATA. 20, 21 y 22 de septiembre de 2023, CABA.

Trabajo presentado en modalidad póster: Evaluación fisicoquímica y ecotoxicológica de muestras de agua de dos sitios con impacto antropogénico (Sub-Cuenca Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista).

**Bianco, Karina A.; Paredes, María G.; Martini, Claudia; Lo Nostro, Fabiana; Menéndez-Helman, Renata J.; Raiger Lustman, Laura J.; Kristoff, Gisela.**

\*XI Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, EMEAP. 7, 8 y 9 de noviembre de 2022, Bahía Blanca.

Trabajo presentado en modalidad póster: Respuestas bioquímicas en *Biomphalaria straminea* por exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas.

**Bianco, K.A.; Paredes, M.G.; Martini, C.; Kristoff, G.**

\*XXXIX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología – III Jornadas Iberoamericanas de Toxicología, ATA. 21, 22 y 23 de septiembre de 2022, CABA.

Trabajos presentados en modalidad póster: Muestras de agua de un arroyo del partido de Moreno, provincia de Buenos Aires, producen efectos en la oviposición, embriogénesis, eclosión y en la supervivencia de los juveniles de un gasterópodo acuático nativo.

**Bianco, K.; Paredes, M.G.; Kristoff, G.**

\*SETAC Latin America 14th Biennial Meeting, SETAC. 26 al 29 de septiembre de 2021, Formato virtual.

Trabajo presentado en modalidad póster: Biomonitoring of Arroyo Las Catonas, Cuenca Reconquista, Provincia de Buenos Aires, Utilizing the Native Aquatic Gasteropod *Biomphalaria straminea*.

**Bianco, K., Kristoff, G.**

\*XXII Congreso Argentino de Toxicología - XXXVII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología – II Jornadas Iberoamericanas de Toxicología, ATA. 24 y 25 de septiembre de 2021, Formato virtual.

Trabajo presentado en modalidad póster: El insecticida organofosforado clorpirifos (principio activo) produce letalidad, comportamiento “de escape”, inhibición de B-esterasas y aumento de defensas detoxificantes y antioxidantes en *Biomphalaria straminea*.

**Bianco, K.; Tejedor, M.J.; Rabuffetti, G.; Fernández Piana, L.; Kristoff, G.**

\*X Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, EMEAP. Noviembre de 2019, Azul, Buenos Aires.

Trabajo presentado en modalidad póster: Ensayos ecotoxicológicos con agua de un arroyo de Buenos Aires, Argentina, en el gasterópodo *Biomphalaria straminea*.

**Herbert, L., Cossi, P., Tejedor, M.J., Rabuffetti, G., Bianco, K., Raiger Lustman, L., Kristoff, G.**

## Abreviaturas

ACh: acetilcolina  
AChE: acetilcolinesterasa  
AcSCh: acetiltiocolina  
ALA: ácido δ-aminolevulínico  
ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa  
BChE: butirilcolinesterasa  
β-Me: β-mercaptopropanoato  
BSA: sero albúmina bovina  
CAT: catalasa  
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno  
CE: carboxilesterasa  
CEA: concentración esperada en el ambiente  
CE<sub>50</sub>: concentración a la cual se observa efecto en el 50% de los organismos expuestos  
ChE: colinesterasa  
CL<sub>50</sub>: concentración a la cual se observa 50% de letalidad  
CR: coeficiente de riesgo  
CYP: citocromo P-450  
DT<sub>50</sub>: tiempo necesario para la degradación del 50% de una sustancia  
DNP-SG: S-(2,4-dinitrofenil) glutatión  
DQO: demanda química de oxígeno  
DTNB: 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)  
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético  
EROS: especies reactivas del oxígeno  
GPx: glutatión peroxidasa  
GR: glutatión reduktasa  
GSH: glutatión  
GSSG: glutatión oxidado  
GST: glutatión S-transferasa  
IC<sub>95</sub>: intervalo de confianza del 95%  
LOEC: menor concentración a la que se observa efecto  
MDR: radio medio de los túbulos  
MET: altura medio del epitelio  
MLR: radio medio del lumen  
NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótico fosfato reducido  
NBT: nitroazul de tetrazolio  
NOEC: mayor concentración a la que no se observa efecto  
OD: oxígeno disuelto  
OF: organofosforado  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PChE: propionilcolinesterasa  
p-NFA: p-nitrofenil acetato

p-NFB: p-nitrofenil butirato

SOD: superóxido dismutasa

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

## **Índice**

<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	5
<b>Agradecimientos</b>	8
<b>Publicaciones</b>	11
<b>Abreviaturas</b>	12
<b>1. Introducción general</b>	18
1.1 La ecotoxicología	18
1.2 Contaminantes en ambientes acuáticos	18
1.3 Análisis de sistemas acuáticos	21
1.4 Uso de biomarcadores para evaluar la toxicidad de los contaminantes y de muestras de agua ambientales	24
1.4.1 Nivel bioquímico	25
1.4.2 Nivel histológico	33
1.4.3 Nivel reproductivo	33
1.4.4 Nivel comportamental	34
1.5 Gasterópodos como bioindicadores	34
1.5.1 <i>Biomphalaria straminea</i>	35
<b>2. Hipótesis</b>	42
<b>3. Objetivos</b>	43
<b>4. Metodología general</b>	45
4.1 Reactivos	45
4.2 Equipos	45
4.3 Ejemplares de <i>B. straminea</i>	46
4.4 Condiciones generales de los bioensayos agudos	47
4.5 Condiciones generales de los bioensayos subcrónicos	47
4.6 Signos de neurotoxicidad	48
4.7 Criterios de letalidad	48
4.8 Homogenatos	48
4.9 Determinaciones de marcadores bioquímicos	49
4.9.1 Contenido total de proteínas	49
4.9.2 Determinación de la actividad AChE	49
4.9.3 Determinación de la actividad CEs	50

4.9.4 Determinación de la actividad GST	51
4.9.5 Determinación de la actividad CAT	51
4.9.6 Determinación de la actividad SOD	52
4.9.7 Determinación de la actividad GR	52
4.9.8 Determinación de la actividad ALA-D	53
4.9.9 Determinación del contenido de GSH	54
4.10 Preparación del material biológico para el análisis histológico	55
4.11 Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia	57
4.12 Análisis estadístico	59
4.13 Descarte y descontaminación	60

---

## **CAPÍTULO I: Evaluación de toxicidad del clorpirifos**

<b>1. Introducción</b>	62
1.1 Breve historia de los plaguicidas	62
1.2 Clasificación de los plaguicidas y su aplicación como formulados comerciales	63
1.3 Insecticidas	65
1.3.1 Insecticidas organofosforados (OFs)	67
1.3.1.1 Clorpirifos	70
<b>2. Metodología</b>	78
2.1 Preparación de las soluciones de clorpirifos	78
2.2 Exposiciones agudas	78
2.2.1 Diseño experimental de los bioensayos de exposición	78
2.2.2 Concentración letal a las 48 h (CL <sub>50-48h</sub> )	79
2.2.3 Determinación de NOEC y LOEC	80
2.2.4 Estimación de riesgo ecológico	80
2.3 Exposiciones subcrónicas	80
2.3.1 Primer ensayo: preliminar	81
2.3.2 Segundo ensayo	82
<b>3. Resultados</b>	89
3.1 Exposiciones agudas	89
3.2 Exposiciones subcrónicas	90
3.2.1 Primer ensayo: exposición al PA de clorpirifos	90
3.2.2 Segundo ensayo: exposición al PA y al FC de clorpirifos	92

3.2.2.1 Signos de neurotoxicidad y letalidad	93
3.2.2.2 Marcadores bioquímicos	93
3.2.2.3 Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia	98
3.2.2.4 Análisis histológico	104
<b>4. Discusión Capítulo I</b>	109
<hr/>	
<b>CAPÍTULO II: Evaluación de toxicidad de muestras de agua ambientales (SubCuenca Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista)</b>	
<b>1. Introducción</b>	122
1.1 Cuenca del Río Reconquista	122
1.2 Subcuenca Las Catonas	124
1.3 Arroyo Las Catonas	125
1.4 Calidad del agua	126
<b>2. Metodología</b>	128
2.1 Sitios de muestreo	128
2.2 Muestreos y determinaciones fisicoquímicas	130
2.3 Bioensayos de exposición	133
2.3.1 Campaña de muestreo de primavera 2019	133
2.3.2 Campaña de muestreo de verano 2021	134
2.3.3 Campaña de muestreo de verano 2022	135
2.3.4 Campaña de muestreo de verano 2023	139
<b>3. Resultados</b>	141
3.1 Características de los sitios de muestreo en las distintas campañas	141
3.2 Parámetros fisicoquímicos determinados en las distintas campañas	144
3.3 Muestreo de primavera de 2019	151
3.4 Muestreo de verano de 2021	153
3.5 Muestreo de verano de 2022	158
3.6 Muestreo de verano de 2023	172
3.7 Resumen de todas las campañas de muestreo	185
<b>4. Discusión Capítulo II</b>	186
<hr/>	
<b>Discusión General</b>	196
<b>Conclusiones</b>	203
<b>Anexos</b>	205
<b>Bibliografía citada y consultada</b>	211

## **1. Introducción general**

### **1.1 La ecotoxicología**

La ecotoxicología surge de la fusión de dos disciplinas científicas, la ecología y la toxicología. Suele considerarse al toxicólogo René Truhaut, como quien introdujo la definición del término ecotoxicología, el cual refiere a "la rama de la toxicología relacionada con el estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes naturales o sintéticos, a los componentes de los ecosistemas, animales (incluidos los seres humanos), vegetales y microbianos, en un contexto integral" (Truhaut, 1977). Posteriormente, se han propuesto otras definiciones de este concepto, siendo una de las más modernas la que utiliza Carriquiriborde (2021): "disciplina científica aplicada que tiene por objeto comprender y predecir la distribución, destino y efectos, directos e indirectos, causados por agentes contaminantes de naturaleza física, química (de origen natural o sintético) o biológica que, producto de la acción antrópica, alcanzan en el ambiente niveles anormales alterando la estructura y/o función de los ecosistemas, con el fin de proveer herramientas de gestión que permitan prevenir, mitigar o remediar tales efectos". Esta definición destaca el carácter integral de esta disciplina, que se actualiza constantemente incorporando nuevos enfoques, perspectivas y herramientas.

A su vez, la definición de contaminante también ha ido variando a lo largo del tiempo y según los autores, pero es correcto decir que los contaminantes son compuestos naturales o sintéticos (antrópicos) que dependiendo de su concentración, tiempo de permanencia y/o frecuencia de aparición perjudican o pueden llegar a perjudicar directa o indirectamente a distintos ecosistemas, plantas, animales y/o otros seres vivos (incluso seres humanos).

### **1.2 Contaminantes en ambientes acuáticos**

Particularmente los sistemas acuáticos reciben un gran número de contaminantes, cuyo origen en algunos casos es natural (por ejemplo el arsénico y/o el mercurio) pero en otros casos es antrópico (por ejemplo residuos de fármacos o de plaguicidas). Los vehículos que permiten que los contaminantes alcancen los recursos hídricos pueden ser las aguas residuales domésticas, las aguas industriales, los lixiviados, las aguas pluviales y los derrames. Además de su transporte, los procesos hidrológicos como la

escorrentía o la lixiviación son medios para la transformación química y/o biológica de los contaminantes. La figura 1 resume los principales procesos hidrológicos que afectan los cuerpos de agua.

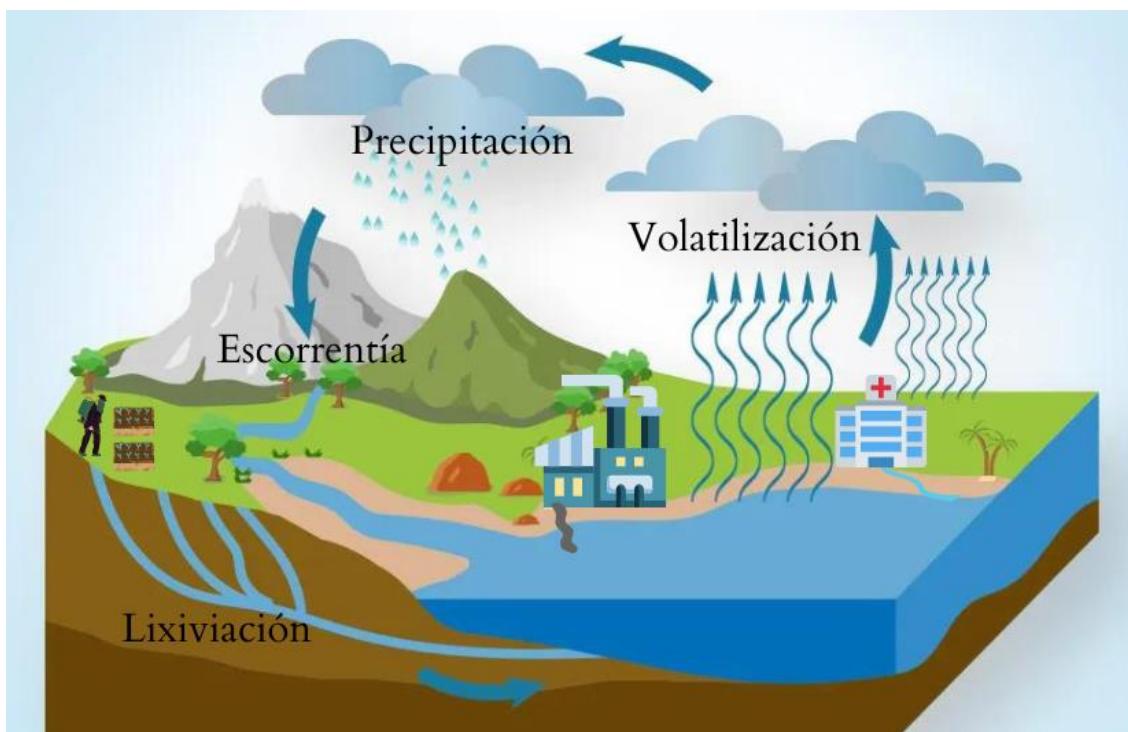


Figura 1. Esquema de los principales procesos hidrológicos.

### Efectos de los contaminantes acuáticos sobre la biota

La presencia de contaminantes en el agua como los compuestos químicos orgánicos, los metales pesados y los materiales físicos pueden afectar la calidad y, potencialmente, dañar tanto la salud humana como la vida acuática (Ustaoğlu et al., 2021). Los distintos organismos que habitan en los cuerpos de agua no solo muestran una gran variedad en cuanto a la sensibilidad a los contaminantes, sino que también pueden estar expuestos a ellos en diferentes grados. En los ecosistemas, los organismos suelen estar expuestos a mezclas de diversas sustancias al mismo tiempo y, excepto algún episodio puntual como puede ser un derrame, esas sustancias se encuentran en bajas concentraciones. Las propiedades y la concentración del contaminante, el período de exposición y la interacción con otras sustancias son claves a la hora de evaluar los efectos que tienen sobre las especies.

Los contaminantes pueden causar efectos de dos formas:

- forma directa: el contaminante causa efecto directamente sobre los organismos,
- forma indirecta: el contaminante causa modificaciones en el medio físico o afecta a un organismo que sirve de alimento a otro.

Los efectos indirectos no deben ser subestimados ya que pueden tener consecuencias ecológicas considerables. Por ejemplo, la eutrofización de las aguas continentales y de las aguas costeras marinas causada por el enriquecimiento con nutrientes inorgánicos derivados de aguas residuales y fertilizantes agrícolas afecta la distribución de las especies por alteración de las características químicas del ambiente en el que viven (Moriarty, 1999).

La mortalidad es el efecto más significativo, por lo que en escenarios ideales ningún nivel de mortalidad debería ser aceptable (Maltby y Calow, 1989). Por lo general, concentraciones altas de uno o varios contaminantes causan efectos tóxicos agudos o letalidad en los seres vivos; sin embargo, otros compuestos se liberan continuamente al ambiente, y bajas concentraciones pueden causar efectos tóxicos subcrónicos, disrupción endocrina y desarrollo de resistencia en algunos organismos. Estos efectos subletales son resultado de situaciones ambientalmente realistas y pueden terminar modificando la estructura y el funcionamiento de un ecosistema.

Una forma de estudiar la toxicidad de los contaminantes sobre las especies es a través de bioensayos controlados en el laboratorio con especies centinelas (condiciones definidas según el objetivo de estudio) o realizar biomonitoreos y evaluaciones del estado del ambiente.

### **Situación en Argentina**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de todas las enfermedades humanas y más de un tercio de las defunciones que ocurren en países en desarrollo pueden atribuirse parcialmente a la falta de abastecimiento de agua potable y de sistemas de saneamiento adecuados o gestionados de forma apropiada. En ríos y cursos de agua de casi todo nuestro país se han detectado contaminantes tales como metales pesados, fármacos, productos de higiene personal, plaguicidas y surfactantes, entre otros (Bergero y Lucchesi, 2018; De Gerónimo et al., 2014; Elorriaga et al., 2013; Iturburu

et al., 2024; Villarreal-Reyes et al., 2022). Muchos de esos productos aún no presentan reglamentaciones para su uso y/o disposición final a pesar de que son numerosos los trabajos que evidencian efectos en múltiples especies incluyendo al ser humano. Incluso no existe información precisa de niveles guías para la protección de la vida, uso recreacional y agua potable para muchos de esos productos en nuestro país.

### **1.3 Análisis de sistemas acuáticos**

Los ecosistemas acuáticos se encuentran entre los más amenazados en el mundo, evidenciándose por una gran pérdida de su biodiversidad (Dudgeon et al., 2006). El monitoreo y la evaluación de la calidad del agua son herramientas útiles para conservar y proteger estos dichos ecosistemas, brindando a su vez evidencia sobre el estado de los cuerpos de agua como resultado de las alteraciones y/o intervenciones producidas por el hombre.

Los estudios que analizan una situación puntual, un momento único, no contemplan las variaciones o intermitencias que sufre el ecosistema en cuanto al ingreso de contaminantes. Las características físicas y químicas de los cuerpos de agua pueden llegar a tener variaciones significativas a lo largo de los años, entre estaciones, meses o incluso en distintos momentos del día (Jerves-Cobo et al., 2020; Mercado-Garcia et al., 2018).

Otro enfoque para detectar contaminación acuática y la biodisponibilidad de los contaminantes consiste en emplear organismos centinelas o bioindicadores. Estos organismos, al sufrir alteraciones en algunos parámetros biomarcadores, nos permiten detectar la presencia de contaminantes en el ambiente (Kristoff, 2010). El uso de bioindicadores ofrece ventajas como la integración de los efectos de múltiples contaminantes y la evaluación de la biodisponibilidad, para lo cual es importante la selección de organismos bioindicadores o centinelas.

#### **Uso de especies centinela como bioindicadoras de contaminación**

Una única medida de la concentración de una sustancia en el ambiente no es suficiente para evaluar el estrés que sufre un ecosistema. La biodisponibilidad, por ejemplo, es un factor muy importante que determina qué cantidad de un contaminante en el agua puede ingresar en los organismos, causando efectos sobre ellos e incluso

afectando a especies que habitan áreas distantes. Diferentes mecanismos homeostáticos permiten la asimilación de contaminantes sin grandes consecuencias para la biota endémica. Sin embargo, cuando la concentración de estos supera esa capacidad de homeostasis de los cuerpos de agua receptores, la supervivencia, el crecimiento y desarrollo de los organismos se pueden ver afectados (Brooks et al., 2006).

### **Parámetros fisicoquímicos**

Algunas de las características físicas comúnmente evaluadas en el agua son la temperatura, la turbidez y la conductividad, mientras que los parámetros químicos más comunes son el potencial de hidrógeno (pH), la concentración de nutrientes, la concentración de oxígeno disuelto (OD), la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de metales traza (Onwona Kwakye et al., 2021; Sharma et al., 2020).

La composición y las características del agua van a determinar su calidad según el uso para el cual esté destinado ese recurso hídrico (irrigación de cultivos, consumo humano, preservación de la vida acuática, recreación, entre otros).

- La temperatura tiene un rol de gran relevancia en toda actividad biológica. Particularmente la temperatura del agua puede modificar la solubilidad de sales y/o gases como el oxígeno, lo que afecta directamente el metabolismo de los organismos acuáticos (Ern, 2019).
- La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad del agua de conducir corrientes eléctricas, indicando su grado de salinidad. El origen del material que genera la conductividad eléctrica puede ser tanto natural como antrópico (desechos domésticos, industriales o agrícolas) (Appelo y Postma, 2005; Carreira et al., 2014). Es utilizada como uno de los principales parámetros indicadores de calidad del agua.
- El OD hace referencia a la cantidad de oxígeno disuelto en el agua y es otro de los principales indicadores de calidad del agua debido al impacto que genera su disponibilidad en las actividades metabólicas y en la salud de los ecosistemas. Este parámetro se ve inversamente influenciado por la temperatura, la salinidad y la contaminación orgánica (Orozco et al., 2003).
- El pH del agua es una medida de su acidez o alcalinidad. Determina la solubilidad y la biodisponibilidad de las sustancias químicas como nutrientes (fósforo, nitrógeno y

carbono, entre otros) y metales pesados (plomo, cobre, cadmio, entre otros) (De Paiva Magalhães et al., 2015).

- La DQO es una medida de la cantidad de materia orgánica oxidable en la muestra de agua. Dicha materia orgánica puede haber llegado al cuerpo de agua por escorrentía, por descomposición de material biológico o por desechos industriales, domésticos o agrícolas (Spence et al., 2011).
- La turbidez es un parámetro que se relaciona con la cantidad de partículas opacas que dispersan la luz, como algas o materia orgánica. Es un indicador habitual de contaminación microbiana (Farrell et al., 2018).
- Entre los nutrientes que pueden determinarse en el agua, se destacan el nitrógeno y el fósforo. Un exceso de nitrógeno y fósforo en el agua puede producir floraciones algales que superan las capacidades de los ecosistemas para mantener el equilibrio. Un aumento significativo en la cantidad de algas deteriora la calidad del agua, los alimentos y los hábitats además de reducir el oxígeno que las especies acuáticas necesitan para vivir. En algunos casos, también se pueden producir cantidades elevadas de toxinas y crecimiento bacteriano (Summers y Ryder, 2023).

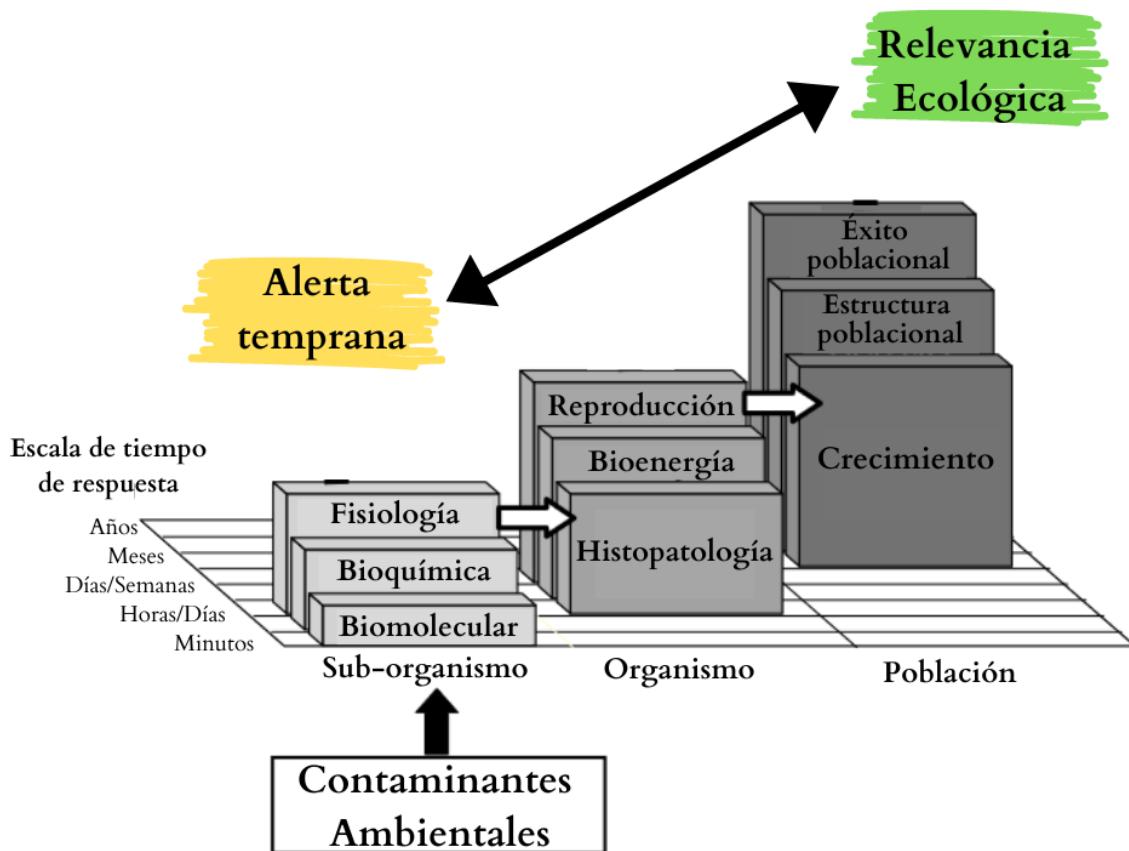
Entre los principales contaminantes químicos se encuentran los metales y los plaguicidas. Si bien algunos metales pesados son esenciales para los organismos, resultan tóxicos a concentraciones muy elevadas (por ejemplo, el cinc y el cobre), mientras que los no esenciales son tóxicos aún a muy bajas concentraciones (por ejemplo, el plomo y el mercurio). Estos elementos pueden impactar fuertemente en el ambiente debido a que no son biodegradables y en consecuencia persisten durante mucho tiempo debido a su naturaleza inorgánica. La presencia de plaguicidas, incluso en sitios muy alejados de donde se aplican, representan un riesgo para las especies. Algunos tienen tiempos de vida media muy largos (hasta 40 años), son bioacumulables y/o incluso pueden aumentar su toxicidad por biotransformación (Kalyabina et al., 2021; Wu et al., 2013).

#### **1.4 Uso de biomarcadores para evaluar la toxicidad de los contaminantes y de muestras de agua ambientales**

Se considera biomarcador a todo parámetro biológico (bioquímico, fisiológico, histológico o comportamental) que refleja alteraciones en un organismo o población como respuesta a la exposición a un compuesto o sustancia tóxica individual o a una mezcla (Chambers et al., 2002). En la actualidad son una herramienta útil en ecotoxicología para la evaluación de los efectos de la contaminación en los organismos.

Se los puede clasificar como biomarcadores de exposición, de efecto o de susceptibilidad (Amiard-Triquet et al., 2013). Los biomarcadores de exposición indican si el organismo estuvo expuesto a un contaminante a partir de la medición del mismo, de algún metabolito o de un producto de interacción entre el contaminante y una molécula blanco (NRC, 1987). En el caso de los biomarcadores de efecto, estos refieren a cualquier alteración cuantificable en un organismo luego de la exposición a un contaminante (NRC, 1987). Los biomarcadores de susceptibilidad, ya sea heredada o adquirida, indican si un organismo es particularmente sensible a los efectos de un compuesto tóxico (Van der Oost et al., 2003).

El análisis integrado de múltiples biomarcadores y a diferentes niveles de organización es ampliamente sugerido en estudios ecotoxicológicos ya que algunos brindan un enfoque más realista de los escenarios ambientales, mientras que otros son herramientas de alerta temprana (figura 2) (Adams y Greeley, 2000; Caliani et al., 2021; Marques et al., 2020; Ribeiro et al., 2020).



**Figura 2.** Jerarquización de las respuestas de los organismos frente a contaminantes ambientales desde los indicadores de alerta temprana más sensibles en los niveles inferiores de organización, hasta las respuestas más tardías pero de mayor relevancia ecológica en los niveles superiores. Adaptado de Adams y Greeley (2000).

#### 1.4.1 Nivel bioquímico

Entre los biomarcadores más utilizados en estudios de toxicidad se encuentran los bioquímicos debido a que presentan una gran sensibilidad, especificidad en varios casos, y a que resultan herramientas útiles de alerta temprana. Además, los efectos que ocurren a nivel bioquímico pueden ayudar a comprender o a predecir los efectos que ocurren en otros niveles de organización (Newman, 2014). Algunos de estos biomarcadores incluyen la actividad de B-esterasas, de enzimas detoxificantes, de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos, entre otros.

##### B-Esterasas

Las esterasas son una familia de enzimas capaces de hidrolizar ésteres ya sean exógenos o endógenos, los cuales están presente en una gran cantidad de xenobióticos.

Desde el punto de vista toxicológico, Aldridge (1953) clasificó a las esterasas en tres grupos:

- A-esterasas: aquellas que no se inhiben por compuestos organofosforados (OFs)
- B-esterasas: aquellas que se pueden inhibir por OFs
- C-esterasas: aquellas que no interaccionan con los OFs

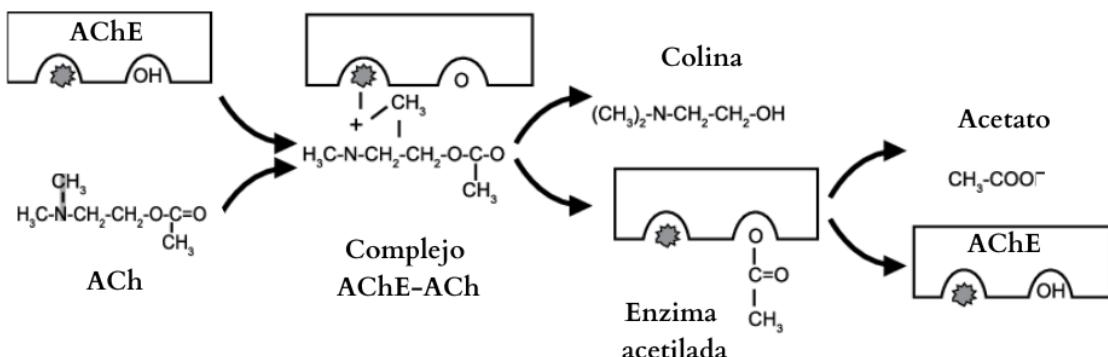
### **Colinesterasas (ChEs)**

Entre las B-esterasas se encuentran las ChEs que son el blanco de acción primario de los insecticidas anticolinesterásicos (OFs y carbamatos). Estas enzimas se clasifican según la especificidad de sustrato en acetilcolinesterasas (AChEs), butirilcolinesterasas (BChEs), propionilcolinesterasas (PChEs), etc. (Casida y Quistad, 2005; Fulton y Key, 2001).

Los vertebrados poseen dos tipos de enzimas: las AChEs, también llamadas colinesterasas verdaderas, y las BChEs ó pseudocolinesterasas. En el caso de los invertebrados, la clasificación de los distintos tipos de ChEs no es tan sencilla. En algunas de las especies estudiadas se encontró una sola forma de ChE, mientras que en otras especies se detectaron varias, teniendo algunas isoformas propiedades similares a las AChE, otras propiedades intermedias entre AChE y BChE y otras similares a las BChEs de los vertebrados (Bocquéné et al., 1997; Gagnaire et al., 2008; Kristoff et al., 2006; Mora et al., 1999; Otero y Kristoff, 2016; Solé y Sanchez-Hernandez, 2018; Varò et al., 2003). Por este motivo, en invertebrados es común referirse a estas enzimas como colinesterasas totales (Bocquéné y Galgani, 1998; Galloway et al., 2002; Rickwood y Galloway, 2004). Sin embargo, es aconsejable la caracterización parcial de estas enzimas (especificidad a distintos sustratos, parámetros cinéticos, respuesta a inhibidores específicos, entre otros) para conocer el tipo de enzima, optimizar las determinaciones de la actividad y obtener resultados confiables (Kristoff et al., 2006; Otero y Kristoff, 2016).

La enzima AChE es una de las enzimas más eficientes del sistema nervioso. Se concentra en las sinapsis colinérgicas y neuromusculares donde finaliza la neurotransmisión degradando rápidamente el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La ACh liberada de las terminales nerviosas presinápticas provoca un estímulo que debe ser interrumpido en un tiempo muy breve para evitar la sobreestimulación de los

receptores de ACh de la membrana post-sináptica. Con dicho fin, la AChE se une a la ACh a través de su sitio activo, quedando la enzima acetilada y liberándose colina. La enzima acetilada se hidroliza naturalmente liberando acetato y quedando la enzima nuevamente activa (figura 3; Froede y Wilson, 1971; Galloway y Handy, 2003).



**Figura 3.** Esquema de la interacción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) con el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y su posterior reactivación. Adaptado de Escalona et al. (2016).

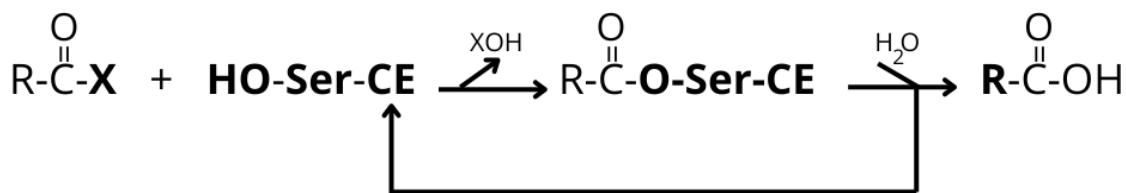
La inhibición de las actividades de las enzimas ChEs es el biomarcador de neurotoxicidad más utilizado en los seres humanos (Costa, 2013) y en otros organismos como peces, insectos, crustáceos y moluscos expuestos a insecticidas OFs y carbamatos (Domingues et al., 2010) debido a su alta especificidad. Sin embargo, en los últimos años se observó que otros compuestos tales como productos farmacéuticos, otros plaguicidas, surfactantes y metales también pueden causar inhibición de estas enzimas, por lo cual actualmente se emplea también para evaluar neurotoxicidad de diferentes contaminantes (Cossi et al., 2020; Da Silva et al., 2022; Sanz Lanzas, 2017; Wu y Li, 2015).

### Carboxilesterasas (CEs)

Otro grupo de B-esterasas son las CEs, una familia de múltiples isoenzimas que varían en cuanto a su afinidad por el sustrato y a su presencia en los tejidos. Estas enzimas participan en la detoxificación y en el metabolismo de varios xenobióticos como plaguicidas y productos farmacéuticos (Solé y Sanchez-Hernandez, 2018; Song et al., 2021; Soto-Mancera et al., 2020).

El principal mecanismo de detoxificación consiste en la hidrólisis de carboxilésteres a través de la acilación reversible de un residuo de serina del sitio activo de la enzima, en

sus correspondientes alcoholes y ácidos carboxílicos (figura 4; Singh, 2014). De esta forma las CEs se consideran enzimas detoxificantes de fase I ya que las reacciones que se incluyen en esta fase corresponden a monooxigenaciones, oxidaciones, reducciones, hidrólisis e hidrataciones de hipóxidos.



**Figura 4.** Hidrólisis de carboxilésteres catalizada por la carboxilesterasa (CE). Adaptado de Singh (2014).

En cuanto a los OFs y carbamatos existe otro mecanismo detoxificante que involucra la unión covalente de la CE con estos insecticidas inhibiendo su actividad, en la mayoría de los casos de forma irreversible. Actúan de esta forma como blanco alternativo, protegiendo las AChEs y así a los organismos de efectos neurotóxicos (Jokanović, 2001; Kristoff et al., 2012; Sanchez-Hernandez, 2007).

En invertebrados, se determinó la actividad de estas enzimas con distintos sustratos y se reportó que tanto la actividad basal como la sensibilidad a xenobióticos es dependiente del sustrato, razón por la cual se sugiere utilizar varios sustratos para su determinación (Kristoff et al., 2010; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009).

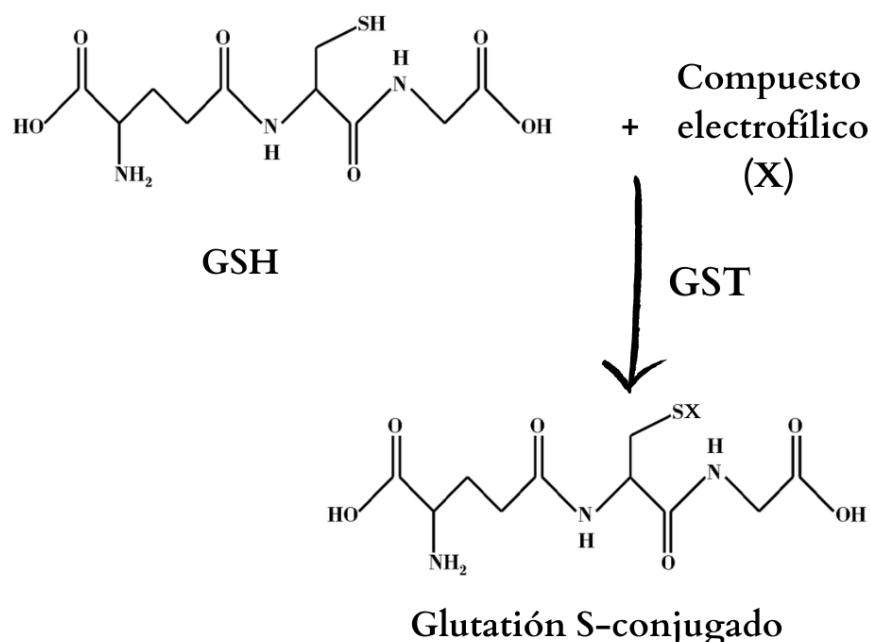
En cuanto al uso de las CEs como biomarcadores, en invertebrados estas enzimas suelen ser más sensibles a los OFs que las ChEs (Otero y Kristoff, 2016; Soto-Mancera et al., 2020). Por tal motivo en los últimos años, el uso combinado de ChEs y CEs fue recomendado por varios autores como la estrategia más adecuada para evaluar la toxicidad de los OFs, combinando la mayor especificidad de ChEs y la mayor sensibilidad de CEs (Cossi et al, 2018; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009).

### Otras enzimas detoxificantes

Además de las enzimas detoxificantes de fase I como las CEs, hay otras enzimas que participan en las reacciones de detoxificación de fase II. Las mismas juegan un papel importante en la biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos a partir

de su unión a ligandos endógenos, como por ejemplo el glutatión (GSH). La adición de esas moléculas aumenta la solubilidad de los compuestos transformándolos en formas más fáciles de excretar. Estas reacciones son catalizadas principalmente por transferasas.

Una familia de enzimas importantes de fase II son las glutatión S-transferasas (GSTs) las cuales catalizan la conjugación de compuestos electrofílicos con GSH a través de un fuerte enlace covalente de su átomo de azufre reactivo, como se muestra en la figura 5 (Townsend y Tew, 2003).



**Figura 5.** Reacción de conjugación de glutatión (GSH) con un compuesto electrofílico (X) catalizada por la glutatión S-transferasa (GST). Adaptado de Townsend y Tew (2003).

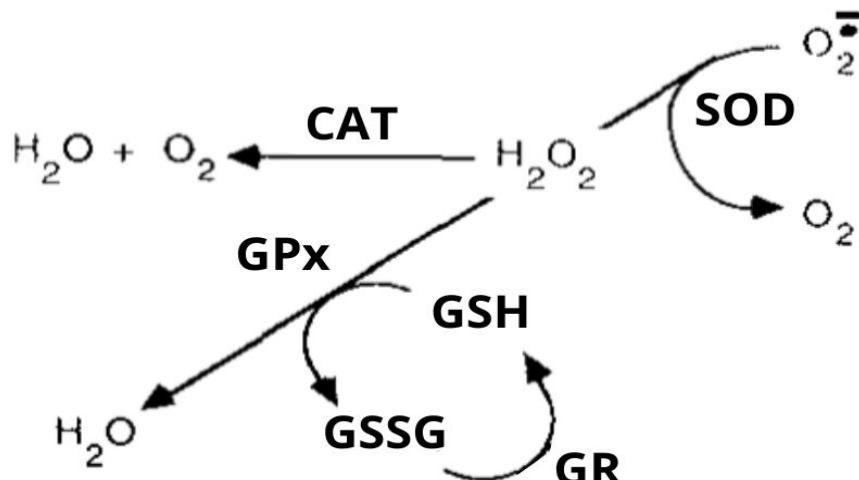
Estas enzimas pueden catalizar conjugaciones con una amplia variedad de compuestos ya que poseen muy baja especificidad por el sustrato electrofílico. Además, su actividad puede variar entre tejidos dependiendo del requerimiento (Herbert et al., 2018).

A pesar de ser una enzima muy utilizada como biomarcador de contaminación orgánica por xenobióticos, es un parámetro altamente variable incluso en una misma especie a distintos tiempos de exposición (Domingues et al., 2010; Paskerová et al., 2012).

### Sistemas antioxidantes

Ciertos contaminantes como hidrocarburos aromáticos, metales pesados o plaguicidas son capaces de producir daño oxidativo en los organismos a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS) y/o alteración de los sistemas antioxidantes. Las EROS son más reactivas que el oxígeno en su estado basal y cabe destacar entre ellas al anión superóxido ( $O_2^-$ ), al radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

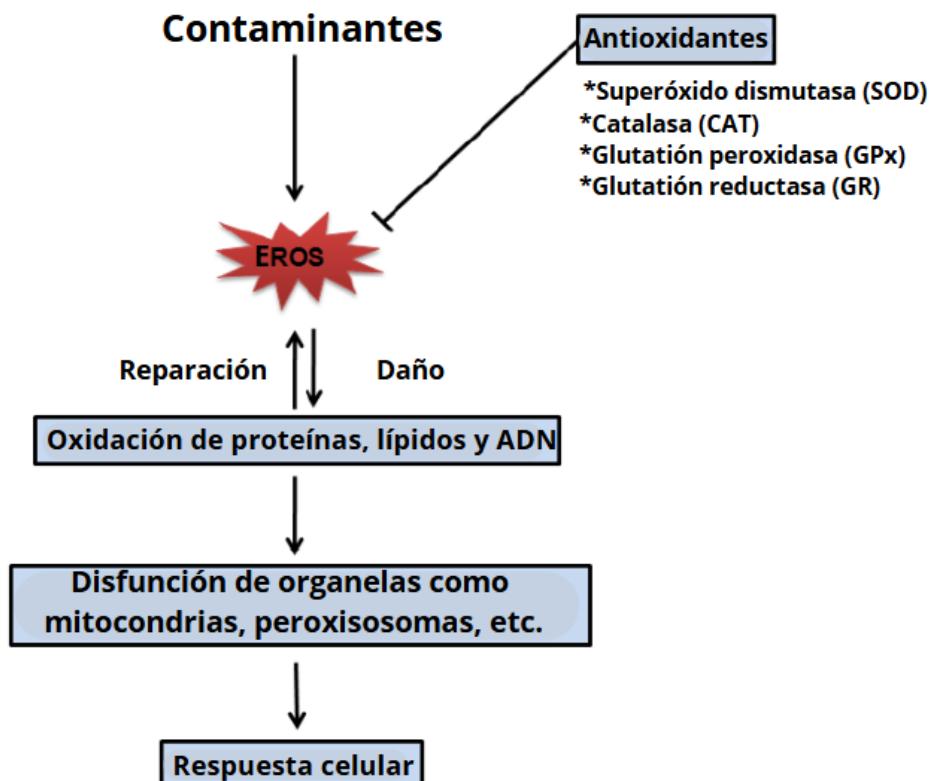
Frente al aumento de los niveles de EROS, se desencadenan mecanismos adaptativos a través de sistemas de defensa antioxidantes que permiten regular esos niveles. Entre los sistemas de defensa antioxidantes solubles no enzimáticos se incluye la razón glutatión oxidado (GSSG)/GSH y dentro de los antioxidantes enzimáticos, las actividades de las enzimas glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), y glutatión peroxidasa (GPx), entre otros (Di Giulio et al., 1989). Estos mecanismos son complejos y por lo general involucran reacciones en cadena, como se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Esquema donde se resumen los sistemas de defensa antioxidantes que involucran a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Adaptado de Di Giulio et al. (1989).

Las EROS son capaces de reaccionar con macromoléculas tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos y provocar desnaturización proteica, peroxidación lipídica y daño en el ADN, entre otros efectos. Dichos procesos pueden tener efectos muy graves

en las células, por eso evaluar antioxidantes es tan importante frente a la exposición a contaminantes (figura 7).



**Figura 7.** Descripción general del efecto de las especies reactivas de oxígeno (EROS) en el estrés oxidativo. Adaptado de Bhagat e Ingole (2016).

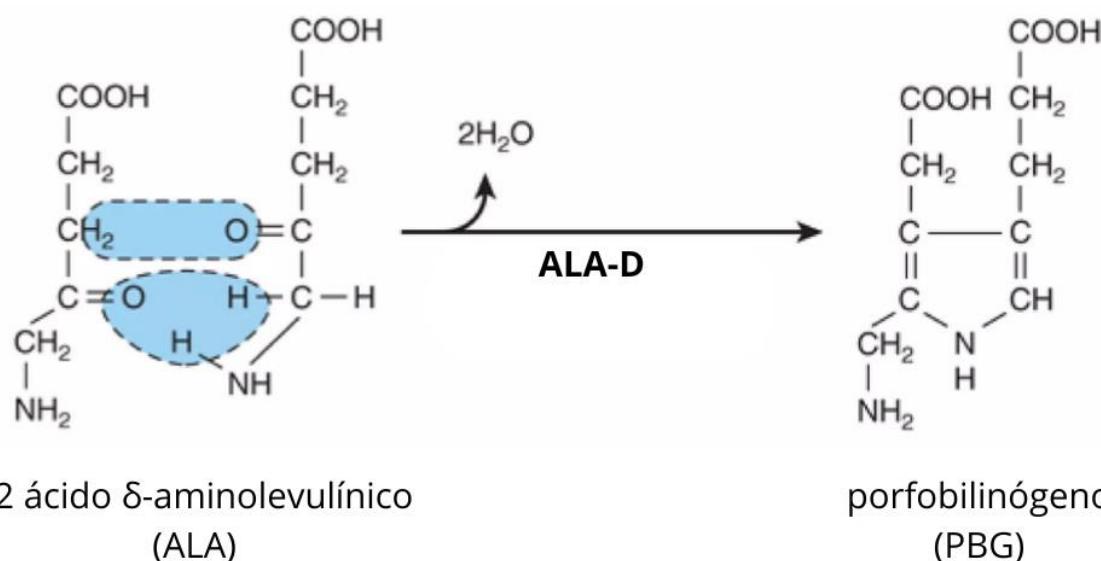
Las enzimas SOD y CAT son consideradas como la primera línea de defensa contra las EROS. SOD convierte al anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual luego será reducido a agua y a oxígeno molecular por acción de CAT (Mates, 2000). En presencia de EROS, estas enzimas se inducen y/o aumentan la actividad para regular sus niveles y así evitar el daño oxidativo. Sin embargo, se observó que niveles elevados de EROS pueden llevar a una disminución de dicha actividad por daño oxidativo. Por lo tanto, frente a contaminantes, las actividades de estas enzimas se pueden ver tanto disminuidas como incrementadas (Bhagat e Ingole, 2016).

Las enzimas GPx también están involucradas en la reducción del peróxido de hidrógeno, oxidando el GSH a GSSG. El GSH es un antioxidante no enzimático cuyo rol es clave en el mantenimiento del estado redox celular, en la protección de las células del daño oxidativo y en el metabolismo de xenobióticos a través de GST (Dickinson y

Forman, 2002; Van der Oost et al., 2003). El aumento de GSSG durante el estrés oxidativo es transitorio debido a que la enzima GR cataliza la reducción de GSSG a GSH para mantenerlo en sus niveles apropiados. Si bien la enzima GR no está involucrada en la defensa antioxidante de la misma forma que las demás enzimas, merece atención debido a la importancia de mantener la homeostasis GSH/GSSG.

### Ácido δ-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D)

La enzima ALA-D cataliza la conversión de dos moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA) en el monopirrol porfobilinógeno (PBG). El PBG es sustrato de otra enzima que cataliza la formación de un tetrapirrol lineal que se cicla enzimáticamente y que, luego de varias descarboxilaciones y oxidaciones, termina convirtiéndose por inserción de un átomo de hierro en el hemo, que es grupo prostético de varias proteínas de gran importancia biológica (hemoglobina, mioglobina, catalasa, peroxidasa y citocromos entre otras) (figura 8; Bogorad y Granick, 1953; Gibson et al., 1955).



**Figura 8.** Conversión de dos moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA) en PBG catalizada por la enzima ácido δ-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D). Adaptado de Gibson et al. (1955).

La actividad de la enzima ALA-D suele ser máxima cuando se trabaja en presencia de compuestos tiólicos como el β-mercaptopetanol (β-Me), cisteína o GSH, tanto solos o combinados con zinc. Su actividad se puede ver disminuida en presencia de metales pesados. Esta enzima es principalmente utilizada como biomarcador de exposición al plomo y a otros metales (Lombardi et al., 2010).

#### **1.4.2 Nivel histológico**

Las exposiciones a contaminantes también pueden resultar en alteraciones a nivel de la organización de los órganos y de los tejidos que los componen como consecuencia de las interacciones químicas y celulares que ocurren en primer lugar. De esta forma, las respuestas a nivel de los tejidos o de los órganos suelen estar directamente relacionadas con funciones fisiológicas de los organismos como crecimiento, reproducción, respiración y/o nutrición (Amiard-Triquet et al., 2013; Paithane et al., 2012; Yancheva et al., 2016).

Por ejemplo, la histología gonadal, acompañada de la evaluación de otros parámetros reproductivos, puede proporcionar información sobre los efectos de distintos estresantes ambientales en la reproducción de un organismo (Blazer, 2002).

En moluscos, la glándula digestiva es el primer órgano afectado frente a la presencia de contaminantes debido a su rol principal en la captación y procesamiento de sustancias desde el exterior, en la digestión intracelular de alimentos y en el metabolismo de compuestos orgánicos e inorgánicos (Marigomez et al., 2002; Rainbow y Phillips, 1993; Usheva et al., 2006). Las alteraciones histológicas de este órgano han sido ampliamente utilizadas como biomarcadores para detectar efectos tóxicos. Algunas de las alteraciones más frecuentes son la presencia de fibrosis, necrosis y/o atrofia (Arrighetti et al., 2022; Otegui et al., 2024).

#### **1.4.3 Nivel reproductivo**

El estrés producido por contaminantes puede alterar la reproducción, especialmente luego de exposiciones subcrónicas. Este efecto es uno de los más dañinos para las especies y en consecuencia para los ecosistemas debido a que se pone en riesgo la perpetuación de las especies, alterando la biodiversidad. Algunos de los parámetros reproductivos que han sido utilizados como biomarcadores en moluscos son: el número de puestas (se considera como una puesta al grupo de huevos depositados en forma conjunta), el número de huevos por puesta y la proporción huevos que poseen embrión, la viabilidad de los embriones, y el porcentaje y el tiempo de eclosión (Caixeta et al., 2022; Rivadeneira et al., 2013). La disminución en la tasa o porcentaje de eclosión de los juveniles es una de los efectos más dañinos de los contaminantes observados en gasterópodos luego de exposiciones a contaminantes orgánicos e inorgánicos y a

muestras de agua ambientales (Agrelo et al., 2019; Oliveira-Filho et al., 2016; Paredes et al., 2022; Tallarico et al., 2014). Algunos autores también han evaluado la calidad de la descendencia (supervivencia, malformaciones, crecimiento) de organismos adultos expuestos a contaminantes (Agrelo, 2012; Paredes et al., 2022).

El uso de embriones y juveniles en bioensayos de toxicidad se ha convertido en una estrategia ampliamente aceptada debido a que son, por lo general, más sensibles a la presencia de contaminantes que los organismos adultos y dan información sobre los efectos que tienen los contaminantes sobre el destino de una población (Bauer et al., 2021; Blahova et al., 2021; Caixeta et al., 2022).

#### **1.4.4 Nivel comportamental**

Las respuestas de los organismos a los cambios ambientales suelen manifestarse en su comportamiento (Tuomainen y Candolin, 2011). La integración de varios sistemas fisiológicos como el sensorial, el hormonal, el neurológico y el metabólico contribuyen al comportamiento. En consecuencia, un estrés inducido por compuestos químicos puede generar una variedad de cambios comportamentales al interferir con uno o varios de esos sistemas. Entre las alteraciones de comportamiento de los invertebrados por exposición a xenobióticos se han detectado movimientos erráticos, inmovilización, imposibilidad de huir de depredadores o de responder a estímulos externos, y alteraciones en el ritmo cardíaco (Bianco et al., 2013; Lebrun et al., 2023; Siregar et al., 2021; Vannuci-Silva et al., 2019).

En gasterópodos, algunos de los signos de neurotoxicidad observados incluyen: protrusión conspicua de la región cabeza-pie (céfalo-pedal), retracción hacia el interior de la concha, falta de adherencia a las paredes del recipiente y falta de movimientos espontáneos (Bianco et al., 2013).

### **1.5 Gasterópodos como bioindicadores**

Los organismos acuáticos pueden estar expuestos a mezclas de compuestos químicos a partir de diferentes vías: el contacto directo con el agua, los sedimentos y el alimento que ingieren. Entre ellos, los moluscos y particularmente los gasterópodos que representan cerca de 80% de todas las especies de moluscos (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003), han sido propuestos como buenos indicadores de contaminación

acuática y buenos modelos para evaluar la toxicidad de compuestos a través de bioensayos. Presentan varias ventajas, ya que son particularmente sensibles a los contaminantes debido a su baja movilidad y baja tasa de eliminación de xenobióticos, tienen alta relevancia ecológica y por lo general son fáciles de recolectar del ambiente y de mantener/cultivar en condiciones de laboratorio (Agrelo et al., 2019; Haszprunar y Wanninger, 2012; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003).

### **1.5.1 *Biomphalaria straminea***

*Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (figura 9) es un gasterópodo hermafrodita de agua dulce que pertenece a la familia Planorbidae, la familia de gasterópodos pulmonados acuáticos más diversa (Jopp, 2006). Es una especie originaria del sureste de América del Sur, pero en la actualidad se distribuye en otras regiones de América, África y China. Su amplia dispersión se debe a que es una especie altamente invasora y competitiva, a que posee una gran capacidad para sobrevivir, incluso en períodos de sequía, y una gran tasa de fecundidad (Yang et al., 2018). En nuestro país, la distribución de la especie abarca las provincias de Salta, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Córdoba, Buenos Aires y Río Negro (Rumi et al., 2008).

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Subclase: Pulmonata

Orden: Basommatophora

Familia: Planorbidae

Género y especie: *Biomphalaria straminea*



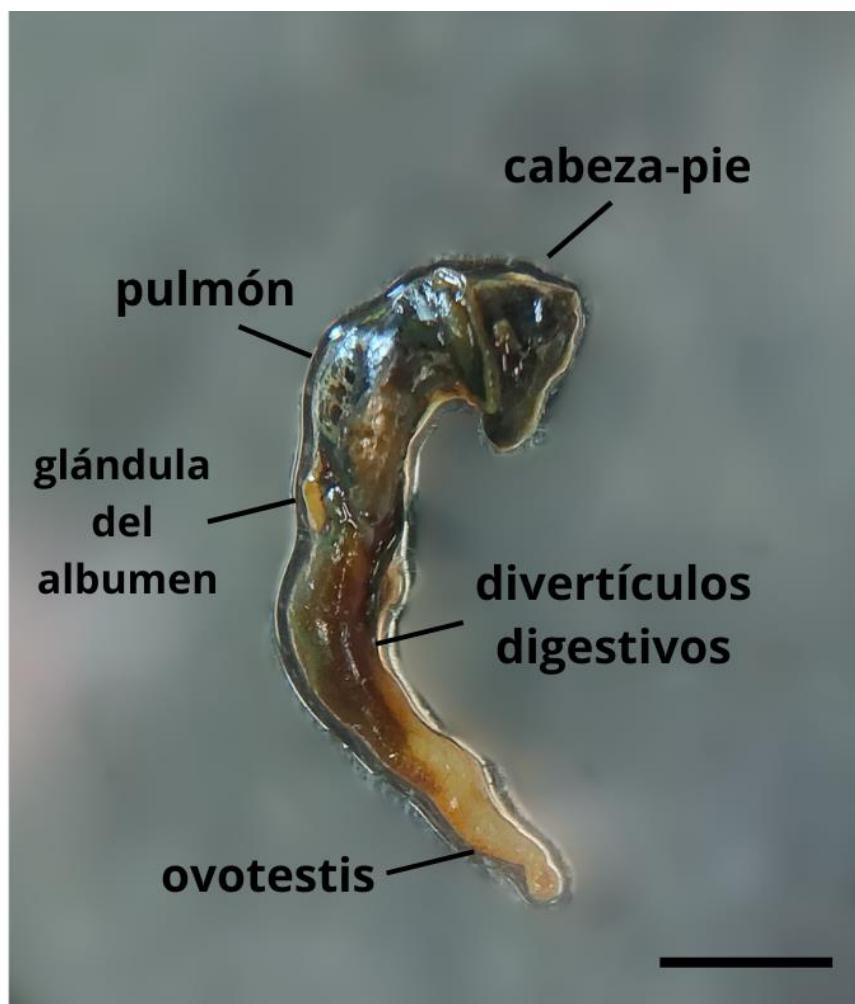
**Figura 9.** Ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea*. Escala: 1 cm. Fotografía: Karina Bianco.

Los gasterópodos pulmonados, en su evolución, perdieron las branquias y utilizan la superficie interna del manto como pulmón para respirar; es común que lleven una burbuja de aire en su caparazón que les permite por un lado flotar, y por otro sobrevivir en ambientes con niveles bajos de oxígeno (figura 10).

Los gasterópodos de la familia Planorbidae se caracterizan por tener tentáculos largos y finos, cuya longitud varía desde la mitad del cuerpo hasta todo el largo del pie, y con ojos situados en la base de los tentáculos. Poseen una concha aplanada lateralmente en espiral con 4 ó 5 vueltas hacia la izquierda (levógiros).

Muchas especies del género *Biomphalaria* son propagadoras de las esquistosomiasis, una parasitosis humana causada por el digeneo *Schistosoma mansoni*. De las especies propagadoras, en Argentina se encuentran *B. tengophila* y *B. straminea*. Las áreas de mayor riesgo de generación de focos endémicos son aquellas con estrecha relación con los ríos más importantes de la cuenca del Plata: Paraná, Uruguay y Río de la Plata (Rumi et al., 2008). Debido a su importancia sanitaria y a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control biológico, han aumentado los estudios morfológicos y fisiológicos de varios órganos internos de estas especies, como la glándula salival o el sistema reproductor (Habib et al., 2018; Moura et al., 2004).

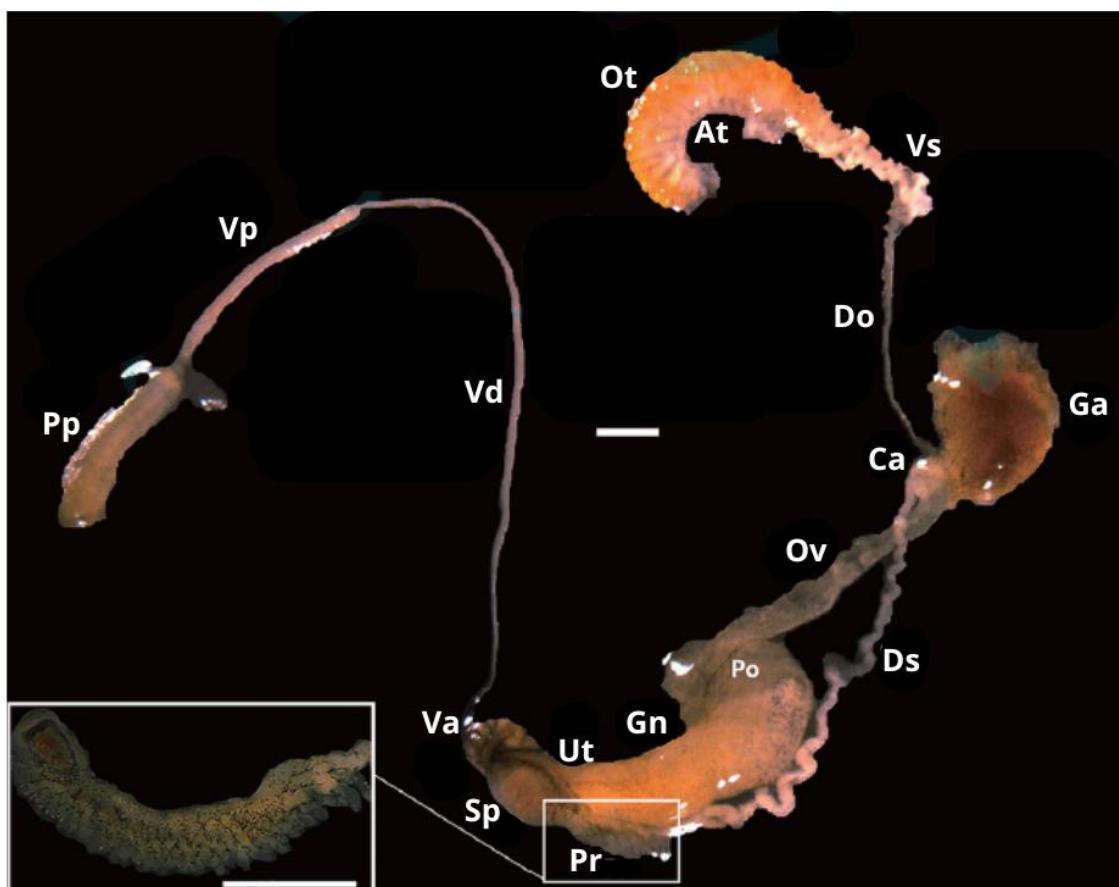
Los gasterópodos del género *Biomphalaria* poseen el mismo tipo de rádula (estructura pequeña localizada en la base de la boca especializada en raspar alimentos) que los gasterópodos herbívoros raspadores pero presentan una dieta no especializada basada principalmente en hojas y en una gran variedad de algas (Vera-Ardila y Linares, 2005; Yipp, 1983). Pueden sobrevivir dentro de una amplia variedad de hábitats, siendo el agua dura, las temperaturas cálidas y los hábitats eutróficos óptimos para su desarrollo (Yipp, 1983).



**Figura 10.** Fotografía bajo lupa de la anatomía externa sin concha de *Biomphalaria straminea*. Escala: 0,5 cm. Fotografía: Karina Bianco.

Los organismos del género *Biomphalaria* son hermafroditas simultáneos con una fase protándrica (los órganos genitales/células sexuales masculinos maduran antes que los femeninos), se reproducen mediante autofecundación y fecundación cruzada, lo que les permite reproducirse fácilmente y colonizar en tiempos cortos nuevos hábitats (Yipp,

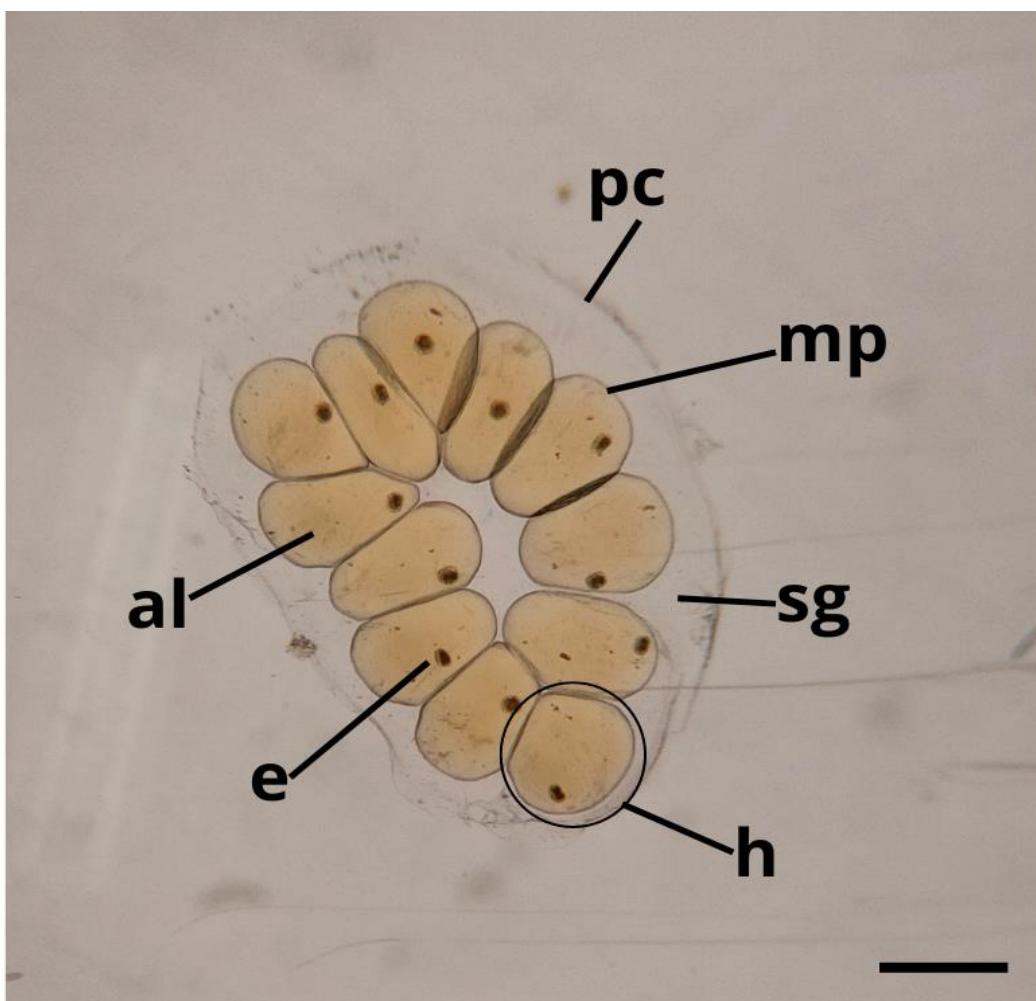
1983). Poseen una gónada hermafrodita única denominada ovotestis que está formado por pequeños sacos de maduración, que son expansiones de una cavidad colectora común o atrio. En los sacos ocurre la maduración de las gametas, las cuales luego desembocan en el atrio que se continúa distalmente con el canal colector del ovotestis (Habib et al., 2018; Nahabedian, 1992). El sistema reproductor completo de la especie *B. straminea* se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Fotografía bajo lupa de la anatomía del sistema reproductor de *Biomphalaria straminea* de Tuyang, China. At: atrio; Ca: Carrefour; Ga: glándula del albumen; Gn: glándula nidamental; Do: ovispermiducto; Ot: ovotestis; Ov: oviducto; Pp: prepucio; Pr: próstata; Vs: vesícula seminal; Ds: ductos espermáticos; Po: saco del oviducto; Sp: espermateca; Ut: útero; Va: vagina; Vd: vasos deferentes. Escala: 1 mm. Adaptado de Habib et al. (2018).

El desarrollo y maduración del ovotestis ocurre muy temprano en la vida de estos gasterópodos. Aproximadamente a las 2 semanas de edad logran una talla de 3 a 4 mm y la mayoría de los organismos alcanzan la maduración del ovotestis. La condición de madurez persiste a lo largo de su vida y, si las condiciones son favorables, alcanzan una talla máxima de 10 mm (Yipp, 1983).

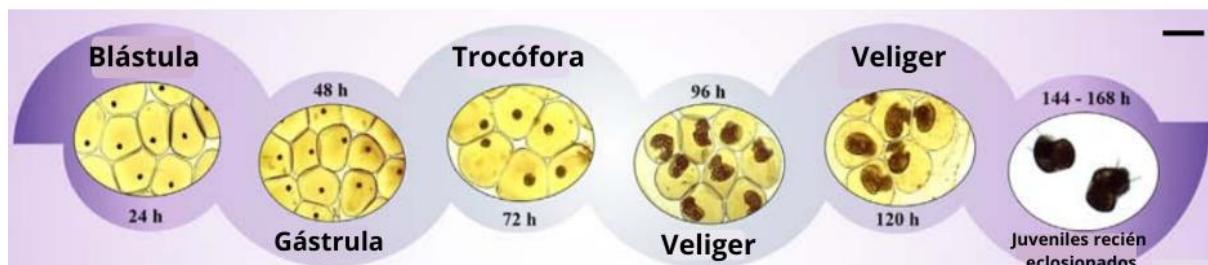
Los organismos sexualmente maduros depositan (oviponen) puestas que son un conjunto de huevos embrionados dentro de una misma cápsula gelatinosa y que adhieren a sustratos duros como plantas, rocas, conchas de otros caracoles u otras superficies, las cuales son fácilmente observables a ojo desnudo o con poco aumento (Smirthwaite, 2008). Las puestas pueden permanecer almacenadas dentro de la concha durante varios días antes de la oviposición. En el interior de las puestas, se pueden observar los huevos con sus embriones y albumen, rodeados de las membranas perivitelinas. Toda la puesta se encuentra limitada por una pared capsular (figura 12).



**Figura 12.** Fotografía de una puesta de *Biomphalaria straminea* observada bajo microscopio estereoscópico. al: albumen; e: embrión; h: huevo; mp: membrana perivitelina; pc: pared capsular; sg: sustancia gelatinosa. Escala: 0,5 mm. Fotografía: Karina Bianco.

Los embriones tienen desarrollo directo (no hay estadios larvales) dentro de los huevos, pasando por diferentes períodos luego de las etapas de blástula y gástrula. El

primer período corresponde al de trocófora en el cual se reconoce el endodermo en el centro y el ectodermo alrededor del borde externo. El período que continúa es el de veliger, caracterizado por el desarrollo de dos lóbulos en los extremos opuestos. El lóbulo anterior originará la región céfalo-pedal, mientras que del lóbulo posterior se formará la concha. En este estadio se puede observar también el desarrollo de los ojos y los latidos del corazón, luego la diferenciación del lóbulo anterior en la región proximal de la cabeza y en la distal del pie, y finalmente el desarrollo de pigmentos. Lo que resta del desarrollo es un crecimiento general y desarrollo de la rádula con la cual podrán raspar la membrana del huevo y la pared capsular para eclosionar como juveniles (figura 13). El tiempo que demoran en eclosionar los juveniles desde que la puesta es depositada es variable. En trabajos anteriores del actual grupo EEAINM<sup>1</sup>, se reportó un tiempo de eclosión de 7,5 días (promedio de los tiempos de eclosión de los diferentes trabajos) (Cossi et al., 2018, 2020; Paredes et al., 2022) bajo condiciones controladas de laboratorio.



**Figura 13.** Esquema de una secuencia de desarrollo de embriones dentro de una puesta de *Biomphalaria glabrata*. Escala: 0,5 mm. Adaptado de Caixeta et al. (2022).

Además de brindar información de los parámetros reproductivos de *B. straminea*, en nuestro grupo de investigación también se caracterizaron las ChEs y las CE<sub>s</sub> (Bianco et al., 2014), se determinaron niveles basales de algunos antioxidantes (Cossi et al., 2018) y se describieron histológicamente las gónadas (Cossi, 2019). En particular en este trabajo de tesis doctoral nos vamos a referir a las ChEs como AChEs ya que el sustrato de preferencia en el modelo biológico utilizado es la ACh y se inhiben por inhibidores

<sup>1</sup>Laboratorio de Evaluación Ecotoxicológica del Agua: Invertebrados Nativos y otros Modelos, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires & Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN).

específicos de AChE (dibromuro de 1,5-bis- (alildimetilamoniofenil)-pentan-3- ona, BW284C51) pero no por inhibidores específicos de BChE (tetraisopropil pirofosforamida, iso-OMPA) (Bianco et al., 2014).

También se realizaron evaluaciones de la toxicidad aguda y subcrónica del principio activo (PA) del OF metilazinfos (Bianco et al., 2014; Cossi et al., 2018), de la toxicidad subcrónica del PA y del formulado comercial (FC) del carbamato carbarilo y del neonicotinoide acetamiprid (Cossi, 2019; Cossi et al., 2020), de la toxicidad aguda del PA y del FC de glifosato (Rabuffetti, 2021) y de la toxicidad aguda del PA del clorpirifos (Tejedor, 2019). A excepción del clorpirifos, ningún plaguicida causó efectos comportamentales, inhibición de AChE ni letalidad. La actividad de CEs, por el contrario, se inhibió en todos los casos, mostrando un rol protector.

Gracias a estos estudios, esta especie ha sido seleccionada por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable (Presidencia de la Nación) como especie prioritaria a ser monitoreada por el interés en su uso como bioindicadora de la salud ambiental (Informe del Medio Ambiente, 2017).

En base a los estudios previos anteriormente detallados, en esta tesis se propuso comparar la toxicidad aguda (48 h) del insecticida OF clorpirifos, como PA y como FC, y estudiar los efectos de concentraciones ambientalmente relevantes luego de exposiciones subcrónicas (14-28 días) sobre una batería de biomarcadores a distintos niveles de organización en el gasterópodo dulceacuícola nativo *B. straminea*.

Teniendo en cuenta que el clorpirifos ha sido detectado en numerosos cursos de agua de nuestro país, se propuso también estudiar los efectos de exposiciones agudas (48 h y 7 días) a muestras de agua de distintos sitios de un arroyo localizado en el partido de Moreno (provincia de Buenos Aires) afectado por actividades antrópicas (entre ellas, la actividad frutihortícola) en el gasterópodo *B. straminea*. Se acompañó esto con la evaluación de varios parámetros fisicoquímicos del agua de dichos sitios.

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis resultan los primeros bioensayos con *B. straminea* de exposición subcrónica a un formulado comercial del clorpirifos y a muestras de agua ambientales.

## **2. Hipótesis**

### **Capítulo I**

-La exposición aguda a altas concentraciones de clorpirifos, como principio activo y como formulado comercial, causa letalidad en *B. straminea*

-La exposición subcrónica a las concentraciones ensayadas clorpirifos, como principio activo y como formulado comercial, produce efectos subletales

-El clorpirifos es neurotóxico

-La exposición a clorpirifos, como principio activo y como formulado comercial, genera inhibición de las actividades de las enzimas acetilcolinesterasa y carboxilesterasa y alteraciones de las defensas antioxidantes

-El clorpirifos, como principio activo y como formulado comercial, causa alteraciones a nivel histológico en la glándula digestiva y en las gónadas

-La exposición subcrónica al clorpirifos, como principio activo y como formulado comercial, disminuye el número de puestas, causa efectos embriotóxicos y letalidad en los juveniles

-El formulado comercial resulta más tóxico que el principio activo para los adultos, los embriones y los juveniles

### **Capítulo II**

-Los parámetros fisicoquímicos varían entre sitios y entre campañas de muestreo

-La exposición de *B. straminea* a muestras de agua provenientes de sitios impactados por desechos industriales y huertas, causa efectos a nivel bioquímico, comportamental, reproductivo y de la descendencia

-Las muestras provenientes de distintos sitios y distintas campañas tienen efectos diferentes en *B. straminea*

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Evaluar efectos del organofosforado clorpirifos y de la exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Cuenca del Río Reconquista) en el gasterópodo nativo *Biomphalaria straminea*.

#### **Capítulo I: Evaluación de la toxicidad del clorpirifos**

##### **Objetivos específicos:**

-Evaluar la letalidad en organismos de *B. straminea* expuestos de manera aguda a un rango de concentraciones del principio activo y de un formulado comercial de clorpirifos.

-Determinar respuestas bioquímicas (actividad de acetilcolinesterasa, carboxilesterasas, glutatión S-transferasa, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y contenido de glutatión), y comportamentales en organismos adultos expuestos de manera subcrónica al principio activo y al formulado comercial.

-Evaluar la oviposición, los efectos embriotóxicos y la supervivencia y alteraciones morfológicas en los juveniles por exposición al principio activo y al formulado comercial del clorpirifos.

-Analizar a nivel histológico la glándula digestiva y las gónadas de organismos adultos expuestos al principio activo y al formulado comercial del clorpirifos.

-Comparar los efectos producidos por el principio activo y el formulado comercial.

#### **Capítulo II: Evaluación de la toxicidad de muestras de agua ambientales (Sub-Cuenca Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista)**

##### **Objetivos específicos:**

-Determinar *in situ* parámetros relacionados con la calidad del agua (temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad) en diferentes sitios del Arroyo Las Catonas.

-Evaluar biomarcadores bioquímicos (actividad de acetilcolinesterasa, carboxilesterasas, glutatión S-transferasa, catalasa, glutatión reductasa y ácido δ-aminolevulínico dehidrasa), comportamentales y la supervivencia en organismos adultos expuestos a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas.

-Analizar la oviposición de los organismos adultos y los efectos embriotóxicos, la supervivencia y la presencia de alteraciones morfológicas en los juveniles expuestos a las muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas.

-Comparar los parámetros determinados y los efectos observados en *B. straminea* entre los distintos sitios y años de muestreo.

## 4. Metodología general

### 4.1 Reactivos

Los reactivos que se enumeran a continuación, utilizados a lo largo del desarrollo de la tesis, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB, CAS 97-00-7, ≥ 97% pureza); 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, CAS 69-78-3, ≥ 98% pureza); ácido acético glacial; ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA, CAS 60-00-4, ≥ 99% pureza); ácido pícrico; ácido δ-aminolevulínico (ALA, CAS 5451-09-2, ≥ 98% pureza); clorpirifos principio activo PESTANAL® (PA, CAS 2921-88-2, ≥ 98% pureza); formaldehído; GSH (CAS 70-18-8, ≥ 98% pureza); GSSG (CAS 103239-24-3, ≥ 98% pureza); ioduro de acetiltiocolina (AcSCh, CAS 1866-15-5, ≥ 98% pureza); L-metionina (CAS 63-68-3, ≥ 99% pureza); nicotinamida adenina dinucleótico fosfato reducido (NADPH, CAS 100929-71-3, ≥ 93% pureza); nitroazul de tetrazolio (NBT, CAS 298-83-9, ≥ 90% pureza); parafina Paraplast® (Leica); p-nitrofenil acetato (p-NFA, CAS 830-03-5, ≥ 98% pureza); p-nitrofenil butirato (p-NFB, CAS 2635-84-9, ≥ 98% pureza); reactivo de Ehrlich (CAS 100-10-7, 99% pureza); reactivo de fenol Folin-Ciocalteu; riboflavina (CAS 83-88-5, ≥ 99% pureza); sero albúmina bovina (BSA, CAS 9048-46-8, ≥ 99% pureza); β-Me (CAS 60-24-2, ≥ 99% pureza).

Acetona (CAS 67-64-1, ≥ 99,5% pureza) y Bioclear® (NC 2710-11-21) fueron adquiridos en Sistemas Analíticos S.A.-Biopack®. Todos los demás reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico.

El formulado comercial (FC) de clorpirifos utilizado corresponde a CLORP-F® FALCROP S.A. (clorpirifos 48%, concentrado líquido emulsionable).

### 4.2 Equipos

En esta tesis se emplearon los siguientes equipos:

\*balanza analítica electromecánica de la línea Entris® de Sartorius

\*homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón acoplado a un agitador rotativo (Precytec S.A.)

\*centrífuga refrigerada Hanil Combi-514R

\*equipo multiparamétrico Hanna HI 9811-5

\*oxímetros portátiles Hanna HI 9145 y HI 9146

\*espectrofotómetro Shimadzu UV-visible 160A de doble haz

\*microscopio estereoscópico Nikon SMZ645

\*micrótomo electrónico de rotación Leica (RM2125RTS)

\*microscopio óptico Zeiss Primestar acoplado a una cámara digital Nikon Coolpix 5400

#### 4.3 Ejemplares de *B. straminea*

Los ejemplares de *B. straminea* que se utilizaron para esta tesis fueron cedidos en el año 2012 por la Dra. Ostrowsky (FCEN, UBA-CONICET) de un cultivo propio. En el momento de la donación el Dr. Nahabedian (DBBE<sup>2</sup>) confirmó la especie de acuerdo con las siguientes características:

1. Sin cresta o línea pigmentada a lo largo del riñón
2. Concha de altura normal, en proporción con el diámetro, sin carenas
3. Más de 50 divertículos en el ovotestis
4. Más de 7 túbulos prostáticos
5. La pared que se encuentra hacia la derecha de la desembocadura del conducto de la *bursa copulatrix*, mirándola desde el ovotestis, en la vía de la hembra, no presenta una bolsa bien desarrollada (bolsa vaginal) o una dilatación baja y lisa semejante a una bolsa rudimentaria
6. La pared que se presenta antes y hacia la izquierda de la desembocadura del ducto de la *bursa copulatrix*, mirándola desde el ovotestis, se presenta fuertemente plegada

En el laboratorio EEAINM los caracoles fueron criados en acuarios de vidrio (5-15 litros) con aireación constante y agua declorada pasivamente al menos por 48 horas (figura 14) bajo condiciones controladas de temperatura de  $22 \pm 1$  °C y fotoperíodo artificial de 12:12 horas (luz:oscuridad). Los caracoles fueron alimentados *ad libitum* a base de hojas limpias de *Lactuca sativa* var. *capitata L.* (lechuga mantecosa) (Fried et al., 1992). El contenido total de agua de los acuarios fue renovado una vez por semana.

---

<sup>2</sup> Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.



**Figura 14.** Cultivo de *Biomphalaria straminea* en acuarios de vidrio con agua corriente declorada, aireación y alimentación. Fotografía: Karina Bianco.

Para realizar los bioensayos, se seleccionaron organismos adultos de peso similar ( $0,082 \pm 0,009$  g) 1 semana antes de la fecha de inicio para acondicionarlos a los recipientes de los bioensayos.

#### 4.4 Condiciones generales de los bioensayos agudos

Los bioensayos agudos tuvieron una duración de 48 h respetando las condiciones de cría de temperatura, fotoperíodo y alimentación. Los ensayos se realizaron de manera estática: sin aireación, sin recambio de soluciones y sin alimentación. Los diseños experimentales se encuentran detallados en los respectivos capítulos.

#### 4.5 Condiciones generales de los bioensayos subcrónicos

Para los bioensayos subcrónicos, se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que en los ensayos agudos. Cada 48 h se realizó el recambio de todas las soluciones, incluyendo los correspondientes controles. Cada 96 h fueron

alimentados todos los organismos. Los diseños experimentales de los bioensayos se encuentran detallados en los capítulos correspondientes.

#### **4.6 Signos de neurotoxicidad**

Durante todos los bioensayos se evaluó a ojo desnudo la presencia de signos de neurotoxicidad observados previamente en gasterópodos: protrusión conspicua de la región cabeza-pie, retracción hacia el interior de la concha, falta de adherencia a las paredes del recipiente y falta de movimientos espontáneos (Bianco et al., 2013; Tejedor, 2019). Se calculó el porcentaje de organismos con signos de neurotoxicidad por tratamiento como:

$$\text{Organismos con signos de neurotoxicidad (\%)} = \frac{\text{organismos con signos}}{\text{total de organismos}} * 100$$

#### **4.7 Criterios de letalidad**

Los caracoles se consideraron muertos cuando no se evidenciaban respuestas frente a estímulos mecánicos, cuando la concha se encontraba vacía o cuando no se evidenciaban latidos bajo microscopio estereoscópico (Cossi et al., 2018). Los caracoles muertos fueron retirados de los recipientes de los bioensayos. El número de organismos muertos se registró diariamente en todos los bioensayos y se calculó el porcentaje de letalidad por tratamiento como:

$$\text{Letalidad (\%)} = (\text{organismos muertos} / \text{total de organismos}) * 100$$

#### **4.8 Homogenatos**

Para realizar los homogenatos de tejido blando total, primero se anestesiaron los organismos en hielo durante 3 a 5 minutos para luego, suavemente y con ayuda de pinzas de disección, retirarles la concha. Se retiró el excedente de líquido del tejido blando con un papel absorbente y se pesó el tejido blando total.

Cada homogenato se realizó juntando (*pool*) todos o varios de los organismos contenidos en un mismo recipiente (entre 3 y 6 organismos, detallado en el diseño experimental de cada bioensayo). Esto responde al tamaño que poseen los organismos

de *B. straminea* y al mínimo volumen de sobrenadante necesario para poder realizar las determinaciones de los biomarcadores bioquímicos.

Para determinar el contenido total de proteínas, el contenido de GSH y las actividades enzimáticas de AChE, CE, GST, CAT, SOD y GR se homogeneizó el tejido blando total (1:10, peso:volumen) en buffer Tris/HCl 20 mM (pH= 7,5) con 0,5 mM de EDTA. Se centrifugó a 11.000 xg por 20 minutos a 4°C y la fracción del sobrenadante se conservó en el freezer (-20°C) hasta el momento de realizar las determinaciones.

Para realizar los homogenatos destinados a la determinación de la actividad de la enzima ALA-D, se utilizó buffer de extracción fosfato de sodio 20 mM (pH= 6,8) con NaCl 0,15 M y β-Me 10 mM (1:5, peso:volumen). Se centrifugó a 11.000 xg por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se conservó en el freezer (-20°C) hasta el momento de la determinación de la actividad enzimática.

#### 4.9 Determinaciones de marcadores bioquímicos

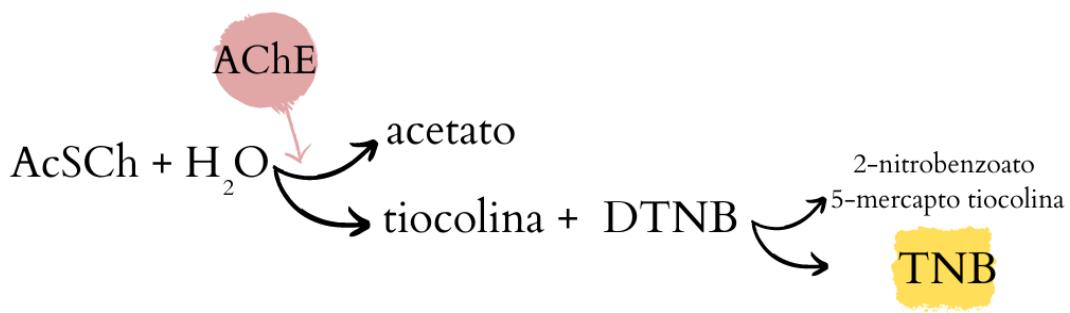
Las determinaciones de los marcadores bioquímicos se realizaron mediante técnicas espectrofotométricas. El contenido total de proteínas en cada homogenato se cuantificó para poder relativizar las actividades enzimáticas a dicha concentración. De esta forma las actividades enzimáticas se expresaron como relativas al contenido total de proteínas.

##### 4.9.1 Contenido total de proteínas

El contenido total de proteínas se determinó según el método de Lowry et al. (1951) realizando una curva de calibración con BSA como estándar. Los sobrenadantes se diluyeron 1/30 para dicha determinación.

##### 4.9.2 Determinación de la actividad AChE

La determinación de la actividad AChE se realizó en buffer fosfato 100 mM (pH= 8,0) con DTNB 0,2 mM y AcSCh 0,75 mM como sustrato de acuerdo al método de Ellman et al. (1961), y con las modificaciones para la especie descritas por Bianco et al. (2014). Este método consiste en la hidrólisis de AcSCh por parte de la AChE resultando en la producción de tiocolina. La tiocolina reacciona con el DTNB formando como uno de sus productos el dianión ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) que presenta color amarillo (figura 15).

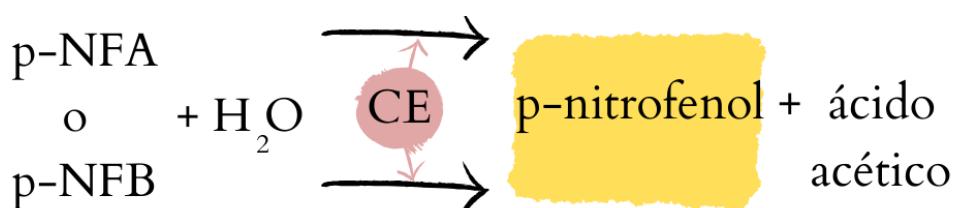


**Figura 15.** Esquema del método de Ellman et al. (1961) para determinar la actividad de AChE. AChE: acetilcolinesterasa; acetiltiocolina (AcSCh); DTNB: 5,5'-ditriobis 2-ácido nitrobenzoico; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico.

La formación de TNB se monitoreó a 412 nm. Se utilizó el coeficiente de extinción molar del TNB ( $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para el cálculo de la actividad de AChE. La actividad se expresó como  $\mu\text{moles}_{\text{TNB}}$  producidos por min por  $\text{mg}_{\text{proteína}}$ .

#### 4.9.3 Determinación de la actividad CEs

La actividad CEs se determinó según el método que describió Kristoff et al. (2010) y siguiendo las sugerencias para la especie de Bianco et al. (2014). Se utilizó buffer fosfato 100 mM ( $\text{pH}=8,0$ ) con 5% de acetona y dos sustratos: p-nitrofenil acetato (p-NFA) y p-nitrofenil butirato (p-NFB) 1,5 mM. Las CEs presentes en la muestra hidrolizan al p-NFA o al p-NFB, liberando un compuesto de color amarillo: el p-nitrofenol (figura 16).

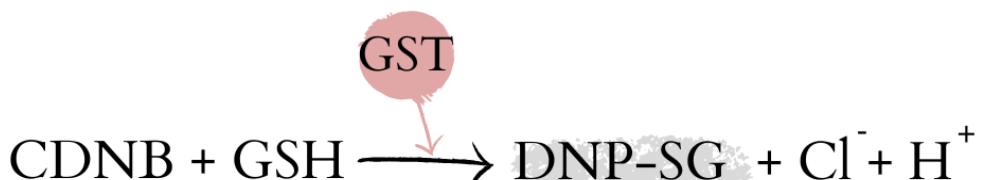


**Figura 16.** Esquema del método descrito por Kristoff et al. (2010) para determinar la actividad de CE. CE: carboxilesterasas, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato.

Se monitoreó la formación de p-nitrofenol a 400 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar ( $18,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para el cálculo de la actividad. La actividad se expresó en  $\mu\text{moles}_{\text{p-nitrofenol}}$  producidos por min por  $\text{mg}_{\text{proteína}}$ .

#### 4.9.4 Determinación de la actividad GST

La determinación de la actividad GST se realizó en buffer fosfato 100 mM (pH= 6,5) con CDNB 1 mM y GSH 1 mM según la técnica de Habig et al. (1974) y teniendo en cuenta las modificaciones para la especie descritas por Cossi et al. (2018). Esta técnica se basa en la reacción del CDNB con el GSH catalizada por GST, para formar el S-(2,4-dinitrofenil) glutatión (DNP-SG) (figura 17).

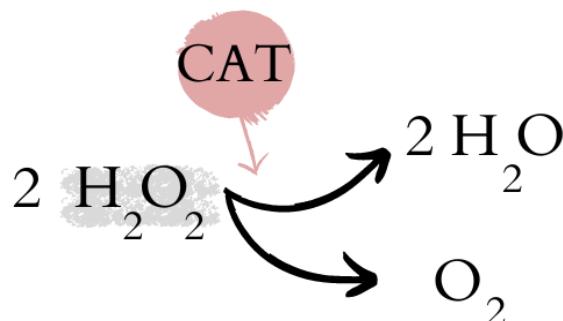


**Figura 17.** Esquema del método de Habig et al. (1974) para determinar la actividad de GST. CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno; DNP-SG: S-(2,4-dinitrofenil) glutatión; GSH: glutatión; GST: glutatión S-transferasa.

La formación de este conjugado se monitorea a 340 nm. La actividad GST se calculó usando el coeficiente de extinción molar del conjugado ( $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y se expresó en  $\mu\text{moles}_{\text{conjugado}} \text{ por min por mg}_{\text{proteína}}$ .

#### 4.9.5 Determinación de la actividad CAT

La actividad de CAT se evaluó de acuerdo al método descrito por Claiborne (1985) y con las modificaciones propuestas para la especie por Cossi et al. (2018). La reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno por acción de la enzima CAT se realizó en buffer fosfato 50 mM (pH= 7,0) y peróxido de hidrógeno 0,03 M (figura 18).

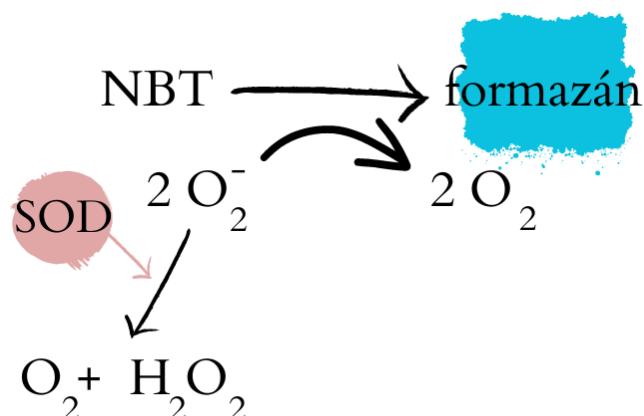


**Figura 18.** Esquema del método de Claiborne (1985) para la determinación del método de CAT. CAT: catalasa.

Se monitoreó la tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno ( $0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para el cálculo de la actividad. La actividad se expresó como  $\mu\text{moles}_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ degradados}} \text{ por min}$  por  $\text{mg}_{\text{proteína}}$ .

#### 4.9.6 Determinación de la actividad SOD

Para medir la actividad SOD se siguió el método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). La determinación se realizó en buffer fosfato 50 mM (pH= 7,4) utilizando metionina 13 mM, EDTA 0,1 mM, NBT 75  $\mu\text{M}$  y riboflavina 20  $\mu\text{M}$ . El método se basa en la generación del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) inducida por la luz y su reacción con el NBT para formar formazán. La SOD cataliza la dismutación del  $\text{O}_2^-$  disminuyendo así la velocidad de aparición del formazán (figura 19).



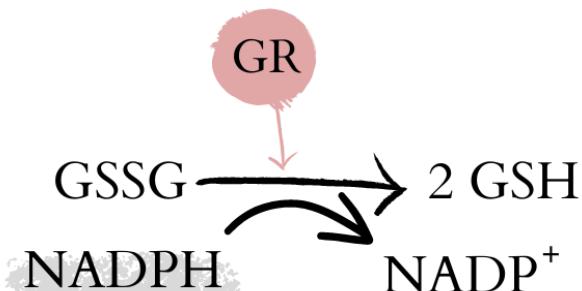
**Figura 19.** Esquema del método de Beauchamp y Fridovich (1971) para la determinación de la actividad de SOD. NBT: nitroazul de tetrazolio, SOD: superóxido dismutasa.

Después de 20 min de exposición lumínica, la absorbancia se registró a 560 nm. Paralelamente se realizaron controles negativos (sin irradiar con luz) y controles positivos (irradiados con luz, pero sin sobrenadante). Los resultados se expresaron en unidades de SOD por  $\text{mg}_{\text{proteína}}$ , donde 1 unidad de SOD se define como la cantidad enzima necesaria para producir el 50% de la inhibición del NBT.

#### 4.9.7 Determinación de la actividad GR

La actividad GR se determinó según lo descrito por Venturino et al. (2001). La reacción se determinó en buffer fosfato 143 mM (pH= 7,5) con NADPH 0,13 mM y GSSG

10 mM. El GSSG es reducido a GSH por acción de la enzima GR, que utiliza NADPH como cofactor. Se determina indirectamente la actividad GR a través del consumo de NADPH (figura 20).

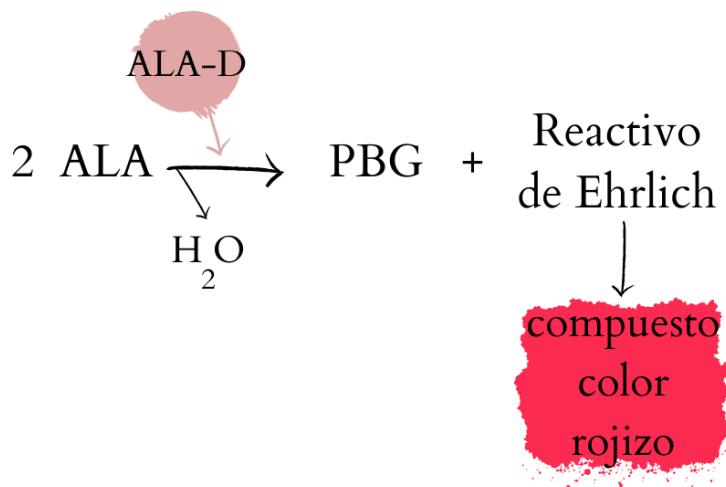


**Figura 20.** Esquema del método descrito por Venturino et al. (2001) para la determinación de la actividad GR. GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

El consumo de NADPH se monitoreó a 340 nm. Se utilizó su correspondiente coeficiente de extinción molar ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para expresar la actividad de GR como  $\mu\text{moles}_{\text{NADPH consumidos}} \text{ por min por mg proteína}$ .

#### 4.9.8 Determinación de la actividad ALA-D

La actividad de la enzima ALA-D se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Mauzerall y Granick (1956). La enzima ALA-D cataliza la condensación de 2 moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA) para dar porfobilinógeno (PBG). El PBG reacciona con el p-dimetil-aminobenzaldehído presente en el reactivo de Ehrlich para formar un producto de condensación de color rojo (figura 21).



**Figura 21.** Esquema del método descrito por Mauzerall y Granick (1956) para la determinación de la actividad de la ALA-D. ALA: ácido δ-aminolevulínico, ALA-D: δ-aminolevulínico dehidrasa, PBG: porfobilinógeno.

La determinación enzimática se llevó a cabo en buffer de incubación fosfato de sodio 50 mM (pH= 6,8) con β-Me 200 mM y ALA 50 mM en buffer de incubación. Se realizó una incubación a 37°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción a través del agregado de CuSO<sub>4</sub> en solución saturada, se agitó vigorosamente a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se trasvasó a un tubo de vidrio, se agregó el reactivo de Ehrlich y se agitó. La absorbancia se leyó entre los 8 y los 15 minutos a 555 nm.

Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó el coeficiente de absorción del PBG (113,6 ml/mg) y la misma se expresó como nmoles<sub>PBG</sub> formados por min por mg<sub>proteína</sub>.

#### 4.9.9 Determinación del contenido de GSH

Se determinó el contenido de GSH según el método que describió Anderson (1985) en buffer fosfato 0,134 M (pH= 7,5) con EDTA 6,3 mM y DTNB 6 mM. Una alícuota de homogenato se precipitó con ácido sulfosalicílico en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugó a 7.000 xg por 5 minutos. En el sobrenadante se determinó el contenido de GSH usando el reactivo de Ellman luego de incubar 30 minutos a temperatura ambiente. El GSH es oxidado por el DTNB, formando TNB, el cual se detecta espectrofotométricamente a 412 nm (figura 22).



**Figura 22.** Esquema del método de Anderson (1985) para la determinación de GSH. DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico); GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico.

Se realizó una curva de calibración utilizando GSH como estándar para interpolar las absorbancias obtenidas de las muestras y poder obtener la concentración. El contenido de GSH se expresó como nmoles<sub>GSH</sub> por g<sub>tejido</sub>.

#### 4.10 Preparación del material biológico para el análisis histológico

##### Fijación

La solución fijadora de Bouin se preparó en el momento de realizar la fijación de los organismos, con las siguientes proporciones de cada componente: 70% de agua destilada saturada de ácido pícrico, 25% de formaldehído y 5% de ácido acético glacial.

Los organismos destinados a los análisis histológicos fueron anestesiados en hielo durante 5 minutos al finalizar los bioensayos. Luego, bajo microscopio estereoscópico, se les retiró la concha delicadamente con ayuda de pinzas de disección. El tejido blando total se colocó en frascos de plástico con 12 mL de solución fijadora de Bouin. Se dejó que el fijador penetre durante 24 h en heladera (8°C). Al cabo de ese tiempo se los traspasó a etanol 70% en cantidad suficiente para cubrirlos por completo, hasta el momento de su procesamiento. El material fijado fue derivado a la Dra. Ariadna Battista (CPA del Área de histología del IBBEA<sup>3</sup>, UBA-CONICET) quién fue la responsable de los pasos de deshidratación, inclusión, corte y coloración bajo la coordinación de la Dra. Lo Nostro, como se detalla en el Anexo I. Se realizaron dos coloraciones: Hematoxilina-Eosina que permite observar los núcleos de color violeta y el citoplasma rosado, y Tricrómico de Masson modificado que permite observar los núcleos de color violeta, el citoplasma de color rojizo, las fibras de colágeno de color azul intenso, y el cartílago y el mucus de color azul claro.

---

<sup>3</sup> Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

### Análisis histopatológicos e histomorfométricos

Los cortes fueron observados y digitalizados utilizando un microscopio óptico acoplado a una cámara digital con el software ZEN 3.4 (Blue Edition) a la altura de la glándula digestiva y de las gónadas. Posteriormente, se utilizó un sistema de análisis de imágenes (software AxioVision 4.8.2, 2013) para dibujar al menos 10 túbulos digestivos por organismo. Los equipos utilizados pertenecen al grupo de trabajo que dirige la Dra. Juliana Giménez, quién además colaboró con la metodología y el análisis de las imágenes.

De acuerdo a Marigomez et al. (1990; 2006), se calcularon los siguientes parámetros planimétricos: el espesor o la altura media del epitelio del túbulos digestivo (MET, por sus siglas en inglés: *mean epithelial thickness*), el radio medio del lumen (MLR, por sus siglas en inglés: *mean luminal radius*) y el radio medio del túbulos (MDR, por sus siglas en inglés: *mean diverticular radius*), utilizando las fórmulas detalladas a continuación.

$$\text{MET} = \frac{2 * (S_o - S_i)}{P_o + P_i}$$

$$\text{MLR} = \sqrt{\frac{S_i}{\pi}}$$

$$\text{MDR} = \sqrt{\frac{S_o}{\pi}}$$

Donde:

$S_o$  es el área de sección de todo el perfil del túbulos

$S_i$  es el área de sección del perfil del lumen

$P_o$  es el perímetro de un círculo con área  $S_o$

$P_i$  es el perímetro de un círculo con área  $S_i$

Los resultados obtenidos para cada parámetro, se expresaron como promedio ± desvío estándar de cada tratamiento en  $\mu\text{m}$ .

Se registró la presencia de necrosis, fibrosis, atrofia u otras alteraciones en todos los túbulos digestivos observados.

Se analizaron las imágenes de las gónadas en búsqueda de anomalías o signos de histopatologías como atresia, necrosis, fibrosis, hiperplasia y/o hipertrofia celular.

#### **4.11 Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia**

En esta sección se detalla la metodología general de los ensayos de reproducción y los diseños particulares de cada bioensayo se encuentran explicados en los respectivos capítulos.

##### **Oviposición**

Una semana antes del inicio de los bioensayos, los organismos adultos de *B. straminea* fueron separados en recipientes de vidrio de 250 ml con 200 ml de agua declorada (6 organismos por recipiente). Las puestas que se depositaron durante ese período fueron descartadas.

Al momento de comenzar los bioensayos, los caracoles fueron trasvasados a recipientes de vidrio recubiertos internamente con una capa de acetato de celulosa inerte (Cossi, 2019), para facilitar la posterior extracción de las puestas. Se registró cada 48 h la cantidad de puestas depositadas en cada recipiente, y cada 96 h se renovaron las capas de acetato. Al finalizar los bioensayos, se calculó el número total de puestas depositadas por recipiente y luego para cada tratamiento se obtuvo el número total de puestas como:

$$\text{nº puestas depositadas} = \sum \text{ puestas depositadas en todos los recipientes del mismo tratamiento durante todos los días de exposición}$$

En las puestas depositadas en las últimas 24-48 h, se registró el número de huevos y el número de huevos embrionados. Las puestas luego se pasaron a placas de 6 wells (una puesta por well) y continuaron bajo distintos tratamientos según se detalla en cada capítulo.

### **Signos de embriotoxicidad**

Los embriones fueron observados bajo el microscopio estereoscópico y se registró la presencia de malformaciones o anomalías morfológicas, así como la cantidad de embriones que presentaban desarrollo detenido o falta de sincronicidad en el desarrollo.

### **Eclosión**

De cada puesta se registró la fecha de la primera eclosión, definida como el día en que eclosionó el primer juvenil de esa puesta. El tiempo de eclosión de cada puesta se calculó contando el número de días que pasaron entre que la puesta fue depositada y la fecha de la primera eclosión:

$$\text{Tiempo de eclosión (días)} = \text{FPD} - \text{FPE}$$

Donde FPD: fecha en que la puesta fue depositada, FPE: fecha de la primera eclosión.

El tiempo de eclosión se expresó como el promedio ± desvío estándar de todas las puestas del mismo tratamiento.

Para calcular el porcentaje de eclosión, se tuvo en cuenta la cantidad de juveniles que eclosionaron por tratamiento sobre el total de huevos embrionados, como se indica en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ eclosión} = \frac{\text{nº juveniles eclosionados}}{\text{nº huevos embrionados}} * 100$$

Además, se calculó el porcentaje de eclosión por puestas como la cantidad de juveniles que eclosionaron de cada puesta sobre el total de huevos embrionados de esa puesta. En este caso, el porcentaje de eclosión se expresó como el promedio ± desvío estándar de todas las puestas del mismo tratamiento.

### **Calidad y supervivencia de los juveniles**

La morfología de los juveniles y su supervivencia se evaluaron diariamente bajo microscopio estereoscópico hasta el final de los ensayos (ver detalles en los siguientes capítulos). Para cada uno de los tratamientos se calculó el porcentaje de supervivencia de los juveniles como el número de juveniles que sobrevivieron al finalizar el ensayo sobre el total de juveniles que eclosionaron.

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{nº juveniles que sobrevivieron}}{\text{nº juveniles que eclosionaron}} * 100$$

Los juveniles se clasificaron de acuerdo a su talla (mayor longitud de la concha) en uno de los siguientes grupos: pequeños, medianos y grandes. Para esto se observaron bajo microscopio estereoscópico con un papel milimetrado dentro del campo de visión (descripción en los respectivos capítulos).

### **4.12 Análisis estadístico**

Se corroboró la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Barlett) (Green et al., 2018). En caso de no cumplirse los supuestos, se transformaron los datos con la función  $\log(y)$  y si los datos transformados seguían sin cumplir con los supuestos, se utilizaron pruebas no paramétricas.

Las diferencias de los parámetros fisicoquímicos, de las determinaciones bioquímicas, de los parámetros histológicos y de algunos de los parámetros reproductivos entre tratamientos fueron testeadas con Student t-test ó con ANOVA de un factor y analizadas por el test de múltiples comparaciones de Tukey-Kramer, ó mediante pruebas no paramétricas (Test de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Los porcentajes de letalidad y de signos de neurotoxicidad, el número de puestas depositadas, los porcentajes de eclosión y de supervivencia de los juveniles, y los tamaños de los juveniles fueron analizados mediante el test de Chi-cuadrado o con la prueba exacta de Fisher.

Cuando fue necesario evaluar las diferencias entre tratamientos y a distintos tiempos de exposición se realizó ANOVA de dos factores.

Para los análisis estadísticos se utilizaron los paquetes GraphPad InStat 3, GraphPad Prism 8 y R. En todos los casos se definió 0,05 como nivel de significancia.

#### **4.13 Descarte y descontaminación**

El descarte y la descontaminación del material se realizaron siguiendo los protocolos del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA).

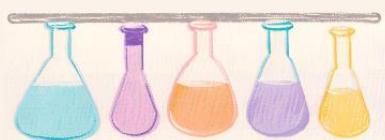
El material que estuvo en contacto con los plaguicidas y con las muestras de agua ambientales fue descontaminado en baño de hidróxido de sodio al 10% por 48 h.

El uso de *B. straminea* fue aprobado por el Servicio de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (Resol. 1722/2003; 1401/2018).



## CAPÍTULO I

### *EVALUACIÓN DE TOXICIDAD DEL CLORPIRIFOS*

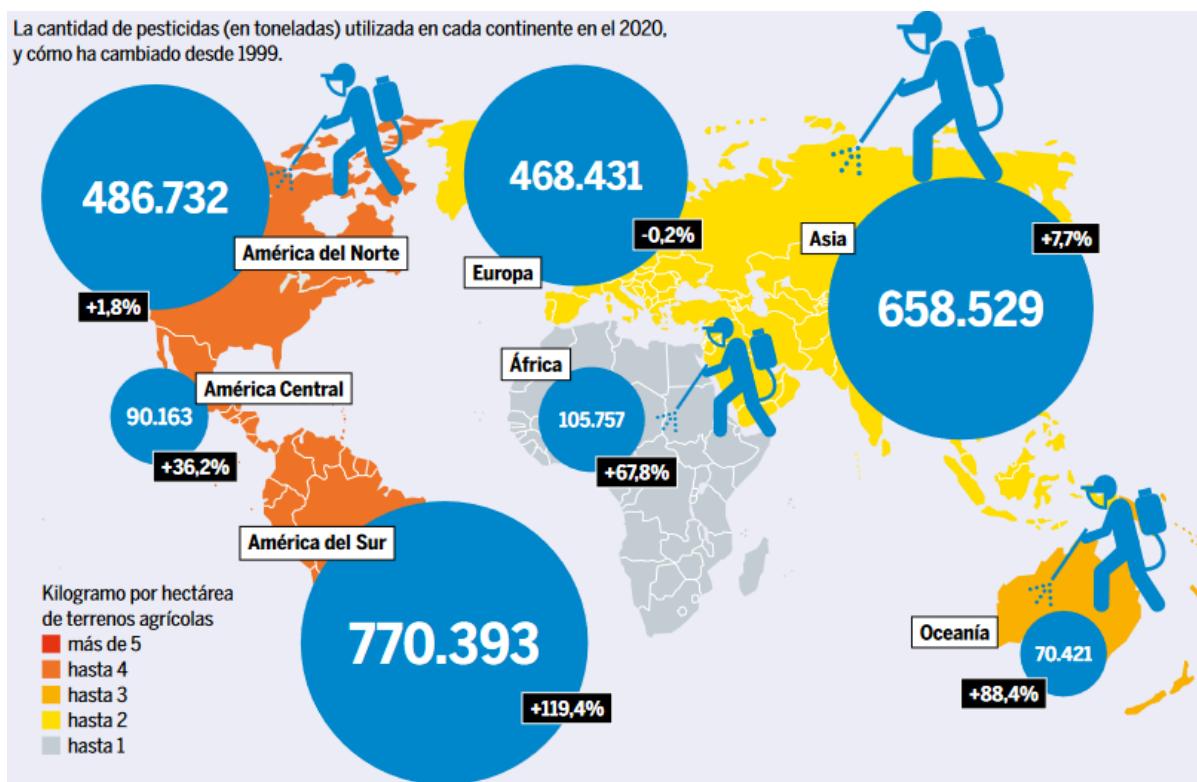


## 1. Introducción

### 1.1 Breve historia de los plaguicidas

Un plaguicida es una sustancia o una mezcla de sustancias (orgánicas, inorgánicas o microbiológicas) que se utilizan para combatir plagas o pestes consideradas nocivas para los seres humanos, los cultivos o frutos y/o los animales domésticos (Steffens et al., 2017). Desde épocas muy antiguas, se utilizan sustancias para combatir o controlar plagas. Inicialmente dichas sustancias eran de origen natural como por ejemplo las plantas cicuta y acónito que utilizaban los egipcios, o el élboro de los romanos. Alrededor de 1880, el químico Scheele desarrolló un pigmento con base de arsénico de color verde, que luego se descubrió que tenía propiedades insecticidas y se llamó Verde de París debido a su amplia utilización para matar ratas en las alcantarillas de dicha ciudad. Con el auge de la industrialización a principios del siglo XX, surgió la necesidad de desarrollar compuestos sintéticos y aparecieron los primeros plaguicidas: el tiocianato de alquilo, el dicloro difenil tricloroetano (DDT) y el bromuro de metilo (Pretty y Bharucha, 2015; Newman, 2014). En 1938 se introdujo el primer insecticida OF, el tetraetilpirofosfato (TEPP), que era muy eficiente contra pulgones y ácaros pero altamente tóxico para mamíferos (Sharpe et al., 2006).

Actualmente, para aumentar la productividad agrícola y mantener una fuente estable de alimentos (producción masiva en poco tiempo y espacio), se aplican grandes cantidades de productos químicos, ya sea con el fin de aumentar el rendimiento, acelerar procesos o combatir plagas perjudiciales (Newman, 2014). El uso de pesticidas en el mundo creció sostenidamente durante décadas siendo dicho aumento entre 1990 y 2017 de aproximadamente un 80%. Particularmente en América del Sur, se registró un aumento en la cantidad de plaguicidas utilizados del 119% entre 1999 y 2020 (figura 23) (Tostado y Bollmohr, 2023). En consecuencia, se han detectado residuos de plaguicidas en alimentos, sedimentos, cuerpos de agua e incluso en tejidos animales (Arikan y Turan, 2020; Bajwa y Sandhu, 2014; Van Toan et al., 2013).



**Figura 23.** Cantidad de plaguicidas (en toneladas) utilizada por continente en el año 2020 y su variación respecto al año 1999. Tomado de Tostado y Bollmohr (2023).

## 1.2 Clasificación de los plaguicidas y su aplicación como formulados comerciales

Las tres formas más comunes de clasificar a los plaguicidas son: (a) de acuerdo al modo de ingreso, (b) de acuerdo a su función y a cual sea la plaga que está destinado a controlar, y (c) de acuerdo a su composición química (Kaur et al., 2019). Basándonos en el segundo ítem, según el organismo al cual están dirigidos, podemos clasificar a los plaguicidas en varios grupos entre los que se encuentran los insecticidas, los fungicidas y los herbicidas (tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los plaguicidas según la plaga que está destinado a controlar.

<b>Tipo de plaguicida</b>	<b>Organismo blanco</b>
Insecticida	Insectos
Acaricida	Ácaros
Herbicida	Malezas
Fungicida	Hongos
Bactericida	Bacterias
Nematicida	Nematodos
Molusquicida	Moluscos
Rodenticida	Roedores
Avicida	Aves

Los plaguicidas se aplican como formulados comerciales (FC) que contienen al principio activo (PA) y sustancias auxiliares: excipientes que actúan como vehículo para incrementar la efectividad de la aplicación y facilitar la manipulación y almacenamiento, coadyuvantes que incrementan y potencian la actividad plaguicida, surfactantes o tensioactivos para reducir la tensión superficial de las gotas, aceites para que penetren más fácilmente las membranas biológicas, adherentes para que se adhieran mejor a las plantas, y también aditivos, como colorantes, esencias, espesantes y anticongelantes (Randall et al., 2008). En general, la identidad y concentración de los excipientes no se declara en las etiquetas por considerarse inertes, lo cual no es cierto en muchos casos; incluso se comprobó que pueden llegar a tener mayor toxicidad que el PA solo y afectar a organismos que no son su blanco (Kalyabina et al., 2021; Mesnage et al., 2014).

Otro punto a tener en cuenta es el hecho de que los métodos de producción intensiva de alimentos implican que múltiples plaguicidas sean aplicados en forma simultánea sobre una misma zona o alternando entre épocas del año o, incluso, de manera combinada (Hernández et al., 2017). Hay plaguicidas que también son ampliamente utilizados en veterinaria, en ambientes domésticos y en salud pública (Hernández et al., 2017).

### ¿Cómo llegan los plaguicidas al agua?

Las partículas de plaguicidas pueden pasar a la atmósfera, quedar adheridas al suelo o retenidas por las partículas suspendidas en el agua durante mucho tiempo antes de ser removidas (Davies, 1990). En particular, pueden alcanzar cuerpos de agua ya sea por las aplicaciones directas sobre ellos, por la percolación entre las partículas del suelo llegando a las aguas subterráneas, o por escorrentía. Incluso fueron relevadas situaciones en las cuales los equipos de aplicación se lavaban en arroyos y ríos, el almacenamiento no era el adecuado o se producían derrames durante el transporte, mezcla o descarga, con la consecuente contaminación asociada (Bonmatin et al., 2015; Steffens et al., 2017). Se han detectado plaguicidas en ambientes acuáticos de países donde se prohibió su uso o incluso donde nunca se utilizaron debido a las corrientes oceánicas y continentales, como por ejemplo en la Antártida (Vudamala et al., 2023).

De esta manera, la calidad del agua puede verse afectada por los PAs a menudo en mezclas, por las impurezas de los ingredientes, por los aditivos y por los productos de degradación (Belden et al., 2009; Macchi et al., 2018; WHO, 2004). La degradación, ya sea por factores bióticos o abióticos, puede derivar en su mineralización completa, resultando en productos inocuos o, por el contrario y como ocurre en muchos casos, se pueden generar productos secundarios de mayor persistencia y toxicidad que los plaguicidas originales (Newman, 2014). De cualquier manera, el uso de plaguicidas genera residuos que pueden llegar a causar daños a largo plazo en el ecosistema al modificar la relación predador/presa y producir pérdida de la biodiversidad, provocar intoxicaciones agudas e intoxicaciones crónicas en seres humanos causando cáncer, enfermedades degenerativas, problemas reproductivos y/o respiratorios, entre otros (Kalyabina et al., 2021; Steffens et al., 2017).

### 1.3 Insecticidas

Como se enunció anteriormente, los insecticidas son plaguicidas cuyo blanco son los insectos. En general, los insecticidas modernos son orgánicos, tanto de origen natural como sintético. Dentro de los sintéticos, se destacan 4 grupos agrupados por su mecanismo de acción: los inhibidores de la AChE (OFs y carbamatos), los antagonistas de canales de sodio (fiproles), los moduladores de canales de sodio (piretroides y

piretrinas) y los moduladores competitivos del receptor nicotínico de la ACh (neonicotinoides) (figura 24) (Kaur et al., 2024; Newman, 2014).

Grupo principal / Punto de acción primario	Subgrupo químico o materia activa representativa	Materias activas con registro en Argentina
<b>1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa</b>	<b>1A</b> Carbamatos	Benfuracarb, carbaryl, carbofuran clorhidrato, carbosulfan, formetanato, metiocarb, metomil, pirimicarb, thiodicarb.
	<b>1B</b> Organofosforados	Acefato, clorpirifos, clorpirifos metil, DDVP o diclorvos, dimetoato, fenamifos, fenitrotoxin, fosmet, fostiazate malation, metamidofos, metidation, pirimifos metil, profenofos.
<b>2 Antagonistas de canales de Sodio</b>	<b>2A</b> Ciclodienos	No existen principios activos registrados en Argentina.
	<b>2B</b> Fenilpirazoles (Fiproles)	Fipronil, ethiprole.
<b>3 Moduladores del canal de sodio</b>	<b>3A</b> Piretroides y Piretrinas	Alfa-cipermetrina, alfametrina, azadiractina, betacipermetrina, bifentrin, beta-ciflutrin, cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, gammacialotrina, lambdaciatorna, permetsrina, teflutrina, zetametrina. Piretrinas.
	<b>3B</b> DDT / Metoxicloro	No existen principios activos registrados en Argentina.
<b>4 Moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina</b>	<b>4A*</b> Neonicotinoides	Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam.
	<b>4B</b> Nicotina	No existen principios activos registrados en Argentina.
	<b>4C*</b> Sulfoximinas	Sulfoxaflor.
	<b>4D</b> Butenolides	No existen principios activos registrados en Argentina.
	<b>4E</b> Mesoionicos	No existen principios activos registrados en Argentina.

**Figura 24.** Grupos de insecticidas clasificados según su modo de acción primario y sus principios activos registrados en Argentina. Fuente: <https://irac-argentina.org/>

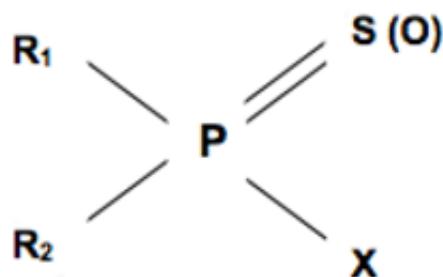
En nuestro país, hay registrados y autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) 1350 formulados con acción insecticida. Los datos sobre consumo nacional de insecticidas, y de plaguicidas en general, dependen de lo

informado por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), que informó en el año 2016 un aumento respecto al año anterior, siendo el volumen comercializado de 17,6 millones de litros (Montoya et al., 2023). CASAFE incluye, aproximadamente, entre un 80 y un 85% de las empresas del mercado, por lo que los valores de uso probablemente sean mayores que los presentados.

### 1.3.1 Insecticidas organofosforados (OFs)

Con la prohibición de los plaguicidas organoclorados en muchos países entre las décadas del 70 y 90 debido a su larga persistencia, bioacumulación y toxicidad (Li et al., 1999; 2001) sumado al modelo actual de agricultura, el uso de OFs y otros grupos de insecticidas ha ido en aumento (Toledo y Bollmohr, 2023). Los OFs son el grupo de plaguicidas más ampliamente utilizado a nivel mundial en la actualidad, alcanzando el 45% del mercado total (Mali et al., 2022; Müller et al., 2007).

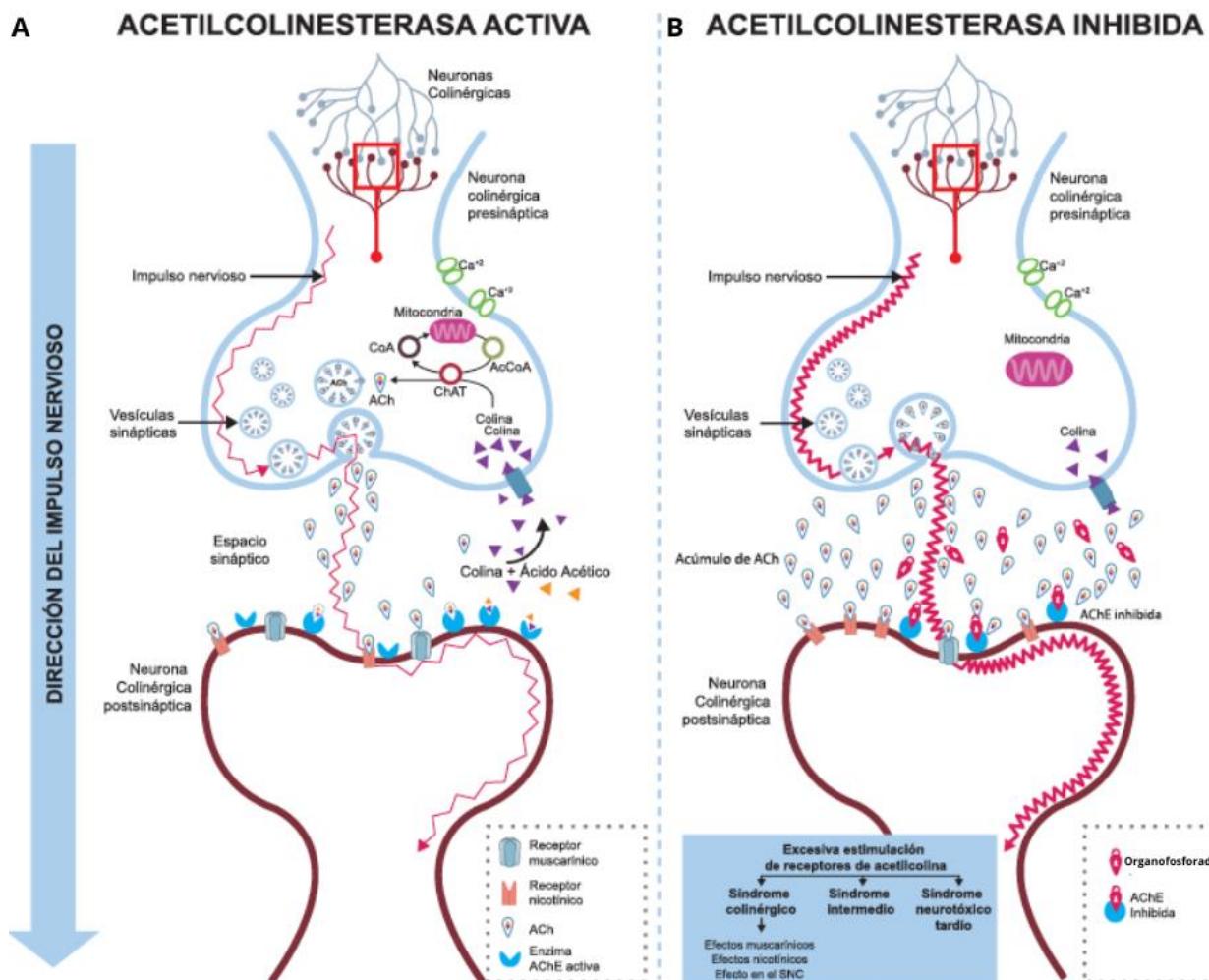
Los OF son ésteres, amidas o tioles derivados de ácidos fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico, fosfónico o fosfénico. En la figura 25 podemos observar su estructura general. Aquellos que poseen uniones P=O se llaman oxones, como el paraoxón o el clorpirifos-oxón, mientras que los que tienen enlaces P=S son tiones, como el paratión o el clorpirifos (Flores et al., 2018). R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> generalmente son sustituciones alcoxi (O-metil u O-etil) y X es el sustituyente más lóbil a la hidrólisis, a la escisión oxidativa o a ser desplazado en la fosforilación con la enzima blanco (Galloway y Handy, 2003).



**Figura 25.** Estructura general de los insecticidas organofosforados.

Los OFs son agentes neurotóxicos, siendo su modo de acción principal la inhibición de la enzima AChE (Costa, 2013). Como se detalló en la Introducción General, la AChE cataliza la hidrólisis del neurotransmisor ACh. La reacción de la AChE con los OFs es

análoga a la reacción con ACh pero, en este caso, la unión de la enzima al OF produce una enzima fosforilada que es más estable y además puede sufrir un proceso de envejecimiento espontáneo volviéndose más resistente a la hidrólisis subsecuente que la acetil-enzima, por lo que la enzima queda inhibida irreversiblemente (Costa, 2013). La degradación de ACh se ve impedida como consecuencia de dicha inhibición y se acumula en el espacio sináptico generando una sobreestimulación de los receptores colinérgicos. Al sostenerse dicha hiperexcitación, se produce depresión o parálisis de los nervios colinérgicos a través del sistema nervioso central y periférico que, eventualmente, pueden generar fallas respiratorias y hasta la muerte (Costa, 2018) (figura 26). Este mecanismo ha sido descrito en vertebrados, siendo similar en invertebrados no blanco, a pesar de que se han observado efectos neurotóxicos variados por lo que el papel exacto de la ACh en la transmisión neuronal en invertebrados todavía no se ha determinado (Galloway y Handy, 2003).



**Figura 26.** Mecanismo de acción de los insecticidas organofosforados. **(A)** El neurotransmisor acetilcolina (ACh) se une a sus receptores en la membrana post-sináptica, el estímulo sináptico que produce la ACh es breve y se detiene con la intervención de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que la hidroliza en colina y ácido acético. **(B)** Los organofosforados, inhiben a la AChE impidiendo la hidrólisis de la ACh, la cual se acumula y produce diversos síndromes. Adaptado de Caro-Gamboa et al. (2020).

Si bien todos los OF comparten un mismo modo de acción, tienen efectos tóxicos diversos. Existen desde compuestos excepcionalmente tóxicos a otros para los cuales prácticamente no se ha encontrado evidencia de toxicidad (Flores et al., 2018; Galloway y Handy, 2003). Los oxones son inhibidores mucho más potentes de la actividad de AChE y altamente reactivos, mientras que las formas tiólicas son pobres inhibidores y requieren un proceso de activación metabólica para formar el oxón derivado. La mayoría de los OFs son tiones debido a su mayor resistencia a la degradación y a su facilidad para atravesar las membranas. En el ambiente, los tiones se pueden oxidar a oxones por acción del oxígeno, la luz solar y de algunos microorganismos capaces de catalizar la reacción, mientras que en otros organismos la metabolización ocurre por acción de oxidases del complejo citocromo P450 (CYP) (Flores et al., 2018; Jokanović, 2001;

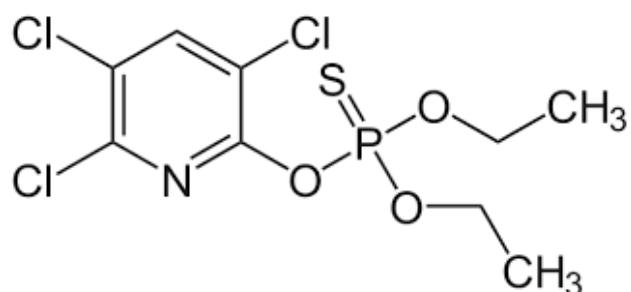
Thullberry, 2006). El metabolismo es complejo, e involucra diferentes enzimas y vías enzimáticas que determinan un balance entre activación y detoxificación particular para cada especie y, como consecuencia, efectos y sensibilidades muy variables (Galloway y Handy, 2003). Además de efectos neurotóxicos agudos, los OFs pueden tener otros efectos indirectos que incluyen, desde interferencias en el desarrollo neurológico, en la diferenciación y proliferación celular (considerándose en algunos casos como posibles cancerígenos) hasta efectos en el sistema inmune (Costa, 2013; Flores et al., 2018).

### 1.3.1.1 Clorpirifos

El clorpirifos es un insecticida OF de origen sintético, no sistémico y de amplio espectro. Es utilizado desde 1965 en agricultura, horticultura, viticultura y forestación en un amplio rango de cultivos y en el control de vectores de enfermedades en animales y seres humanos. Se ha utilizado también en las casas para controlar las cucarachas, pulgas y termitas, y también se ha usado como ingrediente activo en ciertos collares antipulgas para animales domésticos. Se comercializa bajo diferentes formas, como producto sólido, líquido, granulado, polvo o gránulos hidratables, que pueden ser aplicados por equipos aéreos o terrestres (Pechen y Venturino, 2021a).

#### Propiedades fisicoquímicas

El clorpirifos es clasificado químicamente como tiofosfato orgánico, siendo su nombre químico O,O-dietil-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato (figura 27).



**Figura 27.** Estructura química del clorpirifos.

Es un compuesto que presenta volatilización intermedia, lo que le permite encontrarse en el medio ambiente en forma de vapor o adherido a partículas

atmosféricas y así recorrer largas distancias antes de depositarse. La disipación por volatilización es controlada por las propiedades físicas y químicas del clorpirifos (tabla 2) y es el proceso dominante durante las primeras 12 h después de la aplicación ya que luego disminuye a medida que la formulación se absorbe al follaje o al suelo (Mackay et al., 2014; Torres et al., 2021). Presenta baja solubilidad en agua y alta capacidad de adsorción en la materia orgánica ( $\text{Log Kow} = 5,21$ ) logrando atravesar membranas biológicas y acumularse en lípidos (Baez, et al., 2015) (tabla 2). Bellas y Gil (2020) han señalado que el clorpirifos también se absorbe en el polietileno (microplásticos), facilitando efectos tóxicos relacionados con la biota y las cadenas tróficas marinas.

La persistencia en el ambiente es moderada debido a varias posibles vías de disipación que incluyen la volatilización, la fotólisis, la hidrólisis abiótica y la degradación microbiana y que pueden ocurrir simultáneamente. En suelos, el tiempo de vida media es menor a 29 h mientras que en agua varía entre 16 y 29,6 días (tabla 2).

**Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del clorpirifos.**

Propiedades	
Peso molecular	350,6 g/mol
Solubilidad	0,39 mg/L
Presión de vapor (25 °C)	$2,31 \times 10^{-3}$ Pa
Densidad (20 °C)	1,44 g/cm <sup>3</sup>
Log Kow (20 °C)	5,21
Solubilidad en agua (20 °C)	1,05 mg/L
Hidrólisis DT <sub>50</sub> (agua, 25 °C, pH = 9)	16 días
Fotólisis DT <sub>50</sub> (agua, 25 °C, pH = 7)	29,6 días
Fotólisis DT <sub>50</sub> (suelo)	28,5 h
Punto de fusión	42 °C

DT<sub>50</sub>: tiempo necesario para la degradación del 50% de una sustancia. Fuente: <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.018.969>

Los metabolitos generados de la degradación del clorpirifos en el medio ambiente son: i) clorpirifos oxón, por oxidación de clorpirifos, ii) el 3, 5,6-tricloro-2-piridinol (TCP)

y el ácido dietiltiofosfórico (DETP), principales productos de hidrólisis del clorpirifos, y iii) otros productos de transformación de menor impacto ambiental (Torres et al., 2021).

Dentro de los organismos, el mecanismo de acción del clorpirifos como insecticida se inicia con la biotransformación a su forma de oxón, lo cual puede ocurrir por diferentes vías metabólicas. En una de estas vías es bioactivado por medio del sistema microsomal CYP a través de una reacción de desulfuración oxidativa, siendo estas enzimas las que transforman los OFs en el metabolito activo correspondiente (Tang et al., 2001).

### **Información (eco)toxicológica**

La Unión Europea, de acuerdo al Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos, ha categorizado al clorpirifos como un compuesto de toxicidad aguda I para el ambiente acuático (muy tóxico para la vida acuática) y como compuesto de toxicidad crónica I (muy tóxico para la vida acuática con efectos a largo plazo) (European Chemicals Agency, 2022) (tabla 3).

**Tabla 3. Indicadores de toxicidad aguda y crónica del clorpirifos en distintos grupos de organismos.**

Indicador	Tiempo	Organismos	Valor
CL <sub>50</sub>	24 h	<b>peces</b> <i>(Cyprinus carpio)</i>	21 µg/L
	48 h		15 µg/L
	72 h		13 µg/L
	4 días		10 µg/L
NOEC	35 días	<i>(Oncorhynchus mykiss )</i>	4,6 ng/L
LOEC	35 días		10 ng/L
CE <sub>50</sub>	24 h	<b>invertebrados acuáticos</b> <i>(Daphnia magna )</i>	495 ng/L
NOEC	48 h		72,1 ng/L
CE <sub>50</sub>	48 h		214 ng/L
NOEC	21 días		56 ng/L
CE <sub>50</sub>	21 días		56-100 ng/L
CL <sub>50</sub>	21 días		60 ng/L
NOEC	35 días		4,6 ng/L
LOEC	35 días		10 ng/L
CE <sub>50</sub>	48 h	<b>algas</b> <i>(Desmodesmus subspicatus)</i>	730 µg/L
	72 h		580 µg/L
	4 días		480 µg/L

CE<sub>50</sub>: concentración a la cual se observa efecto en el 50% de los organismos expuestos, CL<sub>50</sub>: concentración a la cual se produce 50% de letalidad, LOEC: menor concentración a la que se observa efecto, NOEC: mayor concentración a la que no se observa efecto. Fuente: <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.018.969>

A pesar de que los OFs no son muy persistentes y tienen poca capacidad bioacumulativa como se detalló anteriormente, se han detectado residuos de clorpirifos a nivel mundial en peces, aves, sangre y orina humana, leche materna, sedimentos, tuberías de agua y hasta en agua de lluvia (Torres et al., 2021). A nivel mundial, las concentraciones más altas detectadas de clorpirifos en agua superficial fueron de 26,6 µg/L en Kenia y de 37,3 µg/L en Bangladesh (Hasanuzzaman et al., 2018; Otieno et al., 2012), mientras que en nuestro país la concentración máxima fue de 10,8 µg/L en la provincia de Buenos Aires (Marino y Ronco, 2005). Estos valores exceden ampliamente los límites máximos permitidos que fueron establecidos por distintos entes reguladores, entre ellos el valor máximo para la protección de la vida acuática en nuestro país que

corresponde a 0,006 µg/L (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005) (tabla 4).

**Tabla 4. Valores máximos permitidos de clorpirifos en diferentes matrices y de acuerdo a diferentes entes reguladores.**

Matriz	Límites permitidos	Ente
Aguas superficiales, aguas continentales, cuerpos de agua artificiales	0,03 µg/L (promedio anual) 0,1 µg/L (concentración máxima permitida)	EU, 2015-2018
Agua destinada al consumo humano	30 µg/L (ingesta diaria aceptable) 0,1 µg/L (valor máximo permitido)	OMS, 2018
Agua dulce y agua salada	0,083-0,0056 µg/L ( criterio de calidad del agua)	USEPA, 1987
Agua superficial, protección de la vida acuática	0,006 µg/L (valor máximo)	Subsecretaría de Recursos hídricos de la Nación Argentina, 2005
Residuos en alimentos	0,01 mg/kg (valor máximo)	SENASA, 2010

Adaptado de Torres et al. (2021) y de Quintana e Indaco (2021).

En nuestro país, el clorpirifos se aplicaba generalmente a cultivos como almendra, maíz, algodón y árboles frutales como plátanos, duraznos, naranjas y manzanas para el control de insectos masticadores y chupadores (Quintana e Indaco, 2021). De las 3.736 toneladas de insecticidas que se usaron en la agricultura en el 2017 el 59% correspondieron a insecticidas OFs (FAO, 2020), siendo el clorpirifos el insecticida más utilizado en los cultivos de soja genéticamente modificada (Aparicio et al., 2013). En el SENASA en el año 2020, se encontraban registrados 120 formulados comerciales que contenían clorpirifos como principio activo único o en combinación con otros compuestos (SENASA, 2020).

También se utilizaba en el control de ectoparásitos en el sector agropecuario para controlar garrapatas, ácaros, piojos, pulgas, moscas y tábanos; como principio activo de productos en medicina veterinaria; tenía usos no agrícolas como insecticida fitosanitario en el mantenimiento de campos de golf y áreas recreacionales; y en salud humana en programas sanitarios para el control de vectores y hospedadores de agentes patógenos responsables de enfermedades como el mal de Chagas y el dengue, entre otras (Pechen y Venturino, 2021b).

### Evaluación de riesgo

La evaluación determinística de riesgo de la ecotoxicidad en peces e invertebrados acuáticos puede realizarse a través de un Cociente de Riesgo (CR), empleando como puntos finales las CL<sub>50</sub> para evaluar los efectos agudos (EPA, 2017). Estos parámetros se utilizan como divisores frente a las Concentraciones Esperadas en el Ambiente (CEA), que suelen definirse a partir de la máxima concentración detectada en el agua. De esta forma, el CR se calcula como CEA/CL<sub>50</sub>. Teniendo en cuenta distintos efectos agudos en organismos acuáticos, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) estableció los límites de CR que se muestran en la tabla 5, los cuales permiten presumir el riesgo de un contaminante para los organismos acuáticos.

**Tabla 5. Presunciones de riesgo para organismos acuáticos**

Efecto	Límite CR
Alto riesgo agudo	0,5
Uso restringido agudo	0,1
Riesgo de extinción de especies	0,05

CR: cociente de riesgo. Adaptado de Bieczynski et al. (2021).

### Efectos de la exposición a clorpirifos

El clorpirifos ejerce múltiples efectos dañinos sobre los organismos acuáticos. Algunos de los efectos observados incluyen alteraciones del crecimiento, del desarrollo, de la reproducción, del comportamiento, del sistema inmune y endocrino y de parámetros bioquímicos relacionados a esterasas y estrés oxidativo. A nivel histopatológico, se han observado múltiples órganos afectados por el clorpirifos (gónadas, branquias, cerebro, intestino, hígado y riñones) viéndose afectada la respiración, la regulación iónica y osmótica, la capacidad de absorción y reserva de nutrientes, la capacidad de detoxificación, el crecimiento y la reproducción (Bieczynski et al., 2021; Majumder, 2023; Ravi et al., 2023). En particular en moluscos se reportaron efectos sobre la actividad de AChE, estrés oxidativo y alteraciones de parámetros inmunológicos y reproductivos (Garate et al., 2020; Herbert et al., 2021; Rivadeneira et al., 2013).

Diversas especies terrestres también se ven impactadas por este plaguicida, siendo los invertebrados el grupo que involucra los taxones con los mayores riesgos. En particular, el clorpirifos es extremadamente tóxico para insectos benéficos como las abejas, lo que tiene mucha relevancia por las consecuencias indirectas perjudiciales que trae aparejadas sobre el éxito de control de plagas, polinización y riesgos para la salud humana por contaminación de productos alimenticios y medicinales. En seres humanos, la toxicidad aguda del clorpirifos, como ya ha sido detallado, se debe a la inhibición de la AChE, lo que lleva a un sistema nervioso sobreestimulado que causa náuseas, mareos, confusión, parálisis respiratoria y muerte a niveles de exposición muy elevados (Colović et al., 2013). La exposición crónica a bajas concentraciones se ha asociado con numerosas consecuencias como por ejemplo cáncer de mama, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, alteraciones del microbioma, del neurodesarrollo y enfermedades neurodegenerativas, entre otras patologías (Ali et al., 2020; Guiñazú et al., 2021; Rahman et al., 2021).

### **Reglamentaciones**

En el año 1997, la empresa DowElanco retiró voluntariamente el uso de clorpirifos en interiores y en mascotas, y en 2001 la USEPA lo prohibió para uso residencial en todo el país. Posteriormente, y considerando los informes científicos que describieron daños provocados por clorpirifos sobre el cerebro infantil, en el año 2012 la USEPA llega a un acuerdo con los registrantes del plaguicida para poner zonas de amortiguamiento alrededor de escuelas, guarderías, hogares y campos de juego. Numerosas organizaciones civiles, y grupos de interés público han solicitado reiteradamente la prohibición de uso del clorpirifos en Estados Unidos y en 2020 varios estados avanzaron con su prohibición. Por su parte en el año 2015, el Comité Permanente de Legislación de la Unión Europea redujo los límites máximos de residuos hasta el límite de detección analítica para los cultivos frutihortícolas, lo que supone en la práctica la prohibición de su uso en estos cultivos. Otros países como Australia, India, Tailandia, Palestina, Arabia Saudita y Sudáfrica también han restringido o prohibido su uso (Pechen y Venturino, 2021b). En Argentina, en el año 2021, con la resolución 414/2021, el SENASA prohibió la importación, elaboración y fraccionamiento de principios activos y productos fitosanitarios formulados a base de clorpirifos etil y clorpirifos metil para ese mismo año.

En la misma resolución, se establece que a partir del año 2025 se prohíbe su comercialización y uso en todo el territorio nacional, y se fija en 0,01 mg/kg el límite de determinación de clorpirifos etil y de clorpirifos metil para todos los productos y subproductos agropecuarios que se importen o produzcan localmente para consumo interno (SENASA, 2021).

## 2. Metodología

### 2.1 Preparación de las soluciones de clorpirifos

Para preparar las soluciones madres del PA de clorpirifos, se tuvieron en cuenta sus valores de solubilidad (European Chemicals Agency, 2022). Se prepararon dos soluciones madre disolviendo el PA en acetona: de 5000 y de 500 mg<sub>clorpirifos</sub>/L, las cuales se conservaron en el freezer (-20°C) hasta el momento de los bioensayos. La solución madre más concentrada se utilizó para los tratamientos de mayor concentración del PA de modo que el porcentaje de acetona no superara los valores recomendados. En el caso del FC, este se diluyó en agua bidestilada (por ósmosis inversa) hasta alcanzar una solución madre de concentración 480 mg<sub>clorpirifos</sub>/L. Esta solución se conservó en heladera (4°C) hasta el momento de los bioensayos.

Para llevar a cabo los bioensayos, se realizaron en el momento diluciones de las soluciones madres con agua declarada.

Todas las concentraciones que se enuncian en esta tesis, tanto del PA como del FC, hacen referencia a la concentración de clorpirifos en la solución.

El FC no declara sus solventes y emulsionantes, por lo cual no fue posible incluir un grupo control de excipientes.

### 2.2 Exposiciones agudas

Se realizaron exposiciones agudas bajo las condiciones generales ya detalladas en la Metodología General (Condiciones generales de los bioensayos agudos). Las diferencias entre los diseños experimentales de los bioensayos se explican a continuación.

#### 2.2.1 Diseño experimental de los bioensayos de exposición

Se realizaron dos bioensayos agudos. El primer bioensayo se realizó con el PA de clorpirifos, continuando con lo estudiado por otro miembro de nuestro grupo de investigación (Tejedor, 2019). Luego se adquirió el FC de clorpirifos y se realizó el segundo bioensayo con este formulado y su respectivo control, con algunas modificaciones en el diseño respecto al primer ensayo. El diseño de cada ensayo se detalla a continuación:

- En el primero se realizó la exposición a nueve concentraciones del PA de clorpirifos (0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 y 5 mg/L) y sus correspondientes controles de solvente

(0,001 y 0,005%). Las concentraciones del PA mayores o iguales a 0,1 mg/L son las que contienen como máximo un porcentaje de acetona de 0,005, mientras que las demás concentraciones contienen como máximo 0,001%. Se prepararon 8 recipientes de vidrio de 250 ml con 5 organismos de *B. straminea* cada uno por tratamiento (N= 40) con 200 ml de solución.

-En el segundo ensayo, se dispusieron 4 recipientes de vidrio de 250 ml para cada tratamiento, con 5 organismos cada uno (N= 20) y 200 ml de solución. Los tratamientos fueron: control de agua declorada y ocho concentraciones del FC de clorpirifos (0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 y 4 mg/L).

### 2.2.2 Concentración letal a las 48 h (CL<sub>50-48h</sub>)

Cuando hubo letalidad, se calculó el porcentaje de caracoles muertos a las 48 h como el número de organismos muertos sobre el total de organismos expuestos al mismo tratamiento.

Los resultados de letalidad se utilizaron para calcular la CL<sub>50</sub> a las 48 h (concentración a la cual se observa 50% de letalidad luego de 48 h de exposición) de acuerdo al método de análisis Probit para respuestas cuantales, graficando el porcentaje de letalidad en unidades Probit en función del logaritmo de la concentración (Finney, 1971). Si la mortalidad en los tratamientos controles (de agua declorada y de solvente) no fuera nula tiene que realizarse una corrección y si supera el 20% debe descartarse el ensayo. Se obtuvo también un intervalo de confianza del 95% (IC<sub>95</sub>) a partir de la siguiente fórmula:

$$f = s^{2,77/\sqrt{n}} \quad s = \frac{\frac{DL_{84}}{DL_{50}} + \frac{DL_{50}}{DL_{16}}}{2}$$

, siendo

Donde n' corresponde al total de organismos tratados entre las concentraciones que produjeron 16 a 84% inclusive de letalidad.

Así, los límites superior e inferior del IC<sub>95</sub> corresponden a CL<sub>50xf</sub> y CL<sub>50/f</sub>, respectivamente.

### 2.2.3 Determinación del NOEC y LOEC

Para determinar los valores de NOEC (por sus siglas en inglés: *No Observed Effect Concentration*; mayor concentración a la que no se observa efecto) y LOEC (por sus siglas en inglés: *Lowest Observed Effect Concentration*, menor concentración a la que se observa efecto) se contrastaron los resultados de letalidad a las 48 h de cada concentración de clorpirifos con su correspondiente control (control de agua declorada para el FC y controles de solvente para el PA) (Green et al., 2018).

### 2.2.4 Estimación de riesgo ecológico

La CEA (concentración esperada en el ambiente) del clorpirifos en aguas superficiales luego de 48 h (exposición aguda) post-aplicación corresponde a 10,8 µg/L (Marino y Ronco, 2005). Se calculó el coeficiente de riesgo (CR) para tiempos de exposición aguda como el cociente entre la CEA y los valores estimados de CL<sub>50</sub>-48h, como se detalló en la Introducción del presente capítulo (Bieczynski et al., 2021). Este coeficiente fue comparado contra un valor de nivel de preocupación (LOC, por sus siglas en inglés: *level of concern*), un instrumento que utiliza la USEPA para interpretar el CR y analizar el riesgo potencial para los organismos no blanco en pos de considerar la toma de acciones para la regulación de las sustancias evaluadas. Para animales acuáticos, se considera que si el CR excede el valor LOC agudo de 0,5 existe riesgo agudo de las especies no blanco por exposición a la sustancia.

Para comparar la toxicidad aguda entre el PA y el FC, se calculó el cociente entre sus CL<sub>50</sub>. De acuerdo a Schmuck et al. (1994), cuando el cociente es superior a 2 se puede considerar que el FC es más tóxico.

## 2.3 Exposiciones subcrónicas

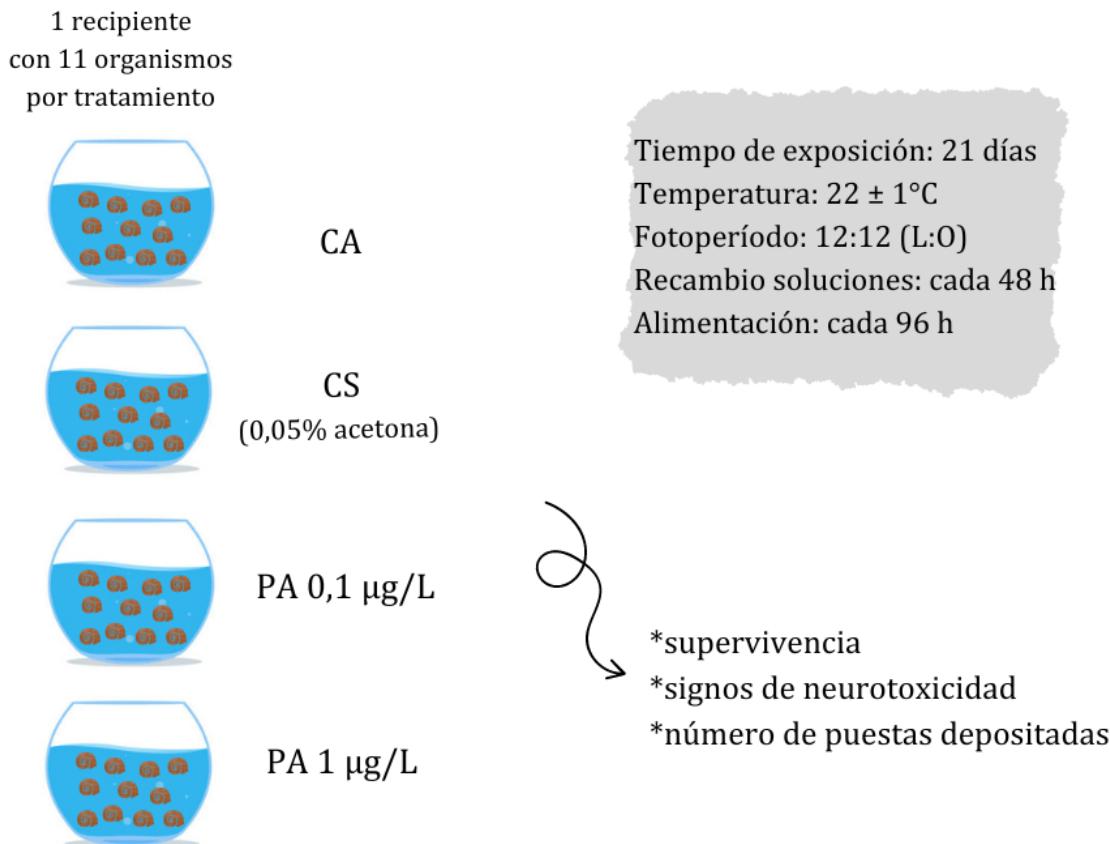
Se realizó un primer ensayo (preliminar) para evaluar si las condiciones propuestas (concentraciones de solvente y de plaguicida, tiempo de exposición, etc.) permitían llevar a cabo los bioensayos sin producir mortalidad. Además, tenía que ser posible el estudio de los parámetros reproductivos: era necesario que depositaran puestas bajo esas condiciones. Una vez finalizado el ensayo preliminar y en base a los resultados obtenidos, se diseñó y se llevó a cabo un segundo ensayo.

Las exposiciones subcrónicas se realizaron de acuerdo a las condiciones generales ya explicadas previamente. Las diferencias entre los diseños experimentales de los bioensayos se detallan a continuación.

### **2.3.1 Primer ensayo: preliminar**

#### **Diseño experimental**

Se realizó un bioensayo de 21 días con organismos de *B. straminea* expuestos a dos concentraciones del PA de clorpirifos (1 y 0,1 µg/L), y donde se incluyó un control de agua declorada pasivamente (CA; pH= 7,0; temperatura= 22 °C; conductividad= 246 µS/cm; OD= 8,8 mg/L) y un control de solvente (CS; 0,05% acetona que corresponde al mayor porcentaje en los tratamientos). Para cada tratamiento se dispuso 1 recipiente de vidrio de 1 L con 700 mL de solución conteniendo 11 organismos, como se muestra en la figura 28. Las soluciones fueron renovadas cada 48 h. Cada 24 h se evaluó la presencia de signos de neurotoxicidad y la supervivencia.



**Figura 28.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones subcrónicas a clorpirifos. Los tratamientos corresponden a CA, CS y dos concentraciones del PA de clorpirifos: 1 y 0,1 µg/L. CA: control de agua decolorada; CS: control de solvente: 0,05% de acetona; PA: principio activo. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

### Oviposición

Cada 48 h se contabilizó el número de puestas depositadas en cada recipiente, sin removerlas de los mismos. Al finalizar el bioensayo, se calculó el total de puestas depositadas por tratamiento a lo largo de los 21 días.

#### 2.3.2 Segundo ensayo

##### Diseño experimental: determinaciones bioquímicas y análisis histológico

Para realizar el segundo ensayo se tuvieron en cuenta los resultados que se obtuvieron en el primero con el fin de optimizar el diseño (ver Resultados).

Se prepararon 9 recipientes de vidrio de 250 ml para cada tratamiento, con 200 ml de solución y 6 caracoles en cada uno. Todos los recipientes fueron recubiertos internamente con acetato de celulosa. Los tratamientos fueron control de agua

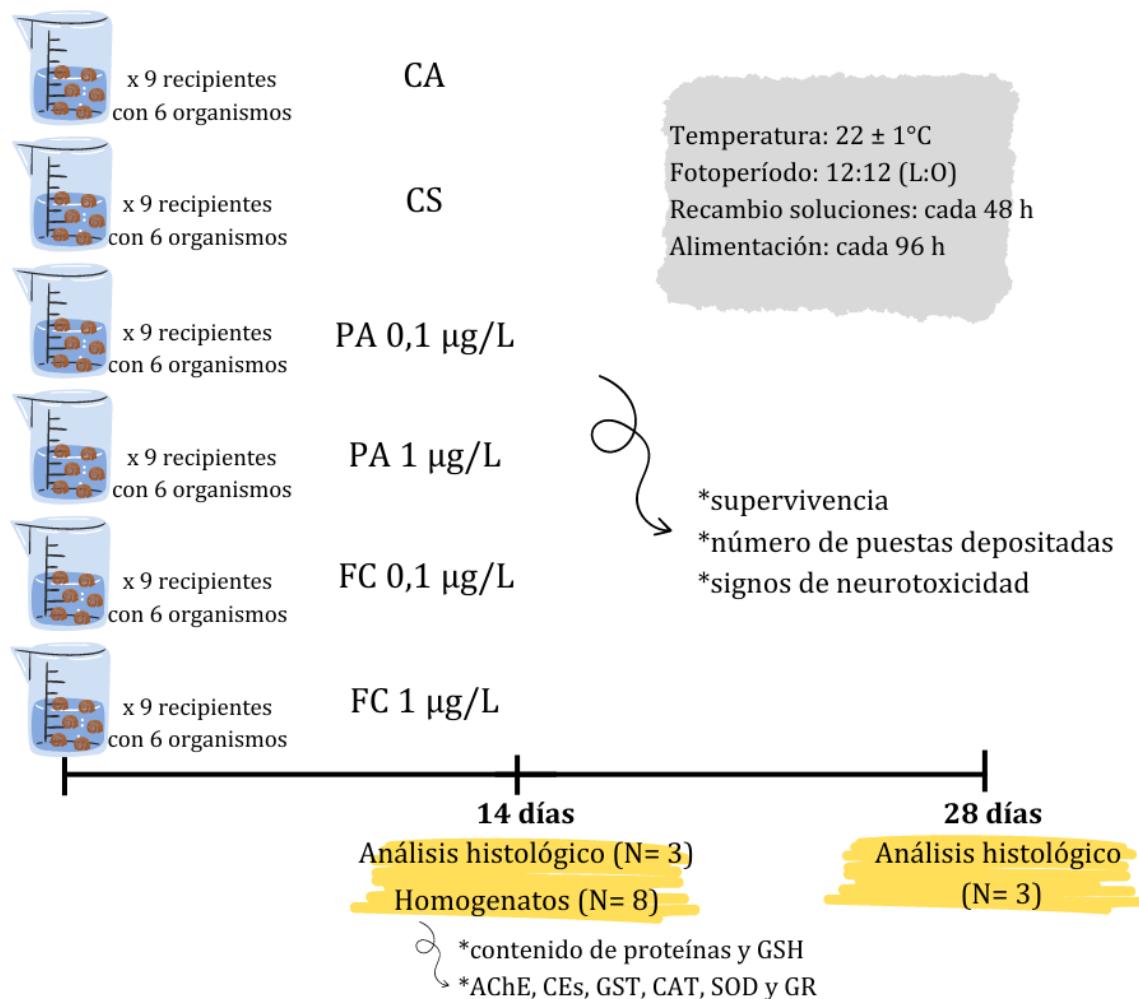
declorada (CA), control de solvente (CS; 0,001% acetona que corresponde al máximo porcentaje de acetona en los tratamientos con PA), dos concentraciones del PA de clorpirimifos (0,1 y 1 µg/L) y dos concentraciones del FC de clorpirimifos (0,1 y 1 µg/L). Los porcentajes de acetona en las soluciones de PA y en el control de solvente no superaron los valores recomendados para ensayos generales de toxicidad acuática (0,01%; OECD, 2010; Cossi et al., 2018) y para ensayos de reproducción (0,002%; Hutchinson et al., 2006).

La exposición se mantuvo durante 14 días con las condiciones estandarizadas de temperatura, fotoperíodo y alimentación de esta especie. Todas las soluciones se renovaron por completo cada 48 h para evitar la degradación del plaguicida (hidrólisis DT<sub>50</sub>: 16 días a 25°C; pH= 9; fotólisis DT<sub>50</sub>: 29,6 días a 25°C; pH= 7; European Chemical Agency, 2022; Herbert et al., 2021) y para mantener los niveles de OD estables durante todo el tiempo de exposición. Cada 48 h se cambiaron las capas de acetato y se registró la mortalidad, los signos de neurotoxicidad y el número de puestas depositadas en cada recipiente (las cuales se descartaron luego de ser contabilizadas).

A los 14 días de exposición se realizaron los homogenatos de tejido blando total haciendo un *pool* de 5 de los 6 caracoles del mismo recipiente, obteniéndose 8 homogenatos por tratamiento (N= 8). Un recipiente por tratamiento no se utilizó para hacer homogenatos. Los sobrenadantes correspondientes se utilizaron para las determinaciones bioquímicas (contenido total de proteínas, contenido de GSH, actividades enzimáticas de AChE, CES, GST, CAT, SOD y GR) según lo detallado en Metodología General. El caracol restante de cada recipiente fue utilizado para otras determinaciones realizadas en el laboratorio que no corresponden a esta tesis.

Los organismos del noveno vaso de cada tratamiento que no se utilizaron para hacer homogenatos, se destinaron al análisis histológico de la siguiente forma: 3 organismos se fijaron a los 14 días de exposición (N= 3) y los 3 restantes se mantuvieron expuestos en las mismas condiciones y se fijaron luego de 28 días de exposición (N= 3).

El diseño de este ensayo se muestra gráficamente en las figuras 29 y 30.



**Figura 29.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones subcrónicas a distintos tratamientos. Los tratamientos corresponden a CA, CS y dos concentraciones del PA y del FC de clorpirifos: 1 y 0,1 µg/L. CA: control de agua declorada; CS: control de solvente: 0,05% de acetona; PA: principio activo; FC: formulado comercial; AChE: acetilcolinesterasas; CEs: carboxilesterasas; GST: glutatión S-transferasa; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.



Figura 30. Fotografías de los bioensayos de exposición subcrónica de los adultos de *Biomphalaria straminea* a distintos tratamientos.

Los parámetros fisicoquímicos determinados en el agua declorada fueron los siguientes: pH=  $7,66 \pm 0,09$ ; temperatura=  $22 \pm 1$  °C; conductividad=  $205,75 \pm 1,26$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; OD=  $8,5 \pm 0,1$  mg/L y saturación de oxígeno=  $95,5 \pm 4,7\%$ .

#### Diseño experimental: parámetros reproductivos

En los recipientes de vidrio donde se expusieron los organismos adultos, se registraron las puestas depositadas a lo largo de los 14 días de exposición. Todas las puestas depositadas en las últimas 48 h (12-14 días de exposición de los organismos adultos) se observaron bajo el microscopio estereoscópico y se registró el número de huevos y de huevos embrionados por puesta.

Las puestas rotas o vacías fueron descartadas. De las puestas que quedaron, se intentó seleccionar al menos 1 de cada uno de los recipientes hasta llegar a 10 puestas

por tratamiento. En algunos tratamientos se separaron menos de 10 puestas ya que no había suficientes.

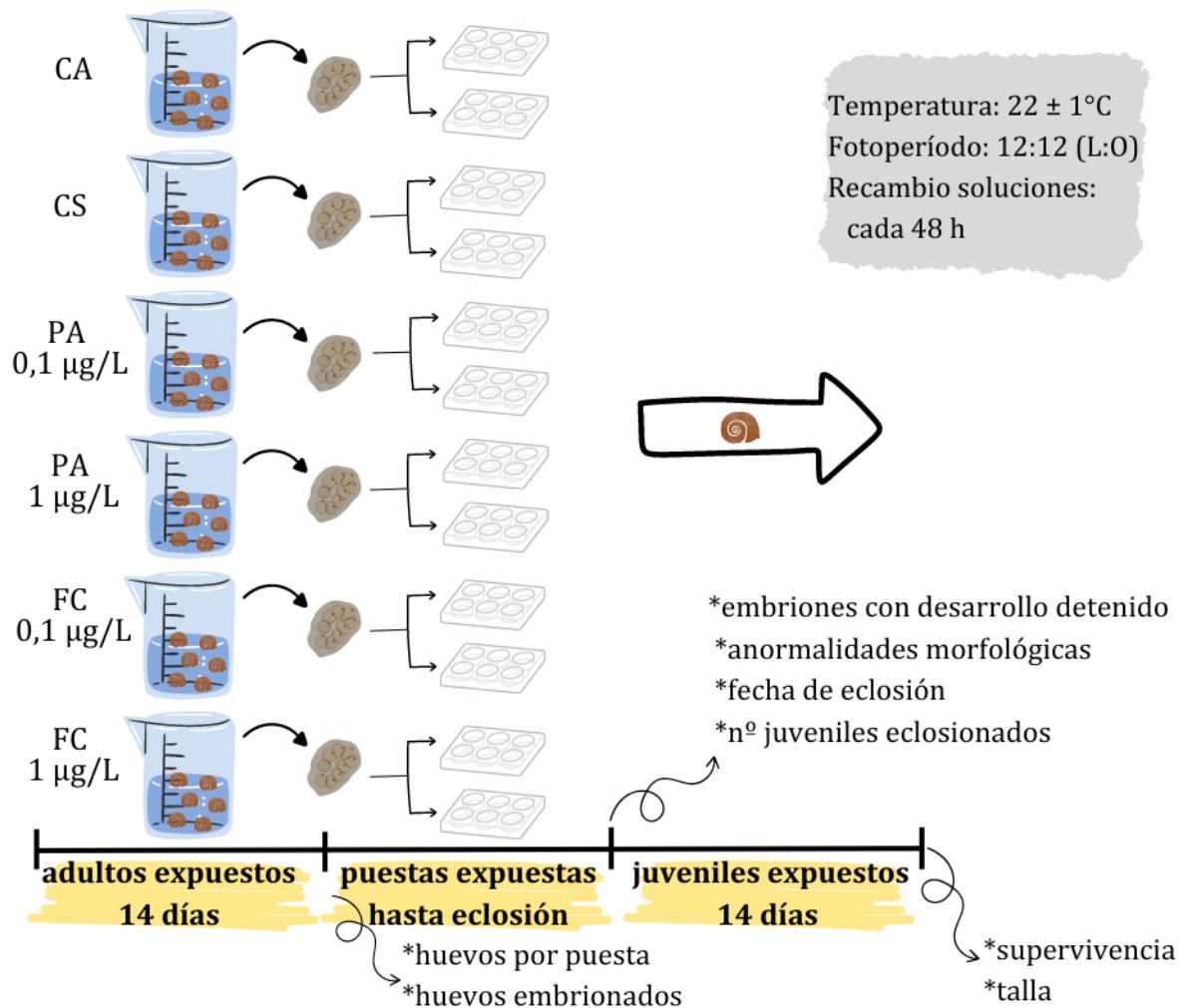
Las puestas seleccionadas (entre 7 y 10 puestas por tratamiento, N= 7-10) se colocaron individualmente en placas de 6 pocillos (figura 31) y se mantuvo la exposición a los mismos tratamientos colocando 10 mL de solución por pocillo. Las soluciones se renovaron cada 48 h, tanto durante el bioensayo de exposición de las puestas como de los juveniles. El bioensayo concluyó 14 días después de la fecha de la primera eclosión. Cada 24 h se observó cada puesta bajo microscopio estereoscópico y se registró la cantidad de embriones con desarrollo detenido en cada estadío, la presencia de anomalías morfológicas, la fecha de la primera y de la última eclosión, y el número de juveniles eclosionados.

Los juveniles fueron alimentados *ad libitum* desde su eclosión. Se calculó el tiempo y el porcentaje de eclosión de cada tratamiento como se detalló en la sección de Metodología General.

El ensayo de reproducción se puede observar resumido en la figura 32.



**Figura 31.** Fotografía de los bioensayos de exposición de las puestas y los juveniles de *Biomphalaria straminea* a distintos tratamientos en placas de wells de 6 pocillos.



**Figura 32. Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos a nivel reproductivo y de la descendencia en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a distintos tratamientos.** Los tratamientos corresponden a CA, CS y dos concentraciones del PA y del FC de clorpirifos: 1 y 0,1 µg/L. CA: control de agua declorada; CS: control de solvente; 0,001% de acetona; PA: principio activo; FC: formulado comercial. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

### Diseño experimental: supervivencia y calidad de la descendencia

Cuando se observaron anormalidades morfológicas en los juveniles, estas se clasificaron en una de las cuatro categorías definidas por Oliveira-Filho et al. (2010): malformaciones hidrólicas, de la concha, cefálicas (ojos y tentáculos) e inespecíficas. Por otro lado, basándose en Caixeta et al. (2022), las anormalidades de los tentáculos fueron clasificadas como: ausencia de tentáculos, tentáculos asimétricos (un tentáculo más corto que el otro) y tentáculos atrofiados (deformados).

Al finalizar la exposición, se clasificó a los juveniles de acuerdo a su tamaño en pequeños (< 1 mm), medianos (entre 1 y 2 mm) o grandes (> 2 mm).

Se calculó el porcentaje de supervivencia de los juveniles como se describió en la Metodología General.

### 3. Resultados

#### 3.1 Exposiciones agudas

En la tabla 6 se pueden observar los valores de letalidad que se obtuvieron con cada uno de los tratamientos luego de 48 h de exposición.

**Tabla 6. Letalidad aguda (48 h) en organismos adultos de *Biomphalaria straminea* expuestos a distintas concentraciones de clorpirifos.**

Tratamiento	Clorpirifos (mg/L)	nº organismos muertos	Letalidad (%)
CA	-	0	0
FC	0,001	0	0
	0,01	0	0
	0,1	2	10
	0,5	2	10
	1	6	30
	1,5	11	55
	2	16	80
	4	17	85
CS 0,001% acetona	-	0	0
CS 0,005% acetona	-	0	0
PA	0,001	0	0
	0,01	0	0
	0,1	2	5
	0,5	4	10
	1	10	24
	1,5	14	35
	2	22	55
	4	28	70
	5	33	83

CA: control de agua decolorada, CS: controles de solvente que corresponden a 0,001% y 0,005% de acetona, FC: formulado comercial de clorpirifos, PA: principio activo de clorpirifos. El N total del ensayo con los grupos FC y CA fue de 180 organismos. El N total del ensayo con los grupos PA y CS fue de 440 organismos.

Debido a que no hubo letalidad en los grupos controles CA y CS, no fue necesario realizar correcciones.

Los porcentajes de ejemplares muertos con cada una de las concentraciones de clorpirifos, se utilizaron para estimar las CL<sub>50</sub>-48h por el método probit. Para el FC resultó

ser 1,34 mg/L ( $IC_{95}$ = 1,02-1,70 mg/L) y para el PA 1,69 mg/L ( $IC_{95}$ = 1,59-1,80 mg/L). Con los mismos porcentajes de letalidad, fue posible estimar valores de NOEC y LOEC. El valor de NOEC correspondió a 0,5 mg/L y el de LOEC a 1 mg/L, tanto para el FC como para el PA (Test de Fisher; NOEC  $p>0,05$ ; LOEC  $p<0,05$ ; tabla 7).

Los valores de CR (CEA/ $CL_{50}$ ) calculados para el FC y para el PA corresponden a 0,008 y 0,006, respectivamente (tabla 7). Ambos valores se encuentran por debajo del límite LOC agudo (0,05) para especies acuáticas.

El cociente entre las  $CL_{50}$  del PA y del FC, resultó ser menor a 2, que es el valor a partir del cual puede considerarse como más tóxico al FC.

**Tabla 7. Parámetros de toxicidad aguda estimados en organismos adultos de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones agudas (48 h) a distintas concentraciones del principio activo (PA) y de un formulado comercial (FC) de clorpirifos.**

	NOEC	LOEC	$CL_{50}(IC_{95})$	CEA	$CR = CEA/CL_{50}$	$\frac{CL_{50}PA}{CL_{50}FC}$
FC	0,5 mg/L	1 mg/L	1,34 mg/L (1,02 - 1,70)		0,008	
PA	0,5 mg/L	1 mg/L	1,69 mg/L (1,59 - 1,80)	0,0108 mg/L	0,006	1,26

NOEC: mayor concentración a la que no se observa efecto, LOEC: menor concentración a la que se observa efecto,  $CL_{50}$ : concentración a la cual se observa 50% de letalidad,  $IC_{95}$ : intervalo de confianza del 95%, CEA: concentración estimada en el ambiente, CR: coeficiente de riesgo.

### 3.2 Exposiciones subcrónicas

#### 3.2.1 Primer ensayo: exposición al PA de clorpirifos

##### Signos de neurotoxicidad y letalidad

No se observó ningún signo de neurotoxicidad durante el tiempo de exposición en los organismos del grupo CA. En el grupo CS se registró un solo organismo retraído hacia el interior de la concha, y por lo tanto sin adhesión, el día 21 de exposición.

En el tratamiento con 0,1 µg/L del PA se registró un solo organismo retraído a partir del día 12, el cual puede observarse en la figura 33. La exposición a la concentración de 1 µg/L generó falta de adhesión en un organismo desde el noveno día y otro el día 14. En ningún caso, la cantidad de organismos con signos de neurotoxicidad resultó ser significativa con respecto al control (Test de Fisher;  $p>0,05$ ).



**Figura 33.** Signos de neurotoxicidad observados en un organismo adulto de *Biomphalaria straminea* expuesto a clorpirifos. **(A)** Región cabeza-pie normal. **(B)** Retracción hacia el interior de la concha y su consecuente falta de adherencia. Escala: 0,5 cm.

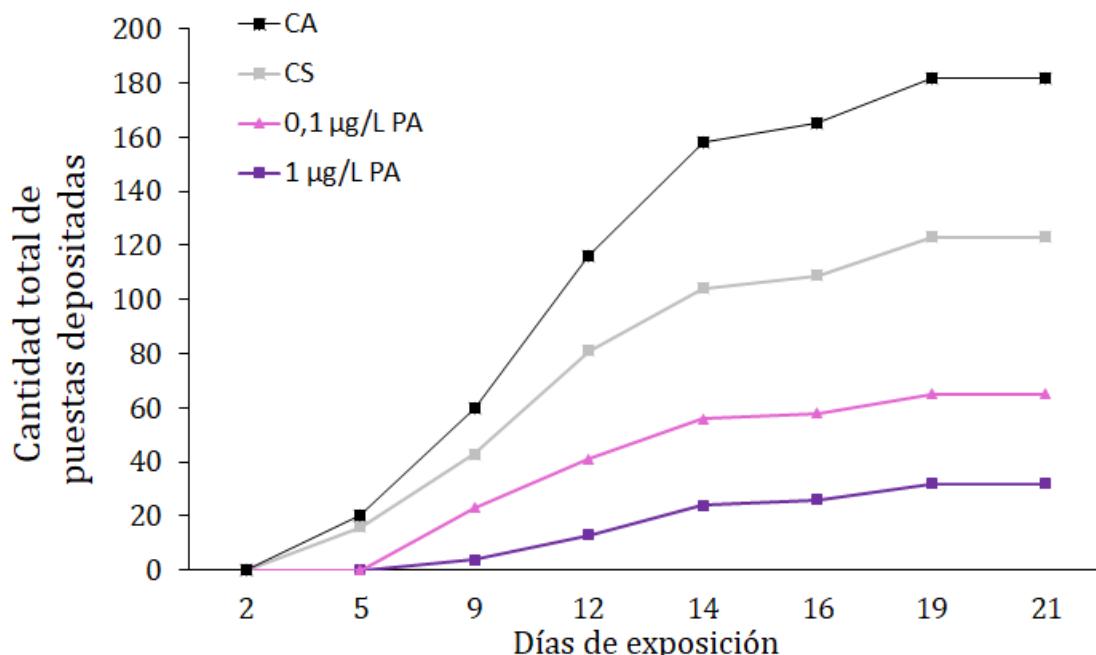
La cantidad de organismos muertos en cada grupo fue la siguiente:

- un organismo muerto el día 21 en CA (9%)
- dos organismos muertos en CS: uno el día 19 y otro el día 21 (18%)
- dos organismos muertos con 0,1 µg/L del PA el día 16 (18%)
- tres organismos muertos con 1 µg/L del PA el día 16 (27%)

A pesar de que los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Test de Fisher;  $p>0,05$ ), se tuvo en cuenta que al día 16 había valores altos de letalidad, principalmente en los tratamientos con el PA.

### Oviposición

La cantidad de puestas depositadas durante el bioensayo se puede observar en la figura 34.



**Figura 34. Cantidad total de puestas depositadas por los ejemplares de *Biomphalaria straminea* a lo largo de 21 días de exposición a distintos tratamientos.** Los tratamientos fueron: control de agua declorada (CA), control de solvente (0,05% de acetona; CS) y dos concentraciones del principio activo (PA) de clorpirimifos: 0,1 y 1 µg/L.

A partir del noveno día se observa que empieza a ser menor la cantidad de puestas depositadas en CS respecto a CA. Además, los individuos expuestos al solvente, depositaron una menor cantidad total de puestas en todo el bioensayo, respecto a CA. Los organismos de los tratamientos con el PA empezaron a depositar puestas más tarde que los controles. También, se observó una disminución en el número de puestas totales en forma proporcional a la concentración de clorpirimifos.

Hubo un efecto negativo de la concentración de solvente utilizada sobre el número de puestas que se depositaron y, en mayor medida, de los tratamientos con el PA.

### 3.2.2 Segundo ensayo: exposición al PA y al FC de clorpirimifos

A partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo y en vistas de evaluar parámetros reproductivos y de la descendencia en este segundo ensayo, se decidió bajar el porcentaje de acetona a 0,001%, tanto el CS como en los tratamientos con PA. Como se detalló en la Metodología del capítulo, para este segundo ensayo se modificó la cantidad de recipientes de vidrio por tratamiento, que además fueron de un volumen distinto. Se repitieron las concentraciones del primer ensayo disminuyendo el tiempo

de exposición a 14 días debido a que la letalidad no fue significativa con esas concentraciones en ese tiempo.

No hubo diferencias significativas en ningún biomarcador entre los organismos de los controles CA y CS (*t*-student,  $p>0,05$ ).

### 3.2.2.1 Signos de neurotoxicidad y letalidad

No se registraron signos de neurotoxicidad en ninguno de los tratamientos.

Entre los organismos de todos los tratamientos se registraron porcentajes bajos de letalidad (entre 2 y 10%), sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ). Los porcentajes de letalidad al finalizar los bioensayos para cada tratamiento se detallan en la tabla 8.

**Tabla 8. Porcentajes de letalidad de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones subcrónicas (14 días) a un formulado comercial (FC) y al principio activo (PA) de clorpirifos.**

	CA	CS	FC		PA	
			0,1 µg/L	1 µg/L	0,1 µg/L	1 µg/L
<b>Letalidad (%)</b>	$6 \pm 6$	$2 \pm 5$	$3 \pm 5$	$10 \pm 17$	$4 \pm 5$	$2 \pm 3$

CA: control de agua declarada, CS: control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona; FC: formulado comercial de clorpirifos; PA: principio activo de clorpirifos.

### 3.2.2.2 Marcadores bioquímicos

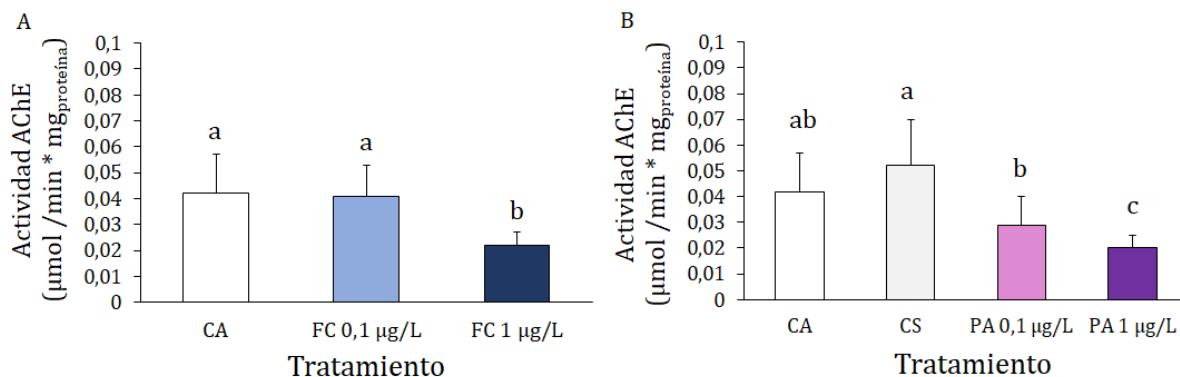
#### Contenido total de proteínas

No hubo variación significativa en el contenido total de proteínas de los organismos de los tratamientos, siendo el promedio  $\pm$  desvío estándar de todos los grupos  $1,83 \pm 0,15$  mg/g tejido (ANOVA;  $p>0,05$ ).

#### Actividad AChE

No se observaron diferencias significativas en la actividad AChE en los organismos expuestos a 0,1 µg/L del FC, respecto a CA (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 35.A). La exposición a 1 µg/L del FC inhibió significativamente la actividad de la enzima un 48% respecto a CA y un 47% respecto a la concentración de 0,1 µg/L (ANOVA;  $p<0,01$ ; figura 35.A). Por su parte, las exposiciones al PA produjeron inhibición significativa de la actividad AChE

tanto con la concentración de 0,1 µg/L como con la concentración de 1 µg/L respecto a CS (44 y 62% respectivamente); mientras que únicamente hubo diferencias entre los grupos 1 µg/L y CA (48% de inhibición) (ANOVA;  $p<0,001$ ; figura 35.B). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre CA y CS (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 35.B).

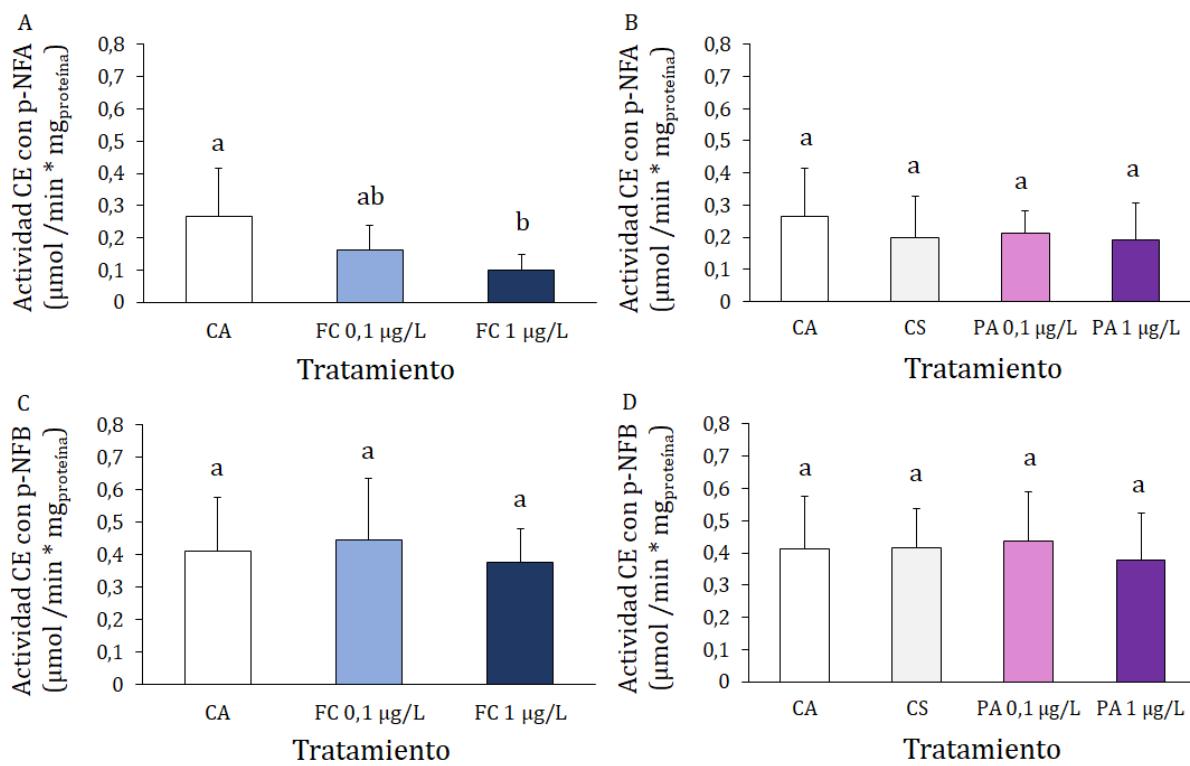


**Figura 35. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos a clorpirifos.** (A) Control de agua declorada (CA) y dos concentraciones de un formulado comercial (FC) de clorpirifos: 0,1 y 1 µg/L. (B) CA, control de solvente (0,001% de acetona; CS) y dos concentraciones del principio activo (PA) de clorpirifos: 0,1 y 1 µg/L. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones por tratamiento ( $N=8$ ). Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) se indican con diferentes letras.

### Actividad CEs

No hubo diferencias en la actividad CEs determinada con p-NFA como sustrato en los organismos expuestos a 0,1 µg/L respecto a los del grupo CA y a los expuestos a 1 µg/L (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 36.A). En cuanto a los organismos expuestos a 1 µg/L del FC, la actividad se inhibió un 62% respecto a los organismos del grupo CA (ANOVA;  $p<0,01$ ; figura 36.A). Por su parte, ninguna de las concentraciones del PA tuvieron efectos significativos sobre la actividad de estas enzimas respecto a los grupos controles (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 36.B).

Ninguna de las concentraciones del FC ni del PA modificaron la actividad CEs en los organismos expuestos respecto a los controles, cuando se determinó con p-NFB como sustrato (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 36.C,D).

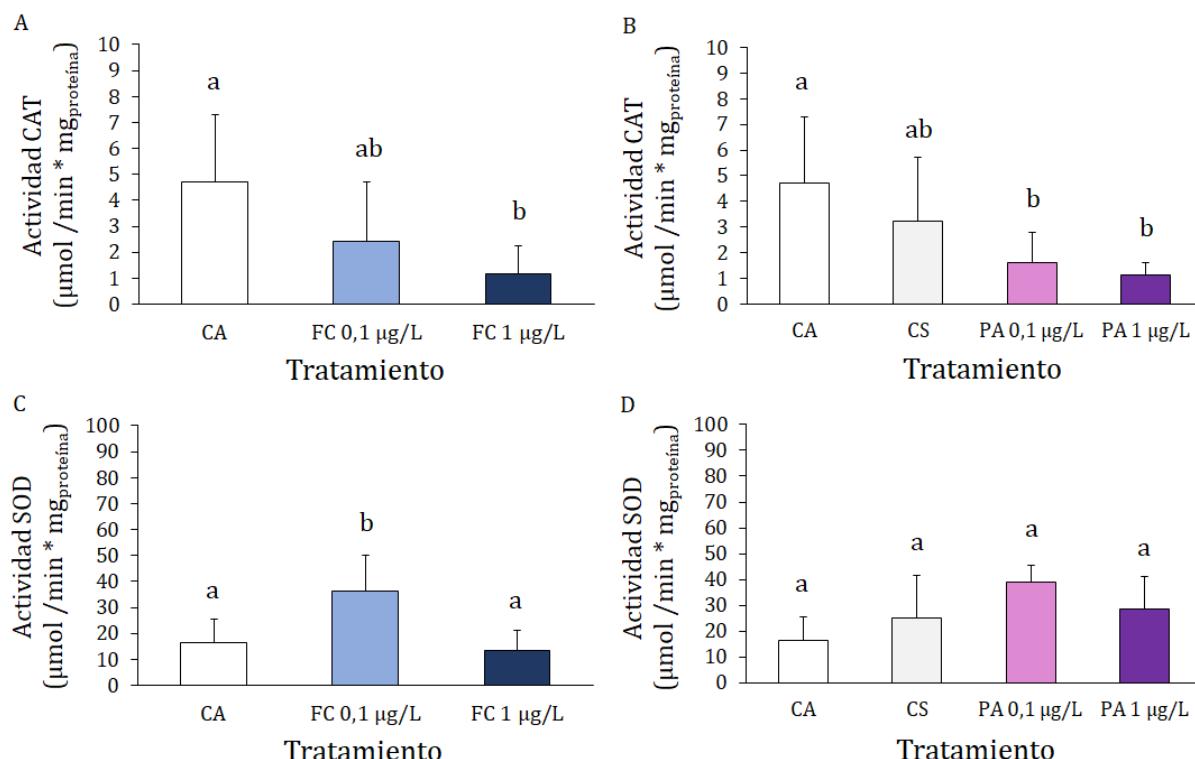


**Figura 36. Actividad de la enzima carboxilesterasa (CE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 14 días a clorpirifos.** (A) CEs con p-nitrofenil acetato (p-NFA): CA y dos concentraciones del FC de clorpirifos. (B) CEs con p-NFA: CA, CS y dos concentraciones del PA de clorpirifos. (C) CEs con p-nitrofenil butirato (p-NFB): CA y dos concentraciones del FC. (D) CEs con p-NFB: CA, CS y dos concentraciones del PA. CA: control de agua declorada; CS: control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona; PA: principio activo; FC: formulado comercial. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones por tratamiento (N=8). Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) se indican con diferentes letras.

### Actividad CAT y SOD

No hubo diferencias significativas en la actividad CAT en los organismos expuestos a 0,1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del FC respecto a los expuestos a 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  y los del grupo CA (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 37.A). En los organismos expuestos a 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del FC, se inhibió significativamente la actividad en un 75% respecto a los organismos de CA (ANOVA;  $p<0,01$ ; figura 37.A). En los organismos de los tratamientos con PA, se evidenció una disminución de la actividad CAT respecto a CS (28 y 50% de inhibición con 0,1 y 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del PA, respectivamente), a pesar de no ser estadísticamente significativa (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 37.B). En cambio, la disminución resultó ser significativa al compararse con la actividad determinada en los organismos del grupo CA (51 y 66 % con 0,1 y 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del PA, respectivamente) (ANOVA;  $p<0,05$ ; figura 37.B).

Con respecto a la actividad SOD, se observó un aumento significativo de esa actividad en los organismos expuestos a la concentración de 0,1 µg/L del FC respecto a los organismos del grupo CA (121% de aumento) y del tratamiento con 1 µg/L (172% de aumento) (ANOVA;  $p<0,01$ ; figura 37.C). Los tratamientos con ambas concentraciones del PA no causaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles ni entre los mismos (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 37.D).

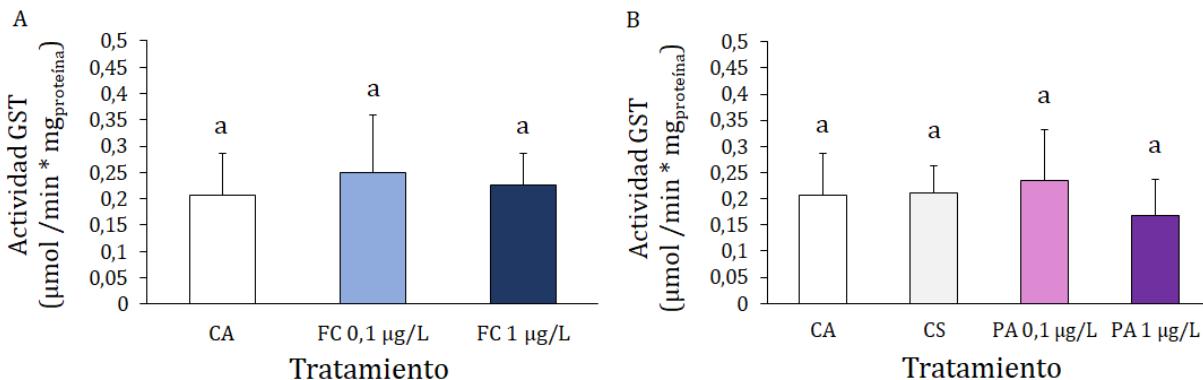


**Figura 37. Actividad de la enzima catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 14 días a distintos tratamientos.** (A) CA y dos concentraciones del FC de clorpirifos. (B) CA, CS y dos concentraciones del PA de clorpirifos. (C) CA y dos concentraciones del FC de clorpirifos. (D) CA, CS y dos concentraciones del PA de clorpirifos. CA: control de agua declorada; CS: control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona; PA: principio activo; FC: formulado comercial. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones por tratamiento ( $N= 8$ ). Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) se indican con diferentes letras.

### Actividad GST

La actividad GST no varió significativamente en los organismos expuestos a ambas concentraciones del FC respecto a los organismos de CA ni entre ambas concentraciones de FC (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 38.A). Tampoco hubo diferencias significativas entre los

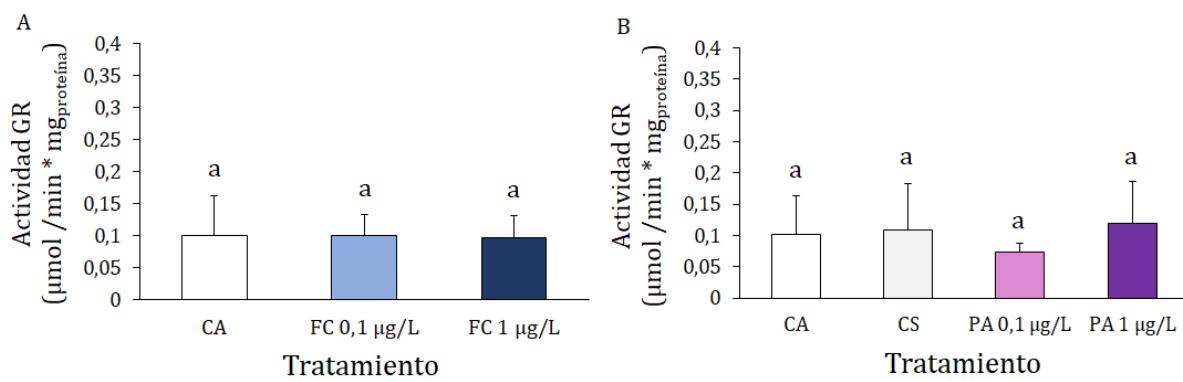
organismos expuestos a ambas concentraciones del PA ni con respecto a los controles (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 38.B).



**Figura 38.** Actividad de glutación S-transferasa (GST) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 14 días a diferentes tratamientos. (A) CA y dos concentraciones del FC de clorpirifos. (B) CA, CS y dos concentraciones del PA de clorpirifos. CA: control de agua declorada; CS: control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona; PA: principio activo; FC: formulado comercial. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones por tratamiento ( $N=8$ ). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

### Actividad GR

La actividad GR en los organismos expuestos a ambas concentraciones del FC no varió significativamente entre ambas concentraciones ni respecto a los organismos del grupo CA (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 39.A). Tampoco hubo diferencias significativas entre los organismos expuestos a ambas concentraciones del PA, ni respecto a los organismos de ambos controles (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 39.B).



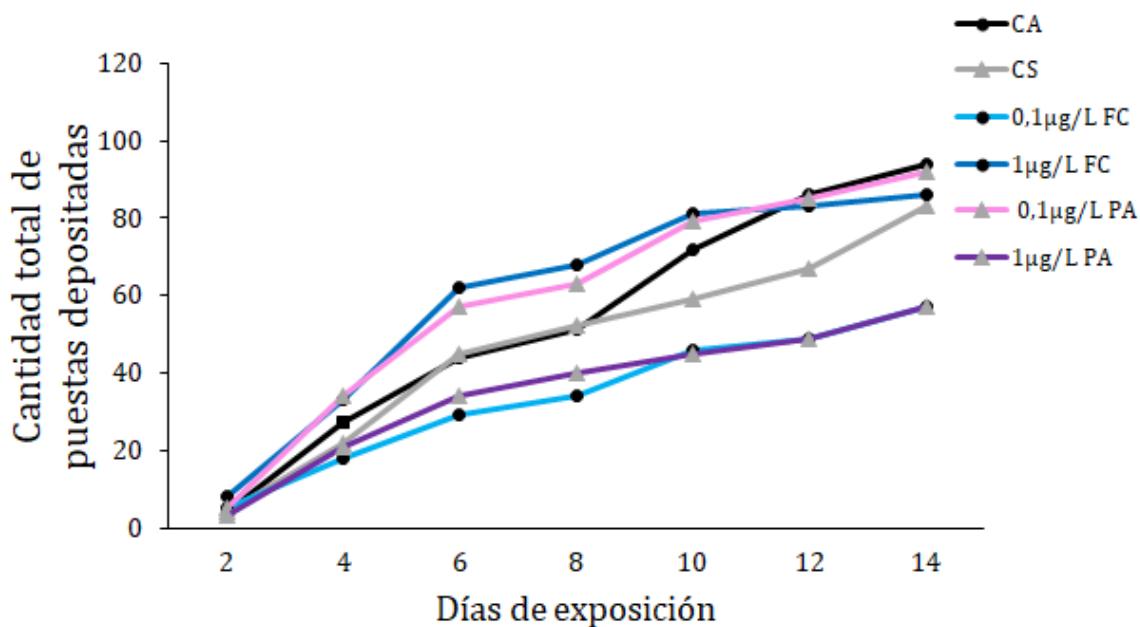
### Contenido de GSH

El contenido de GSH no varió significativamente entre los organismos de los distintos tratamientos, siendo el promedio ± desvío estándar de todos los organismos  $0,336 \pm 0,071 \text{ nmol/g}_{\text{tejido}}$  (ANOVA;  $p>0,05$ ).

#### 3.2.2.3 Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia

##### Oviposición

Los organismos adultos de todos los grupos comenzaron a depositar puestas de forma sincrónica a partir del cuarto día. Se observó que el tratamiento de  $0,1 \mu\text{g}/\text{L}$  del FC y el de  $1 \mu\text{g}/\text{L}$  del PA, produjeron que se depositaran una menor cantidad de puestas a lo largo de los 14 días en relación a los controles. A pesar de esto, al realizar el análisis estadístico, dichas diferencias resultaron ser no significativas (ANOVA;  $p>0,05$ ; figura 40; tabla 9).



**Figura 40.** Cantidad total de puestas depositadas por los ejemplares de *Biomphalaria straminea* a lo largo de 14 días de exposición a distintos tratamientos. Los tratamientos fueron control de agua declorada (CA), control de solvente (0,001% de acetona; CS) y dos concentraciones del principio activo (PA) y del formulado comercial (FC) de clorpirifos: 0,1 y 1 µg/L.

Las puestas depositadas por los organismos adultos de los diferentes tratamientos tuvieron un número similar de huevos, los cuales se encontraban embrionados en un 99-100% (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 9).

No se observaron anomalías morfológicas en los huevos ni en las puestas para ninguno de los tratamientos.

### Eclosión

No se observaron diferencias significativas en el tiempo (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 9) ni en el porcentaje de eclosión entre los organismos expuestos al PA y los controles (Test de Fisher para porcentajes totales y ANOVA para porcentajes por puesta;  $p>0,05$ ; tabla 9). En cambio, las exposiciones a ambas concentraciones del FC aumentaron el tiempo de eclosión (alrededor de 3 días) de los juveniles respecto a los provenientes del control CA (ANOVA;  $p<0,01$ ; tabla 9). También se observó una disminución en el porcentaje de juveniles eclosionados respecto a CA (disminuciones entre 10 y 14%) de forma estadísticamente significativa por exposición a ambas concentraciones del FC cuando se

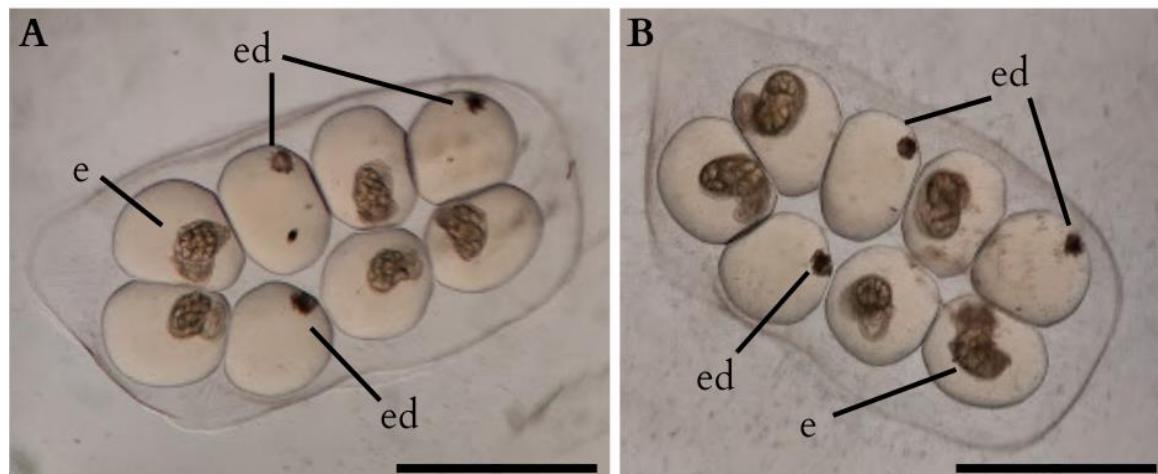
calculó como porcentaje de eclosión total (Test de Fisher;  $p<0,01$ ; tabla 9), y con la mayor concentración cuando se calculó por puesta (ANOVA;  $p<0,01$ ; tabla 9).

La figura 41 muestra los embriones de una puesta expuesta a 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del FC, donde se pueden observar embriones que murieron al quinto día en el estadio de trocófora.

**Tabla 9. Parámetros reproductivos evaluados en las puestas depositadas por ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones subcrónicas (14 días) a diferentes concentraciones de un formulado comercial (FC) y del principio activo (PA) de clorpirifos.**

	Puestas depositadas		Huevos por puesta	Huevos embrionados (%)	Eclosión		
	promedio	total			tiempo (días)	% total	% por puesta
CA	15,7 ± 4,2 <sup>a</sup>	94	13,6 ± 4,9 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	11,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	99,3 <sup>a</sup>	99 ± 4 <sup>a</sup>
FC 0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$	9,5 ± 3,3 <sup>a</sup>	57	12,0 ± 7,3 <sup>a</sup>	99 ± 3 <sup>a</sup>	14,2 ± 2,9 <sup>b</sup>	89,3 <sup>b</sup>	77 ± 38 <sup>a</sup>
FC 1 $\mu\text{g}/\text{L}$	14,3 ± 5,4 <sup>a</sup>	86	12,8 ± 4,6 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	13,7 ± 1,1 <sup>b</sup>	84,4 <sup>b</sup>	82 ± 31 <sup>b</sup>
CA	15,7 ± 4,2 <sup>a</sup>	94	13,6 ± 4,9 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	11,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	99,3 <sup>a</sup>	99 ± 4 <sup>a</sup>
CS	13,8 ± 6,2 <sup>a</sup>	83	12,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	99 ± 3 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	93,3 <sup>a</sup>	95 ± 8 <sup>a</sup>
PA 0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$	15,3 ± 6,2 <sup>a</sup>	92	12,7 ± 3,2 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	98,0 <sup>a</sup>	98 ± 6 <sup>a</sup>
PA 1 $\mu\text{g}/\text{L}$	9,5 ± 4,8 <sup>a</sup>	57	12,1 ± 4,0 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	96,7 <sup>a</sup>	97 ± 4 <sup>a</sup>

Los adultos y las puestas fueron expuestos a 0,1 y 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  de un FC y del PA de clorpirifos. Se incluyeron controles de agua corriente declarada (CA) y de solvente (0,001% de acetona, CS). Los porcentajes de eclosión fueron calculados sobre el total de huevos embrionados y como promedio por puesta. Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).



**Figura 41. Fotografías de embriones con desarrollo detenido dentro de una puesta de *Biomphalaria straminea* expuesta a 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  del FC de clorpirifos. (A) Día 5 de desarrollo; (B) Día 6 de desarrollo. e: embrión con desarrollo normal; ed: embrión detenido; FC: formulado comercial. Escala: 0,5 mm.**

### Supervivencia y malformaciones en los juveniles

En los juveniles expuestos a 1 µg/L del FC, se observó una disminución significativa en la supervivencia a los 14 días respecto a los juveniles de CA, al ser calculado el porcentaje respecto al total de juveniles eclosionados (ANOVA; p<0,001; tabla 10). En el caso del PA, luego de las exposiciones a ambas concentraciones, hubo disminuciones significativas en la supervivencia respecto a CS (porcentajes sobre el total de juveniles eclosionados) (ANOVA; p<0,001; tabla 10).

En todos los tratamientos el mayor porcentaje de juveniles presentaron una talla > 2 mm, en menor proporción entre 1 y 2 mm y solo algunos tenían talla < 1 mm (tabla 10). No hubo diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo de tamaño con los diferentes tratamientos (Test de Chi-cuadrado; p>0,05; tabla 10).

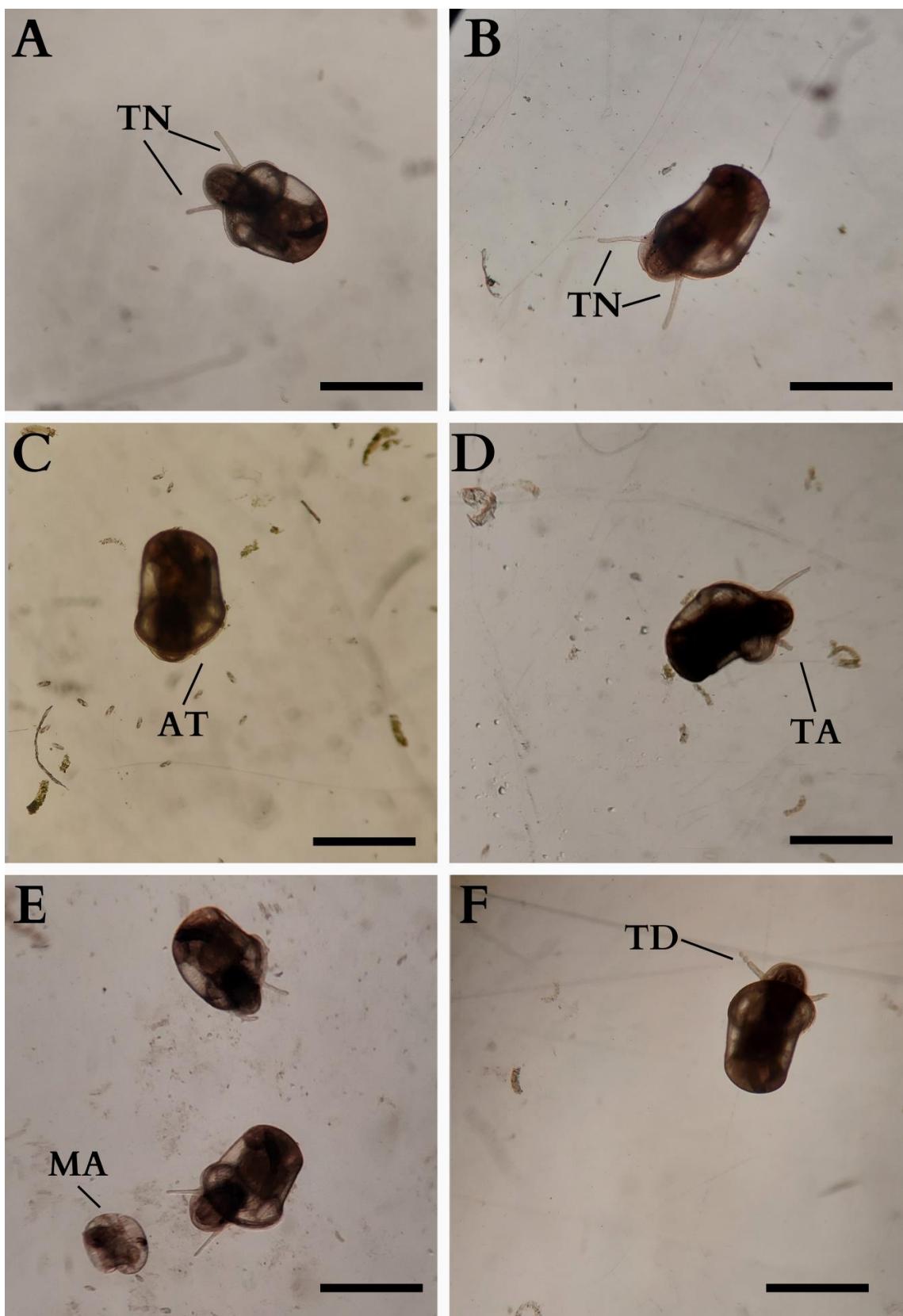
**Tabla 10. Supervivencia y calidad de la descendencia evaluada en juveniles de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones subcrónicas (14 días) a distintos tratamientos con un formulado comercial (FC) y el principio activo (PA) de clorpirifos.**

	Supervivencia		Tamaño (%)		
	% total	% por puesta	pequeño (< 1 mm)	mediano (1-2 mm)	grande (>2 mm)
CA	98,5 <sup>a</sup>	99 ± 3 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	80,2 <sup>a</sup>
FC 0,1 µg/L	97,3 <sup>a</sup>	96 ± 6 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	8,1 <sup>a</sup>	91,9 <sup>a</sup>
FC 1 µg/L	83,1 <sup>b</sup>	88 ± 15 <sup>a</sup>	4,7 <sup>a</sup>	19,8 <sup>a</sup>	75,5 <sup>a</sup>
CA	98,5 <sup>a</sup>	99 ± 3 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	80,2 <sup>a</sup>
CS	98,6 <sup>a</sup>	99,1 ± 2,6 <sup>a</sup>	5,4 <sup>a</sup>	16,3 <sup>a</sup>	78,3 <sup>a</sup>
PA 0,1 µg/L	81,3 <sup>b</sup>	83 ± 33 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	15,1 <sup>a</sup>	82,8 <sup>a</sup>
PA 1 µg/L	88,9 <sup>b</sup>	82 ± 37 <sup>a</sup>	3,8 <sup>a</sup>	19,2 <sup>a</sup>	76,9 <sup>a</sup>

CA: control de agua declorada, CS: control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona, FC: formulado comercial de clorpirifos, PA: principio activo de clorpirifos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Se evidenciaron malformaciones en algunos juveniles provenientes de los tratamientos con clorpirifos, tanto con el FC como con el PA. Todas las malformaciones observadas fueron del tipo cefálicas en los tentáculos, excepto un solo juvenil proveniente del tratamiento con 0,1 µg/L del PA que mostró malformaciones inespecíficas (amorfo) (figura 42.E). Los tres tipos de malformaciones en los tentáculos que se definieron en la Metodología, se observaron tanto con el FC como con el PA. Los juveniles de los grupos controles no presentaron malformaciones. La figura 42 muestra

juveniles controles y juveniles con malformaciones, amorfos y de menor tamaño provenientes de los distintos tratamientos con clorpirifos.



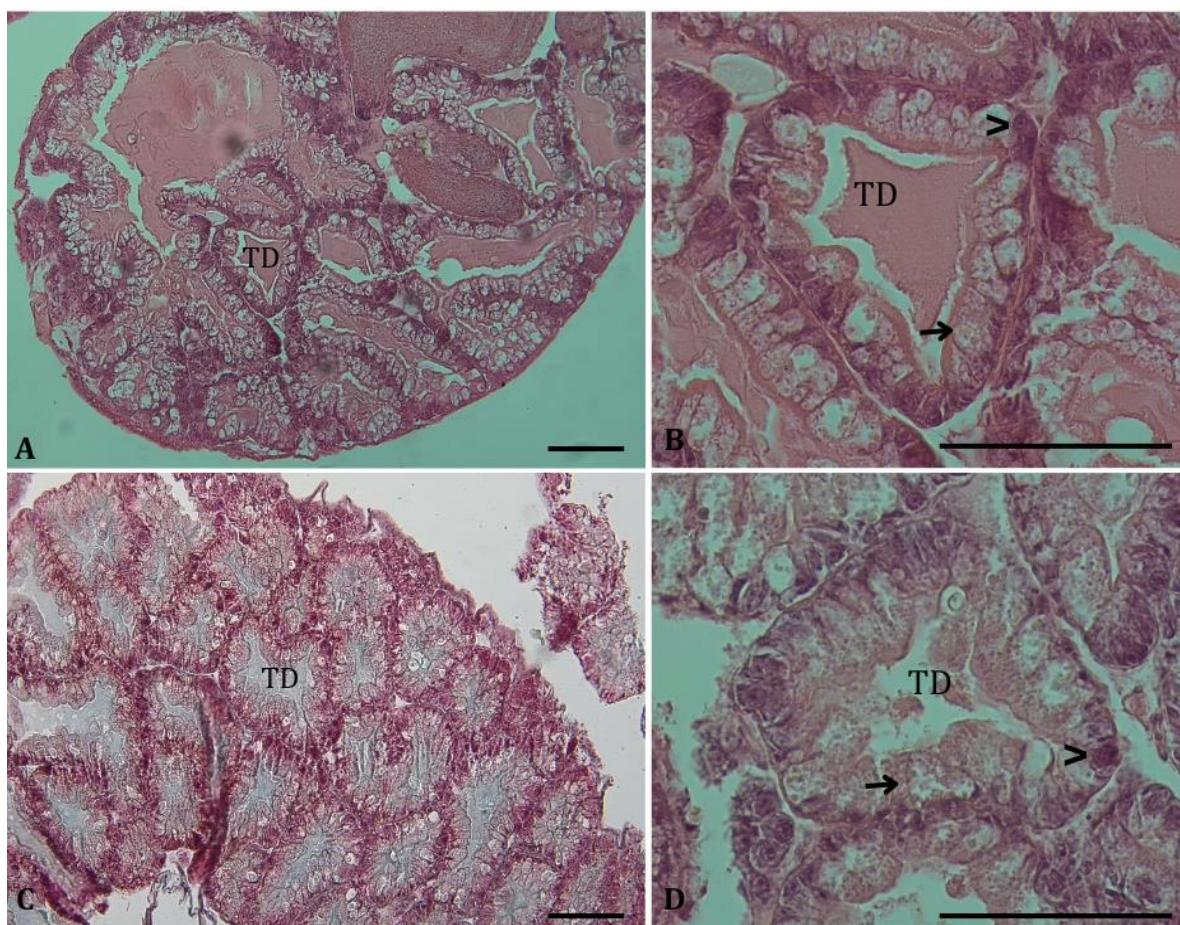
**Figura 42.** Juveniles de *Biomphalaria straminea* expuestos durante 14 días a diferentes concentraciones de un formulado comercial (FC) y del principio activo (PA) de clorpirifos. (A,B) Tentáculos de morfología normal en juveniles que eclosionaron de puestas provenientes de CA. (C) Juvenil con ausencia de tentáculos que eclosionó del tratamiento con 1 µg/L del FC de clorpirifos. (D) Tentáculo asimétrico en un juvenil que eclosionó del tratamiento con 0,1 µg/L del PA de clorpirifos. (E) Juvenil malformado/amorfo que eclosionó del tratamiento con 0,1 µg/L del PA de clorpirifos. (F) Tentáculo atrofiado/deformado en

un juvenil que eclosionó del tratamiento con 1 µg/L del PA de clorpirifos. CA: control de agua declorada; TN: tentáculo normal; TD: tentáculo deformado; TA: tentáculo asimétrico; AT: ausencia de tentáculos; MA: juvenil malformado/amorfo. Escala 1 mm.

### 3.2.2.4 Análisis histológico

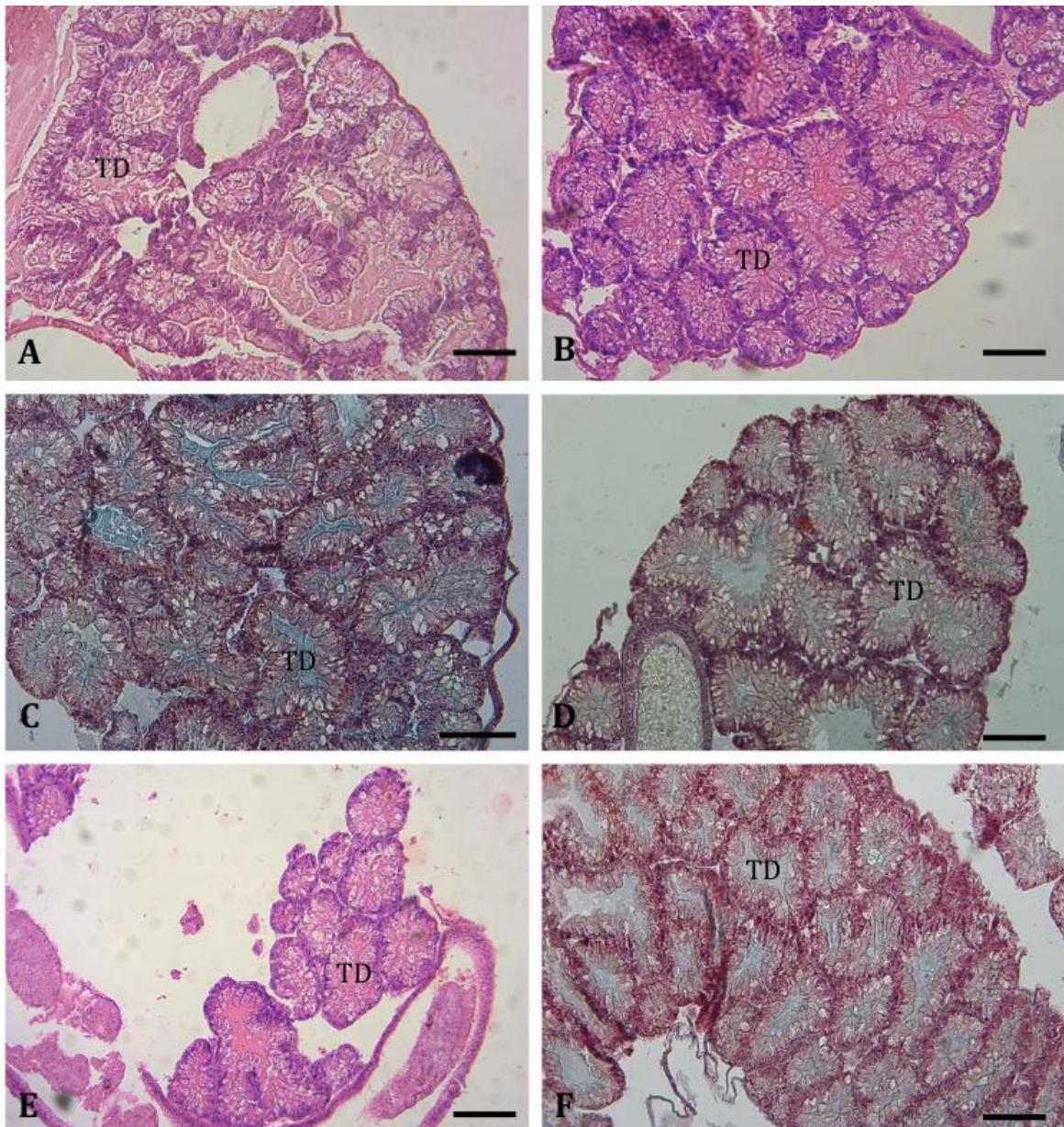
#### Glándula digestiva

En la glándula digestiva se observaron túbulos digestivos con epitelio simple. En los epitelios se distinguieron dos tipos celulares principales: células basófilas y células digestivas, siendo las células digestivas las más abundantes. Al observar los lúmenes de los túbulos digestivos, estos presentaron forma de "Y" o "estrellada" (figura 43).

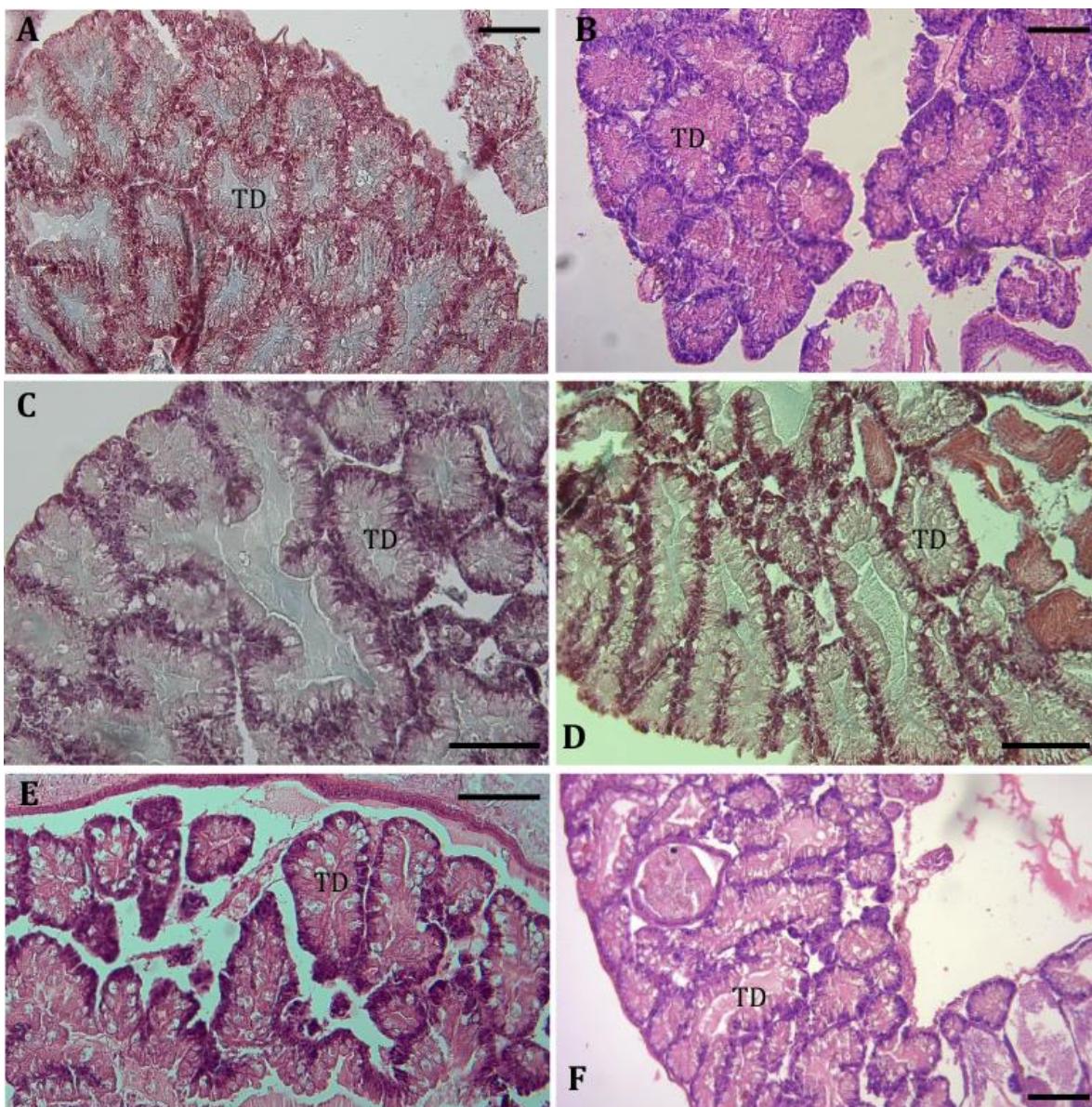


**Figura 43. Fotomicrografías de secciones longitudinales de la glándula digestiva de ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea*. (A,B)** Control de agua declorada luego de 14 días. **(C,D)** Control de agua declorada luego de 28 días. TD: túbulos digestivos; punta de flecha: células del tipo basófilas; flecha: células del tipo digestivas. Escala: 50 µm. Coloración: Hematoxilina-Eosina.

No se detectó atrofia, necrosis y/u otra alteración en los túbulos digestivos luego de las exposiciones a los distintos tratamientos, ni a los 14 días (figura 44) ni a los 28 días (figura 45).

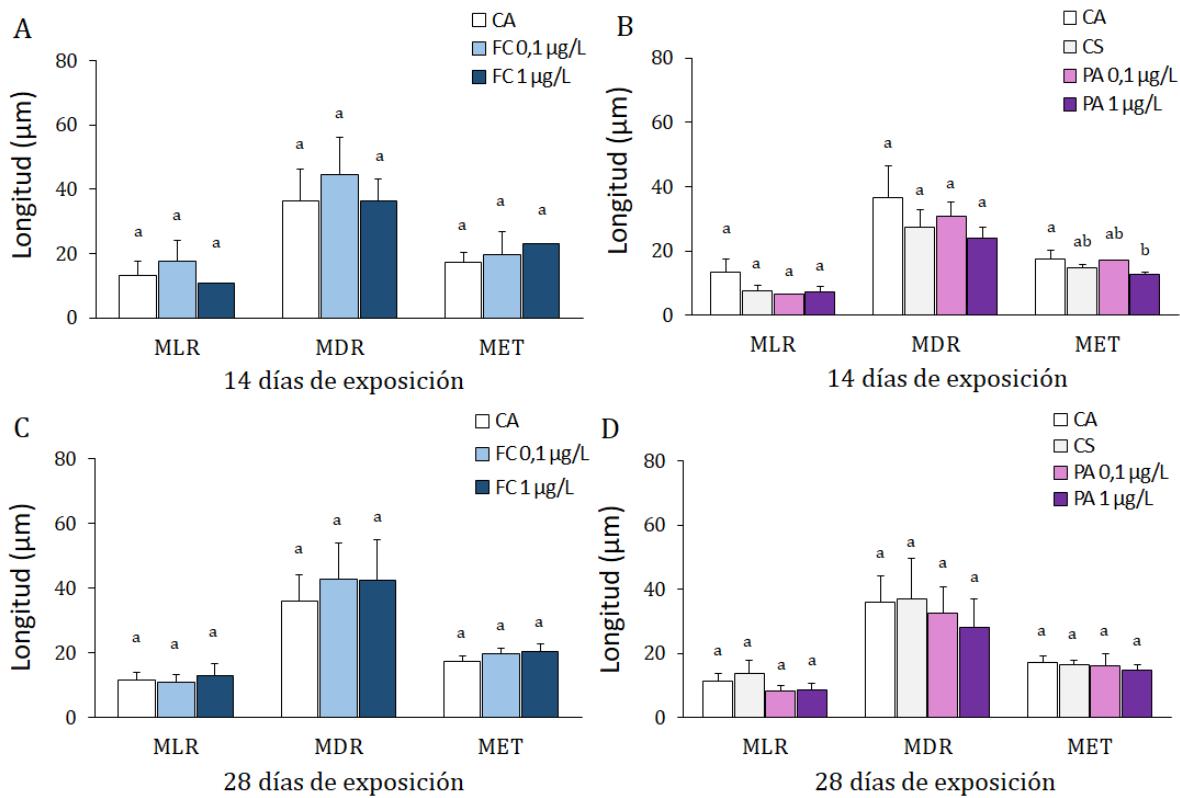


**Figura 44.** Fotomicrografías de secciones longitudinales de la glándula digestiva de ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* expuestos a distintos tratamientos por 14 días. (A) Control de agua declorada. (B) Control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona. (C) 0,1 µg/L del FC de clorpirifos. (D) 1 µg/L del FC de clorpirifos. (E) 0,1 µg/L del PA de clorpirifos. (F) 1 µg/L del PA de clorpirifos. FC: formulado comercial; PA: principio activo; TD: túbulos digestivos. Escala: 50 µm. Coloración: Hematoxilina-Eosina (A,B,E), Tricrómico de Masson (C,D,F).



**Figura 45.** Fotomicrografías de secciones longitudinales de la glándula digestiva de ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* expuestos a distintos tratamientos por 28 días. (A) Control de agua declorada. (B) Control de solvente que corresponde a 0,001% de acetona. (C) 0,1 µg/L del FC de clorpirimifos. (D) 1 µg/L del FC de clorpirimifos. (E) 0,1 µg/L del PA de clorpirimifos. (F) 1 µg/L del PA de clorpirimifos. FC: formulado comercial; PA: principio activo; TD: túbulos digestivos. Escala: 50 µm. Coloración: Hematoxilina-Eosina (A,B,E,F), Tricrómico de Masson (C,D).

De forma preliminar (debido a que el N fue muy bajo), no se observaron alteraciones en la mayoría de los parámetros planimétricos que se calcularon de los túbulos digestivos con ninguno de los tratamientos a los 14 o a los 28 días (Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 46.A,B,C,D). En los organismos expuestos por 28 días a 1 µg/L del PA, se observó una disminución de MET respecto a ese mismo parámetro medido en los organismos del grupo CA (Test de Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ ; figura 46.B).



**Figura 46.** Valores de los radios medios de los lúmenes (MLR), los radios medios de los túbulos (MDR) y las alturas epiteliales de túbulos digestivos (MET) de *Biomphalaria straminea* expuestos a distintos tratamientos con clorpirifos. CA y dos concentraciones de un FC de clorpirifos (0,1 y 1 µg/L) luego de 14 (A) y 28 (C) días de exposición. CA, CS (0,001% de acetona) y dos concentraciones del PA de clorpirifos (0,1 y 1 µg/L) luego de 14 (B) y 28 (D) días de exposición. CA: control de agua declorada; FC: formulado comercial; CS: control de solvente; PA: principio activo. Los resultados corresponden al promedio ± el desvío estándar de al menos 10 túbulos digestivos de 1 ejemplar (N= 1) para los tratamientos con 1 µg/L de FC y con 0,1 µg/L del PA por 14 días; los demás resultados corresponden al promedio ± el desvío estándar de los parámetros de 3 ejemplares (N= 3). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p<0,05$ ).

## Gónadas

No fue posible observar gónadas en todos los organismos que se destinaron al análisis histológico, por lo tanto se presentan estos resultados como preliminares. Las gónadas presentaron organización en acinos donde se pudieron diferenciar gametas de ambos sexos en diferentes estadios, siendo predominantes las gametas masculinas.

No se registraron alteraciones histopatológicas (alteración de la arquitectura normal, necrosis, hiperplasia e hipertrofia o fibrosis en los acinos) luego de las exposiciones a clorpirifos (figura 48). Se observaron oocitos atrésicos en algunos tratamientos, pero en todos los casos hubo preponderancia de oocitos normales.

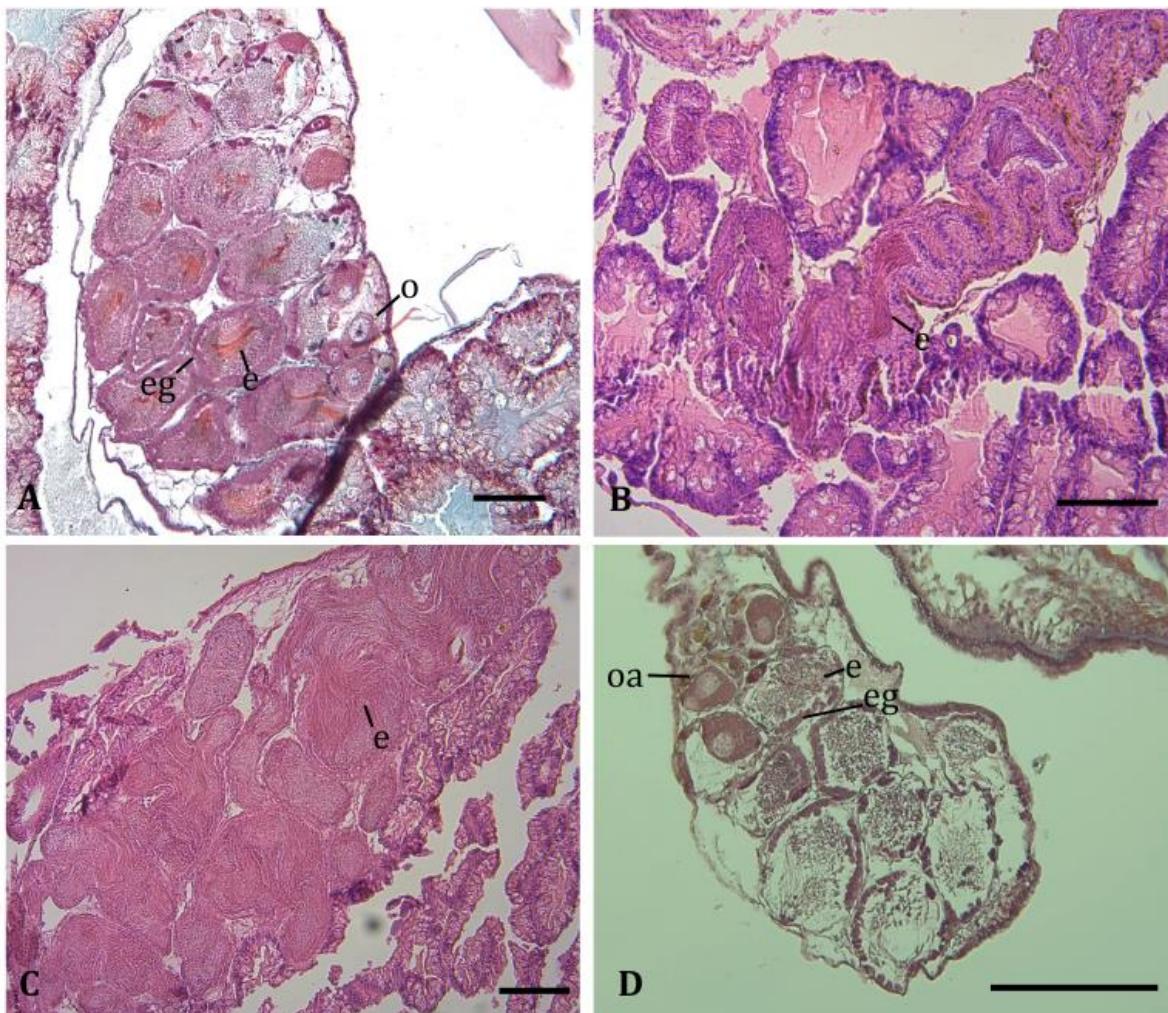


Figura 48. Fotomicrografías de secciones longitudinales del ovotestis de ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* expuestos a diferentes tratamientos. (A) Control de agua declorada luego de 14 días. (B) Control de solvente luego de 28 días, que corresponde a 0,001% de acetona. (C) 14 días de exposición a 1 µg/L del principio activo de clorpirifos. (D) 28 días de exposición a 1 µg/L de un formulado comercial de clorpirifos. Siendo o: oocito, oa: oocito atrésico; e: espermatozoides, eg: epitelio germinal. Escala: 50 µm. Coloración A-B: Tricrómico de Masson, C-D: Hematoxilina-Eosina.

#### 4. Discusión Capítulo I

Existen normas y procedimientos que deben respetar los fabricantes de plaguicidas para que sus productos puedan salir al mercado o bien, si desean promover nuevas aplicaciones de productos ya autorizados. Las empresas deben presentar, entre otra documentación, resultados de estudios toxicológicos en los cuales la concentración en el ambiente, resultante de la aplicación del plaguicida, sea marcadamente menor que la dosis considerada segura. Si eso ocurre, se aprueba el uso y la venta de los productos comerciales que contengan dicho PA, como así también procedimientos específicos de su aplicación que deben respetarse: tipo de cultivos sobre los que se aplican, frecuencia de la aplicación, volúmenes de aplicación, distancia entre el área a tratar y las zonas residenciales, entre otros. Suele ocurrir que distintos países tomen decisiones diferentes sobre un mismo plaguicida en cuanto a los permisos de aplicación o prohibición de uso.

Los estudios de toxicidad suelen llevarse a cabo en animales con cierta similitud anatómica y fisiológica con los humanos (ratas, ratones, perros) y en otras especies de animales y vegetales no blanco (aves, peces, abejas). Son estudios acotados en cuanto a las especies que involucran y a los estadios evaluados. Posterior a la aprobación de un plaguicida, es común que se registre resistencia por parte de las plagas y en consecuencia se comiencen a utilizar volúmenes mayores, mezclas de compuestos y/o se reduzca el tiempo entre las aplicaciones.

Es importante estudiar los efectos que tienen los plaguicidas sobre especies no blanco, por fuera de los modelos estandarizados y ya conocidos, y especialmente sobre especies nativas. De esta forma, es posible predecir el impacto real que podría ocurrir sobre los ecosistemas y su biodiversidad, y contemplar no solo los peligros potenciales sobre el ser humano, sino también sobre el ambiente. Este capítulo tuvo como objetivo estudiar y comparar los efectos producidos por la exposición al clorpirifos como PA y como un FC en el gasterópodo *B. straminea*, que representa una especie no blanco de dicho plaguicida. Se empleó una batería de biomarcadores que incluyeron desde respuestas bioquímicas, histológicas y comportamentales, hasta éxito reproductivo y supervivencia de adultos y juveniles. Si bien existen trabajos donde se estudiaron los efectos del clorpirifos en gasterópodos acuáticos, la mayoría de ellos se limitaron a evaluar la toxicidad aguda del PA en organismos adultos (Cacciatore et al. 2015; Garate et al., 2020; Herbert et al., 2021; Ibrahim y Hussein, 2022).

Los porcentajes de letalidad obtenidos luego de las exposiciones agudas de adultos de *B. straminea* al PA al FC permitieron estimar los valores de NOEC, LOEC, CL<sub>50</sub> y CR. Dichos parámetros no presentaron diferencias entre el PA y el FC, lo cual refuerza el resultado obtenido del cociente entre ambas CL<sub>50</sub>, que al ser <2 indica que el FC no presenta mayor toxicidad que el PA. Al estimar los valores de NOEC y LOEC, hay que tener en cuenta que estos resultados son experimentales quedando una zona de incertidumbre entre ambos. Los resultados de las exposiciones agudas de este capítulo, evidencian que las concentraciones estimadas de NOEC y LOEC (0,5 y 1 mg/L, respectivamente) están por encima de la máxima concentración de clorpirifos detectada en cuerpos de agua de nuestro país de 10,8 µg/L (Marino y Ronco, 2005), y por ende, lo mismo ocurre con las CL<sub>50</sub>. La estimación de CR, por su parte, resultó menor a los límites sugeridos, lo que lleva a considerar al clorpirifos como seguro para la biota acuática. En conjunto todos estos resultados estarían indicando que el clorpirifos es seguro para *B. straminea* en relación a su toxicidad aguda. Sin embargo, estos resultados se basan únicamente en la letalidad para definir la seguridad o no del clorpirifos, y en consecuencia se pierden de vista efectos subletales. Los efectos subletales son de gran importancia y tienen repercusiones a nivel poblacional. Estos, como la alteración de la capacidad de selección de hábitat, la respuesta de escape frente a predadores, la capacidad de alimentarse o la comunicación entre individuos, entre otros ejemplos, pueden ocurrir a concentraciones ambientales muy por debajo de los niveles establecidos como seguros, como se pudo observar en *B. straminea* luego de las exposiciones subcrónicas a clorpirifos. Otros autores han registrado para otros plaguicidas, efectos subletales de relevancia a partir de concentraciones que se encontraban varios órdenes de magnitud por debajo de las CL<sub>50</sub>. En el pez *Colossoma macropomum* exposiciones agudas a concentraciones 30 y 50% más bajas que la CL<sub>50</sub> del OF triclorfón, produjeron una inhibición de más del 90% de la actividad de AChE (Duncan et al., 2020). Otro caso es el reportado por Arias (2019) en el cual organismos de *Simocephalus vetulus* (crustáceo) expuestos a pulsos efímeros del piretroide cipermetrina presentaron menores tasas de alimentación, de fecundidad acumulada y de reproducción a concentraciones hasta 10 veces menores que la CL<sub>50</sub>. Por otro lado, Bianco et al. (2014) evaluaron la letalidad en *B. straminea* por exposición aguda al PA de

otro OF, el metilazinfos, y encontraron que, contrario a lo ocurrido con el clorpirifos, no produjo letalidad con concentraciones de hasta 10 mg/L.

Es de destacar que los parámetros de letalidad aguda para *B. straminea* estimados en esta tesis están, en algunos casos, varios órdenes de magnitud por encima de los que se han determinado para otras especies de invertebrados acuáticos (tabla 3, Introducción capítulo I). Incluir una mayor cantidad y variedad de especies en estudios de seguridad de plaguicidas permitiría no subestimar la sensibilidad de otros organismos frente a la exposición a estos compuestos. Esto debe sumarse al hecho de que las concentraciones detectadas en cuerpos de agua de todo el mundo exceden por mucho los límites establecidos como seguros. Particularmente en nuestro país, la máxima concentración de clorpirifos detectada en agua excede en más de 1.000% el límite máximo permitido de 0,006 µg/L (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005).

Para realizar análisis de riesgo de exposiciones más prolongadas, se utilizan parámetros como NOEC y LOEC. Como parte de esta tesis, no se estimaron esos valores luego de las exposiciones subcrónicas porque no era un objetivo, sino que se buscó evaluar efectos subletales. En este sentido, tanto el PA como el FC de clorpirifos tuvieron efectos subcrónicos en *B. straminea* a distintos niveles de organización, con algunas diferencias entre ambos. Las actividades enzimáticas de las B-esterasas fueron uno de los biomarcadores que se vieron afectados. La AChE resultó ser más sensible al PA, ya que se inhibió significativamente incluso con la concentración más baja, mientras que en el caso del FC solo se vio inhibida con la mayor concentración. La inhibición de AChE era esperable al ser el clorpirifos un compuesto anticolinesterásico; sin embargo ni el metilazinfos ni el carbarilo (carbamato) inhibieron la actividad de esta enzima en estudios previos de exposición subcrónica en la misma especie (Cossi, 2019; Cossi et al., 2018). En cuanto a las CEs, únicamente se vieron inhibidas por el FC cuando se determinaron con p-NFA como sustrato y con la mayor concentración ensayada. Estudios previos en *B. straminea* y en otros gasterópodos (Bianco et al., 2014; Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016) también observaron diferencias en las respuestas a plaguicidas de las CEs dependientes del sustrato utilizado. En cuanto a las diferencias observadas entre el FC y el PA sobre estas enzimas, ha sido descrito que, además de

compuestos OFs y carbamatos, existen otros compuestos que inhiben la actividad de AChE (Guilhermino et al., 1998) y/o aumentan la actividad de CEs debido a su rol en la detoxificación de xenobióticos (Cossi et al., 2020). Estos resultados sugieren que los excipientes presentes en el FC o bien están ejerciendo una acción directa sobre las actividades enzimáticas de las B-esterasas, interfiriendo con la acción del clorpirifos sobre dichas enzimas, o se están observando efectos aditivos o sinérgicos entre los excipientes y el ingrediente activo.

El PA de clorpirifos resultó tener mayor toxicidad subcrónica que el PA de metilazinfos en la misma especie (Cossi et al., 2018). En este sentido, en organismos adultos expuestos al PA de metilazinfos no se registró letalidad, signos de neurotoxicidad, ni inhibición de AChE. Además, la actividad de CEs se vio inhibida, lo que sugiere un posible rol de protección con metilazinfos (Cossi et al., 2018) pero no con clorpirifos. Se observó además que el metilazinfos produjo inhibición significativa de la actividad de CE a partir de 0,02 mg/L a las 48 h (Bianco et al., 2014), mientras que la exposición al PA del clorpirifos produjo inhibición de CE, pero también de AChE a partir de 0,01 mg/L (Tejedor y Kristoff, 2020). Por lo tanto, en concordancia con otros estudios con *B. straminea* en los cuales se demostró que sería más sensible a la exposición aguda a clorpirifos que a metilazinfos, también se observó lo mismo con las exposiciones subcrónicas.

En otros gasterópodos como *Chilina gibbosa*, también se observaron variaciones en las sensibilidades de AChE y CEs a los PAs de metilazinfos y de clorpirifos (Bianco et al., 2013; Herbert et al., 2021). Las respuestas de las B-esterasas parecen ser altamente dependientes del tipo de OF mostrando diferencias dentro de una misma especie y entre especies. El clorpirifos al igual que el metilazinfos, son OFs del tipo tión al tener un enlace tiofosforil (P=S). Esto implica que requieren de una activación metabólica por enzimas del complejo CYP a su análogo oxón para producir inhibición de AChE. Por otro lado, los oxones pueden ser hidrolizados por A-esterasas o “captados” por CEs (Tang et al., 2001). En consecuencia, las variaciones en las actividades metabólicas, ya sean cuantitativas o cualitativas, pueden derivar en diferencias en la toxicidad de los OFs, incluyendo la inhibición de AChE (Kristoff et al., 2006). Más allá de los procesos toxicocinéticos, los procesos toxicodinámicos también pueden contribuir a las diferencias observadas en las susceptibilidades de las B-esterasas. En este sentido, se observaron luego de exposiciones *in vitro* en el gasterópodo *Planorbarius corneus*,

diferencias en la afinidad de la enzima blanco por el oxón de clorpirifos y de metilazinfos (Cacciatore et al., 2012).

En trabajos previos, donde se estudió el efecto de FCs en comparación con sus correspondientes PAs de distintos plaguicidas sobre las actividades de AChE y CE de otros moluscos, se observaron diferentes respuestas. Souza de Silva et al. (2003) describieron que las AChEs de *Phyllocaulis soleiformis* eran insensibles al PA de carbofuran, al PA de glifosato y al PA y un FC de malatión. Sin embargo, las AChEs se inhibieron luego de la exposición a un FC de carbofuran y se indujeron con un FC de glifosato. Cossi et al. (2020), por otro lado, reportaron que tanto el PA como un FC del neonicotinoide acetamiprid aumentaron la actividad de CE sin afectar la actividad de AChE en *B. straminea*. Otro ejemplo es el de Lummato et al. (2013, 2018) quienes reportaron inhibición de la actividad de CEs en el mejillón *Limnoperna fortunei* tanto por exposición al PA de glifosato como luego de ser alimentado con algas expuestas a un FC del mismo. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en la actividad de AChE en ningún caso. Estos resultados controversiales evidencian que son necesarias nuevas investigaciones para clarificar cómo los excipientes y sus mezclas con los PA de los plaguicidas afectan las actividades de las enzimas AChE y CE, teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades propias de cada especie a diferentes tóxicos.

En este trabajo de tesis, se evaluó el efecto de clorpirifos sobre distintos sistemas antioxidantes de *B. straminea* (CAT, SOD, GST, GR y GSH), observándose únicamente alteración de las actividades CAT y SOD. La exposición al FC de clorpirifos aumentó la actividad SOD con la concentración más baja, mientras que la actividad CAT recién se inhibió con la concentración más alta. Las respuestas de las enzimas CAT y SOD solo se observaron con el FC, lo que indicaría que sus excipientes podrían estar participando y perturbando el metabolismo del oxígeno. Varios autores coinciden en que estas enzimas pueden aumentar o disminuir su actividad en condiciones de estrés (Cao et al., 2003; Kristoff et al., 2008; Wang et al., 2016), lo que frecuentemente tiene correlación con los niveles de EROS ya que al verse desbalanceados dichos niveles, puede ocurrir daño oxidativo. El incremento en los niveles de EROS ha sido frecuentemente relacionado con altas concentraciones de plaguicidas o con tiempos de exposición largos. Un incremento grande en los niveles de EROS puede generar daño a proteínas y disminuir la actividad de diversas enzimas. Contrario a esto, un aumento leve en los niveles de EROS puede

inducir las actividades CAT y SOD como mecanismos de defensa (Cossi et al., 2018). Cabe destacar que durante el desarrollo de esta tesis no se midieron los niveles de EROS, con lo cual no es posible confirmar si ellos se vieron aumentados o no con la exposición al PA y al FC de clorpirifos. Es conocido que los OFs producen estrés oxidativo modificando los niveles de antioxidantes o las actividades enzimáticas y aumentando los niveles de EROS en especies de invertebrados. Sin embargo, las respuestas no son específicas y dependen de la especie, del tiempo de exposición y del tipo y concentración del plaguicida (Kristoff et al., 2008). En otros caracoles dulceacuícolas expuestos a clorpirifos se observaron resultados diferentes en las respuestas antioxidantas. Cacciatore et al. (2015) registraron una disminución del contenido de GSH y un aumento de las actividades de las enzimas CAT y GST en organismos de *P. corneus* expuestos 48 h al PA de clorpirifos (7,5 µg/L). Sin embargo, la exposición a 5 µg/L por 14 días no modificó la actividad de la enzima GST en la misma especie (Rivadeneira et al., 2013). Por otro lado, en *C. gibbosa* la actividad GST no se modificó luego de 48 h de exposición a concentraciones de hasta 7,5 mg/L de clorpirifos como PA (Herbert et al., 2021) pero si se inhibió en *B. alexandrina* por exposición de 24 h a 5,6 mg/L de un FC (Ibrahim y Hussein, 2022). En la misma especie utilizada en esta tesis, Cossi et al. (2020) observaron que solo el FC de acetamiprid inhibió las actividades CAT y GST.

Tanto los niveles de EROS como los indicadores de daño oxidativo (peroxidación lipídica, proteínas oxidadas y genotoxicidad, por ejemplo) deberían ser evaluados para permitir concluir sobre el rol del estrés oxidativo en la toxicidad del clorpirifos en *B. straminea*.

Las exposiciones al PA y al FC de clorpirifos no produjeron alteraciones en varios de los parámetros reproductivos evaluados. En todos los tratamientos se registró un número similar de puestas depositadas a lo largo de todo el bioensayo, en las cuales el número de huevos por puestas y el porcentaje de huevos embrionados también fue similar entre grupos. Sin embargo, en los embriones se observó una mayor toxicidad con el FC en comparación al PA. La evidencia de esto fue el aumento en el tiempo de eclosión y la disminución en el porcentaje de eclosión de los juveniles. Estos efectos podrían estar relacionados con retrasos en el desarrollo embrionario, interacciones con las membranas gelatinosas y/o con inhibiciones de actividades enzimáticas (Tallarico et al.,

2014). Dentro de los huevos, los embriones se encuentran protegidos por diferentes membranas y sustancias: membrana perivitelina, albumen, sustancia gelatinosa y pared capsular (figura 12, Introducción General). Los excipientes presentes en el FC podrían estar incrementando la permeabilidad de las membranas, favoreciendo el ingreso de clorpirifos dentro de los huevos, causando los efectos tóxicos que se evidenciaron en los embriones. Sumado a esto, los excipientes *per se* podrían estar afectando negativamente a los embriones. En *B. glabrata* y *B. straminea* se observó una baja embriotoxicidad de los PAs de ivermectina y metilazinfos, lo cual estaría relacionado con el rol de protección de las membranas (Katz et al., 2017; Cossi et al., 2018). Otros autores, por el contrario, han observado efectos del PA de clorpirifos en estadios embrionarios de otras especies, e incluso sugieren que debería ser considerado como teratogénico para la biota acuática. Sotomayor et al. (2015) reportaron malformaciones en los embriones y desarrollo detenido en estadios embrionarios de *Rhinella arenarum*, mientras que Fan et al. (2021) obtuvieron resultados similares al realizar ensayos con embriones del pez *Danio rerio*. En relación a los retrasos en la eclosión, este efecto fue observado en múltiples estudios con *Biomphalaria* spp. expuestos a una gran variedad de compuestos: en *B. alexandrina* expuestos a metales (Abdel-Tawab et al., 2021), en *B. tenagophila* expuestos a distintos pesticidas y emulsionantes (Oliveira-Filho et al., 2009a,b), y en *B. glabrata* expuestos a varios plaguicidas, metales pesados y compuestos derivados de líquenes y de plantas (Araújo et al., 2018; Caixeta et al., 2021; Kristoff et al., 2011; Salice y Roesjadi, 2002; Silva et al., 2018). En especies de peces, este efecto se asoció a una posible inhibición de enzimas relacionadas con la eclosión, desórdenes osmóticos y déficits comportamentales, como debilidad del movimiento espontáneo muscular (SanJuan-Reyes et al., 2020).

En cuanto a los juveniles, tanto aquellos expuestos al PA y como al FC de clorpirifos, presentaron una mayor mortalidad en comparación con los controles. La presencia de malformaciones en la descendencia podría ser una de las causas de la mortalidad observada. En los juveniles, las malformaciones que pudieron observarse fueron principalmente anormalidades en los tentáculos. El mismo efecto se observó en otros caracoles como *Bellamya aeruginosa* recolectados de un lago eutrófico en el este de China (Lei et al., 2017), en *Stramonita haemastoma* recolectados del Canal Bizerta en el noreste del Océano Atlántico (El Ayari et al., 2018) y en *Marisa cornigerietis* expuestos

a una mezcla de Zn y Ni (Sawasdee y Köhler, 2009). Los tentáculos en *Biomphalaria* spp. tienen funciones sensoriales y de orientación, por lo cual malformaciones severas en ellos pueden llevar a una menor eficiencia al momento de orientarse hacia las fuentes de alimento, entre otras consecuencias (Townsend, 1974). En los hábitats naturales, esto podría significar una reducción de la supervivencia de los organismos. Es importante destacar que los efectos tóxicos en la reproducción de *B. straminea* se observaron a bajas concentraciones de clorpirifos, incluso más bajas que las concentraciones utilizadas en trabajos previos. En este sentido, Rivadeneira et al. (2013) reportaron la presencia de puestas sin huevos o con todos sus embriones con desarrollo detenido y efectos severos como mortalidad en la descendencia de *P. corneus* luego de 14 días de exposición a 5 µg/L del PA de clorpirifos. Es probable que concentraciones mayores de clorpirifos a las utilizadas en esta tesis, pero encontradas en el ambiente, tengan efectos más severos sobre la reproducción de *B. straminea*.

Otro nivel de estudio de los efectos de clorpirifos sobre los organismos adultos de *B. straminea* fue el histológico. Particularmente la glándula digestiva de los moluscos ha sido ampliamente estudiada debido a sus funciones digestivas y metabólicas y a que corresponde al principal órgano blanco de los xenobióticos. En *B. straminea*, la primera descripción de la glándula digestiva es la que se presenta en esta tesis y, al igual que las gónadas, su estructura coincide con la estructura básica de todos los moluscos pulmonados (Hyman, 1967) y con la de otras especies del género *Biomphalaria* (Abdel-Ghaffar et al., 2016; Dokmak et al., 2024). Otros autores han reportado cambios histológicos en la glándula digestiva de moluscos como respuesta a la exposición a xenobióticos. Un ejemplo es lo descrito por Arrighetti et al. (2022) quienes observaron daño tisular en la glándula digestiva del gasterópodo *Pomacea canaliculata* expuestos a concentraciones ambientales de cipermetrina. Abdel-Ghaffar et al. (2016) reportaron daños severos en *B. alexandrina* luego de exposiciones a tres herbicidas. En este sentido, los resultados preliminares obtenidos luego de la exposición a clorpirifos en este trabajo de tesis, no evidenciaron histopatologías en la glándula digestiva de *B. straminea*. El PA disminuyó el valor de MET de los túbulos digestivos de la glándula con la mayor concentración ensayada (1 µg/L) luego de 14 días, respecto al grupo CA. Sin embargo, los parámetros planimétricos por sí solos no permiten concluir si hubo o no daño debido

a la morfología dinámica de la glándula digestiva. Este órgano pasa por diferentes fases de digestión en condiciones normales, en las cuales se ven modificados los valores de MET, MDR y MLR. De acuerdo a Vega et al. (1989), los biomarcadores más sensibles de adelgazamiento epitelial o de atrofia causado por factores de estrés ambientales son los cocientes MLR/MET y MET/MDL. Para poder calcularlos y concluir si las exposiciones a clorpirifos producen o no atrofia, se debería repetir el bioensayo con una mayor cantidad de réplicas. En cuanto al tiempo de exposición hay que tener en cuenta que el daño a nivel histológico se suele evidenciar luego de exposiciones largas. Esto se debe a que en primera instancia, pueden ocurrir otros mecanismos que ayuden a las especies a tolerar las exposiciones a contaminantes, y/o que el alcance de las alteraciones bioquímicas aún no llegue a alterar los tejidos u órganos. Por lo tanto, también se deberían estudiar los efectos luego de exposiciones más prolongadas.

Otra de las estructuras analizadas fueron las gónadas, las cuales presentaron una estructura conservada y coincidente con lo descrito por Cossi (2019) en la misma especie: ovotestis conformado por acinos con gametas tanto masculinas como femeninas. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, permiten indicar, de forma preliminar, que las exposiciones a clorpirifos no fueron suficientes para producir daño en este órgano, posiblemente debido a las concentraciones bajas que se utilizaron, al tiempo de exposición o a ambas variables. De esta forma, los efectos observados en los parámetros reproductivos evaluados en *B. straminea* con el FC de clorpirifos, no tuvieron una correlación con daño a nivel tisular en las gónadas. Esto refuerza la idea de que los excipientes del FC favorecen la penetración del clorpirifos a través de las membranas de las puestas y de los huevos, permitiendo que el mismo afecte directamente a los embriones. Cossi (2019) tampoco observó en la misma especie alteraciones a nivel histológico en las gónadas luego de 14 días de exposición al PA de metilazinfos, aún con la concentración más alta utilizada (200 µg/L). Otros autores observaron alteraciones histológicas en gónadas de otras especies de invertebrados acuáticos como resultado de exposiciones a clorpirifos, pero a concentraciones y tiempos de exposición considerablemente mayores. Un ejemplo de esto es lo descripto por Negro y Collins (2017) quienes observaron oocitos atrésicos en el cangrejo *Zilchiopsis collastinensis* luego de 22 días de exposición a 40 y 80 µg/L de PA de clorpirifos. Por otro lado, Hossain et al. (2023) reportaron degradación folicular y

degeneración gonadal en el mejillón *Lamellidens marginalis* expuestos a concentraciones entre 2,53 y 10,15 mg/L durante 35 días. Debido a la ausencia de signos o alteraciones en cantidades significativas en las góndadas, es necesario realizar un análisis de otros parámetros como talla oocitaria o número de oocitos para confirmar los efectos del clorpirifos sobre este órgano incluso luego de la exposición de 28 días.

En un estudio realizado por otros miembros del laboratorio con organismos adultos de *B. straminea* expuestos a clorpirifos como PA y como FC, se analizaron biomarcadores de inmunotoxicidad (Bianco et al., 2024). Luego de 14 días de exposición, se observó que ambas exposiciones produjeron alteraciones en las subpoblaciones de hemocitos (mayor porcentaje de granulocitos y menor de hialinocitos) y que, además, en el caso del FC, hubo un aumento en el porcentaje de granulocitos con pseudópodos. Los aumentos de las subpoblaciones de granulocitos, que son las células con mayor actividad fagocítica, y su activación a través de la emisión de pseudópodos, indican que se han activado mecanismos de defensa por exposición a clorpirifos.

En organismos adultos de algunas especies, se observó que el FC de clorpirifos era levemente más tóxico que el PA. Swann et al. (1996) observaron que el FC causaba una mayor inhibición de la frecuencia de batido ciliar que el PA, en un modelo de paladar *in vitro* de *Rana pipiens*. En otro trabajo con *Daphnia magna*, los autores registraron una mayor toxicidad aguda del FC al calcular y comparar las CL<sub>50</sub> (Demetrio et al., 2014). En cambio, en otras especies se evidenciaron efectos mucho más marcados de los FC en comparación a sus correspondientes PA. En *Caenorhabditis elegans* se observó mayor letalidad, retraso en el desarrollo y en la reproducción, y cambios morfológicos en las neuronas colinérgicas con el FC en relación al PA de clorpirifos (Jacques et al., 2023); mientras que en *Oreochromis niloticus* la mayor toxicidad del FC de cipermetrina se debió a una menor CL<sub>50</sub> (Majumder y Kaviraj, 2017). En organismos adultos de *B. straminea*, las exposiciones agudas al clorpirifos no presentaron diferencias significativas entre el PA y el FC en relación a los parámetros evaluados (letalidad y signos de neurotoxicidad). En el caso de las exposiciones subcrónicas de 14 días, se observó una mayor cantidad de biomarcadores alterados con el FC que con el PA: inhibición de las actividades de CEs y de CAT, aumento de la actividad de SOD, aumento del tiempo de eclosión y disminución del porcentaje de eclosión. Esta mayor toxicidad

del FC a nivel de los biomarcadores bioquímicos y de los parámetros reproductivos posiblemente se deba a los excipientes, que facilitan el ingreso de clorpirifos o de la toxicidad propia de estos excipientes. Sin embargo, no se observó lo mismo en los juveniles: los porcentajes de supervivencia fueron similares con el PA y con el FC.

De acuerdo a los parámetros estimados (NOEC, LOEC, CL<sub>50</sub> y CR) en el estadio adulto de *B. straminea*, se podría inferir que las concentraciones detectadas en el ambiente de clorpirifos no representan riesgo para la especie, sin presentar el FC mayor toxicidad que el PA. Al analizar en conjunto los resultados obtenidos luego de las exposiciones agudas y subcrónicas (efectos letales y subletales) de distintos estadios, la conclusión no es la misma. El FC resultó más tóxico que el PA para los organismos adultos y para los juveniles de *B. straminea* a tiempos más largos de exposición. Los bioensayos subcrónicos con bajas concentraciones de FCs son los que más se asemejan a las situaciones reales en los ambientes. Los resultados indican que a concentraciones ambientales e incluso menores a aquellas detectadas en cuerpos de agua de nuestro país y de otras partes del mundo (Hasanuzzaman et al., 2018; Mac Loughlin et al., 2022; Marino y Ronco, 2005; Otieno et al., 2012), el clorpirifos produce efectos tóxicos a diferentes niveles de organización en el gasterópodo *B. straminea*. Esta especie se distribuye naturalmente en zonas donde aún podría estar aplicándose clorpirifos, entre otros plaguicidas (Rumi et al., 2008). En consecuencia, el clorpirifos podría estar afectando la supervivencia de la especie en su hábitat natural, así como su abundancia y distribución, poniendo en riesgo a las poblaciones. Los efectos negativos a nivel reproductivo de las especies tienen una gran relevancia ecológica ya que afectan no solo a las especies en estudio, sino que también lo hacen indirectamente sobre otras especies que habitan en el mismo ambiente y, en última instancia, a todo el ecosistema.

El clorpirifos resultó ser más tóxico para la especie (alta tasa de mortalidad) que el herbicida glifosato (Rabuffetti, 2021) y que todos los insecticidas previamente estudiados, incluído otro OF: el metilazinfos (Bianco et al. 2014; Cossi et al., 2018), el carbarilo (Cossi, 2019) y el acetamiprid (Cossi et al., 2020). Particularmente el FC de clorpirifos presentó mayor toxicidad que el PA, en especial para los estadios tempranos de desarrollo. Además, esta mayor toxicidad se observó con concentraciones de relevancia ambiental. Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de este capítulo, reafirman la importancia de utilizar embriones y juveniles de gasterópodos en ensayos

de toxicidad debido a la mayor sensibilidad a los contaminantes observada en estadios tempranos en comparación con los organismos adultos (Agrelo et al., 2019; Caixeta et al., 2022). El uso de estadios tempranos permite, además, establecer límites y valores máximos de plaguicidas en el ambiente que sean seguros para todos los estadios de las especies, los cuales deberían también ser incluídos en los ensayos de toxicidad aguda. La actividad de las enzimas AChE y SOD, los efectos en los embriones y la supervivencia de los juveniles resultaron ser los biomarcadores más sensibles en *B. straminea* expuestos a clorpirifos, ya que se vieron alterados incluso con la concentración más baja.



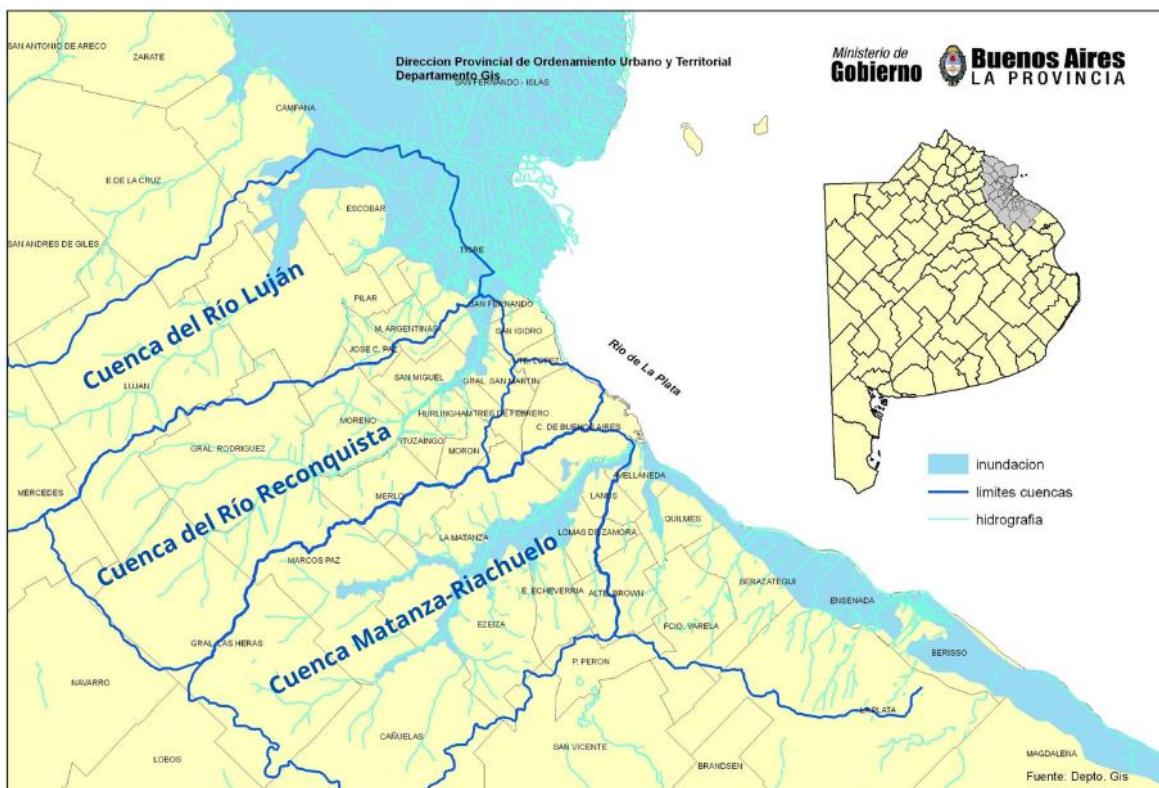
## CAPÍTULO II

**EVALUACIÓN DE TOXICIDAD DE MUESTRAS DE  
AGUA AMBIENTALES (SUBCUENCA LAS CATONAS,  
CUENCA DEL RÍO RECONQUISTA)**

## 1. Introducción

### 1.1 Cuenca del Río Reconquista

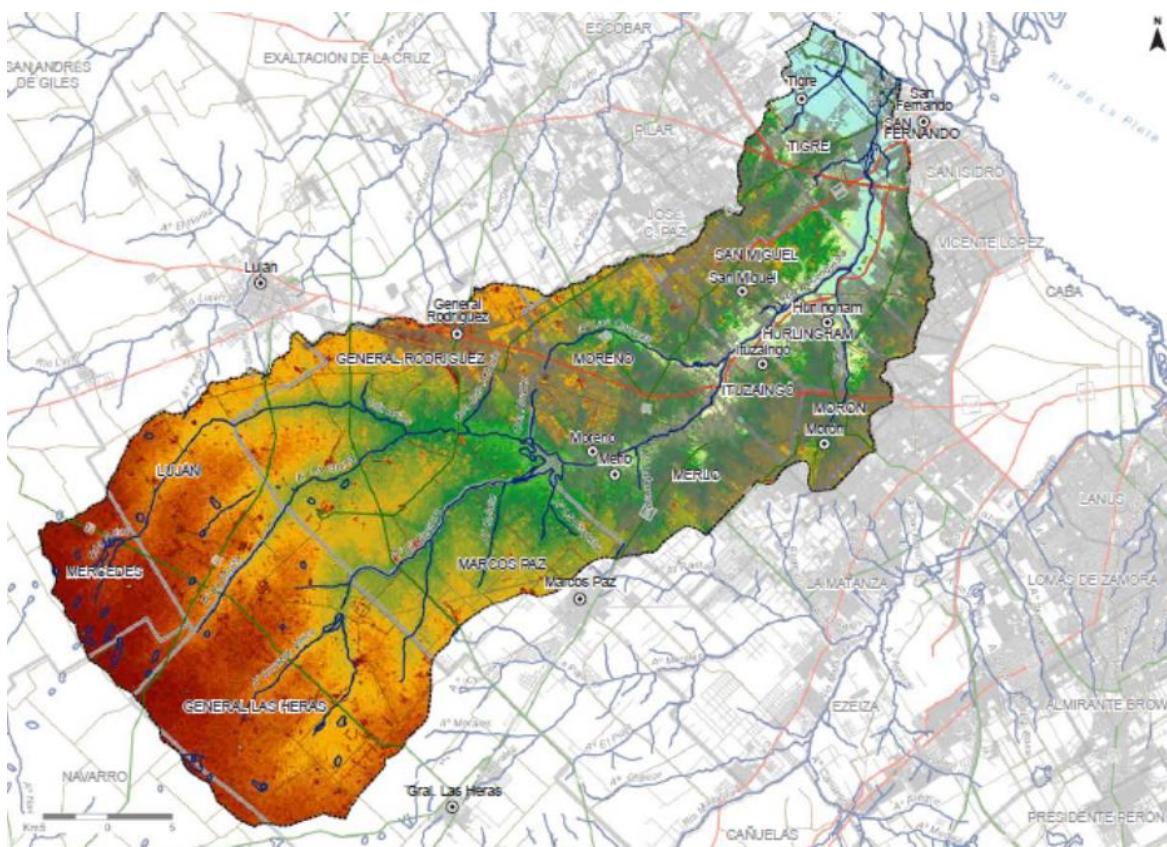
La provincia de Buenos Aires es la más grande del país y la más poblada. Está conformada en gran parte por una vasta llanura húmeda con escasa pendiente hacia el mar. Hay 64 cuencas hídricas en toda la provincia, siendo las 3 más importantes del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) la Cuenca del Río Luján, la Cuenca del Río Reconquista y la Cuenca Matanza-Riachuelo (figura 49).



**Figura 49. Cuencas hídricas del Área Metropolitana de Buenos Aires.** Adaptado del Ministerio de Gobierno, Provincia de Buenos Aires ([www.gobierno.gba.gov.ar](http://www.gobierno.gba.gov.ar)).

La Cuenca del Río Reconquista está situada en el noreste de la provincia de Buenos Aires, tiene una superficie de 1684,51 km<sup>2</sup>, atraviesa 18 municipios bonaerenses y en sus márgenes viven más de 4 millones de personas. De los 134 cursos de agua que tiene, el principal es el Río Reconquista y el cuerpo receptor es el Río Luján (figura 50). Es la segunda cuenca más contaminada, después de la Cuenca Matanza-Riachuelo, lo que afecta directamente a la población, a la biota y a las actividades que ahí se

desarrollan. Dichas actividades son tanto recreativas, económicas y sociales y crecieron mucho en las últimas décadas.



**CUENCA HIDROGRÁFICA RÍO RECONQUISTA**



**Figura 50. Cuenca del Río Reconquista en la provincia de Buenos Aires.** Adaptado de: Autoridad del Agua, Atlas de Cuencas (<https://ada.gba.gov.ar/mapas-de-cuenca/>).

La distribución de la población en las zonas de la cuenca es bastante desigual debido al desarrollo económico e industrial que se produjo con el transcurso de los años alrededor de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), así como de los puertos comerciales establecidos en el Río de la Plata. La mayoría de los afluentes del

Río Reconquista y el propio río presentan un grado de contaminación orgánica de moderado a muy alto, lo que aumenta la demanda de oxígeno y, en consecuencia, deteriora la calidad del agua (Basílico, 2021). La parte media y baja de la cuenca se consideran las más afectadas por actividades antrópicas y en consecuencia las que tienen los mayores grados de contaminación. Dentro de la cuenca hay más de diez mil industrias de diferentes rubros principalmente curtiembres, textiles, caucho, hierro y acero, mataderos y frigoríficos (Basílico, 2021). Otra fuente de contaminación hídrica relevante en la región es el drenaje urbano, que muchas veces transporta efluentes líquidos industriales vertidos a las redes pluviales de manera ilegal o clandestina (Grinberg et al., 2018). Esta cuenca aporta un tercio de la contaminación del Río de la Plata, siendo este último río el que provee agua potable a CABA y sus alrededores.

## 1.2 Subcuenca Las Catonas

La Subcuenca Las Catonas se ubica en la región media de la Cuenca del Río Reconquista con una superficie aproximada de 180 km<sup>2</sup>, los cuales prácticamente en su totalidad se encuentran en el partido de Moreno y cuyo curso de agua principal es el Arroyo Las Catonas.

El área presentó durante mucho tiempo un déficit importante en términos de infraestructura para la provisión de agua potable y la colección de excretas (Herrero y Fresina, 2003; Ruggerio, 2005). En el año 2017, Agua y Saneamientos Argentinos (AYSA) declaró que de 67 perforaciones de agua subterránea para abastecimiento de agua potable, solo 59 se encontraban en funcionamiento pero con instalaciones en estado deficiente y con presencia de coliformes, *Pseudomonas* y bacterias heterótrofas viables en perforaciones y redes de distribución. Además, la recolección de desagües cloacales se encontraba en estado de sobrecarga con desbordes en sitios bajos de la cuenca.

Ruggerio (2005) relevó la localización de industrias declaradas y los principales usos del suelo de la cuenca y sus alrededores (figura 51). En la cuenca predomina el uso urbano con presencia de country o barrios cerrados, luego se observa una zona de transición en la que confluyen usos urbanos y rurales diversos, mientras que las zonas rurales exclusivas son destinadas principalmente a la horticultura y los cultivos extensivos. El uso industrial es discontinuo y los establecimientos se ubican

principalmente en las zonas urbanas y en las proximidades de las vías de comunicación (rutas y ferrocarril) (Ruggerio, 2005).

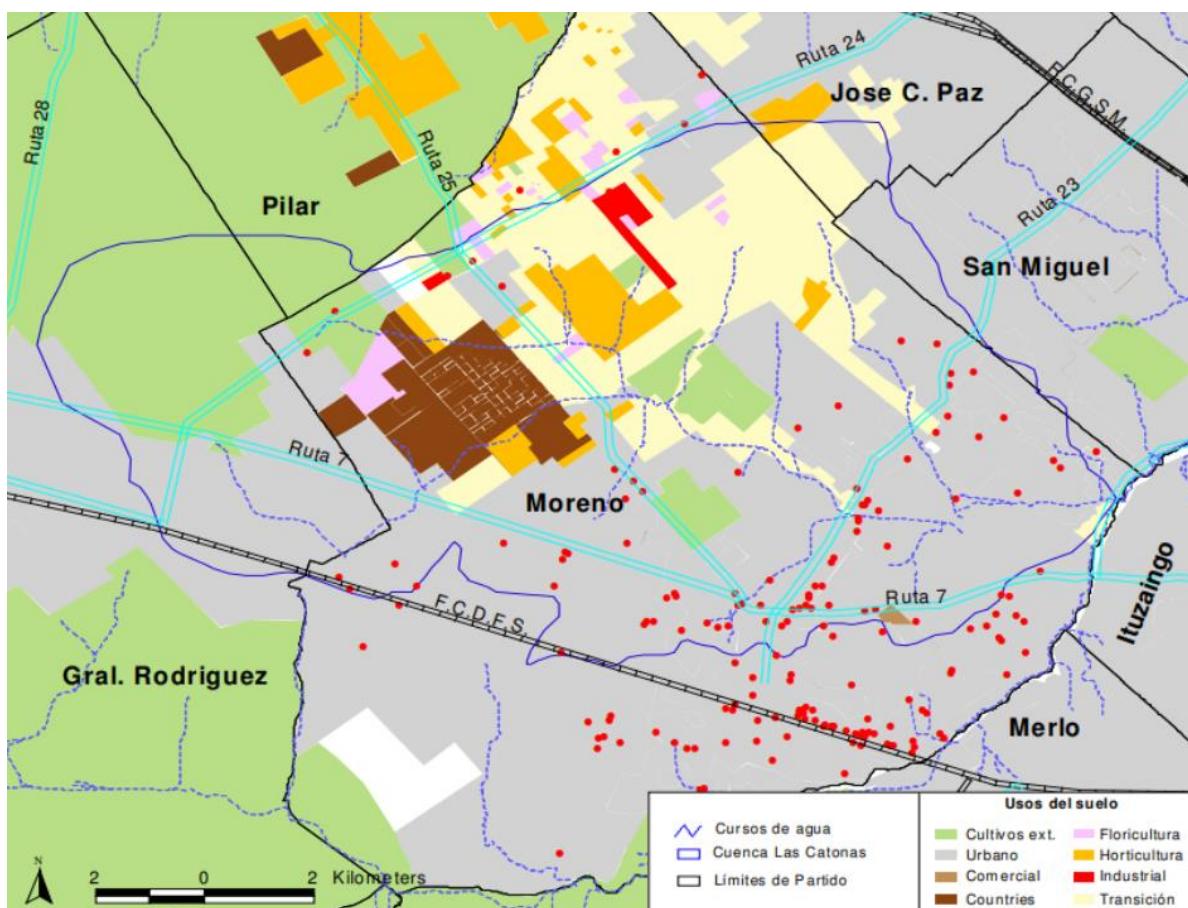


Figura 51. Usos del suelo en la Subcuenca Las Catonas y sus alrededores. Fuente: Ruggerio (2005).

### 1.3 Arroyo Las Catonas

El arroyo Las Catonas se encuentra en la zona de Cuartel V del partido de Moreno, atravesándolo de oeste a este. Tiene 18 km de longitud y tiene como afluentes el Arroyo Los Perros, la Cañada Las Catonas y otros cuatro cursos de agua sin nombre, constituyéndose así en el principal cuerpo colector del área (Ruggerio, 2005). Es uno de los principales tributarios del Río Reconquista junto al Arroyo Morón, vertiendo sus aguas en la cuenca media del Reconquista (Miraglia et al., 2005).

Trabajos previos en este curso de agua han clasificado su composición hidroquímica, determinando parámetros fisicoquímicos en diferentes sitios y realizado análisis de sedimentos, entre otros estudios. Bernal Rey et al. (2019) detectaron plaguicidas en muestras de agua superficiales, entre ellos clorpirifos y paraquat.

Cantera et al. (2018) analizaron la movilidad de elementos traza entre los sedimentos, el agua de poro y el agua superficial concluyendo que, en el caso de los sedimentos, la concentración de metales aumenta con la profundidad y en particular el arsénico se libera de los sedimentos al agua de poro y de ahí al agua superficial. Por otro lado, Raiger Lustman et al. (2021) y Vignale et al. (2022) observaron alteraciones en las comunidades microbianas causadas por el uso intensivo del suelo y los períodos cortos de descanso, con variaciones espaciales y estacionales.

Basílico (2021) de acuerdo a un estudio del área clasificó el agua superficial del Arroyo Las Catonas con nivel de contaminación alto: recibe la descarga de drenajes urbanos, efluentes de una planta depuradora de líquidos cloacales y de una industria avícola.

#### **1.4 Calidad del agua**

Se puede definir 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), los cuales pueden ser consumo humano, preservación de la vida acuática, bebida de especies de producción animal, irrigación de cultivos, actividades recreativas, entre otros. De acuerdo al/los uso/s, diferentes entidades o autoridades han establecido valores guía o rangos permitidos para diferentes parámetros fisicoquímicos. En Argentina, del total de agua que utiliza el ser humano para distintos usos, el 80% es destinada a la agricultura y la ganadería, particularmente al riego, lo que genera que se acarreen sustancias tóxicas como plaguicidas o fertilizantes, entre otras (Ministerio de Salud de La República Argentina, 2025). Si a esto se suman las descargas de efluentes, los derrames y el volcado de residuos, en los cuerpos de agua termina habiendo mezclas complejas de sustancias. Esto dificulta mucho el estudio de los posibles efectos o consecuencias de dicha contaminación sobre la biota y los seres humanos.

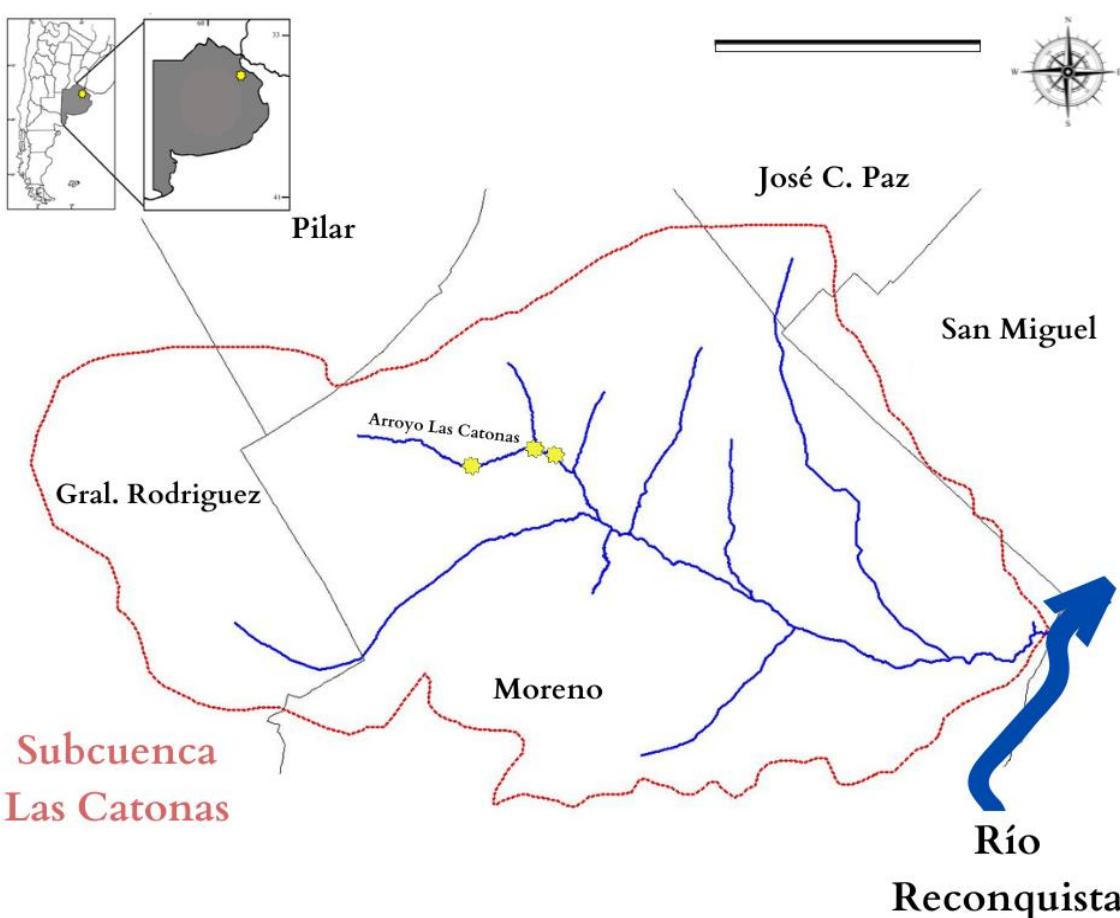
En 2001 se creó el Comité de la Cuenca del Río Reconquista (COMIREC) aprobado por la Ley 12.653 de la Legislatura bonaerense. Se trata de un ente autárquico cuya función principal es la de “prestar servicios y realizar acciones conducentes a la gestión integral y preservación del recurso hídrico de la Cuenca del Río Reconquista”. Junto a la Subsecretaría de Recursos Hídricos bonaerenses, lleva adelante obras de

infraestructura, la mayoría de las cuales consisten en redes primarias o secundarias de desagüe cloacal focalizadas en barrios pertenecientes a municipios que integran las cuencas media y baja del Reconquista. El COMIREC actualmente conduce el Programa de Mejora de la Calidad Ambiental del Recurso Hídrico (ProMeCARH) que busca brindar información continua e ininterrumpida para uso del COMIREC y de las autoridades provinciales que así lo requieran. Pretende a su vez consolidar un monitoreo tanto de las actividades inusuales que puedan detectarse, como de la calidad del curso de agua principal. Para esto, evalúan espacial y temporalmente la calidad del agua superficial y de los sedimentos del Río Reconquista. Desde el 2021 presenta cuatro informes anuales (uno por estación) de los análisis fisicoquímicos e informes anuales desde 2022 de la ictiofauna y de macroinvertebrados.

## 2. Metodología

### 2.1 Sitios de muestreo

Se seleccionaron puntos de muestreo en el Arroyo Las Catonas ubicado en la localidad de Cuartel V, partido de Moreno, provincia de Buenos Aires (Subcuenca Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista) (figura 52). Dichos sitios se ven afectados por distintas actividades antrópicas: residenciales, agrícolas e industriales.



**Figura 52.** Mapa de la zona del partido de Moreno, provincia de Buenos Aires donde se ubica la subcuenca Las Catonas (Cuenca del Río Reconquista). Las estrellas amarillas indican la ubicación aproximada de los puntos de muestreo en el Arroyo Las Catonas. La flecha indica la dirección del curso de agua. Escala: 5 kilómetros. Adaptado de Herrero (2006).

Se realizó un primer muestreo al final de la primavera del año 2019 (mes de diciembre). Los sitios seleccionados para tomar las muestras de agua fueron dos. Uno de los sitios se denominó con el nombre R (sitio de referencia; 34°34'51,1" S,

58°50'08,6" O) el cual se encuentra cercano a una zona residencial y aguas arriba de fuentes puntuales de contaminación. En este sitio, el cauce del arroyo pasa por debajo de una ruta provincial. El segundo sitio se denominó ZH (34°34'55,6" S, 58°49'20,3" O) y se encuentra aguas abajo de una zona industrial y puntualmente lindero a una planta de tratamiento de desechos industriales y de huertas de uso intensivo (figura 53).

Inicialmente el diseño incluía muestreos continuados en las diferentes estaciones del año pero debido a la pandemia de COVID-19 no se pudieron realizar muestreos durante todo el año 2020. El segundo muestreo pudo realizarse en el mes de marzo del año 2021. En esa ocasión se decidió agregar un tercer sitio de muestreo que se denominó ZP (34°34'50,3" S, 58°49'25,0" O) y que se encuentra entre los sitios R y ZH, aguas abajo de la planta de tratamiento de desechos industriales y aguas arriba de la zona de huertas de uso intensivo (figura 53).



**Figura 53.** Mapa con los sitios de muestreo en el Arroyo Las Catonas (subcuenca Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista). R: sitio de referencia, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Escala: 200 m. Fuente: <http://earth.google.com>

Posterior a ese segundo muestreo y nuevamente debido a los continuos aislamientos por la pandemia y a la imposibilidad de ingresar más de una persona al laboratorio, no fue posible realizar muestreos en las distintas estaciones del año 2021. Por lo tanto, los

muestreos de los años siguientes se realizaron en la misma temporada (verano) en los años 2022 y 2023.

En el tercer muestreo realizado en verano de 2022 (mes de abril), no fue posible tomar muestras de agua del sitio R ya que no tenía caudal. Se tomaron entonces muestras de agua de los sitios ZP y ZH, y se incluyó en el diseño experimental un grupo control con agua declorada pasivamente (CA, el agua utilizada en los acuarios y en todos los bioensayos con plaguicidas).

El cuarto y último muestreo fue al final de la temporada de verano de 2023 (mes de abril) y tampoco se pudieron tomar muestras de agua del sitio R ya que continuaba seco y en esa ocasión bloqueado por obras municipales. Se tomaron muestras de agua de los sitios ZP y ZH y se volvió a incluir el control de agua declorada (CA).

La tabla 11 resume los sitios que fueron muestreados en cada campaña y en qué casos se incluyeron controles de agua declorada.

**Tabla 11. Resumen de las campañas de muestreo y de los sitios en el Arroyo Las Catonas que se incluyeron en cada una.**

	Sitio R	Sitio ZP	Sitio ZH	CA
<b>Primavera 2019</b>	✓	✗	✓	✗
<b>Verano 2021</b>	✓	✓	✓	✗
<b>Verano 2022</b>	✗	✓	✓	✓
<b>Verano 2023</b>	✗	✓	✓	✓

R: sitio de referencia, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo, CA: control de agua declorada. Tilde indica que el sitio/grupo se incluyó en la campaña; cruz indica que el sitio/grupo no se incluyó en la campaña.

## 2.2 Muestreos y determinaciones fisicoquímicas

Se tomaron muestras de agua de la superficie utilizando baldes de plástico atados a sogas, previamente enjuagados con agua de cada sitio. Se determinaron *in situ* y por duplicado el pH, la temperatura, la conductividad y el OD utilizando un equipo multiparamétrico Hanna HI 9811–5 y oxímetros portátiles Hanna HI 9145 y HI 9146.

Luego las muestras de agua fueron trasvasadas a distintos contenedores para las posteriores determinaciones. Todos los contenedores que se utilizaron eran nuevos. Al tomar las muestras de agua con los baldes, primero se colocó un pequeño volumen en cada contenedor para enjuagarlo, luego se descartó esa muestra y se llenaron los recipientes sin dejar cámara de aire antes de cerrarlos.

Debido a que este capítulo se enmarca en el proyecto PUE-CONICET 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”, otros miembros del proyecto realizaron distintas determinaciones en las muestras de agua previamente y durante el desarrollo de esta tesis. En muestreos anteriores se determinaron las concentraciones de algunos metales pesados, de plaguicidas y valores de DQO. Dichos resultados fueron tenidos en cuenta para las determinaciones que se realizaron en el marco de esta tesis.

En el caso de los metales, durante la tesis doctoral de la Dra. Bernal Rey se detectaron principalmente cadmio, cobre, plomo y zinc (en el año 2021) por lo cual durante los muestreos de los años 2022 y 2023 se tomaron muestras de agua para la determinación de estos mismos metales. Las muestras de agua se colocaron en botellas de polipropileno de 1 L y se tercerizaron dentro de las 48 h a la empresa Ambiental Pehuen para las determinaciones de los metales (sin acidificar de acuerdo al protocolo de la empresa). Se empleó el método analítico de espectrofotometría de absorción atómica SM 3111 B para cobre y zinc y SM 3113 B para cadmio y plomo.

Para las determinaciones de DQO se separó agua de los distintos sitios de muestreo en botellas de polipropileno de 1 L. En 2019 las muestras se enviaron a la empresa Biological Assistance Company S.A.S. No fue posible evaluar este parámetro en 2021 debido a problemas de insumos de las empresas ocasionados por la pandemia. En 2022 y 2023 se enviaron las muestras ambientales y el agua declorada utilizada para el grupo CA a Ambiental Pehuen. En todos los casos las muestras se conservaron acidificadas con ácido sulfúrico a pH< 2. En 2019 el método que se utilizó para la determinación fue SM 5220 D, mientras que en 2022 y 2023 el método correspondió al SM 5220 COD.

En relación a los plaguicidas, en 2019 y 2021 se detectaron y cuantificaron plaguicidas por otros miembros del proyecto como parte de sus tesis doctorales. Los análisis se

limitaron al herbicida glifosato (N-(fosfonometil) glicina) y al insecticida clorpirifos debido a que se encuentran entre los OFs más utilizados en el país para combatir plagas agrícolas (CASAFE, 2014) sumado a que habían sido ambos detectados previamente en el arroyo (Bernal Rey, 2022; Bernal Rey et al., 2019). En el año 2022 no fue posible la determinación de plaguicidas en las muestras ambientales ya que las empresas consultadas presentaban dificultades para la adquisición de los reactivos. En la campaña del año 2023, se separaron muestras de agua en botellas de vidrio color ámbar de 1 L previamente esterilizadas en autoclave. Las muestras fueron enviadas a la empresa C&D Laboratorios para la determinación de clorpirifos (método EPA SW 846 M 8141 CG NPD) y de glifosato (método EPA M 547).

La tabla 12 resume los parámetros fisicoquímicos, los metales y los plaguicidas que fueron determinados en cada una de las campañas de muestreo en el desarrollo de esta tesis.

**Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos, metales y plaguicidas determinados en cada campaña de muestreo en el Arroyo Las Catonas.**

	Temperatura	pH	Conductividad	OD	DQO	Metales	Plaguicidas
Primavera 2019	✓	✓	✓	✓	✓	✗	*
Verano 2021	✓	✓	✓	✓	✗	*	*
Verano 2022	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
Verano 2023	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

OD: oxígeno disuelto, DQO: demanda química de oxígeno. Asteriscos indican que las determinaciones pertenecen a la tesis doctoral de la Dra. Bernal Rey (2022), aún no publicada; tilde indica que la determinación se incluyó en la campaña; cruz indica que la determinación no se incluyó en la campaña.

En todos los muestreos también se trasvasaron muestras de agua a bidones de polipropileno de 5 L para realizar los bioensayos de exposición con *B. straminea* (N= 3 bidones por sitio). Los bidones eran nuevos y fueron previamente enjuagados con agua de cada sitio como se indicó previamente.

Los contenedores y las botellas fueron transportados desde los sitios de muestreo hasta el laboratorio en heladeras portátiles con bloques de hielo. Los bidones destinados a los bioensayos se colocaron en cámara fría a  $10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (DBBE, FCEN, UBA), mientras que las botellas destinadas a las determinaciones de DQO, metales y plaguicidas se mantuvieron en heladera a  $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su despacho.

Al llegar al laboratorio se midieron nuevamente la temperatura, el pH, la conductividad y el OD. Estos mismos parámetros se evaluaron en el agua declorada cuando fue utilizada para los grupos CA. Para los bioensayos de exposición de más de 48 h de duración (correspondientes a los años 2022 y 2023), las mediciones de los parámetros fisicoquímicos se repitieron cada 48 h retirando los bidones de la cámara fría al menos 2 h antes para que se encontraran a la misma temperatura a la que se llevaban a cabo las exposiciones.

En todos los casos las mediciones fueron realizadas por duplicado para calcular y expresar los resultados como promedio ± desvío estándar.

### **2.3 Bioensayos de exposición**

Una semana antes de los bioensayos, los organismos de *B. straminea* se aclimataron en recipientes de vidrio de 250 ml con 200 mL de agua declorada y bajo las condiciones generales de temperatura, fotoperíodo y alimentación ya detalladas para esta especie. Los bioensayos se iniciaron inmediatamente al llegar al laboratorio con las muestras de agua.

#### **2.3.1 Campaña de muestreo de primavera 2019**

##### **Diseño experimental: exposiciones de 48 h**

Las muestras de agua de los 2 sitios (R y ZH) se utilizaron para llevar adelante exposiciones agudas de 48 h. Por tratamiento se dispusieron 8 recipientes de vidrio de 250 ml con 200 ml de agua de cada sitio ( $N= 8$ ). En cada recipiente se colocaron 6 organismos de *B. straminea* y se realizaron exposiciones bajo condiciones estandarizadas de temperatura y fotoperíodo.

Se registró cada 24 h la presencia de signos de neurotoxicidad y la letalidad.

Al finalizar las exposiciones se realizaron los homogenatos de tejido blando total haciendo un *pool* de todos los caracoles del mismo recipiente y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para las determinaciones bioquímicas (contenido total de proteínas, actividades enzimáticas de AChE, CEs, GST y CAT).

El diseño se resume en la figura 54.

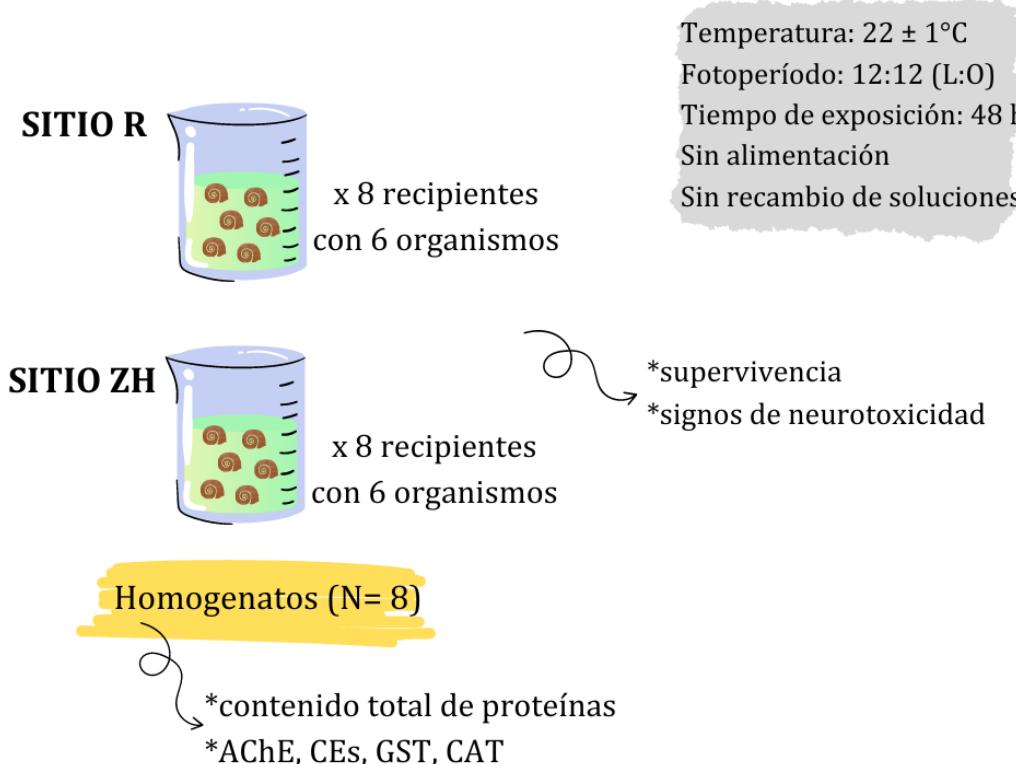


Figura 54. Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones agudas a muestras de agua del Arroyo Las Catonas en primavera de 2019. Los tratamientos corresponden a muestras de agua de dos sitios: R (sitio de referencia localizado en zona residencial) y ZH (sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales y de huertas de uso intensivo). AChE: acetilcolinesterasas; CES: carboxilesterasas; GST: glutatión S-transferasa; CAT: catalasa. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

### 2.3.2 Campaña de muestreo de verano 2021

#### Diseño experimental: exposiciones de 48 h

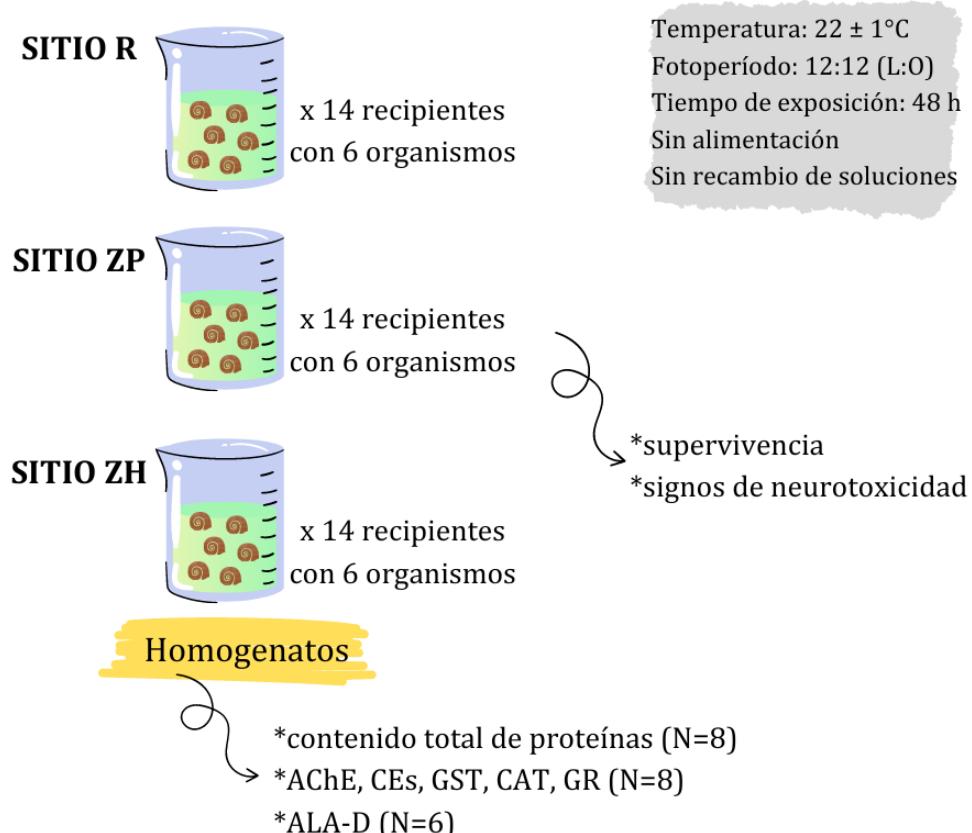
Las muestras de agua de los 3 sitios (R, ZP y ZH) se utilizaron para llevar adelante exposiciones agudas de 48 h. Por tratamiento se dispusieron 14 recipientes de vidrio de 250 ml con 200 ml de agua de cada sitio: 6 destinados a la determinación de la actividad de ALA-D ( $N= 6$ ) que se puso a punto y se incorporó a partir de esta campaña, y 8 para el resto de las determinaciones bioquímicas ( $N= 8$ ). En cada recipiente se colocaron 6 organismos de *B. straminea* y se realizaron las exposiciones bajo condiciones controladas y estandarizadas de temperatura y fotoperíodo.

Se registró cada 24 h la presencia de signos de neurotoxicidad y la letalidad.

Al finalizar la exposición, se realizaron los homogenatos de tejido blando total haciendo un *pool* de todos los caracoles del mismo recipiente y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para las determinaciones bioquímicas: contenido total de

proteínas, actividades enzimáticas de AChE, CEs, GST, CAT, GR y ALA-D. Los homogenatos destinados a las determinaciones de ALA-D se realizaron con un buffer y con una relación peso:volumen distintos a los homogenatos preparados para las demás determinaciones, como se detalló en la Metodología General.

El diseño se resume en la figura 55.



**Figura 55. Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones agudas a muestras de agua del Arroyo Las Catonas en verano de 2021.** Los tratamientos corresponden a muestras de agua de tres sitios: R (sitio de referencia localizado en zona residencial), ZP (sitio aguas abajo una planta de tratamiento de desechos industriales) y ZH (sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo). AChE: acetilcolinesterasas; CEs: carboxilesterasas; GST: glutación S-transferasa; CAT: catalasa; GR: glutación reductasa; ALA-D: ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

### 2.3.3 Campaña de muestreo de verano 2022

**Diseño experimental: exposiciones de 48 h y 7 días.**

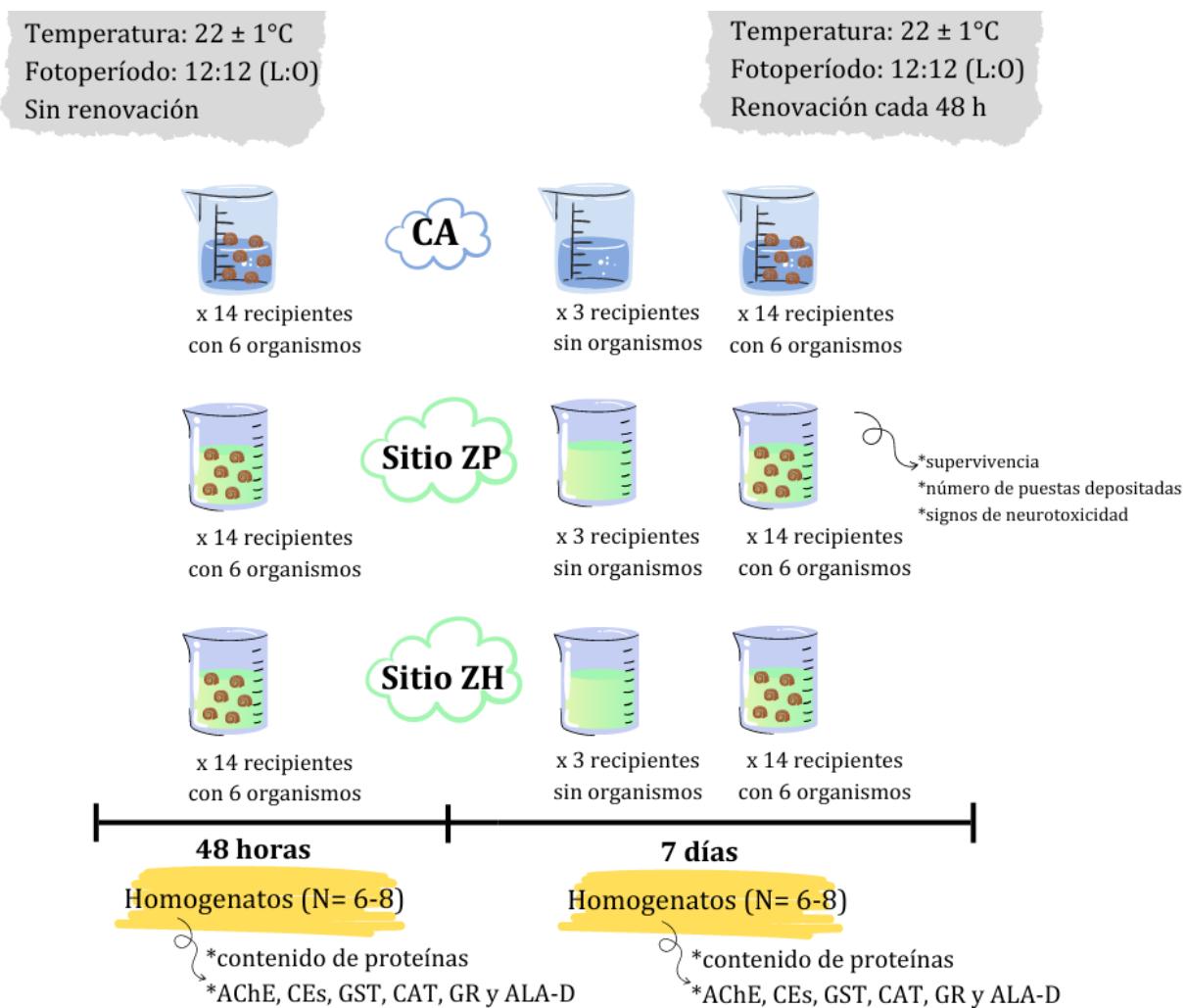
En esta campaña se tomaron muestras de agua de los sitios ZP y ZH, las cuales se utilizaron para llevar adelante exposiciones de 48 h y de 7 días. Se incorporó además un

control de agua declorada (CA). Por tratamiento y por tiempo de exposición se dispusieron 14 recipientes de vidrio de 250 ml con 200 ml de agua: 6 destinados a la determinación de la actividad de ALA-D ( $N= 6$ ) y 8 para el resto de las determinaciones bioquímicas ( $N= 8$ ). En cada recipiente se colocaron 6 organismos de *B. straminea*. Todos los recipientes destinados a las exposiciones de 7 días fueron recubiertos internamente con una capa de acetato de celulosa para el estudio de los parámetros reproductivos. Se incluyeron además 3 recipientes por tratamiento solo con agua, sin organismos, para realizar mediciones de los parámetros fisicoquímicos cada 48 h.

Ambas exposiciones se realizaron bajo condiciones estandarizadas de temperatura, fotoperíodo y alimentación. Se registró cada 24 h la presencia de signos de neurotoxicidad y la letalidad. Cada 48 h se renovó el contenido de todos los recipientes, se cambiaron las capas de acetato y se registró el número de puestas depositadas por recipiente (las cuales se descartaron luego de ser contabilizadas).

A las 48 h y a los 7 días se realizaron homogenatos de tejido blando total haciendo un *pool* de todos los caracoles del mismo recipiente. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para las determinaciones bioquímicas: actividad enzimática de ALA-D ( $N= 6$ ) y de contenido total de proteínas y actividades enzimáticas de AChE, CEs, GST, CAT y GR ( $N= 8$ ). Los homogenatos destinados a las determinaciones de ALA-D se realizaron con un buffer y con una relación peso:volumen distintos a los homogenatos preparados para las demás determinaciones, como se detalló en la Metodología General.

El diseño de ambas exposiciones se resume en la figura 56.



**Figura 56. Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a muestras de agua del Arroyo Las Catonas en verano de 2022 y de 2023.** Los tratamientos corresponden a muestras de agua de ZP (sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales) y ZH (sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo) y un control de agua declorada (CA). AChE: acetilcolinesterasas; CEs: carboxilesterasas; GST: glutatión S-transferasa; CAT: catalasa; GR: glutatión reductasa; ALA-D: ácido  $\delta$ -aminolevúlico dehidrasa. Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

## Diseño experimental: parámetros reproductivos

En los recipientes de vidrio donde se expusieron los organismos adultos por 7 días, se registraron las puestas depositadas a lo largo de todo el bioensayo. Las puestas depositadas en las últimas 48 h se observaron bajo un microscopio estereoscópico y se registró en cada una el número de huevos y de huevos embrionados.

Las puestas que estaban rotas o sin ningún huevo/embrión, fueron descartadas. De las puestas que quedaron, se seleccionó al azar al menos una de cada uno de los recipientes hasta llegar a 10 puestas por tratamiento. Las puestas seleccionadas ( $N= 10$ )

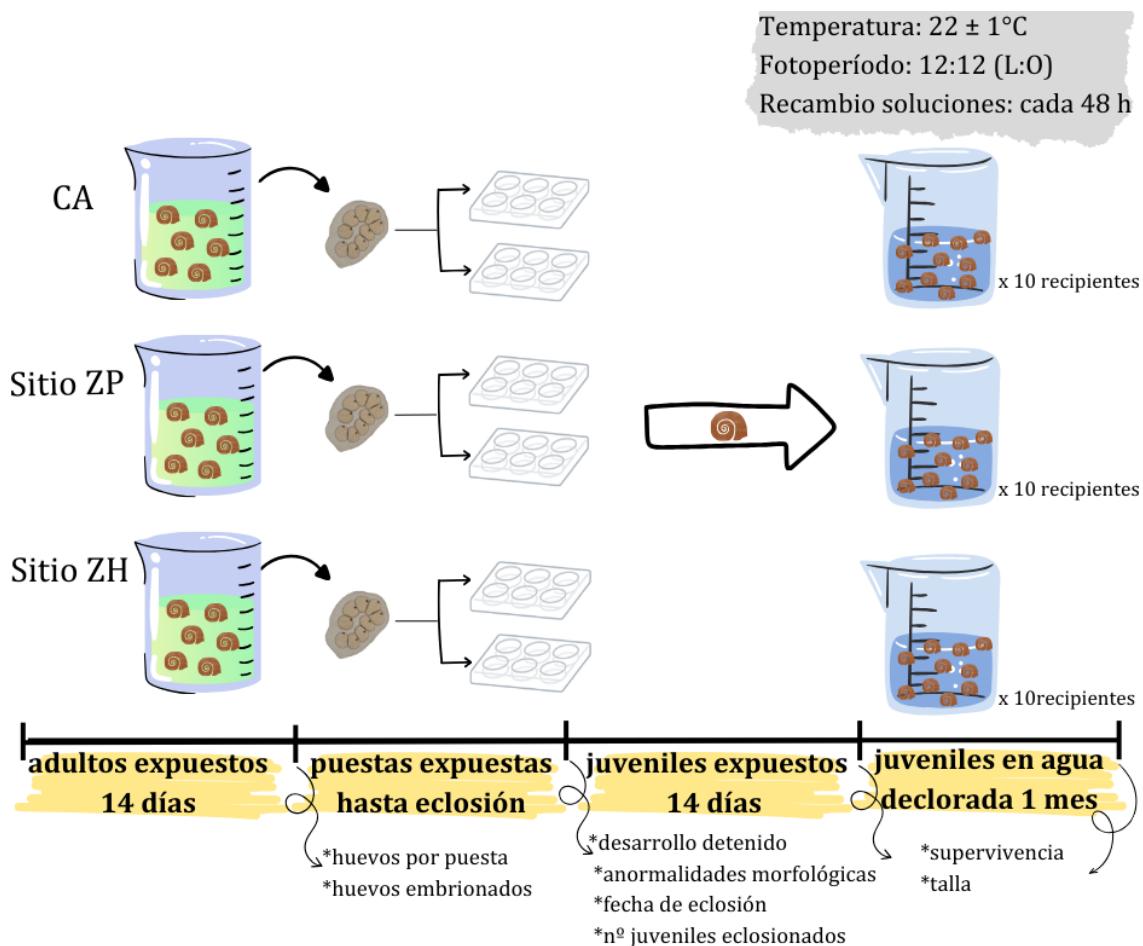
se colocaron individualmente en placas de 6 pocillos y se mantuvo la exposición colocando 10 mL de solución por pocillo. Las soluciones durante el bioensayo de exposición de las puestas y de los juveniles fueron renovadas cada 48 h.

Cada 24 h se observó cada puesta bajo microscopio estereoscópico y se registró la cantidad de embriones con desarrollo detenido en cada estadio, la presencia de anormalidades morfológicas, la fecha de la primera y de la última eclosión, y el número de juveniles eclosionados. Los juveniles fueron alimentados *ad libitum* desde su eclosión. Se calculó el tiempo y el porcentaje de eclosión de cada tratamiento como se detalló en la sección Metodología General. Se mantuvieron las exposiciones durante 14 días contando desde la primera eclosión. El ensayo de reproducción se puede observar resumido en la figura 57.

#### **Diseño experimental: supervivencia y calidad de la descendencia**

El día 14 después de la eclosión, todos los juveniles (los que provenían del grupo CA y de los tratamientos con agua de los sitios ZP y ZH) fueron clasificados en 3 grupos según su longitud máxima: pequeños (<2 mm), medianos (2-4 mm) y grandes (>4 mm), y luego fueron transferidos a agua declorada. Se dispuso de un recipiente de vidrio de 250 mL para cada grupo de juveniles provenientes de la misma puesta (10 puestas por tratamiento= 10 recipientes por tratamiento). El contenido de agua de todos los recipientes fue renovado 48 h y los juveniles fueron alimentados *ad libitum*. La presencia de anormalidades morfológicas y la supervivencia se registró cada 48 h.

Luego de 1 mes en agua declorada, finalizó el bioensayo y se contabilizó el número de juveniles vivos y su peso (figura 57). Se calculó el porcentaje de supervivencia de los juveniles como se describió en la Metodología General.



**Figura 57. Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos a nivel reproductivo y de la descendencia en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a distintos tratamientos.** Los tratamientos corresponden a muestras de agua de ZP (sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales) y ZH (sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo) de la campaña del año 2022 y un control de agua declarada (CA). Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

### 2.3.4 Campaña de muestreo de verano 2023

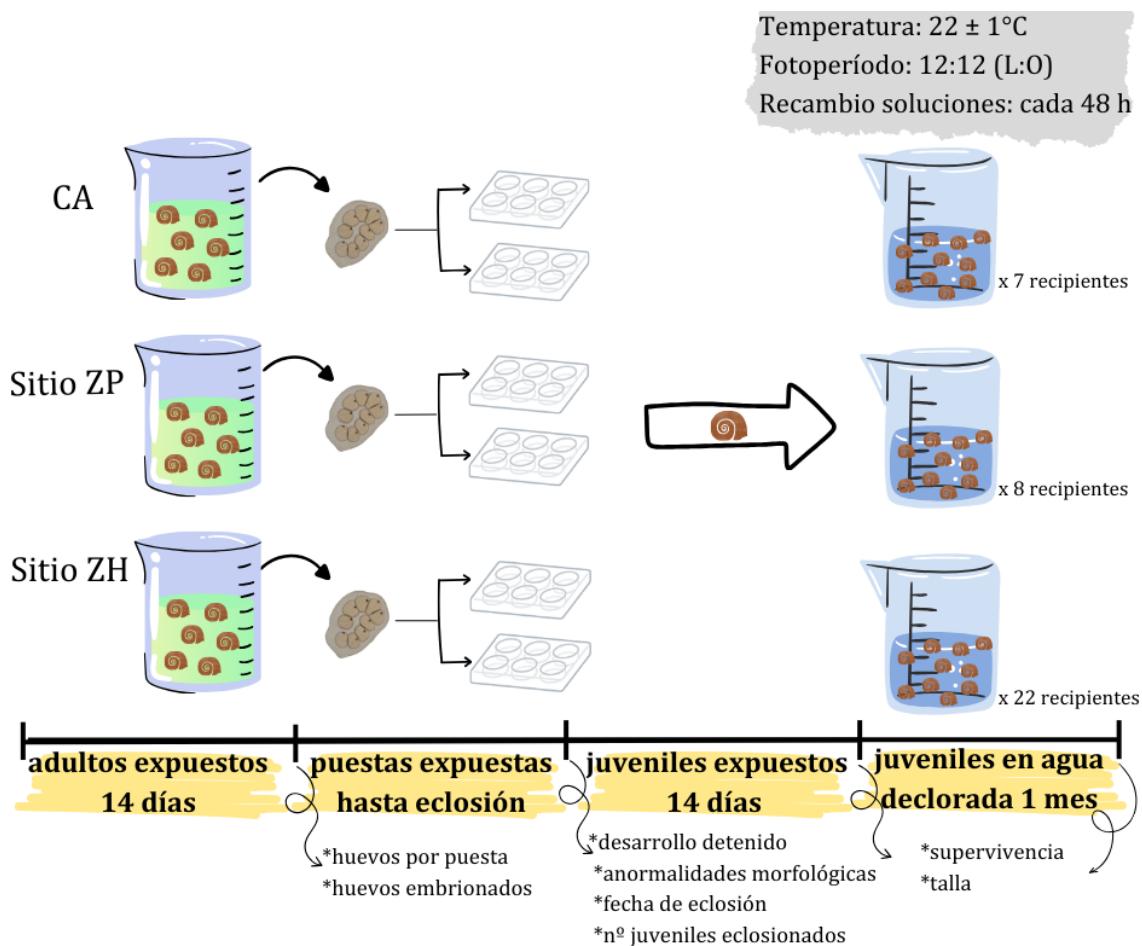
#### Diseño experimental: exposiciones de 48 h y 7 días

Las exposiciones de 48 h y de 7 días con las muestras de agua de los sitios ZP y ZH tomadas en la campaña de 2023, se llevaron a cabo bajo el mismo diseño experimental del año 2022 (figura 56).

#### Parámetros reproductivos, supervivencia y calidad de la descendencia

Los parámetros reproductivos se estudiaron siguiendo el mismo diseño que el año anterior, con la excepción del número de puestas que se separaron luego de los 14 días de exposición de los adultos. En algunos de los tratamientos (grupos CA y ZP) el número

de puestas depositadas fue menor a 10, por lo cual se decidió continuar los ensayos de exposición con todas las puestas de todos los tratamientos ( $N= 7-22$ ) (figura 58).



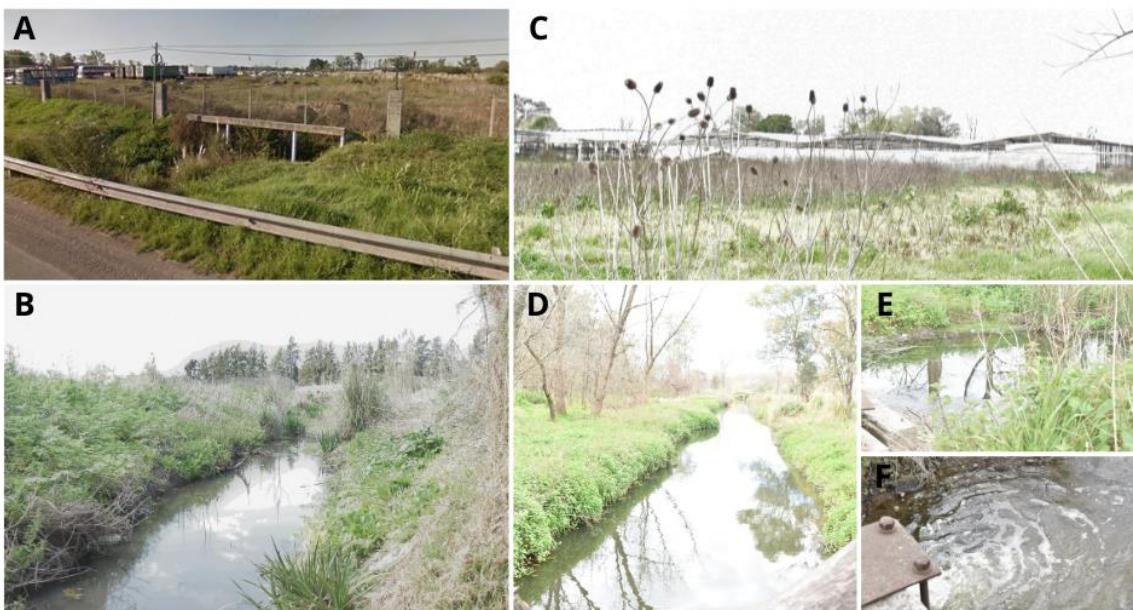
**Figura 58.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado para estudiar efectos a nivel reproductivo y de la descendencia en *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a distintos tratamientos. Los tratamientos corresponden a muestras de agua de ZP (sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales) y ZH (sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo) de la campaña del año 2023 y un control de agua declarada (CA). Las ilustraciones no representan escalas reales de los componentes.

La supervivencia de los juveniles y la calidad de la descendencia se evaluó de la misma forma que se detalló para el año 2022.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características de los sitios de muestreo en las distintas campañas

En la primera campaña de muestreo realizada en el año 2019, se tomó agua de los sitios R y ZH. El sitio R se encontraba accesible desde ambos lados de la ruta, con abundante caudal (figura 59.A,B). Lo mismo ocurrió con el sitio ZH, donde no se observó presencia de residuos sólidos en el agua pero sí materia orgánica como ramas, troncos y hojas (figura 59.D,E,F). La zona de huertas se encontraba cultivada (figura 59.C).



**Figura 59. Fotografías de los sitios de muestreo en el Arroyo Las Catonas, partido de Moreno, Buenos Aires, en primavera de 2019.** (A,B) Sitio de referencia (R) a ambos lados de la ruta provincial que atraviesa el cauce del arroyo. (C) Huertas de uso intensivo. (D,E,F) Sitio ZH aguas abajo del sitio R y de las huertas de uso intensivo, a ambos lados de un puente peatonal/vehicular desde donde se tomaron las muestras de agua.

En la segunda campaña llevada a cabo en verano del año 2021, además de los sitios R y ZH se incorporó el sitio ZP (figura 60.A,B,C). Los 3 sitios se encontraban accesibles, sin residuos sólidos y con poca materia orgánica como ramas, troncos y hojas en los márgenes. Tanto en el sitio ZP como en el ZH había olores fuertes y el agua estaba turbia y oleosa (figura 60.C,F). La zona de las huertas se encontraba cultivada y en una comunicación oral con los trabajadores de las mismas nos indicaron que sacaban agua de pozo para el riego de los cultivos (figura 60.D,E). A diferencia de otras campañas, en esta ocasión había cultivos de maíz.



**Figura 60. Fotografías de los sitios de muestreo en el Arroyo Las Catonas, partido de Moreno, Buenos Aires, en verano de 2021.** (A,B,C) Sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes (ZP), a ambos lados del puente peatonal desde donde se tomaron las muestras de agua. (D,E) Zona de huertas de uso intensivo. (F) Sitio ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo.

En la campaña de verano del año 2022, el sitio de muestreo R se encontraba sin caudal e invadido por abundante vegetación lo cual imposibilitó la toma de muestras de agua (figura 61). Previo al sitio ZP, había mucha actividad de camiones que entraban y salían de la planta de tratamiento, y se detectaron olores fuertes. En la zona de las huertas se pudieron reconocer cultivos de maíz, soja y hortalizas y estaban fumigando en el momento del muestreo.



**Figura 61. Fotografías del sitio de muestreo R en el Arroyo Las Catonas, partido de Moreno, Buenos Aires, en verano de 2022.** Sitio R: de referencia, aguas arriba de fuentes puntuales de contaminación.

Al momento del muestreo del año 2023, el sitio de muestreo R estaba bloqueado por una obra municipal pero, más allá de no poder acceder al sitio, se pudo ver que no tenía caudal (figura 62.A,B). Los sitios ZP y ZH se encontraban sin desechos sólidos y no se registraron olores (figura 62.C,E). La zona de huertas estaba mayoritariamente sin cultivos (figura 62.D). En una comunicación informal con los trabajadores de las huertas, ellos indicaron que el cultivo de soja y el uso de varios plaguicidas se habían prohibido recientemente en la zona.

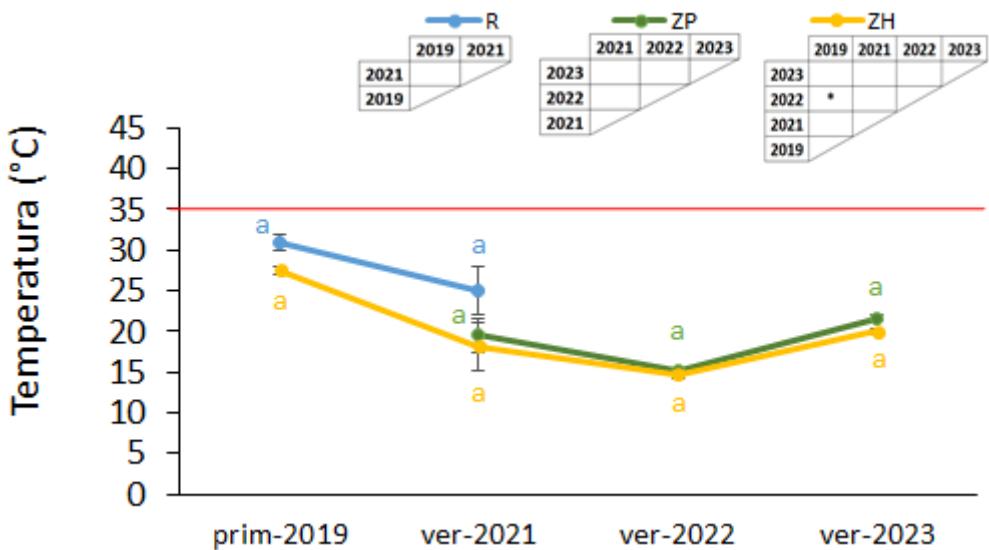


**Figura 62. Fotografías de los sitios de muestreo en el Arroyo Las Catonas, partido de Moreno, Buenos Aires, en verano de 2023.** (A-B) Sitio R: de referencia, aguas arriba de fuentes puntuales de contaminación. (C) Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales. (D) Zona de huertas de uso intensivo. (E) Sitio ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo.

### 3.2 Parámetros fisicoquímicos determinados en las distintas campañas

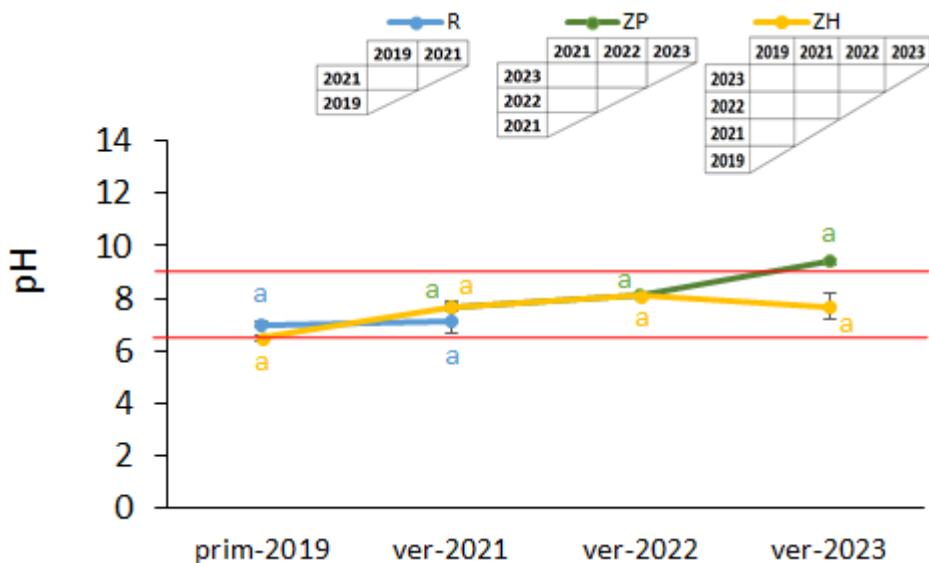
El número de réplicas que se utilizó para las determinaciones fisicoquímicas ( $N= 2$ ), fue siempre bajo, por lo cual las diferencias entre grupos en la mayoría de los casos no resultaron ser significativas a pesar de observarse valores marcadamente diferentes.

En todas las campañas de muestreo se obtuvieron valores de temperatura del agua acordes a la época del año y por debajo de los 35°C que es la temperatura límite para todos los usos/objetivos de calidad para las aguas superficiales (ACUMAR, 2019) (figura 63). Los resultados se analizaron por campaña y también por sitio, realizando los correspondientes análisis estadísticos por separado. En ninguna de las campañas hubo diferencias significativas entre sitios (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 63), aunque se observa que la temperatura en R fue mayor que en los otros dos sitios, en las dos campañas que se pudo determinar. Por otro lado, al analizar estadísticamente los valores de cada sitio para las diferentes campañas, únicamente fue significativa la diferencia de temperatura en ZH en el 2019 respecto al 2022 (Test de Kruskal-Wallis;  $p<0,005$ ; figura 63).



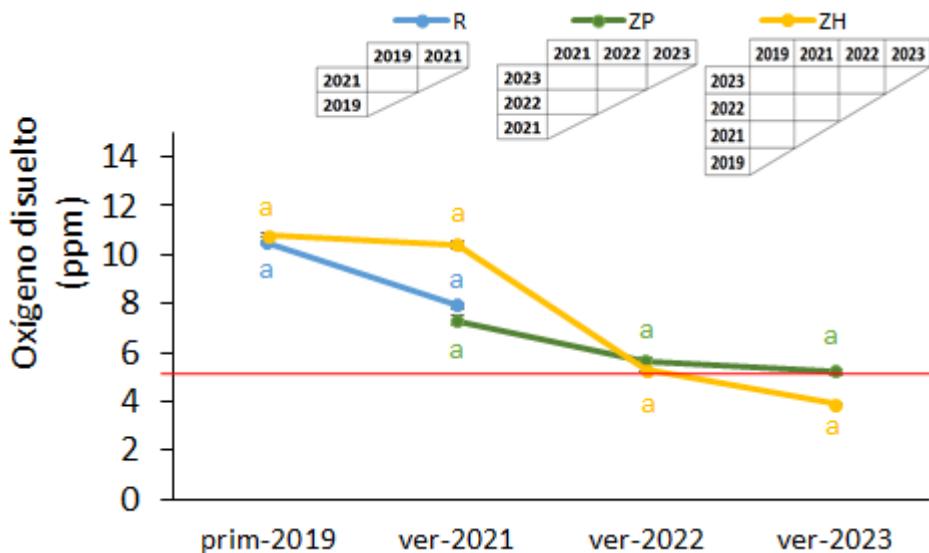
**Figura 63. Perfil de temperatura en las diferentes campañas y en los diferentes sitios de muestreo del Arroyo Las Catonas, Moreno, Buenos Aires.** Mismas letras indican que no hay diferencias significativas entre los sitios para cada campaña de muestreo ( $p>0,05$ ). Asterisco en la tabla indica diferencias significativas entre campañas de un determinado sitio ( $p<0,05$ ). Línea roja: límite de temperatura de 35°C para todos los usos/objetivos de calidad para las aguas superficiales.

En cuanto al pH, para que el agua se considere apta para la protección de la biota debe tener valores entre 6,5 y 9 (ACUMAR, 2019). Como se observa en la figura 64, con excepción del sitio ZP en el 2023 ( $\text{pH} = 9,4 \pm 0,1$ ), los valores medidos se encontraron, en todos los casos, dentro de ese rango óptimo. En ningún muestreo hubo diferencias significativas entre sitios, pero se observa que en 2023 la diferencia entre los sitios ZP y ZH fue más marcada que en las demás campañas (pH más alcalino en ZP) (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 64). Tampoco se observaron diferencias en los valores de pH para los sitios entre las distintas campañas de muestreo (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 64).



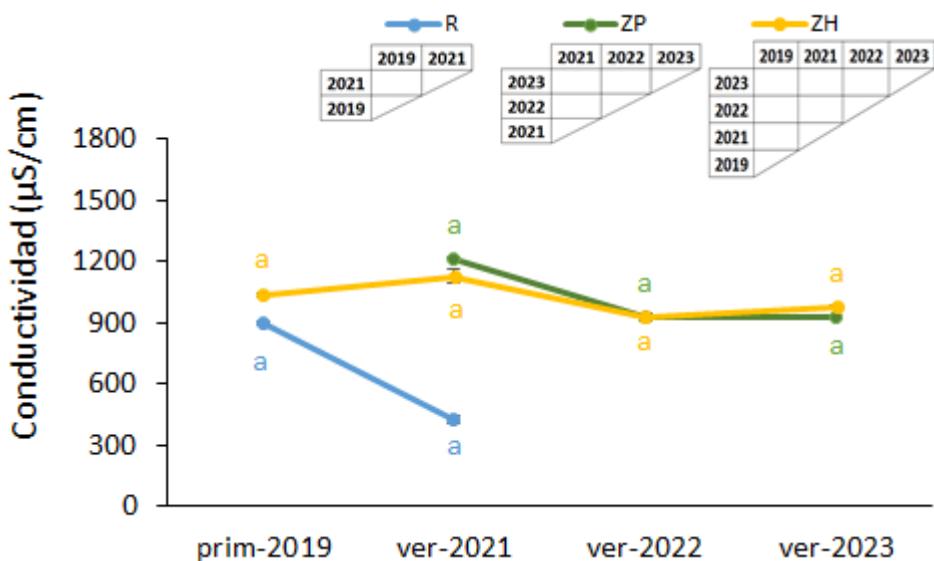
**Figura 64. Perfil de pH en las diferentes campañas y en los diferentes sitios de muestreo del Arroyo Las Catonas, Moreno, Buenos Aires.** Mismas letras indican que no hay diferencias significativas entre los sitios para cada campaña de muestreo ( $p>0,05$ ). Ausencia de asterisco en la tabla indica que no hay diferencias significativas entre campañas de un determinado sitio ( $p>0,05$ ). Línea roja inferior: pH 6,5; línea roja superior: pH 9.

Para el OD, existe un valor guía mínimo para la protección de la biota de 5 ppm (ACUMAR, 2019). Únicamente el sitio ZH en 2023 presentó un valor por debajo de dicho nivel ( $3,9 \pm 0,0$  ppm), aunque los sitios ZP y ZH en 2022, y ZP en 2023 estuvieron muy cercanos a dicho límite (figura 65). Al comparar para cada campaña los distintos sitios, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 65). En cuanto a los valores para un mismo sitio a lo largo de las campañas, se observa que en los 3 sitios el OD fue disminuyendo con el paso de los años, a pesar de no ser estadísticamente significativas las diferencias (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 65).



**Figura 65.** Perfil de oxígeno disuelto en las diferentes campañas y en los diferentes sitios de muestreo del Arroyo Las Catonas, Moreno, Buenos Aires. Mismas letras indican que no hay diferencias significativas entre los sitios para cada campaña de muestreo ( $p>0,05$ ). Ausencia de asterisco en la tabla indica que no hay diferencias significativas entre campañas de un determinado sitio ( $p>0,05$ ). Línea roja: nivel guía para la protección de la vida acuática de 5 ppm.

Tanto el sitio ZP como el ZH presentaron valores estadísticamente similares de conductividad en todas las campañas (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 66). Los dos primeros años, en los cuales fue posible tomar muestras de agua del sitio R, se observó una menor conductividad en dicho sitio en comparación con los otros dos. Esta diferencia fue más notoria en el año 2021, a pesar de no ser estadísticamente significativa (Test de Mann-Whitney; Test de Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ; figura 66). No es posible comparar los valores de conductividad determinados en los sitios con niveles guía y/o límites permitidos debido a que no existen. Esto se debe a que este parámetro es muy variable según el tipo, la ubicación y las características de cada cuerpo de agua.



**Figura 66. Perfil de conductividad en las diferentes campañas y en los diferentes sitios de muestreo del Arroyo Las Catonas, Moreno, Buenos Aires.** Mismas letras indican que no hay diferencias significativas entre los sitios para cada campaña de muestreo ( $p>0,05$ ). Ausencia de asterisco en la tabla indica que no hay diferencias significativas entre campañas de un determinado sitio ( $p>0,05$ ).

La determinación de DQO en el 2019 se realizó por un método diferente al utilizado en los años 2022 y 2023. Por este motivo, los resultados que se muestran a continuación tienen límites de detección diferentes. En el muestreo de 2019, la DQO en el sitio ZH fue más alta que en el sitio R, sin ser estadísticamente significativa esa diferencia (Test de Mann-Whitney;  $p>0,05$ ; tabla 13). En el verano de 2022 no hubo diferencias entre los sitios muestreados. En cambio en 2023, el sitio ZH presentó un valor mayor de DQO que el sitio ZP, pero no fue posible analizar estadísticamente esta diferencia por encontrarse el valor de ZP por debajo del límite de detección del método (tabla 13). Al analizar las variaciones del mismo sitio entre campañas, tampoco se observaron diferencias significativas, pero se observó que los valores del año 2023 de ambos sitios fueron más bajos que los del año 2022 (Test de Mann-Whitney;  $p>0,05$ ; tabla 13). En todos los casos, los valores determinados estuvieron por debajo de 250 mg/L que es el valor guía que indica la Autoridad del Agua (AdA) de la Provincia de Buenos Aires (Resolución 336-03) para descargas en cuerpos de agua superficiales.

**Tabla 13. Valores de DQO determinados en muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en distintas campañas.**

	Primavera 2019		Verano 2021	Verano 2022		Verano 2023	
	Sitio R	Sitio ZH		Sitio ZP	Sitio ZH	Sitio ZP	Sitio ZH
DQO (mg/L)	84,5 ± 3,0	13,0 ± 3,0	ND	58,0 ± 3,0	58,0 ± 3,0	< 26	30,5 ± 3,5

DQO: demanda química de oxígeno. ND: no determinado. Método utilizado en primavera 2019: SM 5220 D; límite de detección: 6,4 mg/L; incertidumbre: 2,6%. Método utilizado en verano de 2022 y de 2023: SM 5220 COD; límite de detección: 26 mg/L; incertidumbre: 5,7%.

### Metales y plaguicidas

Ninguno de los 4 metales que se analizaron (cadmio, cobre, plomo y zinc) en las campañas de 2022 y 2023 fueron detectados, siendo los límites de detección de los métodos 0,05 mg/L para cobre y zinc y 0,0001 mg/L para cadmio y plomo.

Como se describió en la Metodología de este capítulo, tanto en muestreos previos como en los muestreos del 2019 y 2021, se detectaron en ZH y ZP plaguicidas como el clorpirifos y el glifosato (Bernal Rey et al., 2019; Bernal Rey, 2022). En el año 2021 la concentración de clorpirifos determinada en ZH fue de 4,02 µg/L, mientras que en R no se detectó (Bernal Rey, 2022; publicado en Bianco et al., 2023). Posteriormente en la campaña de 2023, en las determinaciones realizadas como servicios a terceros, no se detectó clorpirifos ni glifosato, en ZP ni en ZH, siendo los límites de detección de los métodos 0,07 µg/L para clorpirifos y 0,01 µg/L para glifosato.

### Seguimiento de los parámetros fisicoquímicos durante los bioensayos de 7 días

En las exposiciones de 7 días que se llevaron a cabo en los años 2022 y 2023, se realizó un seguimiento de los parámetros fisicoquímicos tanto en las muestras de agua del ambiente, como en el agua utilizada para los grupos CA. Por un lado se compararon los valores de las muestras ambientales con su respectivo control CA, tanto a tiempo 0 (al momento de iniciar los bioensayos) como luego de los 7 días de bioensayo. Además, se analizó cómo cada parámetro varió a lo largo de los 7 días en cada grupo y si dichas variaciones fueron significativas.

Las muestras de agua de los distintos sitios como el agua utilizada para los grupos CA, no mostraron variaciones durante el tiempo que duró su correspondiente bioensayo en cuanto a la temperatura, la conductividad y el OD (ANOVA;  $p>0,05$ ; tablas 14 y 15).

**Tabla 14. Seguimiento de parámetros fisicoquímicos determinados en muestras ambientales del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022 a lo largo de un bioensayo de 7 días en laboratorio.**

Verano 2022	Tiempo 0			Promedio de los 7 días		
	CA	ZP	ZH	CA	ZP	ZH
Temperatura (°C)	23,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	20,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	19,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	21,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	20,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
pH	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
Conductividad (μS/cm)	395,9 ± 28,4 <sup>a</sup>	962,0 ± 18,9 <sup>b</sup>	937,5 ± 11,9 <sup>b</sup>	390,3 ± 18,4 <sup>a</sup>	955,8 ± 38,0 <sup>b</sup>	949,3 ± 48,5 <sup>b</sup>
OD	8,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	7,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,7 <sup>a</sup>
	92,5 ± 7,0 <sup>a</sup>	87,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	94,0 ± 6,2 <sup>a</sup>	94,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	87,0 ± 2,9 <sup>a</sup>	86,7 ± 6,5 <sup>a</sup>

CA: control de agua declorada, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de todas las determinaciones de un mismo grupo al momento de inicio del bioensayo (tiempo 0) y a lo largo de los 7 días del bioensayo. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada tiempo ( $p<0,05$ ).

**Tabla 15. Seguimiento de parámetros fisicoquímicos determinados en muestras ambientales del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023 a lo largo de un bioensayo de 7 días en laboratorio.**

Verano 2023	Tiempo 0			Promedio de los 7 días		
	CA	ZP	ZH	CA	ZP	ZH
Temperatura (°C)	21,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	21,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	21,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	21,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	21,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	21,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
pH	6,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,2 <sup>ab</sup>	5,0 ± 1,7 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>ab</sup>
Conductividad (μS/cm)	272,0 ± 65,1 <sup>a</sup>	927,5 ± 14,5 <sup>b</sup>	995,7 ± 11,0 <sup>b</sup>	243,0 ± 58,3 <sup>a</sup>	916,3 ± 14,6 <sup>b</sup>	968,0 ± 26,5 <sup>b</sup>
OD	8,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	7,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,9 <sup>a</sup>
	99,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	85,8 ± 8,1 <sup>a</sup>	89,1 ± 4,3 <sup>a</sup>	96,0 ± 4,6 <sup>a</sup>	77,8 ± 7,6 <sup>a</sup>	70,5 ± 2,8 <sup>a</sup>

CA: control de agua declorada, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de todas las determinaciones de un mismo grupo al momento de inicio del bioensayo (tiempo 0) y a lo largo de los 7 días del bioensayo. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada tiempo ( $p<0,05$ ).

La temperatura promedio del agua se mantuvo en  $21,2 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  (promedio de todos los grupos en ambas campañas de muestreo).

En el caso de la conductividad, en el agua utilizada para los grupos CA el valor de este parámetro se mantuvo siempre estable, siendo el promedio  $316,6 \pm 88,3 \mu\text{S}/\text{cm}$ . En el

caso de las muestras de agua ambientales, los valores de conductividad medidos en ellas fueron significativamente más elevados que los medidos en el agua del grupo CA, en ambas campañas (ANOVA;  $p<0,05$ ; tabla 14 y 15) pero se mantuvieron a lo largo de los 7 días sin modificaciones significativas y sin diferencias entre los dos sitios (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 14 y 15).

En el caso del OD, los valores en 2022 fueron similares entre grupos y a lo largo de los días (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 14), resultando el promedio de todos los grupos en  $7,4 \pm 1,3$  ppm. En cambio en 2023, el OD fue más bajo en ZP y aún más bajo en ZH con respecto a CA, sin ser dichas diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 15). En todos los casos los valores se mantuvieron por encima del valor guía para la protección de la vida acuática de 5 ppm.

Por último, los valores de pH en 2022 no presentaron diferencias a través de los días ni tampoco entre grupos (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 14). En cambio, en 2023 los valores fueron más bajos que el año anterior, y hubo diferencias significativas entre CA y las muestras de agua provenientes de ZP: pH más ácido en el caso de las muestras ambientales a lo largo de los 7 días (ANOVA;  $p<0,05$ ; tabla 15). Cabe resaltar que los valores de todos los grupos del año 2023, con excepción de CA a tiempo 0, estuvieron por fuera del rango recomendado para la protección de la biota (6,5-9).

### **3.3 Muestreo de primavera de 2019**

#### **Bioensayos**

Se realizaron bioensayos de exposición de 48 h con las muestras de agua de los sitios R y ZH, según lo detallado en la Metodología.

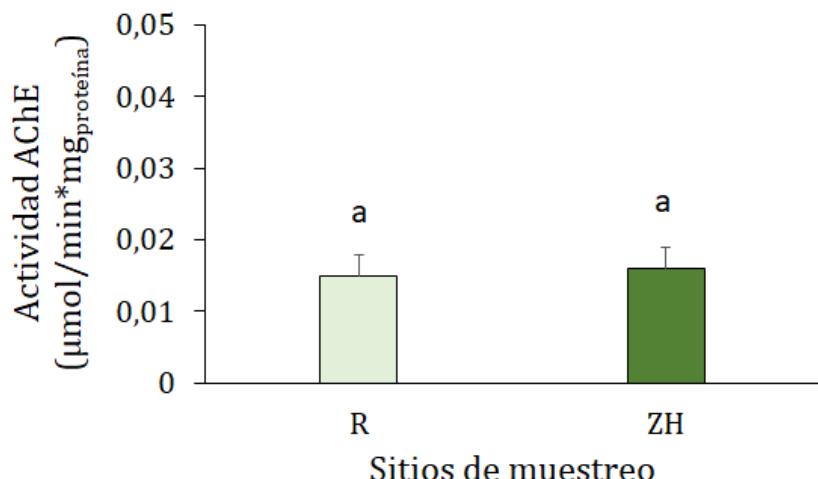
#### **Neurotoxicidad y letalidad**

No se detectaron signos de neurotoxicidad ni letalidad en los organismos expuestos a las muestras de agua de los sitios R y ZH.

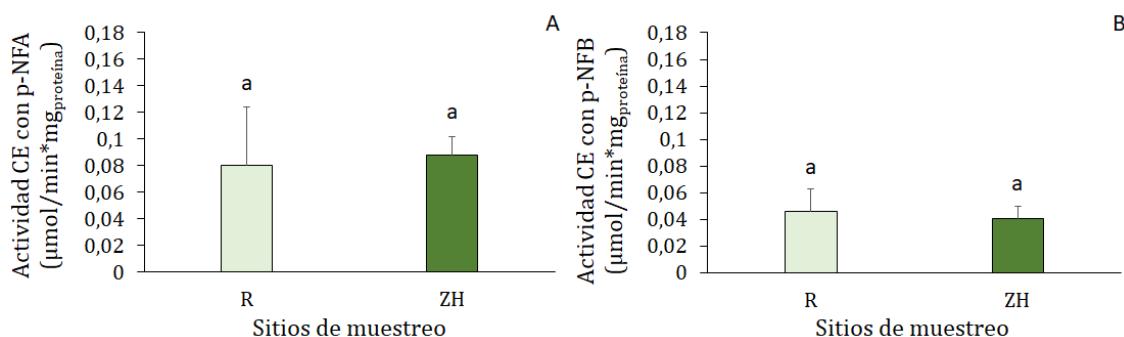
#### **Parámetros bioquímicos**

No hubo variación significativa en el contenido total de proteínas entre los tratamientos, siendo el promedio  $\pm$  desvío estándar  $3,45 \pm 0,71$  mg/g<sub>tejido</sub> (ANOVA;  $p>0,05$ ).

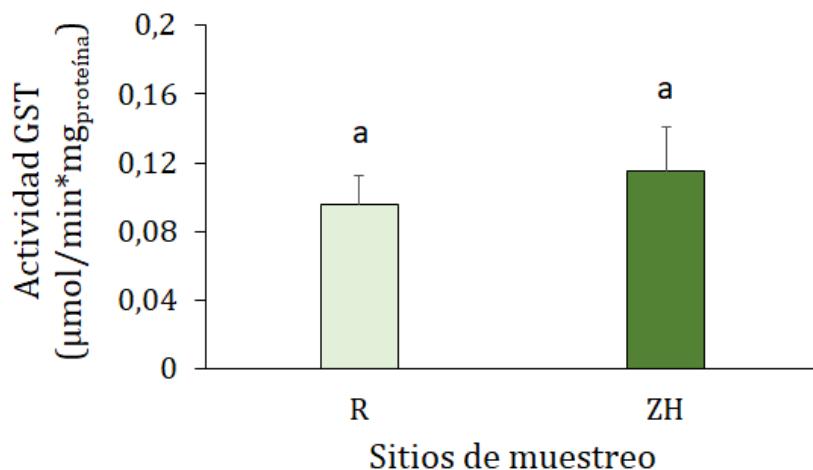
Los biomarcadores bioquímicos evaluados en los sobrenadantes (AChE, CE con p-NFA y p-NFB, GST y CAT), no presentaron diferencias significativas entre sitios (Student t-test;  $p>0,05$ ; figuras 67 a 70).



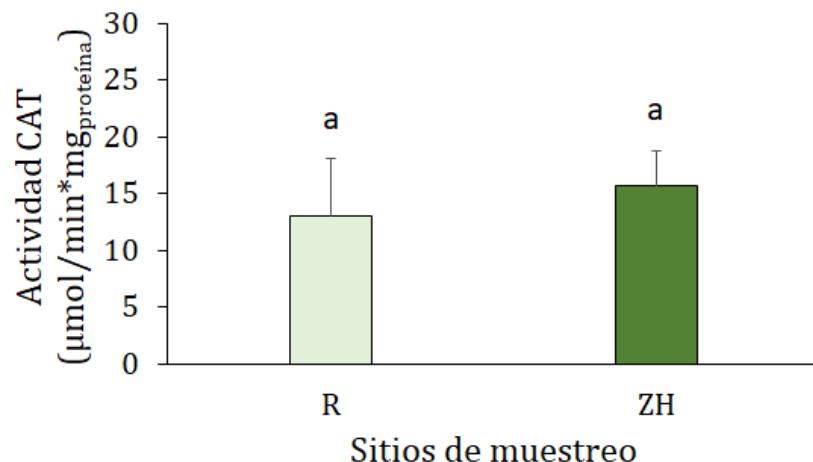
**Figura 67.** Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en primavera de 2019. Sitio R: de referencia; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones ( $N= 8$ ). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p>0,05$ ).



**Figura 68.** Actividad de la enzima carboxilesterasa (CE) determinadas en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en primavera de 2019. (A) Actividad determinada con p-nitrofenil acetato (p-NFA) y (B) con p-nitrofenil butirato (p-NFB) como sustratos. Sitio R: de referencia; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones ( $N= 8$ ). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p>0,05$ ).



**Figura 69.** Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) determinadas en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en primavera de 2019. Sitio R: de referencia; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p>0,05).



**Figura 70.** Actividad de la enzima catalasa (CAT) determinadas en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en primavera de 2019. Sitio R: de referencia; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p>0,05).

### 3.4 Muestreo de verano de 2021

#### Bioensayos

Con las muestras de agua de los sitios R, ZP y ZH tomadas en 2021, se realizaron exposiciones de 48 h.

### Neurotoxicidad y letalidad

No se registraron organismos con signos de neurotoxicidad en ningún grupo.

Del total de organismos expuestos al agua del sitio ZH, el 60% murió a las 48 h, siendo este porcentaje significativo respecto a los tratamientos con agua de R y de ZP en los cuales no hubo letalidad (Chi cuadrado;  $p<0,0001$ ). En la figura 71 se muestran algunos de los ejemplares muertos.

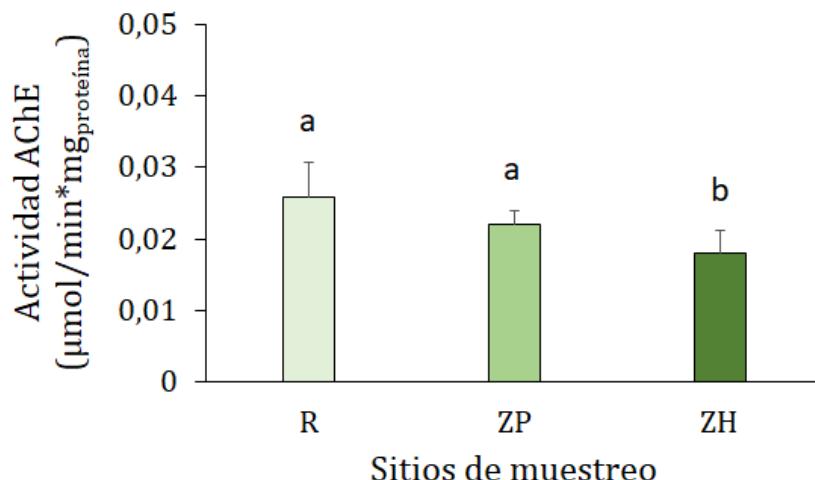


**Figura 71.** Organismos de *Biomphalaria straminea* muertos luego de 48 h de exposición a muestras de agua del sitio ZH en el Arroyo Las Catonas, partido de Moreno, Buenos Aires, tomadas en verano de 2021. ZH: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes y de una zona de huertas de uso intensivo; V: organismo vivo; M: organismo muerto.

### Parámetros bioquímicos

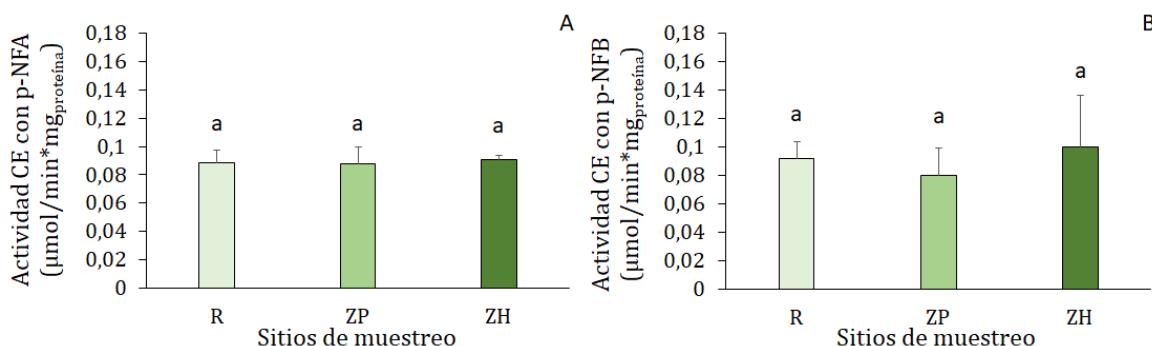
No hubo variación significativa en el contenido total de proteínas entre los tratamientos, siendo el promedio  $\pm$  desvío estándar  $7,82 \pm 1,51$  mg/g<sub>tejido</sub> (ANOVA;  $p>0,05$ ).

La actividad de la enzima AChE luego de 48 h de exposición al agua del sitio ZH, se inhibió 30% respecto al sitio R (ANOVA;  $p<0,005$ ; figura 72).

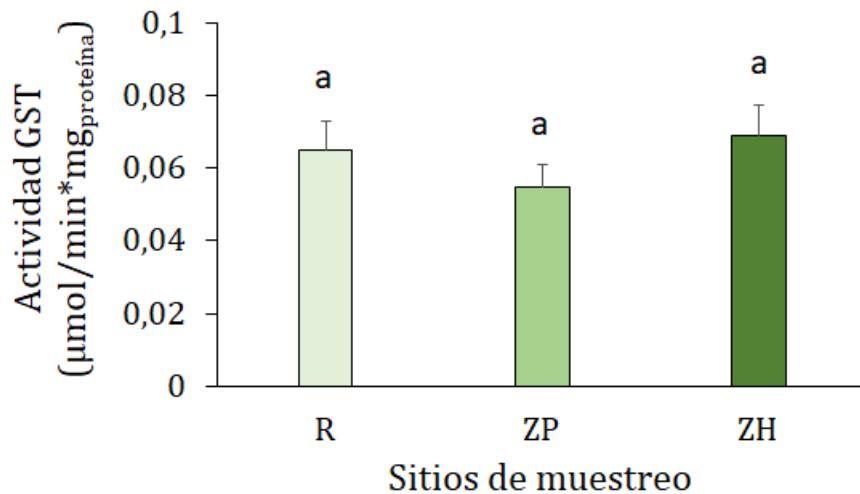


**Figura 72.** Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) se indican con diferentes letras.

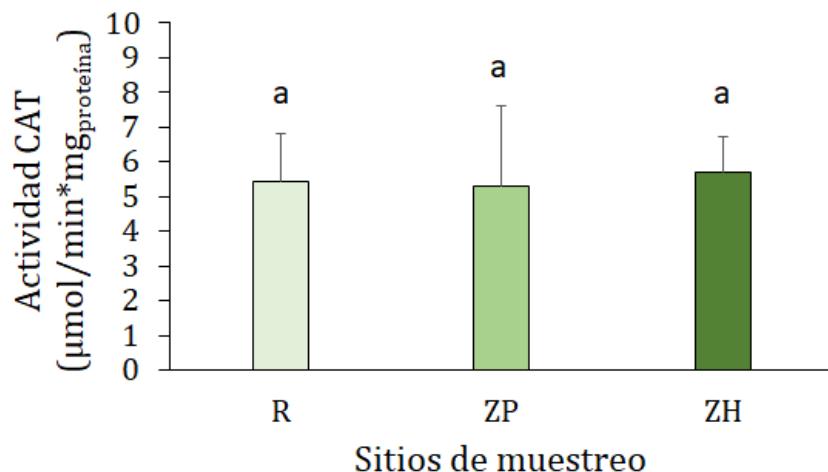
Por otro lado, las actividades de las enzimas CE, GST, CAT y GR no se vieron modificadas por los distintos tratamientos (ANOVA;  $p>0,005$ ; figuras 73 a 76).



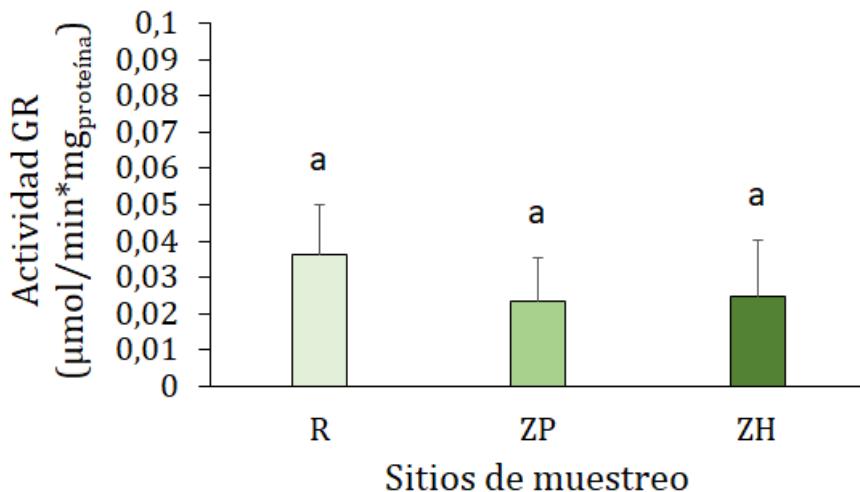
**Figura 73.** Actividad de la enzima carboxilesterasa (CE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. (A) Actividad determinada con p-nitrofenil acetato (p-NFA) y (B) con p-nitrofenil butirato (p-NFB) como sustratos. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).



**Figura 74.** Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

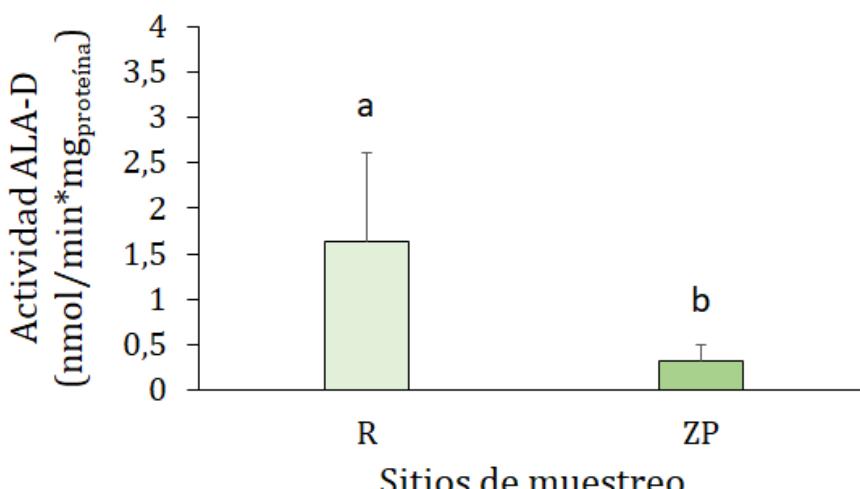


**Figura 75.** Actividad de la enzima catalasa (CAT) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).



**Figura 76.** Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

La actividad de la enzima ALA-D se inhibió un 81% con el tratamiento con agua de ZP respecto a R (ANOVA;  $p<0,005$ ; figura 77). No pudo determinarse este biomarcador en el tratamiento ZH, ya que debido a la letalidad, el volumen de sobrenadante no fue suficiente.



**Figura 77.** Actividad de la enzima ácido δ-aminolevulínico dehidratasa (ALA-D) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2021. Sitio R: de referencia; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 6 determinaciones (N= 6). Diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) se indican con diferentes letras.

### 3.5 Muestreo de verano de 2022

#### Bioensayos

Se tomaron muestras de agua de los sitios ZP y ZH y con ellas se realizaron exposiciones de 48 h y 7 días con organismos adultos de *B. straminea*. Además, se estudió la embriotoxicidad y la calidad de la descendencia como se detalló en la Metodología.

#### Neurotoxicidad y letalidad

Tanto con la exposición de 48 h como con la de 7 días, se observaron organismos con signos de neurotoxicidad en todos los tratamientos. En todos los casos, esos porcentajes fueron menores al 10%, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ; tabla 16 y 17). Los signos de neurotoxicidad observados en dichos organismos fueron falta de adherencia y protrusión de la región céfalo-pedal.

Durante la exposición de 48 h, se registró solo 6% de letalidad en el control CA, sin ser ese valor estadísticamente significativo respecto a los demás tratamientos (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ; tabla 16). La exposición de 7 días ocasionó letalidad en todos los grupos, siendo mayor el porcentaje en los tratamientos con agua ambiental, aunque en ningún caso las diferencias respecto a CA fueron significativas (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ; tabla 17).

**Tabla 16. Signos de neurotoxicidad y letalidad en organismos de *Biomphalaria straminea* luego de 48 h de exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022.**

%	CA	ZP	ZH
<b>Signos de neurotoxicidad</b>	$6 \pm 7^a$	$3 \pm 6^a$	$2 \pm 4^a$
<b>Letalidad</b>	$6 \pm 7^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$

CA: control de agua declorada, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de una zona de huertas de uso intensivo. Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticas entre grupos (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ).

**Tabla 17. Signos de neurotoxicidad y letalidad en organismos de *Biomphalaria straminea* luego de 7 días de exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022.**

%	CA	ZP	ZH
<b>Signos de neurotoxicidad</b>	$3 \pm 6^a$	$9 \pm 11^a$	$3 \pm 6^a$
<b>Letalidad</b>	$3 \pm 6^a$	$6 \pm 7^a$	$9 \pm 19^a$

CA: control de agua declorada, ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de una zona de huertas de uso intensivo. Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticas entre grupos (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ).

### Parámetros bioquímicos

No hubo variación significativa en el contenido total de proteínas entre los tratamientos con ninguno de los tiempos de exposición. El promedio  $\pm$  desvío estándar de todos los grupos expuestos por 48 h correspondió a  $5,76 \pm 0,89$  mg/g<sub>tejido</sub> y en el caso de los grupos expuestos por 7 días el promedio fue de  $5,42 \pm 1,26$  mg/g<sub>tejido</sub> (ANOVA;  $p>0,05$ ).

Luego de la exposición por 48 h, la actividad de la enzima CE determinada con p-NFB aumentó un 36% con la exposición a ZP respecto a CA (ANOVA 1 factor;  $p<0,05$ ; tabla 18). Los demás parámetros bioquímicos no se vieron alterados significativamente entre grupos y sus respectivos controles con este tiempo de exposición (ANOVA 1 factor;  $p>0,05$ ; tabla 18).

**Tabla 18. Actividades enzimáticas determinadas en *Biomphalaria straminea* luego de 48 h de exposición a muestras de agua de sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2022).**

	CA	ZP	ZH
AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	0,008 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,008 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,006 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>
CE (p-NFA) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	0,053 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,056 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,051 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>
CE (p-NFB) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	0,064 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	↑ 0,087 $\pm$ 0,015 <sup>b</sup>	0,073 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>
GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	0,053 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,053 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,058 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>
CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	8,07 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup>	6,66 $\pm$ 2,33 <sup>a</sup>	6,70 $\pm$ 2,14 <sup>a</sup>
GR ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	0,063 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>	0,048 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>	0,061 $\pm$ 0,020 <sup>a</sup>
ALA-D ( $\text{nmol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	6,85 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	5,22 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	6,26 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>

AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, GST: glutatión S-transferasa, CAT: catalasa, GR: glutatióón reductasa, ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato, CA: control de agua declorada, ZH: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar (N= 8). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0,05).

En los caracoles expuestos por 7 días al agua de ZP, se observó un aumento significativo de la actividad de AChE del 39% con respecto a CA (ANOVA 1 factor; p<0,05; tabla 19). Por otro lado, la exposición al agua del sitio ZH produjo una inhibición de la actividad de GR del 71% respecto a CA (ANOVA 1 factor; p<0,05; tabla 19). Los demás parámetros no se vieron modificados con los tratamientos (ANOVA 1 factor; p>0,05; tabla 19).

**Tabla 19.** Actividades enzimáticas determinadas en *Biomphalaria straminea* luego de 7 días de exposición a muestras de agua de sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2022).

	CA	ZP	ZH
AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,007 \pm 0,002^{\text{a}}$	$\uparrow 0,010 \pm 0,003^{\text{b}}$	$0,008 \pm 0,001^{\text{ab}}$
CE (p-NFA) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,064 \pm 0,009^{\text{a}}$	$0,072 \pm 0,018^{\text{a}}$	$0,074 \pm 0,018^{\text{a}}$
CE (p-NFB) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,082 \pm 0,025^{\text{a}}$	$0,101 \pm 0,032^{\text{a}}$	$0,105 \pm 0,040^{\text{a}}$
GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,049 \pm 0,014^{\text{a}}$	$0,052 \pm 0,011^{\text{a}}$	$0,057 \pm 0,014^{\text{a}}$
CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$6,77 \pm 2,57^{\text{a}}$	$7,80 \pm 2,46^{\text{a}}$	$8,20 \pm 2,83^{\text{a}}$
GR ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,065 \pm 0,025^{\text{a}}$	$0,048 \pm 0,010^{\text{a}}$	$\downarrow 0,019 \pm 0,010^{\text{b}}$
ALA-D ( $\text{nmol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$2,97 \pm 0,87^{\text{a}}$	$3,19 \pm 1,23^{\text{a}}$	$4,41 \pm 1,18^{\text{a}}$

AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, GST: glutatión S-transferasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, ALA-D: ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato, CA: control de agua declorada, ZH: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar (N= 6-8). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p<0,05$ ).

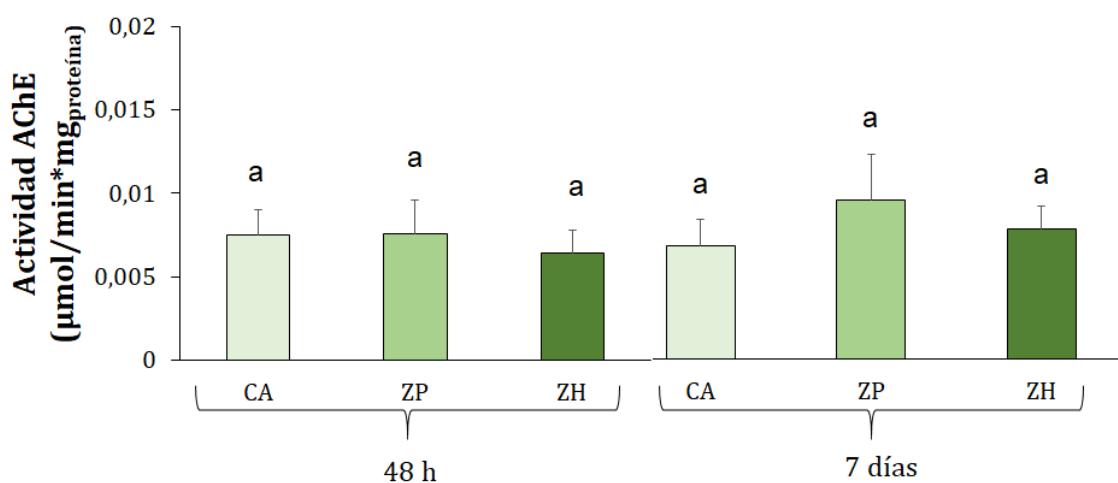
Al realizar ANOVA de dos factores para identificar diferencias entre los tiempos de exposición, los tratamientos y en la interacción tiempo x tratamiento, se observaron resultados distintos para las diferentes enzimas (tabla 20).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la enzima AChE entre tiempos, tratamientos ni en su interacción (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 78).

**Tabla 20.** Resumen del ANOVA dos factores para analizar el efecto de tiempo, tratamiento y su interacción sobre los distintos parámetros bioquímicos estudiados en *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2022).

Parámetro	Tiempo			Tratamiento			Interacción		
	g.l	F	p	g.l	F	p	g.l	F	p
Actividad AChE	2	3,12	0,0847	3	3,13	0,0541	6	2,25	0,1181
Actividad CE (p-NFA)	2	20,45	<0,0001*	3	0,85	0,4350	6	0,89	0,4170
Actividad CE (p-NFB)	2	9,57	0,0035*	3	3,37	0,0541	6	0,59	0,5576
Actividad GST	2	0,64	0,4280	3	1,50	0,2350	6	0,15	0,8640
Actividad CAT	2	0,32	0,5770	3	0,03	0,9700	6	2,50	0,7774
Actividad GR	2	5,93	0,0194*	3	6,16	0,0046*	6	7,30	0,0019*
Actividad ALA-D	2	23,54	<0,0001*	3	1,53	0,232	6	5,53	0,3541

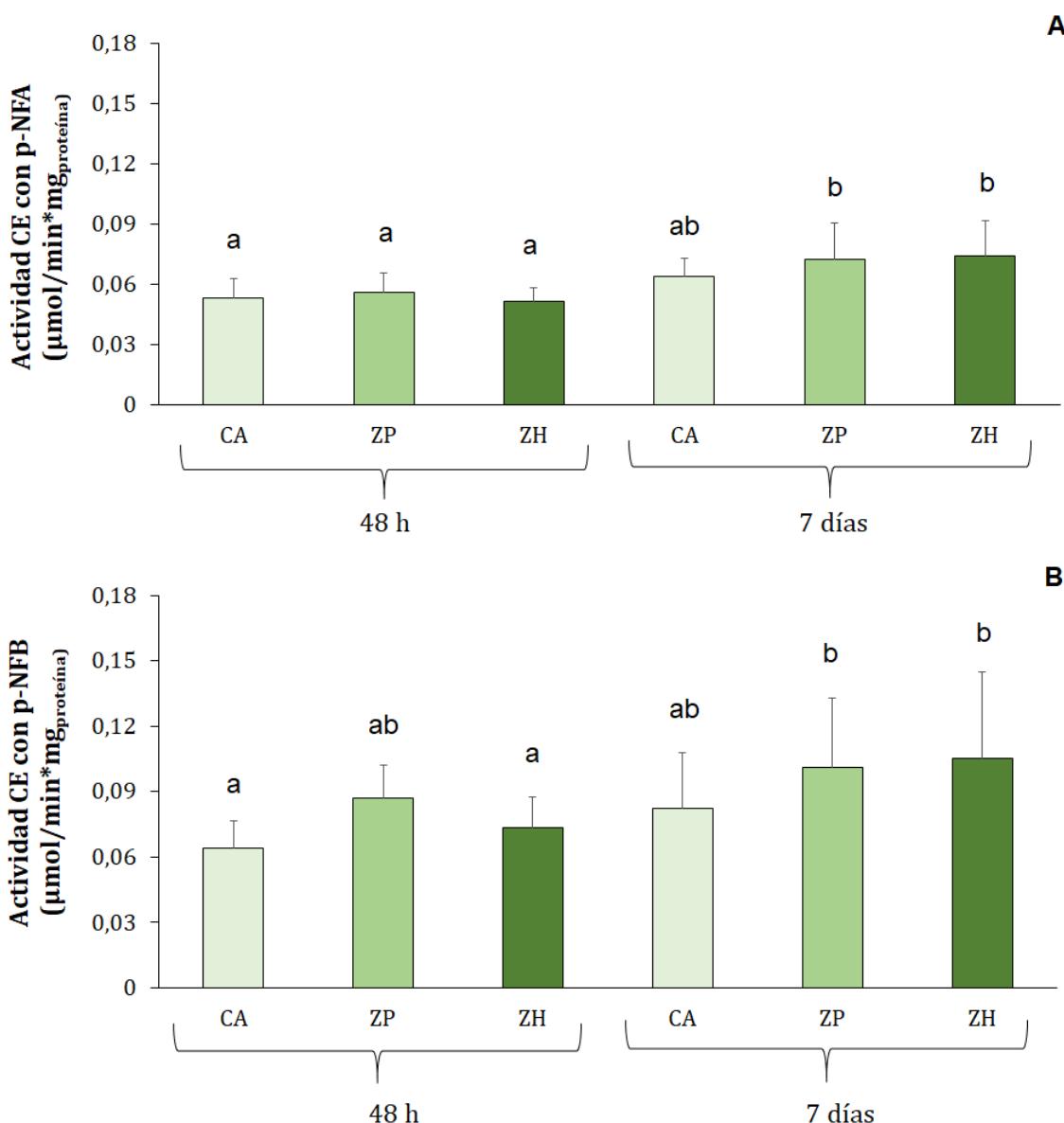
g.l: grados de libertad; F: proporción de Fisher; p: probabilidad de F; CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo; AChE: acetilcolinesterasa; CE: carboxilesterasa; p-NFA: p-nitrofenil acetato; p-NFB: p-nitrofenil butirato; GST: glutatió S-transferasa; CAT: catalasa; GR: glutatió reductasa; ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa. Los asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 78.** Actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA 2 factores;  $p>0,05$ ).

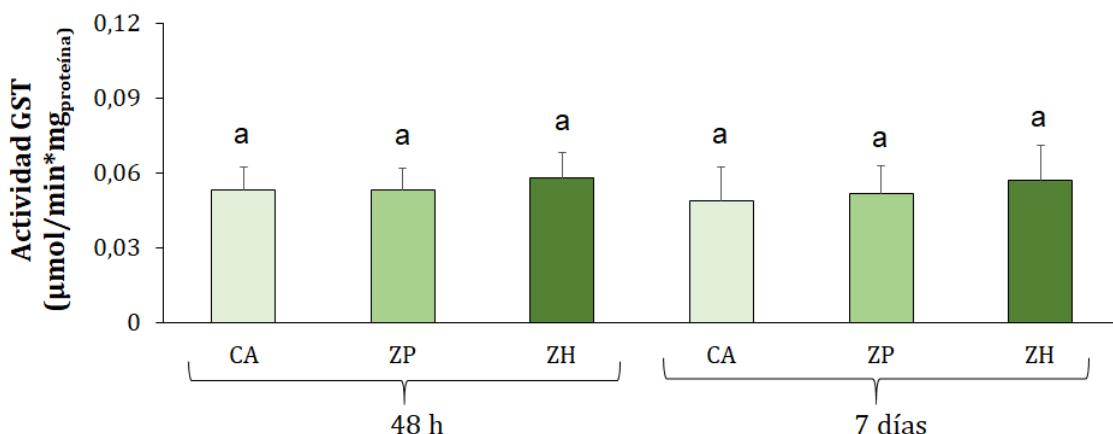
En el caso de la actividad CE determinada con p-NFA, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tiempos (tabla 20). La actividad se vio aumentada en los grupos ZP y ZH a los 7 días de exposición, con respecto a las 48 h. No hubo diferencias entre los grupos CA a los distintos tiempos, ni entre los tratamientos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles a cada tiempo (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 79.A).

Por otro lado, sobre la actividad CE determinada con p-NFB se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tiempos, pero no entre tratamientos ni en su interacción (tabla 20). No hubo diferencias entre los controles CA. En el grupo ZH la actividad fue mayor a los 7 días respecto a las 48 h (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 79).

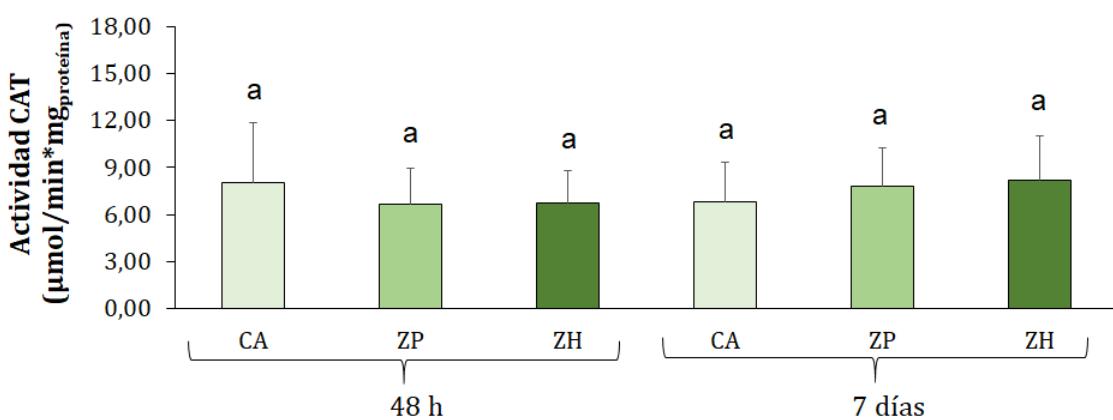


**Figura 79.** Actividad enzimática de carboxilesterasa (CE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. Actividad determinada con (A) p-nitrofenil acetato (p-NFA) y con (B) p-nitrofenil butirato (P-NFB) como sustratos. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con diferentes letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las actividades de las enzimas GST y CAT con los distintos tratamientos o tiempos de exposición, así como tampoco en su interacción (ANOVA 2 factores; tabla 20; figuras 80 y 81).



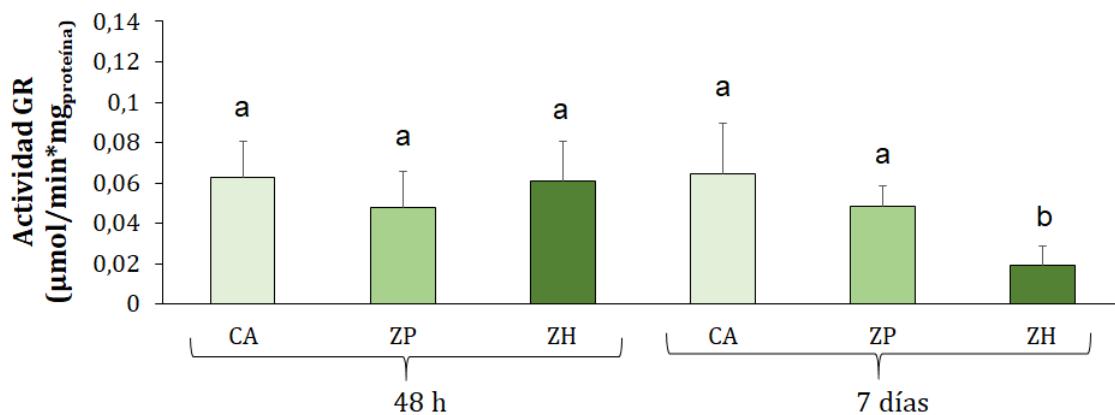
**Figura 80.** Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA 2 factores; p>0,05).



**Figura 81.** Actividad enzimática de catalasa (CAT) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA 2 factores; p>0,05).

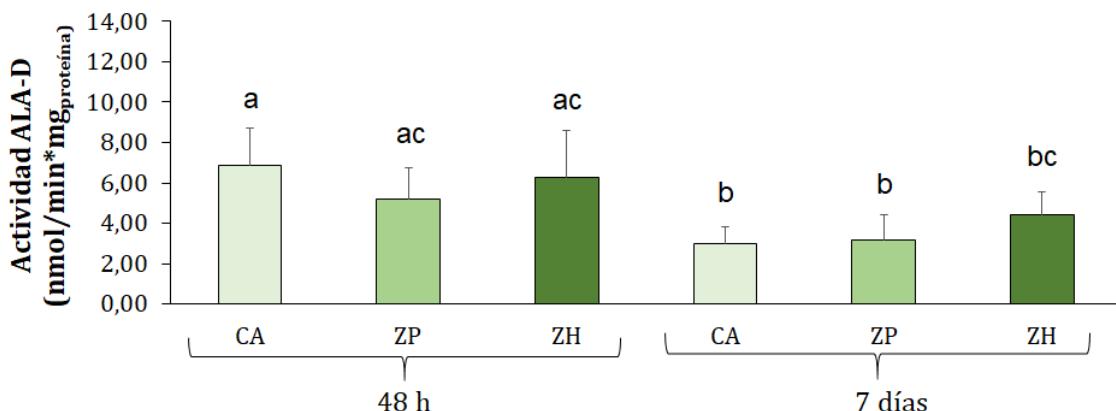
En cuanto a la actividad de la enzima GR, hubo diferencias estadísticamente significativas entre tiempos de exposición, tratamientos y en su interacción (tabla 20). Se observó una inhibición de la actividad en el grupo ZH a los 7 días en comparación a los demás tratamientos del mismo tiempo, y a todos los tratamientos de 48 h de exposición (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 82). No hubo diferencias entre los

tratamientos a las 48 hs, ni entre los grupos CA y ZA a los 7 días (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 82).



**Figura 82.** Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con diferentes letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

Por último, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la enzima ALA-D con los distintos tiempos de exposición, pero no entre tratamientos ni en su interacción (tabla 20). En los grupos controles CA y en los tratamientos con muestras del sitio ZP, la actividad se inhibió significativamente a los 7 días respecto a las 48 h. No hubo diferencias en este biomarcador con el tratamiento ZH a los distintos tiempos. Tampoco hubo diferencias entre los distintos tratamientos para un mismo tiempo de exposición (ANOVA 2 factores; tabla 20; figura 83).

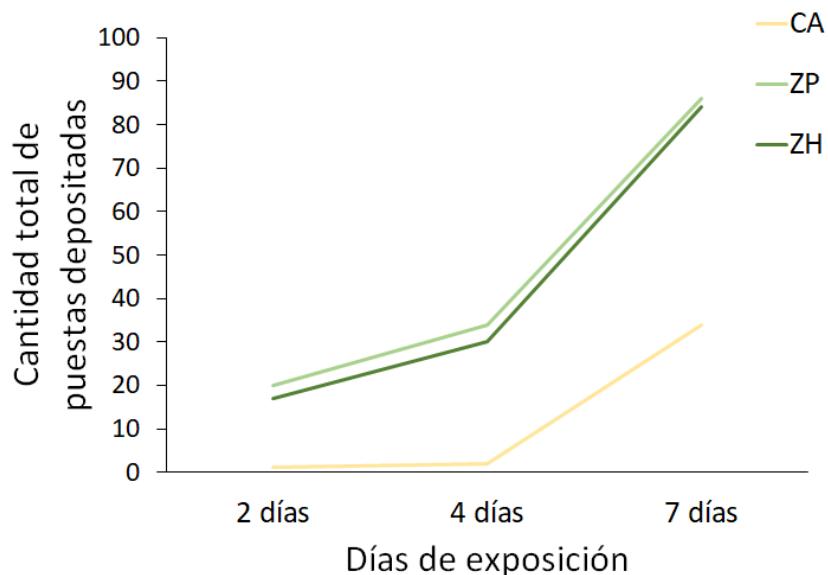


**Figura 83.** Actividad enzimática de ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 6 determinaciones ( $N= 6$ ). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con diferentes letras (ANOVA 2 factores;  $p<0,05$ ).

### Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia (2022)

#### Oviposición

Los organismos expuestos a CA, ZP y ZH comenzaron a depositar puestas de forma sincrónica el segundo día de exposición. Los caracoles expuestos a las muestras de agua del arroyo, depositaron una mayor cantidad de puestas a lo largo de los 7 días de bioensayo respecto a CA, sin diferencias entre ambos sitios (figura 84).

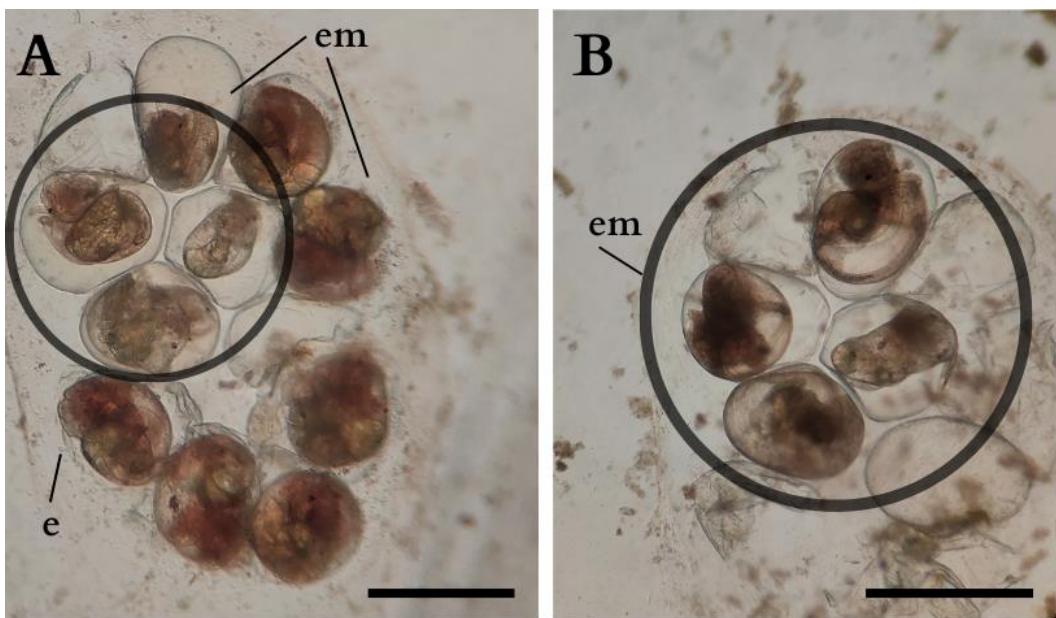


**Figura 84.** Cantidad total de puestas depositadas por ejemplares de *Biomphalaria straminea* a lo largo de 7 días de exposición a muestras de agua de 2 sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2022. Los tratamientos corresponden a un control de agua declorada (CA) y a muestras de agua de los sitios ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes) y ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo).

#### Desarrollo de los embriones y eclosión

No se observaron diferencias significativas en el número de huevos por puesta entre los tratamientos (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 21). Los huevos se encontraron embrionados en un 100%.

Una puesta proveniente del grupo ZH presentó cinco embriones con menor tamaño, alteraciones morfológicas (amorfos/deformes) y decoloración (figura 85). De esos 5 embriones, solo 1 eclosionó. En los otros grupos no se observaron malformaciones o alteraciones en las puestas o en los embriones.



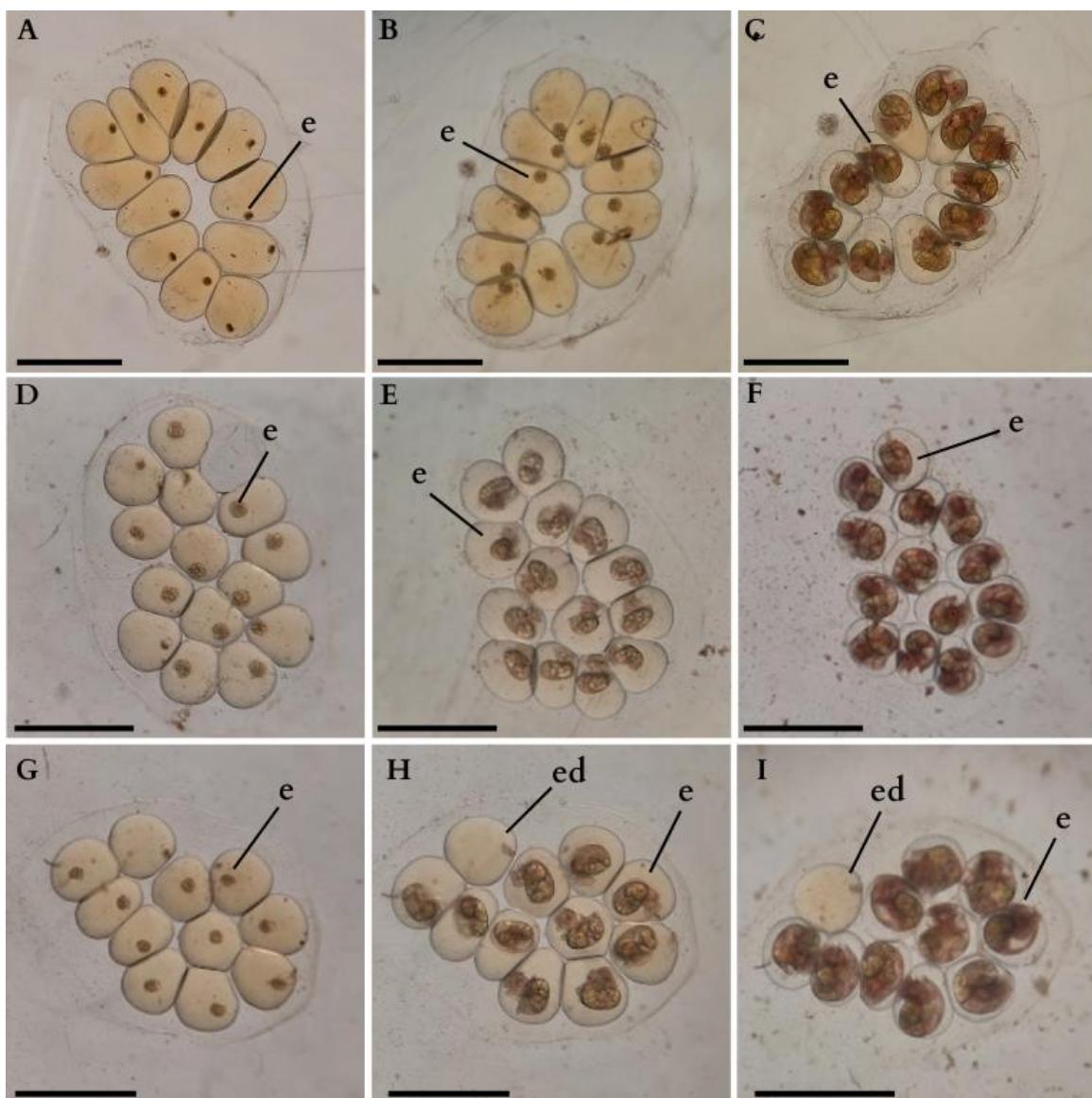
**Figura 85.** Embriones de *Biomphalaria straminea* con malformaciones provenientes de un tratamiento con muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires). Las muestras de agua se tomaron del sitio ZH ubicado aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales y de una zona de huertas de uso intensivo, en verano de 2022. **(A)** Día 8 de desarrollo. **(B)** Día 16 de desarrollo. e: embrión con desarrollo normal; em: embrión con malformación. Escala: 0,5 mm.

El tiempo de eclosión (tiempo transcurrido desde que la puesta fue depositada hasta que eclosionó el primer juvenil) fue estadísticamente similar en los distintos grupos (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 21). Las muestras de agua del sitio ZH provocaron una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de eclosión de los juveniles (Test de Fisher y ANOVA;  $p<0,05$ ; tabla 21). En la figura 86 se pueden observar secuencias de desarrollo de embriones provenientes de los distintos grupos.

**Tabla 21.** Parámetros reproductivos evaluados en las puestas depositadas por ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones de 7 días a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires).

	Puestas depositadas		Huevos por puesta	% huevos embrionados	Eclosión		
	promedio	total			tiempo (días)	% total	% por puesta
CA	$4,4 \pm 2,8^a$	34	$11 \pm 2,7^a$	100	$9,6 \pm 0,8^a$	100 <sup>a</sup>	$100 \pm 0^a$
ZP	$11 \pm 2,8^b$	86	$11,8 \pm 2,5^a$	100	$8,5 \pm 1,4^a$	99 <sup>ab</sup>	$99 \pm 3^{ab}$
ZH	$10,5 \pm 3,8^b$	84	$11,6 \pm 2,2^a$	100	$9,1 \pm 1,2^a$	91 <sup>b</sup>	$92 \pm 10^b$

Los adultos y las puestas fueron expuestos a muestras de agua de los sitios ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales) y ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo). Se incluyó un control de agua corriente desclorada (CA). Los porcentajes de eclosión fueron calculados sobre el total de huevos embrionados. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).



**Figura 86.** Fotografías de las secuencias de desarrollo de los embriones dentro de las puestas de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires). (A-C) Día 1,3 y 7 de desarrollo de una puesta del grupo control (agua declorada). (D-F) Día 3, 6 y 9 de desarrollo de una puesta del tratamiento con agua del sitio ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes). (G-I) Día 3, 6 y 8 de desarrollo de una puesta del tratamiento con agua del sitio ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo). e: embrión con desarrollo normal; ed: embrión detenido. Escala: 0,5 mm.

### Supervivencia de los juveniles

El tratamiento con agua del sitio ZH disminuyó la supervivencia de los juveniles a los 14 días de exposición, respecto a ZP y a CA (ANOVA;  $p<0,05$ ; tabla 22). En los tres grupos, se observó un mayor porcentaje de juveniles de talla grande ( $>4$  mm), una menor proporción de medianos (2-4 mm) y un pequeño porcentaje de talla pequeña ( $<2$  mm) (Test de Chi-cuadrado;  $p>0,05$ ; tabla 22).

**Tabla 22. Supervivencia y calidad de la descendencia evaluada en juveniles de *Biomphalaria straminea* expuestos a muestras de agua de diferentes sitios del Arroyo Las Catonas.**

	14 días de exposición a cada tratamiento					
	Supervivencia (%)		Tamaño (%)			
	total	por puesta	pequeño (<2 mm)	mediano (2-4 mm)	grande (>4 mm)	
CA	100 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	
ZP	100 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	
ZH	94 <sup>b</sup>	94 ± 10 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>	

CA: control de agua declorada, ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).

Posterior a los 14 días de exposición a cada tratamiento, los juveniles se mantuvieron un mes en agua declorada y en ese momento se calculó nuevamente el porcentaje de supervivencia, respecto al total de juveniles que había vivos al momento de trasvasarlos a agua declorada. Los porcentajes de supervivencia de los juveniles provenientes de los tratamientos con muestras de agua ambientales no variaron significativamente respecto al control (Test de Fisher;  $p>0,05$ ; tabla 23), pero si entre ellos siendo menor el porcentaje en ZH respecto a ZP (Test de Fisher;  $p<0,05$ ; tabla 23). Tampoco se observaron diferencias estadísticas en los pesos de los organismos de los distintos grupos al finalizar el mes (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 23), siendo el peso promedio individual de  $0,009 \pm 0,001$  g.

**Tabla 23. Supervivencia y calidad de la descendencia evaluada en juveniles de *Biomphalaria straminea* luego de 1 mes en agua declorada.**

	1 mes en agua	
	Supervivencia (%)	Peso (g)
CA	89 <sup>ab</sup>	$0,010 \pm 0,001^a$
ZP	94 <sup>a</sup>	$0,009 \pm 0,001^a$
ZH	84 <sup>b</sup>	$0,010 \pm 0,001^a$

CA: control de agua declorada, ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. El peso se expresa como promedio ± desvío estándar de todos los juveniles del mismo grupo. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).

En ningún caso se observaron juveniles con alteraciones morfológicas de ningún tipo.

### 3.6 Muestreo de verano de 2023

#### Bioensayos

Se tomaron muestras de agua de los sitios ZP y ZH para llevar a cabo exposiciones de 48 h y 7 días con organismos adultos de *B. straminea*. Además, se estudió la embriotoxicidad y la calidad de la descendencia.

#### Neurotoxicidad y letalidad

En ningún tratamiento se observaron organismos con signos de neurotoxicidad.

La exposición de 48 h no produjo letalidad. El último día de la exposición por 7 días (séptimo día) se registraron dos organismos muertos en CA (4%) y uno en el tratamiento con agua de ZP (2%). Dichos porcentajes de letalidad no resultaron estadísticamente significativos respecto a los demás tratamientos (Chi cuadrado;  $p>0,05$ ).

#### Parámetros bioquímicos

No hubo variación significativa en el contenido total de proteínas entre los tratamientos con ninguno de los tiempos de exposición. El promedio  $\pm$  desvío estándar de todos los grupos expuestos por 48 h correspondió a  $4,55 \pm 0,39$  mg/g<sub>tejido</sub>, y de los grupos expuestos por 7 días a  $3,80 \pm 0,59$  mg/g<sub>tejido</sub> (ANOVA;  $p>0,05$ ).

La exposición por 48 h al agua del sitio ZH aumentó significativamente la actividad de AChE un 37% respecto a CA (ANOVA 1 factor;  $p<0,05$ ; tabla 24). Los demás parámetros no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (ANOVA 1 factor;  $p>0,05$ ).

**Tabla 24. Actividades enzimáticas determinadas en *Biomphalaria straminea* luego de 48 h de exposición a muestras de agua de sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2023).**

	CA	ZP	ZH
AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,026 \pm 0,003^{\text{a}}$	$0,028 \pm 0,003^{\text{a}}$	$\uparrow 0,035 \pm 0,006^{\text{b}}$
CE (p-NFA) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,095 \pm 0,016^{\text{a}}$	$0,105 \pm 0,015^{\text{a}}$	$0,115 \pm 0,018^{\text{a}}$
CE (p-NFB) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,152 \pm 0,049^{\text{a}}$	$0,148 \pm 0,045^{\text{a}}$	$0,162 \pm 0,029^{\text{a}}$
GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,066 \pm 0,006^{\text{a}}$	$0,061 \pm 0,011^{\text{a}}$	$0,070 \pm 0,010^{\text{a}}$
CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$8,07 \pm 3,44^{\text{a}}$	$9,13 \pm 2,48^{\text{a}}$	$8,94 \pm 3,23^{\text{a}}$
GR ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,047 \pm 0,015^{\text{a}}$	$0,043 \pm 0,017^{\text{a}}$	$0,052 \pm 0,019^{\text{a}}$
ALA-D ( $\text{nmol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$13,28 \pm 6,81^{\text{a}}$	$11,31 \pm 4,54^{\text{a}}$	$11,60 \pm 6,94^{\text{a}}$

AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, GST: glutatión S-transferasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato, CA: control de agua declorada, ZH: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar (N= 6-8). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p<0,05$ ).

En el caso de las exposiciones por 7 días, el agua del sitio ZH produjo una disminución significativa de la actividad de la enzima CAT del 24% con respecto al tratamiento con agua del sitio ZP (ANOVA 1 factor;  $p<0,05$ ; tabla 25). Ningún otro parámetro se vio modificado significativamente respecto al control (ANOVA 1 factor;  $p>0,05$ ; tabla 25).

**Tabla 25. Actividades enzimáticas determinadas en *Biomphalaria straminea* luego de 7 días de exposición a muestras de agua de sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2023).**

	CA	ZP	ZH
AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,034 \pm 0,009^{\text{a}}$	$0,037 \pm 0,010^{\text{a}}$	$0,040 \pm 0,002^{\text{a}}$
CE (p-NFA) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,131 \pm 0,029^{\text{a}}$	$0,121 \pm 0,011^{\text{a}}$	$0,122 \pm 0,024^{\text{a}}$
CE (p-NFB) ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,204 \pm 0,021^{\text{a}}$	$0,211 \pm 0,047^{\text{a}}$	$0,238 \pm 0,048^{\text{a}}$
GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,093 \pm 0,018^{\text{a}}$	$0,106 \pm 0,021^{\text{a}}$	$0,095 \pm 0,006^{\text{a}}$
CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$11,22 \pm 2,90^{\text{ab}}$	$13,22 \pm 2,41^{\text{a}}$	$\downarrow 9,98 \pm 1,58^{\text{b}}$
GR ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,079 \pm 0,019^{\text{a}}$	$0,077 \pm 0,013^{\text{a}}$	$0,076 \pm 0,023^{\text{a}}$
ALA-D ( $\text{nmol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$16,81 \pm 5,26^{\text{a}}$	$13,56 \pm 4,37^{\text{a}}$	$17,22 \pm 6,05^{\text{a}}$

AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, GST: glutatión S-transferasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato, CA: control de agua declorada, ZH: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar (N= 6-8). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p<0,05$ ).

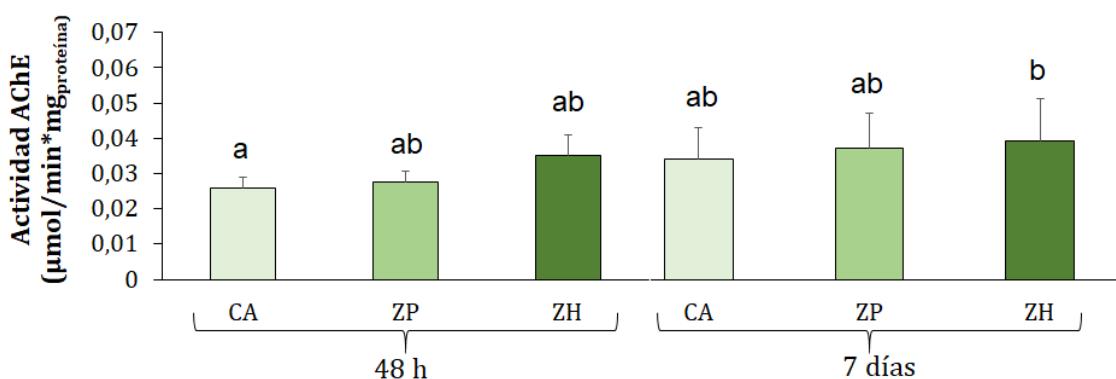
A partir del ANOVA de dos factores, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tiempos de exposición en todos los biomarcadores determinados, con excepción de la actividad de la enzima ALA-D (tabla 26). No hubo diferencias entre tratamientos ni en la interacción tiempo x tratamiento para ninguno de los biomarcadores (tabla 26).

La actividad AChE aumentó significativamente en el grupo ZH a los 7 días, respecto a CA a las 48 h. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 87).

**Tabla 26. Resumen del ANOVA dos factores para analizar el efecto de tiempo, tratamiento y su interacción sobre los distintos parámetros bioquímicos estudiados en *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas, Cuenca del Río Reconquista (verano 2023).**

Parámetro	Tiempo			Tratamiento			Interacción		
	g.l	F	p	g.l	F	p	g.l	F	p
Actividad AChE	2	8,71	0,0052*	3	2,80	0,0725	6	0,40	0,6753
Actividad CE (p-NFA)	2	12,07	0,0012*	3	0,40	0,6729	6	2,13	0,1317
Actividad CE (p-NFB)	2	28,10	<0,0001*	3	1,44	0,2480	6	0,37	0,6950
Actividad GST	2	71,34	<0,0001*	3	0,43	0,6547	6	2,67	0,0808
Actividad CAT	2	12,13	0,0012*	3	1,89	0,1635	6	1,29	0,2857
Actividad GR	2	41,22	<0,0001*	3	0,20	0,8210	6	0,53	0,5910
Actividad ALA-D	2	3,94	0,0564	3	0,67	0,5179	6	0,26	0,7726

g.l: grados de libertad; F: proporción de Fisher; p: probabilidad de F; CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo; AChE: acetilcolinesterasa; CE: carboxilesterasa; p-NFA: p-nitrofenil acetato; p-NFB: p-nitrofenil butirato; GST: glutación S-transferasa; CAT: catalasa; GR: glutatió reductasa; ALA-D: ácido δ-aminolevúlico dehidrasa. Los asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

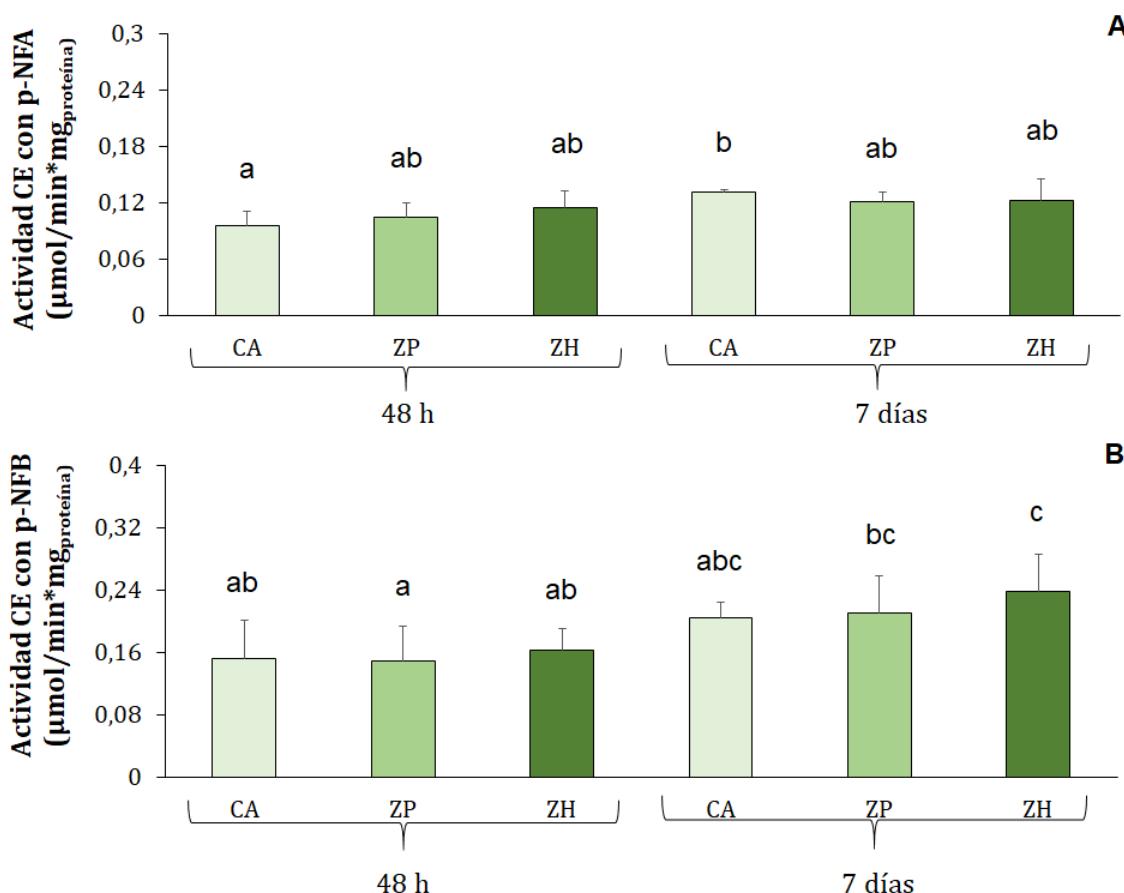


**Figura 87. Actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023.** CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones ( $N= 8$ ). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con distintas letras (ANOVA 2 factores;  $p<0,05$ ).

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de CE determinada con p-NFA en el grupo CA a los 7 días respecto a las 48 h. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de

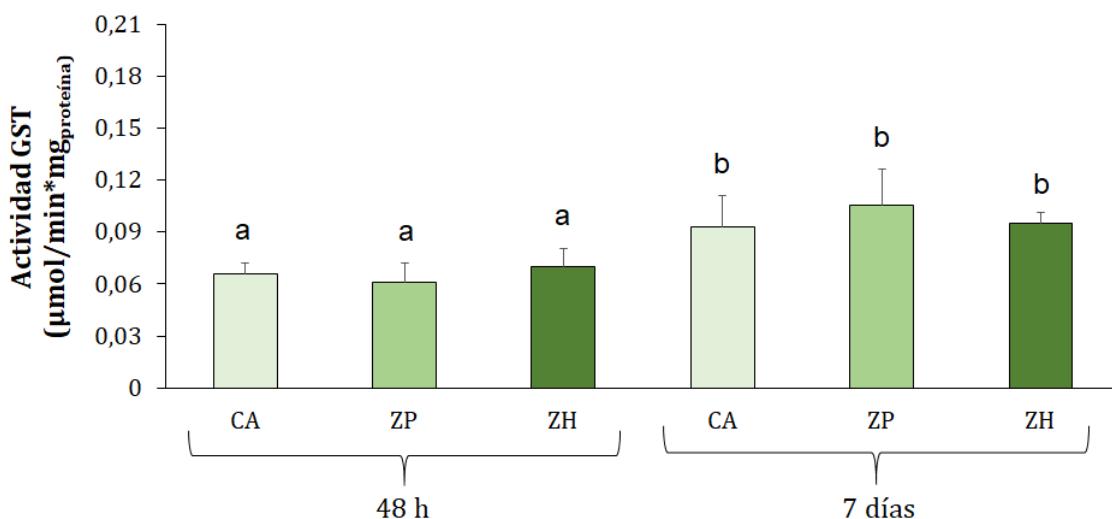
exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 88.A).

En la actividad de CE determinada con p-NFB, se observó un aumento estadísticamente significativo en los grupos expuestos a las muestras de agua ambientales a los 7 días. El tratamiento ZP a los 7 días, aumentó significativamente la actividad respecto al mismo tratamiento de 48 h. En cuanto al tratamiento ZH, la actividad fue significativamente mayor a los 7 días en comparación a los tres grupos de 48 h. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 88.B).



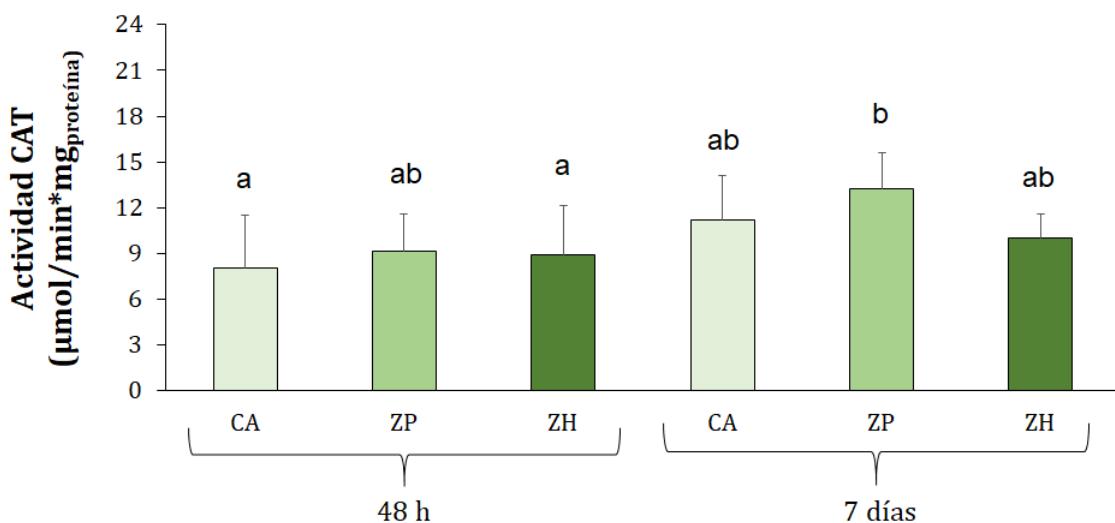
**Figura 88.** Actividad enzimática de carboxilesterasa (CE) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. Actividad determinada con (A) p-nitrofenil acetato (p-NFA) y con (B) p-nitrofenil butirato (P-NFB) como sustratos. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con diferentes letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

Se observaron aumentos estadísticamente significativos en la actividad de la enzima GST, en todos los tratamientos de 7 días de exposición respecto a los tratamientos de 48 h de exposición. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 89).



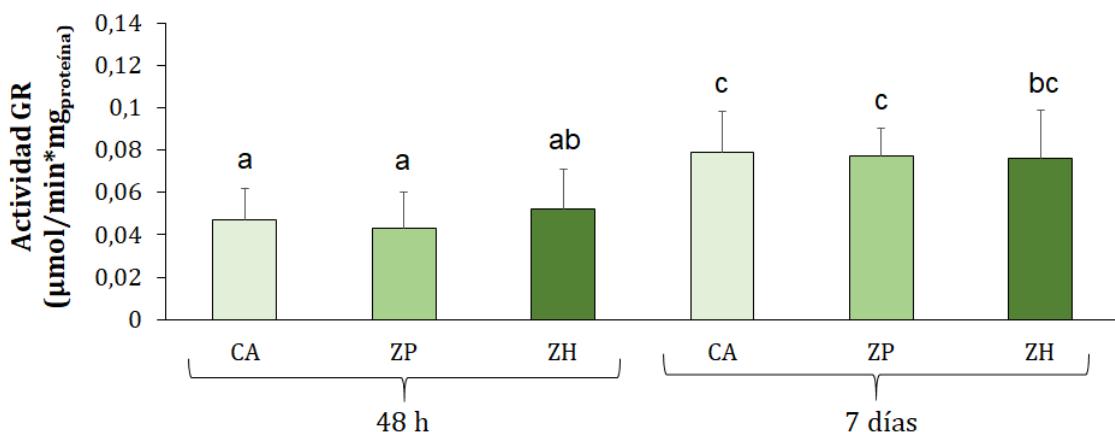
**Figura 89.** Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con distintas letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de CAT en el grupo ZP a los 7 días respecto los grupos CA y ZH a las 48 h. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 90).



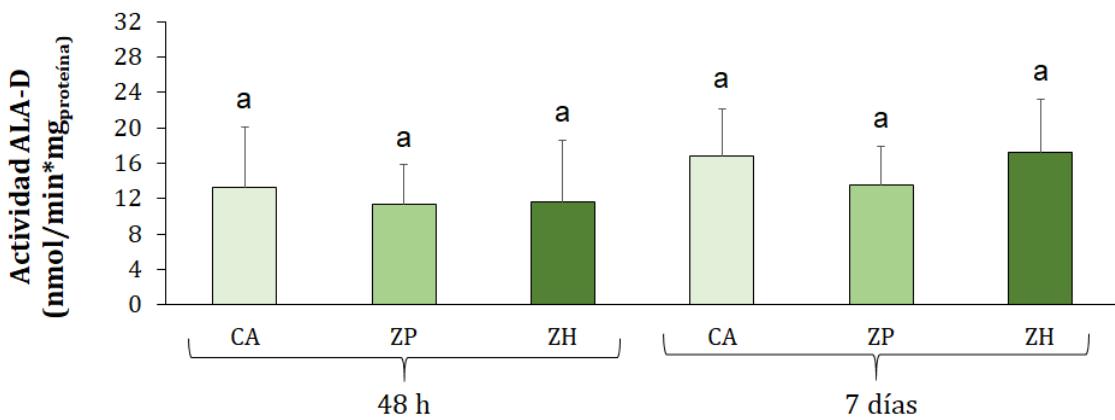
**Figura 90.** Actividad enzimática de catalasa (CAT) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con distintas letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de CAT con el tiempo de exposición en los tratamientos CA y ZP. El tratamiento ZH aumentó la actividad de la misma forma, pero no de forma significativa. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a un mismo tiempo de exposición, ni entre los grupos con muestras de agua ambientales y sus respectivos controles (ANOVA 2 factores; tabla 26; figuras 91).



**Figura 91.** Actividad enzimática de glutatión reductasa (GR) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 8 determinaciones (N= 8). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican con distintas letras (ANOVA 2 factores; p<0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la enzima ALA-D entre tiempos, tratamientos ni en la interacción tiempo x tratamiento (ANOVA 2 factores; tabla 26; figura 92).

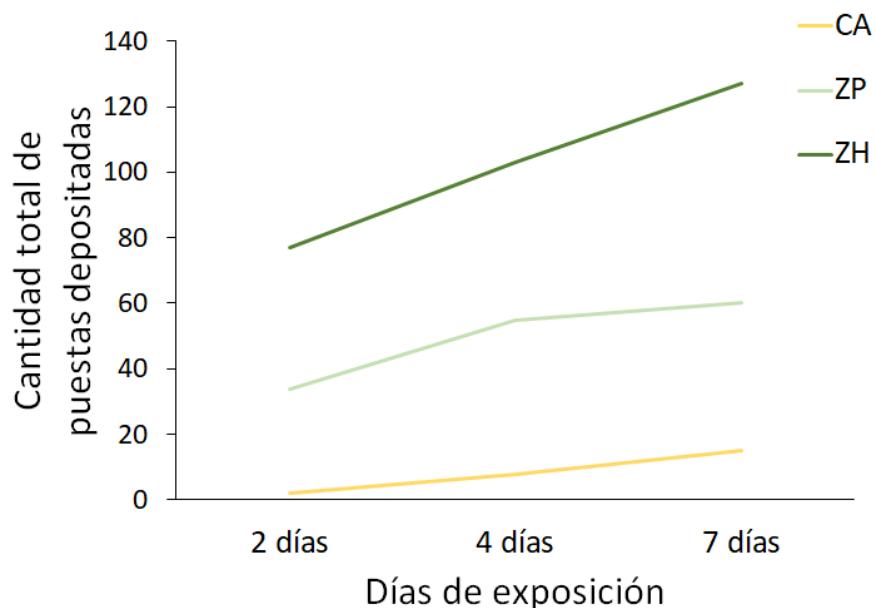


**Figura 92.** Actividad enzimática de ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) determinada en organismos de *Biomphalaria straminea* expuestos 48 h y 7 días a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. CA: control de agua declorada; Sitio ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes; Sitio ZH: aguas abajo de una planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Los resultados expresados corresponden al promedio ± el desvío estándar de 6 determinaciones (N= 6). Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA 2 factores; p>0,05).

## Parámetros reproductivos y calidad de la descendencia (2023)

### Oviposición

Los organismos de todos los grupos comenzaron a depositar puestas de forma sincrónica al segundo día de exposición. Los caracoles expuestos a las muestras de agua del ambiente depositaron una mayor cantidad de puestas a lo largo de los 7 días de ensayo en comparación con CA; a su vez en el tratamiento con ZH hubo una cantidad mayor de puestas depositadas respecto a ZP (figura 93; tabla 25).



**Figura 93.** Cantidad total de puestas depositadas por los ejemplares de *Biomphalaria straminea* a lo largo de 7 días de exposición a muestras de agua de 2 sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) tomadas en verano de 2023. Los tratamientos corresponden a un control de agua declorada (CA) y a muestras de agua de los sitios ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes) y ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo).

Las puestas presentaron similar número de huevos con 95-100% de los mismos embrionados (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 27).

### Desarrollo de los embriones y eclosión

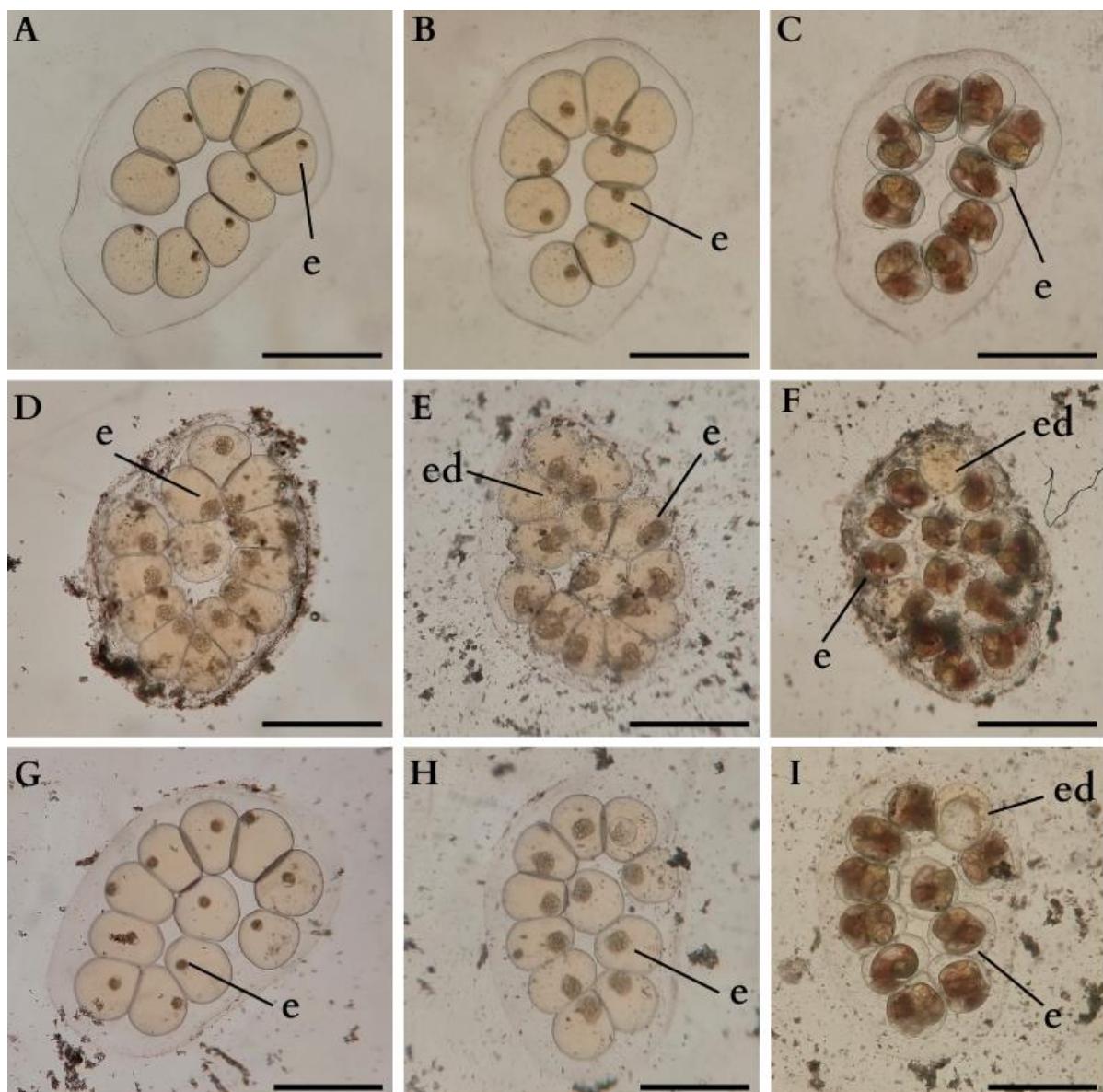
Ningún embrión presentó alteraciones morfológicas. El tiempo de eclosión de los juveniles expuestos al agua del sitio ZH (8,5 días) fue significativamente menor en comparación con los expuestos al agua del sitio ZP (9,8 días), pero ninguno de los dos tratamientos varió respecto a CA (ANOVA;  $p<0,005$ ; tabla 27). También se observó que

las muestras del sitio ZP provocaron una disminución significativa en el porcentaje de eclosión de los juveniles (87% de eclosión total y 90% de eclosión por puesta) respecto al grupo control CA (Test de Fisher y ANOVA; tabla 27). La figura 94 muestra el desarrollo de una puesta de cada grupo. En la puesta del tratamiento ZP y en la puesta del tratamiento ZH, se observa un embrión con crecimiento detenido, que no eclosionaron.

**Tabla 27. Parámetros reproductivos evaluados en las puestas depositadas por ejemplares adultos de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones de 7 días a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires).**

	Puestas depositadas		Huevos por puesta	% huevos embrionados	Eclosión		
	promedio	total			tiempo (días)	% total	% por puesta
CA	1,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	15	11,1 ± 3,8 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,8 <sup>ab</sup>	99 <sup>a</sup>	99 ± 4 <sup>a</sup>
ZP	7,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	60	9,6 ± 4,0 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	9,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	87 <sup>b</sup>	90 ± 10 <sup>b</sup>
ZH	15,9 ± 4,6 <sup>c</sup>	127	9,3 ± 3,9 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	96 ± 6 <sup>ab</sup>

Los adultos y las puestas fueron expuestos a muestras de agua de los sitios ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes) y ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo). Los porcentajes de eclosión fueron calculados sobre el total de huevos embrionados. Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ). CA: control de agua declorada.

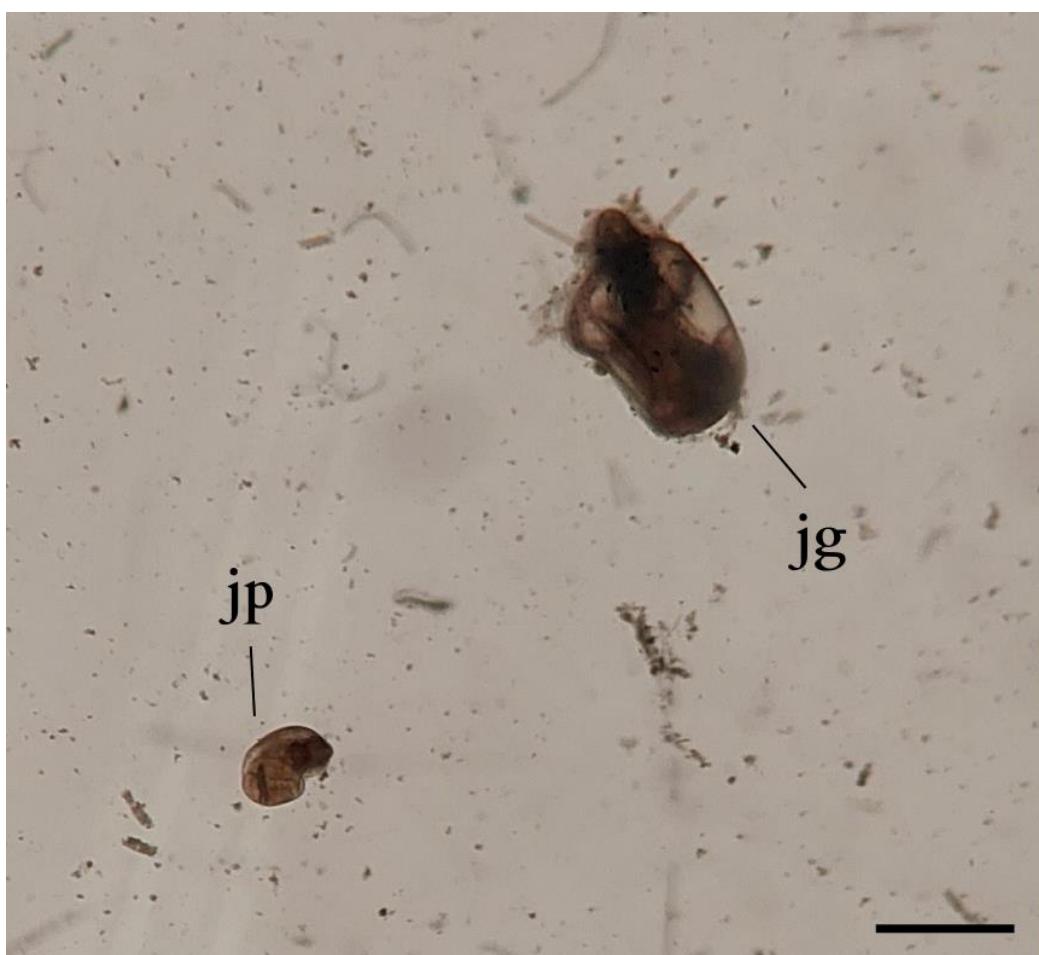


**Figura 94.** Fotografías de las secuencias de desarrollo de los embriones dentro de las puestas de *Biomphalaria straminea* luego de exposiciones a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires). (A-C) Día 1, 3 y 7 de desarrollo de una puesta del grupo control (agua declorada). (D-F) Día 2, 4 y 8 de desarrollo de una puesta del tratamiento con agua del sitio ZP (aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes). (G-I) Día 1, 3 y 7 de desarrollo de una puesta del tratamiento con agua del sitio ZH (aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo). e: embrión con desarrollo normal; ed: embrión detenido. Escala: 0,5 mm.

### Supervivencia de los juveniles

La supervivencia de los juveniles luego de 14 días de exposición fue similar en todos los grupos (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 28). La exposición al agua de los sitios ambientales provocó un mayor crecimiento de los juveniles luego de ese tiempo, en comparación a CA, lo que se observa en el mayor porcentaje de organismos de talla grande en esos

grupos (tabla 28; figura 95). En el caso del grupo control, la mayor parte de los organismos tuvo un tamaño mediano (Test de Chi-cuadrado;  $p<0,05$ ; tabla 28).



**Figura 95.** Juveniles de distintas tallas provenientes de una misma puesta expuesta a muestra de agua del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) a las 3 semanas de eclosión. Ambos juveniles eclosionaron 3 semanas antes de la toma de la fotografía. La muestra de agua en el arroyo se tomó en el sitio ZH: zona posterior a una planta de tratamiento y a huertas de uso intensivo. jg: juvenil grande ( $>4\text{mm}$ ), juvenil pequeño ( $<2\text{mm}$ ). Escala: 5 mm.

**Tabla 28. Supervivencia y calidad de la descendencia evaluada en juveniles de *Biomphalaria straminea* expuestos a muestras de agua de diferentes sitios del Arroyo Las Catonas.**

	14 días de exposición a cada tratamiento				
	Supervivencia (%)		Tamaño (%)		
	total	por puesta	pequeño ( $<2\text{ mm}$ )	mediano ( $2-4\text{ mm}$ )	grande ( $>4\text{ mm}$ )
CA	94 <sup>a</sup>	93 ± 9 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
ZP	97 <sup>a</sup>	98 ± 6 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>
ZH	98 <sup>a</sup>	99 ± 2 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>

CA: control de agua desclorada, ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).

Los porcentajes de supervivencia de los juveniles luego de 1 mes en agua declarada (posterior a los 14 días de exposición a cada tratamiento) no variaron significativamente entre los grupos (Test de Fisher y ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 29), así como tampoco fue significativa la diferencia de pesos de los juveniles ( $0,005 \pm 0,003$  g) (ANOVA;  $p>0,05$ ; tabla 29).

**Tabla 29. Supervivencia y calidad de la descendencia evaluada en juveniles de *Biomphalaria straminea* luego de 1 mes en agua declarada.**

	1 mes en agua		Peso (g)	
	Supervivencia (%)			
	total	por puesta		
CA	88 <sup>a</sup>	92 ± 14 <sup>a</sup>	$0,003 \pm 0,001^a$	
ZP	95 <sup>a</sup>	97 ± 12 <sup>a</sup>	$0,006 \pm 0,004^a$	
ZH	87 <sup>a</sup>	87 ± 12 <sup>a</sup>	$0,006 \pm 0,003^a$	

CA: control de agua declarada, ZP: aguas abajo de una planta de tratamiento de desechos industriales, ZH: aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo. El peso se expresa como promedio ± desvío estándar de todos los juveniles del mismo grupo. Mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

En ningún caso se observaron juveniles con alteraciones morfológicas de ningún tipo.

### 3.7 Resumen de todas las campañas de muestreo

En la tabla 30 se resumen los biomarcadores que se vieron alterados según el sitio y la campaña de muestreo.

**Tabla 30. Efectos producidos por exposiciones a muestras de agua de distintos sitios del Arroyo Las Catonas (Moreno, Buenos Aires) en distintos biomarcadores del gasterópodo *Biomphalaria straminea*.**

	Primavera 2019	Verano 2021		Verano 2022				Verano 2023			
	48 h ZH	48 h		48 h		7 días		48 h		7 días	
		ZP	ZH	ZP	ZH	ZP	ZH	ZP	ZH	ZP	ZH
Letalidad			60%								
Signos de neurotoxicidad											
AChE											
CE p-NFA											
CE p-NFB											
GST											
CAT											
GR											
ALA-D			↓81%								
nº puestas depositadas							↑	↑		↑	↑↑
nº huevos por puestas											
% huevos embrionados								5			
Embriones con malformaciones											
Tiempo de eclosión											
% de eclosión								↓		↓	
% supervivencia juveniles								↓			
Tamaño de los juveniles										↑	↑
Juveniles con malformaciones											

ZP: sitio aguas abajo de una planta de tratamiento de efluentes, ZH: sitio aguas abajo de la planta de tratamiento y de huertas de uso intensivo, AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesteras, GR: glutatión reductasa, CAT: catalasa, ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa. Los porcentajes de inhibición y de aumento de las actividades enzimáticas se expresan respecto al sitio de referencia en las campañas de 2019 y 2021 y respecto a un control de agua declorada en las campañas de 2022 y 2023.

#### 4. Discusión Capítulo II

Los cuerpos de agua naturales, como los arroyos o los ríos, son sistemas abiertos y complejos. Su estudio representa un gran desafío debido a los múltiples procesos que ocurren en ellos de forma simultánea. Su composición química varía a lo largo del tiempo y del curso, y los contaminantes presentes en dichos cuerpos interaccionan entre sí y con otras sustancias disueltas. Se suman factores externos que también intervienen en los procesos que ocurren en los cuerpos de agua como por ejemplo, factores climáticos, hidrogeológicos y antrópicos.

La calidad del agua hace referencia a un conjunto de condiciones que deben cumplirse para asegurar la protección del recurso hídrico y la salud de la población y de las especies en ese territorio. Dichas condiciones se entienden como parámetros físicos, químicos y/o biológicos que deben respetar niveles o límites establecidos, los cuales se fijan de manera diferenciada según los diversos usos a los que se destina el recurso (consumo humano, riego, industria, ganadería, recreación, vida acuática, etc.). Los ensayos de exposición con especies nativas también representan una estrategia útil para estos estudios debido a que permiten observar los efectos reales que producen las sustancias o compuestos presentes en los cuerpos de agua sobre las especies que ahí habitan.

Si bien no hay límites establecidos específicamente para la Cuenca del Río Reconquista, existen leyes nacionales, reglamentaciones provinciales (AdA de la Provincia de Buenos Aires) y de otras cuencas (ACUMAR, CARU) que aportan valores guía de varios parámetros. Los parámetros fisicoquímicos que se analizaron en el Arroyo Las Catonas durante el desarrollo de esta tesis, estuvieron en la mayoría de las campañas y de los sitios, dentro de los rangos o respetando los valores guías establecidos para la protección de la vida acuática. En el caso de la temperatura del agua, siempre estuvo por debajo de los 35°C y fue acorde a la estación en la que se realizó cada muestreo. Se observó una leve disminución de la misma a medida que se avanzaba aguas abajo en el arroyo. Otro parámetro muy relacionado con la temperatura es el OD, el cual suele disminuir a medida que la temperatura aumenta. Esta relación pudo observarse en las últimas 3 campañas (2021, 2022 y 2023) realizadas en los sitios ZP y ZH: a mayor temperatura, menor fue el valor de OD. No ocurrió lo mismo con el sitio R, ya que en

2019 presentó mayor temperatura que en 2021 y sin embargo el valor de OD fue más alto también. Vignale et al. (2022) observaron resultados similares en los sitios R y ZH durante campañas de muestreo llevadas a adelante entre 2017 y 2018. En dichos sitios, la relación entre la temperatura y el OD no fue siempre inversamente proporcional. Por otro lado, otros autores que han determinado el OD *in situ* en el Arroyo Las Catonas, siempre reportaron valores por encima del nivel guía de 5 ppm, contrario a los resultados que se obtuvieron en el sitio ZH en 2023 donde no se alcanzó dicho valor. En los cuerpos de agua contaminados por materia orgánica, se ve favorecido el crecimiento de bacterias aeróbicas, las cuales aumentan el consumo de oxígeno para oxidar dicha materia orgánica (Becerra-Gutiérrez et al., 2014). Cuando dicho consumo de oxígeno excede los niveles de su producción por procesos fotosintéticos o por la incorporación desde la atmósfera, disminuye el oxígeno presente en el sistema.

En cuanto al pH, los valores obtenidos fueron acordes a los reportados previamente por otros autores en el arroyo (Cantera et al., 2018; Vignale et al., 2022) y siempre estuvieron dentro del rango considerado óptimo, con excepción del sitio ZP en 2023 donde el pH excedió el límite. Aumentos de pH en cuerpos de agua pueden estar relacionados con procesos de eutrofización generados por niveles altos de nitrógeno o fósforo (Smith et al., 1999).

En relación a la conductividad, es un parámetro que varía mucho de acuerdo al cuerpo de agua en estudio, por lo que no hay valores guías establecidos que indiquen riesgo o no para la biota y/o grado de contaminación. La CARU (Comisión Administradora del Río Uruguay), por ejemplo, establece un valor óptimo de 100 µS/cm para el Río Uruguay que es mucho más bajo que los valores de conductividad determinados en otros cuerpos del agua del país. En el Río Reconquista los valores reportados por otros autores se encuentran entre los 500 y los 1300 µS/cm (Cantera et al., 2018; Castañe et al., 2006; Rigacci, 2019) lo que coincide con los valores determinados en los sitios de muestreo del Arroyo Las Catonas de esta tesis. Valores más altos de conductividad en los sitios ZP y ZH en comparación al sitio R, también fueron observados en otro estudio (Vignale et al., 2022). Varios autores afirman que productos domésticos (jabones o detergentes) y agrícolas (fertilizantes, abonos o plaguicidas) alteran el contenido de iones y de materiales disueltos en el agua, lo que

produce modificaciones en los niveles de conductividad (Lombardo et al., 2010; Primavesi, 2002).

La DQO es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica que hay presente en un cuerpo de agua susceptible a ser biodegradada. Los valores obtenidos en todos los sitios y campañas de muestreo en el Arroyo Las Catonas fueron similares y aceptables de acuerdo a las reglamentaciones.

En cuanto a los metales y a los plaguicidas, si bien se detectaron en las primeras campañas de los años 2019 y 2021, no ocurrió lo mismo en 2022 y 2023 (en 2022 solo pudieron tercerizarse muestras para la determinación de plaguicidas). La prohibición en el uso de agroquímicos para la producción de alimentos tanto humanos como animales en todo el partido de Moreno (Ordenanza municipal nº 6422/20, Concejo Deliberante de Moreno, 2020) parece haber sido efectiva, al menos en el caso del clorpirifos y del glifosato que no se detectaron posteriormente. No es posible asegurar que no se estuvieran aplicando otros plaguicidas más allá de los dos que se evaluaron en esta tesis. La ordenanza municipal propone sustituir el uso de fitosanitarios y fertilizantes sintéticos por biopreparados, los cuales podrían haber estado en las muestras de agua tomadas e incluso tener efectos desconocidos sobre la biota.

Si se observan en forma conjunta todos los parámetros fisicoquímicos, podemos observar que la campaña de 2023 fue la que presentó las peores condiciones *in situ*: un sitio (ZH) con OD por debajo del límite y otro sitio (ZP) con pH más alcalino que lo recomendado, aunque sin presencia de los metales ni de los plaguicidas encontrados en campañas previas. Podría, sin embargo, haber en el agua otros compuestos no determinados en esta tesis.

En relación a las dos últimas campañas, en las cuales se incorporaron exposiciones más largas (7 días), algunos de los parámetros determinados durante los bioensayos, se mantuvieron similares a los medidos *in situ* en las muestras de agua ambientales, mientras que otros no. Al realizar los bioensayos bajo condiciones controladas de temperatura, no era esperable que la misma se viera modificada a lo largo del bioensayo. La conductividad se mantuvo en niveles similares, siendo los valores de las muestras ambientales siempre más elevados que los del agua de canilla declorada utilizada para los grupos controles (CA). El pH en 2022, se modificó al llegar al laboratorio respecto a los valores *in situ*, pero no sufrió cambios significativos a lo largo de los 7 días

que duró en bioensayo. En cambio en 2023, hubo una disminución a lo largo de los días que fue significativa tanto en ZP como en ZH. En la campaña de 2023, el pH de CA también fue más bajo de lo esperado. Estos valores más bajos que lo habitual, incluso en el agua desclorada, podrían deberse en parte a algún error de medición, como por ejemplo mala calibración de los equipos. Si no fuera ese el caso, variaciones en el pH podrían estar alterando la toxicidad, la bioacumulación y la biodisponibilidad de contaminantes tales como metales (si los hubiera) presentes en las muestras (Meyer et al., 2024; Zhao et al., 2024). En organismos acuáticos, se ha estudiado que el pH puede afectar procesos metabólicos como la reproducción y el crecimiento (Kim et al., 2015; Yin y Niu, 2008). Por último el OD medido *in situ* estuvo cercano al límite en ambas campañas mientras que en el laboratorio aumentó desde el momento que llegaron las muestras de agua al laboratorio hasta el final del bioensayo. Excepto ZH en 2023, el OD en las muestras de agua del ambiente fue estadísticamente similar a CA. Para poder referirnos a hipoxia, los valores de OD deben encontrarse por debajo de los 2-3 mg/L. Sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (sin llegar a la hipoxia), también se han observado efectos graves en organismos acuáticos sobre el crecimiento, la reproducción, la respiración y la regulación endocrina, entre otros (Galic et al., 2019; Hou et al., 2020).

En las 4 campañas de muestreo, se tomaron muestras de agua y se realizaron exposiciones agudas de 48 h con organismos de *B. straminea*. Las respuestas observadas fueron diferentes temporal y espacialmente. En el primer bioensayo realizado en 2019, no hubo mortalidad ni variaciones de los biomarcadores bioquímicos analizados al comparar los organismos expuestos al agua del sitio ZH con los expuestos al agua del sitio R. Por el contrario, el siguiente muestreo realizado en 2021, posterior a estar un año en ASPO por la pandemia de COVID-19, tuvo como efectos la inhibición de la actividad de ALA-D con el tratamiento ZP y la inhibición de AChE y un alto porcentaje de letalidad en los organismos del grupo ZH. La inhibición de ALA-D ocurrió a pesar de no haberse detectado plomo en dicho sitio (Bernal Rey, 2022). Si bien el plomo es considerado como el principal inhibidor de dicha enzima, también puede verse modificada su actividad por la presencia de otros electrófilos blandos como mercurio e incluso por herbicidas como el glifosato (Concato et al., 2022; Rocha et al., 2012). Tanto

la inhibición de AChE como la letalidad en el grupo ZH, podría estar relacionada con la presencia de clorpirifos en el agua superficial, con la presencia de otros compuestos anticolinesterásicos no evaluados o incluso podría deberse a una interacción entre varios compuestos. Las mezclas ambientales complejas no permiten relacionar directamente la presencia de un contaminante con un efecto observado. Esta premisa se hace evidente con la inhibición de AChE observada en 2021 pero no en 2019, siendo que en ambos muestreros se detectó la presencia de clorpirifos en el agua (Bernal Rey, 2022).

En el año 2022 el efecto observado a las 48 h fue un aumento de la actividad CE por exposición al agua de ZP, mientras que en 2023 lo que varió significativamente respecto al control fue la actividad de la enzima AChE. Las CEs actúan en el metabolismo de detoxificación de contaminantes como pueden ser los agroquímicos, los productos farmacéuticos o algunas drogas de abuso por lo cual su actividad puede verse aumentada en presencia de estos compuestos (Cossi et al., 2020; Wheelock et al., 2008). Por otro lado, varios autores atribuyeron aumentos en la actividad enzimática de AChE a compuestos como hidrocarburos o metales, e incluso por exposición a agua de sitios contaminados de nuestro país. Wang et al. (2022) observaron que en el gasterópodo *Lymnaea stagnalis* la exposición a nanopartículas de plata producía inducción de esta enzima. En embriones del pez *Sebastiscus marmoratus* expuestos a concentraciones ambientales de un hidrocarburo policíclico aromático (benzo(a)pireno), también se reportó el mismo efecto (He et al., 2012). En otro pez, *Jenynsia multidentata*, también se observó aumento de la actividad de AChE por exposición al agua de diferentes sitios de un río de la provincia de Córdoba con impacto de actividades antrópicas (Ballesteros et al., 2017). A pesar de no ser conocido el mecanismo por el cual aumenta la actividad AChE por la exposición a xenobióticos, en el caso de otras esterasas se relacionó esa inducción con un rol detoxificante de estas enzimas (López-Durán et al., 2018).

En escenarios reales, las especies acuáticas pueden estar expuestas a los contaminantes presentes en el agua durante períodos de tiempo prolongados. La toxicidad que tenga cada uno de esos compuestos para la biota mientras más días estén expuestos, dependerá del tipo de xenobiótico, su naturaleza, sus propiedades físicas y químicas, y de la sensibilidad de cada especie. Es habitual que los contaminantes sufran algún tipo de degradación estando en el ambiente, pero también que vuelvan a ingresar

a los cuerpos de agua de forma sistemática. Por este motivo, a partir del año 2022, se decidió sumar al diseño experimental ensayos exponiendo a *B. straminea* por más tiempo. Surge de esta forma la posibilidad de comparar efectos luego de exposiciones a distintos tiempos (48 h y 7 días) a las mismas muestras de agua, sin perder de vista la compleja composición de dichas muestras y la posibilidad de que alguno o varios de los compuestos puedan sufrir procesos de degradación y/o se alteren de alguna forma, además, por ejemplo, de los cambios de pH y OD.

No se observaron signos de neurotoxicidad ni letalidad significativa en ninguna de las dos exposiciones por 7 días. Los resultados del análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor, mostraron que distintos biomarcadores bioquímicos vieron alterados sus niveles de actividad según el sitio de muestreo. En el caso de la campaña de 2022, las muestras de agua del sitio ZP produjeron en *B. straminea* un aumento de la actividad de AChE luego de 7 días, mientras que las muestras de agua de ZH inhibieron la actividad de GR en el mismo tiempo. En cambio, en el 2023, ningún parámetro se vio significativamente modificado por la exposición de 7 días a las muestras de agua del ambiente respecto al control, pero se observó una inhibición de la actividad de CAT en el grupo ZH respecto a ZP. El aumento en la actividad de AChE observado en 2022, puede deberse a la presencia de diversos compuestos en el agua y a un rol detoxificante de esta enzima, como fue explicado para la exposición por 48 h de 2023, cuando se observó la misma alteración. En cuanto a las alteraciones de los sistemas antioxidantes GR y CAT, otros autores mostraron previamente evidencia de que los moluscos sufren estrés oxidativo por contaminación antrópica de cuerpos de agua dulce (Ji et al., 2020; Klimova et al., 2020).

El segundo análisis estadístico que se llevó a cabo fue el ANOVA de 2 factores para evaluar la influencia del tiempo, del sitio de muestreo (tratamiento) y de la interacción entre ambos factores, en cada una de las campañas. En relación a la campaña de 2022, el tiempo fue el factor de mayor influencia, viéndose efectos sobre las actividades de las enzimas CEs determinadas con ambos sustratos, GR y ALA-D. El tratamiento con agua de los distintos sitios influyó sobre la actividad CE con p-NFB y de GR, mientras que únicamente se observó interacción entre ambos factores sobre la actividad de la enzima GR. El mismo análisis con los resultados de la campaña de 2023 evidenció que solo el

tiempo tuvo influencia sobre todos los biomarcadores estudiados, con excepción de ALA-D. En base a los resultados obtenidos se pudo identificar que el tiempo de exposición resultó tener la mayor relevancia en ambas campañas, lo cual concuerda con la mayor cantidad de efectos obtenidos al comparar ambos tiempos de exposición de forma conjunta, y no por separado. En el ambiente, las especies están expuestas de forma continua a los contaminantes, cuyas concentraciones van variando; de esta forma los bioensayos de exposición a tiempos más largos brindan información de gran relevancia. El tiempo más largo de exposición estudiado en este capítulo, podría ser corto en comparación con un escenario ambiental real, y los efectos producidos en las especies podrían entonces ser mayores.

Además de los biomarcadores ya mencionados, en las últimas dos campañas se incluyó el estudio de parámetros reproductivos y de calidad de la descendencia. Lo primero que se observó fue un mayor número de puestas depositadas por los organismos adultos expuestos a las muestras de agua ambientales en comparación a CA. En el año 2022 la cantidad de puestas fue similar entre ambos sitios, pero en 2023 fue mayor en el grupo ZH. Este aumento probablemente está relacionado con la presencia de materia orgánica, de nutrientes y/o de fertilizantes en el Arroyo Las Catonas, los cuales favorecen la reproducción. Resultados similares encontraron Paredes et al. (2024) al exponer organismos adultos de *B. straminea* a muestras de agua de un lago urbano de CABA y registrar que depositaban más puestas en comparación al control.

Las puestas en ambas campañas no difirieron del control en cuanto a la cantidad de huevos por puestas y al porcentaje de huevos que estaban embrionados. En el año 2022 el tratamiento con agua de ZH tuvo efectos sobre la embriogénesis y la calidad de la descendencia, al contrario del año 2023 cuando los efectos fueron observados por exposición a las muestras de agua de ZP. En el caso del año 2022, una de las puestas depositadas por un organismo adulto expuesto a ZH, presentó cinco embriones con malformaciones, de los cuales solo uno logró eclosionar. Algunos embriones detienen su desarrollo antes de eclosionar lo que produce disminución en el porcentaje de eclosión. En el tratamiento con agua de ZH del 2022, la disminución de ese porcentaje fue significativa respecto al grupo control. Sumado a este resultado, la supervivencia de

los juveniles del grupo ZH a los 14 días desde la eclosión también fue significativamente menor respecto al control, y luego de un mes respecto al grupo ZP. En la campaña del 2023 el porcentaje de eclosión fue menor pero como consecuencia del tratamiento con agua de ZP, pero además se registró un mayor tiempo de eclosión en dicho grupo respecto a ZH. En otro estudio con *B. straminea*, los autores observaron que la exposición a muestras de agua de un lago urbano de CABA producían una disminución significativa en el porcentaje de eclosión (Paredes et al., 2022). Por otro lado, Tallarico et al. (2014) informaron retraso en el desarrollo de embriones de *B. glabrata* expuestos a los efluentes de una planta de tratamiento de desechos en Brasil, a pesar de no haber ocurrido en una cantidad estadísticamente significativa.

En los juveniles, a pesar de no haberse observado malformaciones, se registró que la supervivencia disminuyó con la exposición al agua de ZH del año 2022 tanto a los 14 días como al mes después de la eclosión. Esto implica que en los juveniles se están manifestando efectos de las exposiciones a las muestras de agua ambientales de los adultos y de las puestas. Un resultado similar se observó en la misma especie por exposición a muestras de agua del Lago Lugano, donde la supervivencia de los juveniles disminuyó significativamente incluso dos meses después del inicio del bioensayo (Paredes et al., 2022).

Los estadios tempranos de desarrollo suelen ser los más susceptibles a la presencia de contaminantes en el agua. Los efectos embriotóxicos no incluyen únicamente la supervivencia de los embriones, sino que puede verse afectado también el *fitness* de los estadios más avanzados (Rangasamy et al., 2018). Además de las malformaciones observadas en los embriones expuestos a las muestras de agua del Arroyo Las Catonas, podrían estar ocurriendo otros procesos internos en los embriones que no fueron estudiados. Por ejemplo, un estudio con embriones de peces cebra expuestos a efluentes hospitalarios, reveló que varios parámetros indicadores de estrés oxidativo se alteraban (Rosales-Pérez et al., 2024). Otro ejemplo es el trabajo realizado por SanJuan-Reyes et al. (2020) a partir del cual concluyeron que la exposición a los efluentes industriales de una planta productora de drogas antiinflamatorias en una ciudad de México, inducían efectos embriotóxicos y teratogénicos en embriones de *Cyprinus carpio*. En ambos bioensayos con *B. straminea* de esta tesis, la disminución del

porcentaje de eclosión y de supervivencia de los juveniles fueron los principales efectos que se observaron por exposición al agua de los diferentes sitios del arroyo.

El grado de contaminación encontrado en el Arroyo Las Catonas producto de la actividad industrial y agrícola de la zona, tuvo efectos negativos sobre *B. straminea*, y podría estar afectando de la misma forma a otras especies que habitan en dicho ambiente. Los efectos no solo pueden estar ocurriendo sobre las especies acuáticas y terrestres que habitan en el cuerpo de agua constante o esporádicamente, sino que dichas condiciones representan un peligro para los habitantes de las zonas linderas. En la zona donde se realizaron los muestreos, se colecta agua del arroyo para riego y otros usos domésticos lo que implicaría un riesgo para la comunidad local. Analizar la calidad del agua de la cuenca del Río Reconquista resulta relevante debido a la gran densidad poblacional que hay en esa área y porque el destino final es el Río de la Plata, que suple de agua a gran parte de CABA. El agua del sitio ZH, aguas abajo de la planta de tratamiento de efluentes y de la zona de huertas, alteró una mayor cantidad de parámetros, especialmente en la campaña de 2022, pudiendo deberse justamente a que recibe diversos compuestos provenientes de ambas fuentes de contaminación.

Durante el desarrollo de esta tesis, no fue posible realizar un biomonitoring de forma continua de los sitios seleccionados en el arroyo (por ejemplo, teniendo en cuenta que el tipo de cultivo depende en gran parte del clima de la época, realizar muestreos en las distintas estaciones del año). La principal causa de esto fue la pandemia de COVID-19 que afectó prácticamente durante dos años la posibilidad de realizar los bioensayos y los muestreos. Como consecuencia, también se vio modificado el tipo de producción de las huertas y el uso de plaguicidas en la zona. Un gran punto de incertidumbre es la actividad que se realiza en la planta de tratamiento de efluentes. No hay registro municipal ni provincial de la actividad precisa que realizan: qué tipo de efluentes son los que tratan, de qué forma lo hacen o cuales son las características de sus descargas al arroyo.

Es importante contextualizar que un bioensayo de exposición en un momento determinado no es un reflejo de la condición o de la calidad del agua sino que solo representa una imagen de ese momento en particular. Esto se hizo evidente al evaluar

los efectos producidos en *B. straminea* por exposición a muestras de agua de los mismos sitios pero tomadas en momentos diferentes. Los resultados obtenidos en este capítulo refuerzan la importancia de realizar biomonitoreos continuos integrando el análisis de variables fisicoquímicas con estudios ecotoxicológicos que utilicen especies no blanco como *B. straminea*, además de estadios tempranos de desarrollo. Varios autores de nuestro país realizan biomonitoreos y/o evaluaciones de calidad de agua con especies de invertebrados, entre ellos moluscos, reforzando la relevancia y sensibilidad de este grupo a la presencia de contaminantes en los cuerpos de agua (Giarratano et al., 2024; Girones et al., 2020; Noya Abad et al., 2024; Rocha et al., 2020).

## Discusión general

La interacción entre el medio ambiente y los seres humanos es constante e inevitable y suele ser la principal causa de los problemas de contaminación ambiental. Los recursos hídricos son indispensables para todos los seres vivos por lo que son fuente particular de muchos estudios que buscan conservar o mejorar su calidad. Sin embargo, es evidente su continuo deterioro a nivel global.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se estudió la utilidad del gasterópodo nativo *B. straminea* para bioensayos de toxicidad del OF clorpirifos y como especie bioindicadora de calidad de agua ambiental de nuestro país. En ambos casos, se observaron efectos tóxicos en los organismos luego de las diferentes exposiciones, los cuales se muestran resumidos en la tabla 29.

Hay que tener en cuenta que no se determinaron todos los biomarcadores en ambos capítulos de esta tesis, ni a todos los tiempos de exposición (tabla 31). En el capítulo I que corresponde a la exposición a clorpirifos, se utilizaron tres tiempos de exposición distintos con los organismos adultos (48 h, 14 y 28 días) durante los cuales se evaluó la letalidad. A los 14 días además se analizó la neurotoxicidad, biomarcadores bioquímicos (contenido total de proteínas y de GSH, y actividades de las enzimas AChE, CEs, GST, CAT, GR y SOD), parámetros reproductivos y de la descendencia y se llevó a cabo el análisis histológico de la glándula digestiva y de las gónadas. Por últimos a los 28 días de exposición, se realizaron únicamente análisis histológicos. En cuanto al capítulo II que engloba los bioensayos con muestras de agua del Arroyo Las Catonas, se realizaron exposiciones por 48 h y por 7 días con los organismos adultos. En ambos casos se evaluó la letalidad, la neurotoxicidad, biomarcadores bioquímicos (contenido total de proteínas y actividades de las enzimas AChE, CEs, GST, CAT y GR), pero se incorporó también la actividad de ALA-D debido a su relevancia como biomarcador de exposición a contaminantes ambientales (como metales) y no se realizó la determinación de la actividad de SOD, del contenido de GSH ni análisis histológicos. En el caso de las exposiciones de 7 días, se incluyó también el estudio de parámetros reproductivos y de la descendencia. Por otro lado, los diseños de exposición de los juveniles fueron diferentes. En el caso del capítulo I, tanto las puestas como los juveniles estuvieron expuestos a los distintos tratamientos con clorpirifos, mientras que en el caso del

capítulo II, las puestas y los juveniles se mantuvieron expuestos a las muestras de agua de los diferentes sitios, pero se sumó un mes de exposición de los juveniles en agua declorada.

**Tabla 31. Biomarcadores en *Biomphalaria straminea* que fueron sensibles a la exposición al clorpirifos y a muestras de agua del Arroyo Las Catonas.**

Clorpirifos			Arroyo Las Catonas		
PA	48 h	Letalidad	2021	48 h	Letalidad
	14 días	↓ AChE ↓ supervivencia juveniles			↓ AChE ↓ ALA-D
FC	48 h	Letalidad	2022	48 h	↑ CE
	14 días	↓ AChE ↓ CE ↓ CAT ↑ SOD ↑ tiempo de eclosión ↓ % eclosión ↓ supervivencia juveniles		7 días	↑ AChE ↓ GR Malformaciones en los embriones ↓ % eclosión ↓ supervivencia juveniles
			2023	48 h	↑ AChE
				7 días	↓ CAT ↓ % eclosión

PA: principio activo, FC: formulado comercial, AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, CAT: catalasa, SOD: superóxido dismutasa, GR: glutatión reductasa, ALA-D: ácido δ-aminolevulínico dehidrasa, MLR: radio medio del lumen de los túbulos digestivos, MDR: radio medio de los túbulos digestivos, MET: altura media del epitelio de los túbulos digestivos.

Si se tienen en cuenta los biomarcadores determinados en ambos capítulos, la actividad de AChE y los parámetros determinados en la descendencia son los biomarcadores que respondieron tanto a la exposición a clorpirifos PA, a clorpirifos FC como a las muestras de agua del Arroyo Las Catonas. La actividad de AChE si bien no se vio alterada con las muestras de agua provenientes de todos los sitios en todos los muestreos, fue el biomarcador bioquímico que se modificó en con mayor número de muestras de agua ambientales; por lo tanto la actividad de AChE, el porcentaje y el tiempo de eclosión y la supervivencia de los juveniles serían los biomarcadores de elección en esta especie.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran la importancia de incorporar estadios tempranos de desarrollo en bioensayos de exposición al ser más sensibles que los adultos y debido a su relevancia para la continuidad de la especie ya que al verse afectada la reproducción y/o la calidad de la descendencia, se pone en juego la supervivencia de la población. Sin embargo, hay que tener en cuenta que varios de

los parámetros calculados en esta tesis como porcentajes de eclosión, de supervivencia y tiempo de eclosión, variaron estadísticamente respecto a sus controles a pesar de no haberse obtenido diferencias muy grandes. Dentro de la especie, estos parámetros presentan cierta variabilidad. En la tabla 32 se muestran los resultados de los controles de agua declorada de otros bioensayos realizados con *B. straminea* y bajo condiciones similares de temperatura y fotoperíodo, tanto luego de un mes de bioensayo en placas de wells (un mes aproximado teniendo en cuenta el tiempo de exposición de las puestas más las primeras semanas desde la eclosión de los juveniles), como a tiempos más largos manteniendo a los juveniles en recipientes de vidrio de 250 ml.

**Tabla 32. Parámetros reproductivos de *Biomphalaria straminea* en grupos controles.**

Parámetro	Valor	Detalle	Referencia
Tiempo de eclosión	8 días		Cossi et al., 2018
	6 días		Cossi et al., 2020
	8 días		Paredes et al., 2022
	11 días		Capítulo I - Presente Tesis
	10 días		Capítulo II - Presente Tesis
% de eclosión	92%		Cossi et al., 2018
	96%		Cossi et al., 2020
	82%		Paredes et al., 2022
	99%		Capítulo I - Presente Tesis
	100%		Capítulo II - Presente Tesis
% supervivencia de los juveniles	62%	luego de 1 mes de bioensayo	Cossi et al., 2018
	92%	luego de 1 mes de bioensayo	Cossi et al., 2020
	100%	luego de 1 mes de bioensayo	Paredes et al., 2022
	99%	luego de 1 mes de bioensayo	Capítulo I - Presente tesis
	97%	luego de 1 mes de bioensayo	Capítulo II - Presente Tesis
	100%	luego de 2 meses de bioensayo	Paredes et al., 2022
	100%	3 meses de bioensayo	
	100%	4 meses de bioensayo	
	89%	luego de 2 meses de bioensayo	Capítulo II - Presente Tesis

En el ambiente algunos o todos estos valores, probablemente sean aún más variables, teniendo en cuenta situaciones como la predación, la presencia de parásitos, los cambios en las condiciones ambientales, entre muchas otras que ocurren naturalmente.

Las actividades enzimáticas de AChEs y CEs son los biomarcadores más utilizados en estudios de toxicidad con *B. straminea*. Sin embargo, también se ha observado cierta variabilidad entre controles de diferentes bioensayos realizados a distintos tiempos de exposición (Bianco et al., 2014; Cossi et al., 2018, 2020). Incluso en ambos capítulos de esta tesis, se observaron algunas diferencias en los valores de estos biomarcadores, siendo la actividad promedio de ambos capítulos para AChE  $0,037 \pm 0,006$   $\mu\text{moles}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ , la de CEs con p-NFA  $0,122 \pm 0,043$   $\mu\text{moles}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$  y la de CEs con p-NFB  $0,183 \pm 0,025$   $\mu\text{moles}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$  (tabla 33). Al comparar estos valores de actividades enzimáticas con los reportados en un trabajo previo (Bianco et al., 2014), se observa que resultan estar en el mismo orden de magnitud (tabla 33). Resulta importante que en cada bioensayo se incluyan los correspondientes grupos controles, aún si se van a determinar biomarcadores ampliamente conocidos y utilizados como es el caso de las B-esterasas.

**Tabla 33. Actividades de B-esterasas de *Biomphalaria straminea* en grupo controles.**

Parámetro	Valor	Referencia
Actividad AChE ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,051 \pm 0,018$	Bianco et al., 2014
	$0,042 \pm 0,015^*$	Capítulo I - Presente Tesis
	$0,036 \pm 0,004^{**}$	Capítulo II - Presente Tesis
Actividad CE con p-NFA ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,621 \pm 0,134$	Bianco et al., 2014
	$0,265 \pm 0,151^*$	Capítulo I - Presente Tesis
	$0,086 \pm 0,016^{**}$	Capítulo II - Presente Tesis
Actividad CE con p-NFB ( $\mu\text{mol}/\text{min}^*\text{mg}_{\text{proteína}}$ )	$0,394 \pm 0,135$	Bianco et al., 2014
	$0,411 \pm 0,166^*$	Capítulo I - Presente Tesis
	$0,126 \pm 0,027^{**}$	Capítulo II - Presente Tesis

AChE: acetilcolinesterasa, CE: carboxilesterasa, p-NFA: p-nitrofenil acetato, p-NFB: p-nitrofenil butirato.

\*Promedio  $\pm$  desvío estándar de los controles realizados en los bioensayos de 14 días del capítulo I.

\*\*Promedio  $\pm$  desvío estándar de los controles realizados en los bioensayos de los años 2022 y 2023 (48 h y 7 días) del capítulo II.

Los resultados obtenidos de los ensayos de exposición a clorpirifos y a las muestras de agua del Arroyo Las Catonas donde se detectó este plaguicida, no tuvieron los mismos efectos. La exposición por 48 h a las muestras de agua del arroyo en la campaña

de 2021 tuvo efectos muy severos (letalidad e inhibición de la actividad de AChE), habiéndose determinado en el agua una concentración de clorpirifos (4,02 µg/L) que no produjo letalidad en los bioensayos de exposición aguda, la cual se registró a partir de la concentración de 1 mg/L. Con respecto a la AChE, en un trabajo previo del laboratorio (Tejedor, 2019) se evaluó su actividad luego de 48 h de exposición al PA de clorpirifos y se registró una inhibición significativa desde 0,01 mg/L, concentración similar a la detectada en el arroyo. Estudiar un contaminante en forma aislada y en condiciones controladas de laboratorio ayuda a comprender su mecanismo de toxicidad. Sin embargo, en condiciones ambientales reales, los contaminantes se presentan formando mezclas complejas y las interacciones entre las sustancias son múltiples pudiendo tener efectos antagonistas, sinergistas o aditivos sobre múltiples biomarcadores (Herbert et al., 2021).

Las respuestas que se analizan en toxicología, pueden ser tanto cuantales como graduales. En el caso de las respuestas cuantales (como la letalidad, si hay o no oviposición, la presencia o ausencia de malformaciones) su ventaja radica en que son fáciles de interpretar resultando especialmente útiles en bioensayos ambientales. Sin embargo, incluir también respuestas graduales (variación de actividades enzimáticas o de porcentajes y tiempos de eclosión) permite analizar en mayor detalle cómo es la relación dosis-respuesta, y proporciona información acerca del/os mecanismo/s por el/los cual/s se ejerce la toxicidad. En este último tipo de respuestas, es necesario disponer de controles adecuados con los cuales comparar las respuestas obtenidas. Incluir ambos tipos de respuestas permite aprovechar las ventajas que presentan cada una de ellas.

Al igual que lo observado en condiciones controladas de laboratorio, en el ambiente los organismos también presentan cierta variabilidad en relación a los parámetros bioquímicos. Los biomarcadores bioquímicos determinados en especies bioindicadoras son considerados como señales tempranas de alarma ya que suelen alterarse a concentraciones bajas de contaminantes en el ambiente. Sin embargo, es necesario plantear un enfoque que incluya múltiples biomarcadores para obtener una evaluación lo más completa posible de los efectos sobre la biota. Las enzimas involucradas en los procesos de detoxificación (CEs y GST) así como en el estrés oxidativo (CAT, SOD y GR),

son usualmente utilizadas en estudios con especies de invertebrados pero suelen tener baja especificidad, viéndose modificadas sus actividades por una amplia variedad de factores de estrés.

Otros gasterópodos han sido utilizados en nuestro laboratorio en ensayos de toxicidad de xenobióticos: *B. glabrata* (Kristoff et al., 2006, 2008, 2010, 2011, 2012), *P. corneus* (Agrelo et al., 2019; Otero y Kristoff, 2016; Rivadeneira et al., 2013, 2015) y *C. gibbosa* (Bianco et al., 2013; Boburg et al., 2019; Cossi et al., 2015; Herbert et al., 2018, 2021). *P. corneus* y *B. glabrata* pertenecen a la misma familia que *B. straminea* y las tres especies presentan características que permiten estudiar parámetros reproductivos y de la descendencia gracias a que alcanza en un tiempo breve la madurez sexual, tienen alta tasa de eclosión y de supervivencia de los juveniles y depositan un gran número de puestas. Sin embargo, *B. straminea* es la única especie nativa de las tres. En cuanto a *C. gibbosa*, pertenece a una familia diferente (Chilinidae) y tiene condiciones estrictas tanto de mantenimiento como de cría (baja tasa de reproducción, lento desarrollo y bajas tasas de eclosión y de supervivencia de los juveniles). De esta forma, el uso de *B. straminea* presenta varias ventajas que no se encuentran en otros gasterópodos. En primer lugar, permite estudiar parámetros reproductivos y de la descendencia, y disponer de un cultivo propio y continuo. Esto último es de gran utilidad debido a la menor variabilidad de los biomarcadores en comparación a especies recolectadas del ambiente y la posibilidad de realizar bioensayos en cualquier momento del año. En segundo lugar, es una especie tolerante a condiciones desfavorables, presencia de xenobióticos y tiempos largos de exposición. A esto se suma el hecho de ser una especie nativa, lo que aporta mayor relevancia a los resultados. Por lo tanto, este modelo resulta recomendable respecto a otros utilizados previamente para ensayos conjuntos de toxicidad de contaminantes y de muestras de agua ambientales. La elección de este modelo biológico se mantiene desde el año 2012 y en 2017, gracias a los aportes del grupo, la especie fue seleccionada como prioritaria a ser monitoreada por el interés en su uso como bioindicadora de la salud ambiental (Informe del Medio Ambiente, 2017). Ese mismo año, se comenzaron a utilizar los organismos de *B. straminea* en estudios de exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas como parte del proyecto PUE-CONICET detallado en la introducción del capítulo II (Herbert et al., 2019), y que luego

continuó con la presente tesis. Los resultados obtenidos de estos primeros bioensayos con muestras de agua ambientales de la provincia de Buenos Aires, fueron la base para comenzar a realizar biomonitoreos de otros cuerpos de agua de CABA: Lago Lugano y Lago Soldati (Paredes et al., 2022, 2024).

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten concluir que *B. straminea* es una especie útil tanto como bioindicadora de contaminación ambiental como en bioensayos de toxicidad de plaguicidas OFs. Estos resultados resultan relevantes no sólo en cuanto a la utilidad de *B. straminea*, sino también para profundizar en el conocimiento del estado de los cuerpos de agua de nuestro país y concientizar sobre medidas de prevención y/o reglamentaciones necesarias.

En futuros trabajos se propone profundizar en *B. straminea* el análisis del daño oxidativo producido por la exposición a xenobióticos, sumar análisis histomorfométricos tanto de la glándula digestiva (aumentar el N, incluir proporción de células digestivas y basófilas, y de túbulos en sus diferentes fases) y de las gónadas como de otros órganos, y profundizar en los mecanismos por los cuales los xenobióticos pueden producir efectos embriotóxicos y alteraciones en la descendencia. En cuanto a los biomonitoreos, se propone estudiar el efecto de exposiciones a muestras de agua sobre nuevos biomarcadores e incluir una mayor variedad de parámetros indicadores de embriotoxicidad y de calidad de la descendencia.

## Conclusiones

De acuerdo al objetivo general planteado en este trabajo de tesis “Evaluar efectos del organofosforado clorpirimifos y de la exposición a muestras de agua del Arroyo Las Catonas (Cuenca del Río Reconquista) en el gasterópodo nativo *Biomphalaria straminea*”, y a los objetivos específicos de cada capítulo, se desprenden las siguientes conclusiones:

- a) El clorpirimifos produjo letalidad aguda a partir de 1 mg/L con el PA y con el FC, siendo sus CL<sub>50</sub>-48h similares.
- b) El CR (cociente de riesgo) no presume riesgo, sin embargo la exposición por 14 días a clorpirimifos a concentraciones de relevancia ambiental, generó efectos subletales a distintos niveles de organización.
- c) Se produjo inhibición de la actividad de AChE, tanto con el PA como con el FC.
- d) Se registró letalidad en los juveniles con el PA y con el FC.
- e) El FC resultó ser más tóxico ya que modificó las actividades de CEs, CAT y SOD y causó efectos embriotóxicos (aumento en el tiempo de eclosión y disminución en el porcentaje de eclosión).
- f) De forma preliminar, se observó alteración en el MET en los túbulos digestivos por exposición al PA.
- g) En las muestras de agua del Arroyo Las Catonas, la mayoría de los parámetros fisicoquímicos presentaron valores acordes para la protección de la vida acuática.

- h) Los efectos observados en *B. straminea* luego de la exposición a muestras de agua de distintos sitios del arroyo, mostraron dependencia temporal y espacial, evidenciando que el Arroyo Las Catonas presentaba condiciones diferentes entre campañas y entre sitios.
- i) Las muestras de agua provenientes de los sitios estudiados causaron efectos embriotóxicos y disminución en la supervivencia de los juveniles.
- j) La actividad de AChE resultó ser el biomarcador que se vio alterado en la mayoría de las campañas.
- k) El sitio ZH en la campaña del 2021 demostró ser el más impactado basado en la letalidad y la inhibición de la actividad AChE obtenidas luego de la exposición aguda, lo cual podría relacionarse con la concentración de clorpirifos determinada.
- l) La actividad de la enzima AChE y los parámetros reproductivos fueron las respuestas más observadas, tanto por exposición a clorpirifos como a muestras de agua ambientales.

*B. straminea* es una especie sensible a la presencia de diversos contaminantes en el agua, resultando útil tanto en bioensayos de toxicidad de xenobióticos como en estudios de calidad de agua, presentando la ventaja adicional de las especies nativas.

## Anexo I

### Procedimientos histológicos

#### Etapas para la preparación del material fijado para el análisis histológico

\*Deshidratación: se deshidrataron las piezas en una serie ascendente de alcohol (etanol de 70° a 100°) y se aclararon en xilol Bioclear®.

\*Inclusión en parafina: se incluyeron las piezas en parafina Paraplast® en estufa (62°C) durante 6 h. Cuando solidificaron, se tallaron los bloques y se montaron sobre tacos de madera.

\*Cortes en micrótomo: se realizaron cortes histológicos seriados de 7 µm de espesor con un micrótomo electrónico de rotación, los cuales fueron colocados sobre portaobjetos previamente gelatinizados (2 g de gelatina más 0,1 g de alumbre de cromo disueltos en 200 mL de agua destilada). Posteriormente se los dejó 10 minutos en estufa a 60°C para que se secan.

\*Desparafinado e hidratación: los cortes luego se desparafinaron en xilol y se hidrataron en una serie descendente de alcoholes (etanol de 96° a 50°) y finalmente agua destilada.

\*Coloración: de cada muestra procesada se realizaron dos tipos de coloraciones: Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson modificado, de acuerdo a los protocolos que se detallan a continuación.

#### Protocolo de Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina de Carazzi por 15 minutos
- lavado en agua destilada por 1 minuto
- Eosina acuosa iodada 0,25% por 5 minutos
- lavado en agua destilada por 1 minuto

#### Protocolo de coloración Tricrómico de Masson modificado

- Hematoxilina de Carazzi por 9 minutos

- agua de la canilla (viraje de color) por 1 minuto
- lavado en agua destilada por 1 minuto
- Fucsina por 1 minuto + 20 segundos
- lavado en agua destilada por 1 minuto
- ácido fosfomolíbdico (mordiente) por 4 minutos + 30 segundos
- Azul de Anilina por 3 minutos
- agua destilada (3 lavados) por 1 minuto

\*Deshidratación: posteriormente los cortes fueron deshidratados en una serie ascendente de alcoholes (etanol de 50° a 100°) y finalmente aclarados en xilol.

\*Montaje: finalmente se realizaron los montajes definitivos aplicando Bálsamo de Canadá sintético en los portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjeto limpio. Se eliminaron las burbujas aplicando una suave presión sobre los cubreobjetos y se los dejó secar bajo la campana por al menos 24 h antes de su observación.

## Anexo II

Principio activo (figura 96) y formulado comercial de clorpirifos CLОРР-F (figura 97) utilizado en esta tesis y su correspondiente folleto en el cual se incluyen las recomendaciones y restricciones de uso, además de su clasificación de toxicidad para el ambiente y el ser humano.



Figura 96. Principio activo de clorpirifos Pestanal.



Figura 97. Formulado comercial de clorpirifos CLОРР-F.

INSECTICIDA - ACARICIDA



CONCENTRADO EMULSIONABLE

**COMPOSICION**

clorpifos: 0,0 dietil-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato .....	48 g
solvente y emulsionantes ... c.s.p. ....	100 ml

**LEA INTEGRAMENTE ESTE FOLLETO ANTES DE UTILIZAR EL PRODUCTO**

Inscripto en Senasa con el N° 36.711

Nº de Partida:

Fecha de vencimiento:

Cont. Neto: **1 Lt**

Industria Argentina

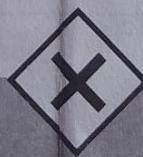
**INFLAMABLE DE 3ra. CATEGORIA**



Falcrop S.A.

Ciudad de la Paz 3727, 3º piso, (1429), Capital Federal,  
Argentina - Tel /Fax : 11-5294-1133/71/75/84  
E-mail: info@falcrop.com.ar

**RESPONSABILIDAD LEGAL:** LA EMPRESA ofrece este producto, cuidadosamente elaborado según normas científicas, haciéndose responsable, dentro de la fecha de vencimiento, de su composición concordante con la declarada. Como su aplicación se hace sin su intervención, empleando dosis y técnicas fuera de su control y bajo condiciones de medio variables, LA EMPRESA no se responsabilizará por los daños que pudieran atribuirse al empleo de este producto y sobre todo si se hiciese en forma distinta a la indicada en el rótulo.



**NOCIVO**

Cultivo	Plaga	Dosis	Tc	Momento de Aplicación
Tomaté	Pollilla de la papa ( <i>Informatoschemia operculata</i> ), Pollilla del tomate ( <i>Uita absoluta</i> )	160 cc/100 de agua	21	Previamente e desechar el transplante cada 2 semanas. Repetir cada 2 semanas en 2 capas interiores. Se utiliza en morada con cipermetrina al 25% (30 cc/100 l de agua).
Sorgo	Mesquita del sorgo ( <i>Contarinia sorghiella</i> )	0.25-0.30 (m)	30	1er tratamiento: Usar solo harina para garantizar el 90% de las bandas mosquita cada 10 plantas, si se observa una fioración es necesario 2º tratamiento: a los 4 días del 1º.
Cítricos	Acaro de la yema ( <i>Aceria sheldoni</i> ), Acaro del hostaldo ( <i>Phyllocoptes oleivora</i> )	100 cc/100 de agua	21	A la caída de los pétales y cuando hayan 3-4 ácaros por hoja. Es preferencial 2º tratamiento: a los 4 días del 1º, si la floración es desparada.
	Cochinilla blanca ( <i>Aonidiella aurantii</i> )			1ª aplicación de cubierta a diciembre; 2ª aplicación de letrero a marzo
	Cochinilla blanca ( <i>Locustacris hesperidum</i> ), Cochinilla del Delta ( <i>Lecanium deltae</i> ), Cochinchilla harina ( <i>Psylloborus cinctus</i> ), Cochinchilla roja común ( <i>Crypsomphalus aciculiferum</i> ), Puigones tostadora ( <i>Aphis chrysanthemi</i> )			Aplicar en los meses de verano, al finalización de las frutas. El agregado de benzoquinona ambarina su acción. Puede usarse en mezclas con insecticidas emulsificantes, reduciendo las dosis a la mitad. Mezclar la mitad (o más) el aceite, ramales y tronco.
	Cochinilla roja australiana ( <i>Aonidiella aurantii</i> )	100-120 cc/	21	Al 1/2 de la edad de las 3/4 partes de los pétales, al observar las primeras ninas móviles. Dejar transcurrir 25 días entre tratamientos.
Manzano y Peral	Arácnido roja común ( <i>Tetranychus telarius</i> ), Arácnido roja europea ( <i>Paronychus ulmi</i> )	150 cc/100 lt de agua	30	Según el servicio de lampara
	Gusano de la pera y la manzana ( <i>Cydiopsis pomonella</i> )	80-100 cc/100 lt's de agua		Al observar las plimuritas colgadas en la parte abierta de la planta.
	Cochinilla comuna ( <i>Lanopeltis ulmi</i> )	100 cc/100 lt		Al observar las plimuritas colgadas en la parte abierta de la planta.
	Pulgón laniger ( <i>Eriophyes lanigerum</i> )	75-90 cc/100 lt's de agua		En curvas de invierno aplicar a vena hincada o duritas verdes.
	Piojo de San José ( <i>Quadrastrioides pentoseus</i> ), Piojo del peral ( <i>Psyllia prunaria</i> )	Maizel con 1/5 l de aceite mineral para el control de arañuelas		
TRATAMIENTO DE SUELO				
Cultivo	Plaga	Dosis	Tc	Momento de Aplicación
Cereales de inverno. Girasol, Maíz, Sorgo, Tabaco, Hortícolas	Guisanos cortadores ( <i>Agrotis sp.</i> ); Feria maízena, Pardoma saúca; <i>Eucoa sp.</i>	25 - 4	Aplicación total, incorporando a 3-4 cm con rastra con rastra de disco.	
		125-2	Aplicación en banda en el surco abierto por la sembradora, antes del haga seco, incorporar	
Cereales, Hortícolas (papa, tomate y pimiento), Lino, Tabaco	Guisanos blanque ( <i>Conoderus sp.</i> ); Guisanos sp.; Gorgojo del tomate ( <i>Phytonemus mucronalis</i> ), Larva de pulguita ( <i>Epitrix sp.</i> )	4 - 6	Incorporar con rastro de discos a 5-10 cm de profundidad. Se recomienda tratar con la siguiente cantidad de larvas por metro cuadrado Gusano blanque: Lino 15; Maíz 20; papa, batata, cebolla en general 20-25; Gusano Blanco Cereales 10; lino 15, para 3-4 duritas de escamas 4-6; pulguitas 20-30 das.	
<b>RECOMENDACIONES DE USO:</b>				
Cultivo	Plaga	Dosis	Tc	Momento de Aplicación
Alfalfa	Pulgón de la alfalfa ( <i>Acytropis pisum</i> )	0.35-0.40 (m)	7	Cuando aparezcan las primeras flores.
	Isca de la alfalfa ( <i>Codias lechia</i> )			
Cereales (Trigo)	Ovula militar tardía ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ), Ovula militar verdadera ( <i>Pseudaletia adulatrix</i> )	0.75-0.90 (m)	30	Al leerger 40-60 iscas cada 20 gletes de red.
Avena	Pulgón amarillo ( <i>Acytropis thomae</i> )	0.75-0.90 (m)		Revisar el cultivo ante la presencia de manjospas. Cuando las iscas son pequeñas, a 1.5 cm de largo
Cebada,	Pulgón verde de los cereales ( <i>Schizaphis graminum</i> )	0.34-0.40 (m)		Al observar los primeros poligones
Centeno	Iscas contadoras ( <i>Agrotis sp.</i> ; <i>Peridroma saucia</i> ; <i>Feltia malinea</i> )	1.30-1.60 (m)		Al observar plantas cortadas al ras del suelo, mojando bien alrededor de las iscas. Se pueden preparar cebos con 30 a 40 Kg de avena, 100 cc. de clorofitos y 10 l. de agua, para tratar 1 ha. Se aplica mejor agregando 4 Kg de melaza.
Algodón	Gusano cogolero ( <i>Helicoverpa armigera</i> ); Isca bolillera ( <i>Helicoverpa armigera</i> )	1 - 2 /ha	2	Con 200 ugas /100 plantas o 7 a 10 % de pimpollos dañados. Puede utilizarse en mezcla 225 cc clorofitos + 120 cc de cipermetrina 25%.
	Chinchirayada ( <i>Horma nobilis</i> )	0.24-0.31 (m)		Cuando se recogen 10-15 chinchirios cada 100 golpes de red. Dosis menores en presencia de nimfas y doses mayores en presencia de adultos. Puede utilizarse en mezcla con 40-60 cc de cipermetrina 25%.
	Chinchirayada ( <i>Onthiscerus phagnensis</i> )	1.5 /ha		Cuando se encuentre 20 chinchirios, cada 100 plantas.
Oruga de la mariposa ( <i>Alabama argillacea</i> )	0.5-0.6 (m)		Cuando se recogen 50-100 orugas cada 100 golpes de red. Puede utilizarse en mezcla 160-210 cc clorofitos + 30-40 cc de cipermetrina 25%.	
	Pulgón del algodón ( <i>Aphis gossypii</i> )	0.3-0.5 (m)		Cuando en las plantas se encuentren 5-8 pulgones por hoja.
Maíz y sorgo	Gusano cogolero ( <i>Helicoverpa armigera</i> )	1 /ha	30	Las iscas se sitúan en el cuello "cogollo" de la planta. Aplicar con 15-20% de plantas afectadas. Aplicar con 80 l/ha de agua o más.
	Gusano contador ( <i>Agrotis sp.</i> ; <i>Peridroma saucia</i> ; <i>Feltia malinea</i> )	1.3-1.6 /ha		Cuando se observen las primeras larvas o plantas cortadas a ras de suelo.
	Ovula militar tardía ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	1 /ha		Las iscas se sitúan en el cuello "cogollo" de la planta. Aplicar con 15-20% de plantas afectadas. Aplicar con 80 l/ha de agua o más.
	Pulgón del maíz ( <i>Bioplacophilum maidis</i> )	0.30-0.35 (m)	25	Al observar los primeros ataques
Girasol	Gata peluda norteamericana ( <i>Spilosoma virginica</i> ); Gusano contador; aspero ( <i>Agnos sp.</i> ); Eucoa ( <i>Eucoa sp.</i> ); Gusano variado ( <i>Peridroma saucia</i> )	0.80-0.90 (m)		Cuando se observen 3 iscas por planta



**RESTRICCIONES DE USO:** Dejar transcurrir entre la última aplicación y la cosecha o pastoreo, cereales 20 días; citrus 21 días; girasol 25 días; manzana y peral 30 días; soja 25 días; jorgo 30 días; papa, tomate y pimiento 21 días; algodón 21 días; tabaco y lino 30 días; cultivos de pastoreo y alfalfa 7 días. En caso que el cultivo o sus subproductos se destinen a la exportación, deberán conocerse el límite máximo de residuo del país de destino y observar el período de carencia que corresponda a ese valor de tolerancia".

**COMPATIBILIDAD:** Es compatible con la mayoría de los fitaguidos, excepto con los de reacción fuertemente alcalina, como polisulfuro de calcio, caldo bordoles, etc.

**FITOTOXICIDAD:** No es fitotóxico siguiendo fielmente las indicaciones de uso.

CONSULTE CON UN INGENIERO AGRONOMO.

**PRECAUCIONES**

- MANTENER ALEJADO DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS Y PERSONAS INEXPERTAS.
- NO TRANSPORTAR NI ALMACENAR CON ALIMENTOS.
- INUTILIZAR LOS ENVASES VACIOS PARA EVITAR OTROS USOS.
- EN CASO DE INTOXICACIÓN LLEVE ESTA ETIQUETA AL MEDICO.

**MEDIDAS PRECAUTORIAS GENERALES:** Evitar el contacto con la piel, los ojos, e inhalación, como así también la contaminación con alimentos. Usar ropa protectora adecuada, guantes, botas, máscara durante la preparación y aplicación. No aspirar las gotas de la aspersión. No comer, no beber y no fumar durante la aplicación del producto. No pulverizar contra el viento. Luego de utilizar el producto lavar muy bien todas las partes expuestas del cuerpo con abundante agua y jabón y asegurarse un correcto lavado de las prendas que hayan tenido contacto con el producto antes de ser usadas nuevamente. Lavar todos los utensilios y destruir los envases vacíos.

**RIESGOS AMBIENTALES:** **Aves:** Moderadamente tóxico. No aplicar en lugares cercanos o sobre los dormideros, áreas donde se alimentan activamente o esté nidificando. **Peces:** Muy tóxico. No aplicar directamente sobre espejos de agua ni en áreas donde existiera agua libre en superficie, dejando una franja de por lo menos cuarenta metros entre el cultivo tratado y dichas superficies de agua como medida de precaución. No contaminar fuentes y cursos de agua con el agua del lavado de los equipos. Evitar la deriva. **Abejas:** Altamente tóxico. Dar aviso a los apicultores vecinos previo al tratamiento. Trasladar las colmenas; de no ser posible tapar la entrada de la piquera con arpillería húmeda o espuma. Asperjar fuera del horario de pecoreo o actividad de las abejas.

**TRATAMIENTOS DE REMANENTES:** Si el contenido de este envase es usado parcialmente, el mismo debe ser almacenado en un depósito en lugar aislado y a resguardo de factores climáticos. Los remanentes del producto sin diluir pueden mezclarse con agua y aplicarse sobre alambrados y zonas no cultivadas donde quiera eliminar malezas. Almacenar los recipientes en lugar apropiado y luego enviarlo a lugar debidamente habilitado para su destrucción.

**TRATAMIENTO Y MÉTODO DE DESTRUCCIÓN DE ENVASES VACÍOS:** Verificar que estén vacíos, enjuagar tres veces con agua y volcar el agua de lavado en el tanque de la pulverizadora para su aplicación. Inutilizarlos por rotura y colocarlo en tambores bien identificados para enviar a una planta para su incineración. No quemar a cielo abierto.

**ALMACENAMIENTO:** Conservar en su envase original cerrado herméticamente, en lugar seco y fresco; con buena ventilación y lejos de alimentos y forrajes, fertilizantes, semillas, insecticidas o fungicidas.

**DERRAMES:** Aislar y absorber el derrame con material absorbente (arena, tierra, arcilla), luego colocar en tambores y enviar a una planta de tratamiento para su incineración. Evitar que el material alcance corrientes de agua o cloacas.

**PRIMEROS AUXILIOS:** En caso de inhalación: llevar al accidentado al aire libre y aflojar sus ropas. De ser necesario dar respiración artificial. En caso de ingestión: dar papilla de carbón activado y purgante salino no oleoso (sulfato de sodio). En caso de contacto con la piel: quitar las ropas y lavar las partes contaminadas con agua jabonosa o bicarbonato. En el caso de contacto ocular se deben lavar bien los ojos con agua limpia durante 15 minutos manteniendo los párpados bien abiertos. Se recomienda llevar el envase o la etiqueta del producto al médico. Dar atropina 1 a 2 mg cada hora por vía intravenosa u oral. No dar tranquilizantes ni leche. No poner apóstitos grasos.

**ADVERTENCIA PARA EL MEDICO: CLASE II: MODERADAMENTE PELIGROSO.** Moderado irritante ocular. Mínimo irritante dermal. Clase inhalatoria II.

Aplicar tratamiento para fosforados, Antídoto: Atropina.

**SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN AGUDA:** Sudoración exagerada, pupilas muy cerradas, debilidad, dolor de cabeza, congestión bronquial, salivación, náuseas, vómitos, diarrea y calambres.

**CONSULTAS EN CASO DE INTOXICACIONES:**

- Centro Toxicológico del Hospital Municipal de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Tel: (011) 4962-6666/2247.
- Centro Nacional de Intoxicaciones Policlínico Prof. A. Posadas. Tel: (011) 4655-6648 y 658-7777.
- Hospital de Clínicas José de San Martín. Tel: (011) 5950-8804/06.
- Hospital de Niños (La Plata) Tel. (0221) 451-5555. Línea gratuita: 0800-333-0160.



## Bibliografía citada y consultada

- Abdel-Ghaffar, F., Ahmed, A.K., Bakry F., Rabei, I., Ibrahim, A., 2016. The impact of three herbicides on biological and histological aspects of *Biomphalaria alexandrina*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Malacol.* 59(2), 197-210. <https://doi.org/10.4002/040.059.0201>
- Abdel-Tawab, H., Ibrahim, A.M., Hussein, T., Mohamed, F., 2021. Mechanism of action and toxicological evaluation of engineered layered double hydroxide NMs in *Biomphalaria alexandrina* snails. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 11765-11779. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16332-w>
- ACUMAR, 2019. Anexo C, resolución Nº 283/2019 - T.O. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-283-2019-334281/texto>
- AdA (Autoridad del Agua), 2003. Resolución Nº 336/03. <https://normas.gba.gob.ar/documentos/OP3k4eSA.html>
- Adams, S.M., Greeley, M. S., 2000. Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut.* 123: 103-115. <https://doi.org/10.1023/A:1005217622959>
- Agrelo, M., 2012. Alteraciones en la reproducción y en la actividad de B-esterasas de *Planorbarius corneus* expuestos a metilazinfos. Análisis de malformaciones, reproducción, crecimiento y supervivencia de su descendencia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Agrelo, M., Rivadeneira, P.R., Cossi, P.F., Cacciatore, L.C., Kristoff, G., 2019. Azinphos-methyl causes in *Planorbarius Corneus* toxic effects on reproduction, offspring survival and B-Esterases depending on the exposure time. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 217, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.002>
- Aldridge, W.N., 1953. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53, 110-117. <https://doi.org/10.1042/bj0530110>
- Ali, S.N., Baqar, M., Mumtaz, M., Ashraf, U., Anwar, M.N., Qadir, A., Ahmad, S.R., Nizami, A.S., Jun, H., 2020. Organochlorine pesticides in the surrounding soils of POPs destruction facility: source fingerprinting, human health, and ecological risks assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 7328-7340. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07183-7>
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2013. Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 450.
- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: Methods in Enzymology, 113, 548-555. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9)
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in Surface and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93(9), 1866-1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>
- Appelo, C.A., Postma, D., 2005. Geochemistry, groundwater and pollution. Amsterdam: CRC Oress, Taylor and Francais Group. <https://doi.org/10.1201/9781439833544>
- Araújo, H.D.A., Silva, L.R.S., Siqueira, W.N., Fonseca, C.S.M., Silva, N.H., Melo, A.M.M.A., Martins, M.C.B., Lima, V.L.M., 2018. Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata*(Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* 179, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.007>
- Arias, M., 2019. Efecto del uso de fertilizantes y pesticidas sobre organismos acuáticos en arroyos de la zona hortícola de La Plata. Tesis doctoral. Instituto de Limnología "DR. Raúl A. Ringuelet", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. <http://hdl.handle.net/11336/81874>
- Arikan, K., Turan, S.L., 2020. Organochlorine pesticide residues in feathers of four bird species from westernpart of Turkey. *Turk. J. Zool.* 44(5), 401-407. <https://doi.org/10.3906/zoo-2005-52>

- Arrighetti, F., Landro, S.M., Lavarías, S.M., 2022.** Sensitivity of histopathological and histochemical parameters in the digestive gland of the apple snail *Pomacea canaliculata* exposed to cypermethrin. *Aquat. Toxicol.* 252, 106292. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106292>
- Autoridad del Agua, Atlas de Cuencas.** <https://ada.gba.gov.ar/mapas-de-cuencas/>
- Agua y Saneamientos Argentinos (AYSA), 2017.** [https://www.aysa.com.ar/media-library/sustentabilidad/bid/BID\\_AAS\\_LC\\_Anexo\\_I\\_Estudio\\_de\\_Servicio\\_Moreno\\_1.pdf](https://www.aysa.com.ar/media-library/sustentabilidad/bid/BID_AAS_LC_Anexo_I_Estudio_de_Servicio_Moreno_1.pdf)
- Baez, M.E., Espinoza, J., Silva, R., Fuente, E., 2015.** Sorption-desorption behavior of pesticides and their degradation products in volcanic and nonvolcanic soils: interpretation of interactions through two-way principal component analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8576–8585. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4036-8>
- Bajwa, U., Sandhu, K.S., 2014.** Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. *J. Food Sci. Technol.* 51, 201–220. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0499-5>
- Ballesteros, M.L., Rivetti, N.G., Morillo, D.O., Bertrand, L., Amé, M.V., Bistoni, M.A., 2017.** Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Sci. Tot. Environ.* 595, 711-722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.203>
- Basílico, G.O., 2021.** Características de la cuenca del río Reconquista: aspectos geográficos y ambientales. Fundación de Historia Natural Félix de Azara, 279-303. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/163265>
- Bauer, B., Mally, A., Liedtke, D., 2021.** Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *Intern. J. Molec. Sci.* 22(24), 13417. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44 (1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Becerra-Gutiérrez, L.K., Horna-Acevedo, M.V., Barriosnuevo-Albújar, K.I., 2014.** Nivel de contaminación en los efluentes provenientes de camales de la región la libertad. *Revista del cuerpo médico del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 7(3).
- Bellas, J., Gil, I., 2020.** Polyethylene microplastics increase the toxicity of chlorpyrifos to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Pollut.* 260, 114059. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114059>
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2009.** How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?. *Integr. Environ. Assess. Manag. An Int. J.* 3, 364-372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>
- Bergero, M.F., Lucchesi, G.I., 2018.** Degradation of cationic surfactants using immobilized bacteria: Its effect on adsorption to activated sludge. *J. Biotechnol.* 272, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.03.003>
- Bernal Rey, D., 2022.** Monitoreo ambiental, cuantificación de plaguicidas y evaluación de efectos neurotóxicos y de estrés oxidativo en peces dulceacuícolas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Aún no publicada.
- Bernal Rey, D., dos Santos Afonso, M., Menendez-Helman, R.J., 2019.** Determinación y cuantificación de plaguicidas en el arroyo Las Catonas, cuenca del Río Reconquista. En: Castoldi Leonardo, Martínez Bollo Ignacio y Guzmán Leticia Ana. Implementación de las bases de la economía circular en el cinturón verde hortícola del conglomerado Villa María-Villa Nueva. Congreso de Ciencia y Tecnología Ambiental 2019. Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, Florencio Varela, 77. <https://www.aacademica.org/cifaldi.ruano.gonza/48>
- Bhagat, J., Ingole, B.S., 2016.** Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. *Invertebrate Survival J.* <http://drs.nio.org/drs/handle/2264/7875>
- Bianco, K.A., Martini, C.N., Tejedor, M.J., Paredes, M.G., Kristoff, G., 2024.** Multi-biomarker approach to evaluate the responses of the snail *Biomphalaria straminea* at environmentally

- relevant concentrations of chlorpyrifos (active ingredient and commercial formulation). Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 281, 109923. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109923>
- Bianco, K., Otero, S., Oliver, A. B., Nahabedian, D., Kristoff, G., 2014. Resistance in cholinesterase activity after an acute and subchronic exposure to azinphos-methyl in the freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 109, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.038>
- Bianco, K., Yusseppone, M.S., Otero, S., Luquet, C., Ríos de Molina, M., del, C., Kristoff, G., 2013. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. Aquat. Toxicol. 144-145, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.025>
- Bieczynski, F., Lascano, C., Venturino, A., 2021. Informe técnico-científico sobre los usos e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. 5, 106-176. ISBN 978-987-1560-86-8.
- Blahova, J., Doubkova, V., Plhalova, L., Lakdawala, P., Medkova, D., Vecerek, V., Svobodova, Z., Faggio, C., 2021. Embryotoxicity of selective serotonin reuptake inhibitors—Comparative sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) and african clawed frog (*Xenopus laevis*) embryos. Applied Sci. 11(21), 10015. <https://doi.org/10.3390/app112110015>
- Blazer, V.S., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiol. Biochem. 26(1), 85-101. <https://doi.org/10.1023/A:1023332216713>
- Boburg, B., Herbert, L.T., Cossi, P., Kristoff, G., 2019. Differential responses of biochemical and behavioral parameters in the native gastropod *Chilina gibbosa* exposed subchronically to environmental concentrations of two insecticides used in Argentina. En: Gómez-Oliván, L. (eds) Pollution of Water Bodies in Latin America. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-27296-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27296-8_5)
- Bocquéné G., Roig A., Fournier D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*) Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. Febs. Lett. 407(3), 261-266. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00339-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00339-6)
- Bocquéné, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds, ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. Copenhagen, Denmark. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5048>
- Bogorad, L., Granick, S., 1953. The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. Proc. Nat. Acad. Sci. 39(12), 1176-1188. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.12.1176>
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Env. Sci. Pollut. Res. 22, 35-67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Brooks, B.W., Riley, T.M., Taylor, R.D., 2006. Water quality of effluent-dominated stream ecosystems: Ecotoxicological, hydrological, and management considerations. Hydrobiol. 556: 365-379. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-0189-7>
- Cacciatore, L.C., Kristoff, G., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2012. Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic cholinesterase inhibition in *Planorbarius corneus*. Chemosphere, 88(4), 450-458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.069>
- Cacciatore, L.C., Nemirovsky, S.I., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2015. Azinphos-methyl and chlorpyrifos, alone or in a binary mixture, produce oxidative stress and lipid peroxidation in the freshwater gastropod *Planorbarius corneus*. Aquat. Toxicol. 167, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.009>
- Caixeta, M.B., Araújo, P.S., Pereira, A.C., de Freitas Tallarico, L., Rocha, T.L., 2022. *Biomphalaria* embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing

- standard protocols. Sci. Total. Environ. 833, 155211. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155211>
- Caixeta, M.B., Araújo, P.S., Rodrigues, C.C., Gonçalves, B.B., Araújo, O.A., Beviláqua, G.B., Malafaia, G., Silva, L.D., Rocha, T.L., 2021. Risk assessment of iron oxide nanoparticles in an aquatic ecosystem: A case study on *Biomphalaria glabrata*. J. Hazard. Mater. 401, 123398. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123398>
- Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D'Agostino, A., Ammendola, A., Di Noi, A., Gori, A., Casini, S., 2021. Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 208, 111486. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111486>
- Cantera, C.G., Scasso, R.A., Tufo, A., Villalba, L.B., dos Santos Afonso, M., 2018. Mobility of trace elements between the river water, the sediments, and the pore water of Las Catonas Stream, Buenos Aires Province, Argentina. Environ. Earth Sci. 77(14), 535. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7699-5>
- Cao, C., Leng, Y., Kufe, D., 2003. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. J. Biol. Chem. 278, 29667–29675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301292200>
- Caro-Gamboa, L.J., Forero-Castro, M., Dallo-Báez, A.E., 2020. Inhibición de la colinesterasa como biomarcador para la vigilancia de población ocupacionalmente expuesta a plaguicidas organofosforados. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 21(3), 1-23. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num3\\_art:1562](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1562)
- Carreira, P.M., Marques, J.M., Nunes D., 2014. Source of groundwater salinity in coastline aquifers based on environmental isotopes (Portugal): Natural vs. human interference. A review and reinterpretation. Appl. Geochem. 41, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2013.12.012>
- Carriquiriborde, P., 2021. Principios de ecotoxicología. Libros de Cátedra. Principios de ecotoxicología / Valeria Amé ... (et al.); coordinación general de Pedro Carriquiriborde. 1a ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, EDULP, 2021. ISBN 978-950-34-1987-8. Medio Ambiente. I. Amé, Valeria. II. Carriquiriborde, Pedro, coord. CDD 577.07. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/118183>
- CARU, 2019. Digesto sobre el uso y el aprovechamiento del Río Uruguay, resolución Nº 28/19. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-28-2019-333930/texto>
- CASAFE, 2014. Informe del Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 9. <https://www.casafe.org/pdf/2018/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitarios-2014>
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2005. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. Chem-Biol. Interact. 157, 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.036>
- Castañe, P.M., Rovedatti, M.G., Topalián, M.L., Salibián, A., 2006. Spatial and temporal trends of physicochemical parameters in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). Environ. Monitor. Assess. 117, 135-144. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-7980-z>
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., Straus, D.L., 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. Hum. Ecol. Risk. Assess. 8, 165-176. <https://doi.org/10.1080/20028091056809>
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. En: Greenwald, R. (Ed.), CRC Handbook of Methods For Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, Florida, 283-284. [http://refhub.elsevier.com/S0147-6513\(18\)30588-8/sbref23](http://refhub.elsevier.com/S0147-6513(18)30588-8/sbref23)
- Colović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Curr. Neuropharmacol. 11, 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Comité de la Cuenca del Río Reconquista (COMIREC). <https://www.gba.gob.ar/comirec>
- Concato, A.C., Tamagno, W.A., Alves, C., Sutorillo, N.T., Vanin, A.P., Vargas, L., Galon, L., 2022. Enzymatic antioxidant defense system and ALA-D enzyme activity in soybean Enlist™ line. Bragantia. 81, 3922. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20220010>

- Concejo Deliberante de Moreno, 2020. Ordenanza municipal N° 6422/20. <https://sibom.slyt.gba.gov.ar/bulletins/4936/contents/1548101>
- Cossi, P.F., 2019. Efectos de la exposición subcrónica a concentraciones ambientales de contaminantes de relevancia en un gasterópodo nativo de agua dulce: *Biomphalaria straminea*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <http://hdl.handle.net/11336/80083>
- Cossi, P.F., Beverly, B., Carlos, L., Kristoff, G., 2015. Recovery study of cholinesterases and neurotoxic signs in the non-target freshwater invertebrate *Chilina gibbosa* after an acute exposure to an environmental concentration of azinphos-methyl. Aquat. Toxicol. 167, 248-256. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.014>
- Cossi, P.F., Herbert, L.T., Yusseppone, M.S., Pérez, A., Kristoff, G., 2018. Environmental concentrations of azinphos-methyl cause different toxic effects without affecting the main target (cholinesterases) in the freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 162, 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.091>
- Cossi, P.F., Herbert, L.T., Yusseppone, M.S., Pérez, A., Kristoff, G., 2020. Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail® 70) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 192, 110248. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110248>
- Costa, L.G., 2013. En: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 8th edition. Klaassen, C. (Ed.). New York: McGraw-Hill Professional. ISBN: 978-0-07-176922-8
- Costa, L.G., 2018. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. Toxicol. Sci. 162, 24-35. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx266>
- Da Silva, L.F., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Pereira, C.D.S., de Souza Abessa, D.M., Choueri, R.B., Gusso-Choueri, P.K., Cesar, A., 2022. Non-destructive biomarkers can reveal effects of the association of microplastics and pharmaceuticals or personal care products. Marine Poll. Bull. 177, 113469. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113469>
- Davies, J., 1990. Enfoque agromédico sobre manejo de plaguicidas. Organización Mundial de la salud. Washington, U.S.A
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. Chemosphere, 107, 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>
- Demetrio, P.M., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2014. The Effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 268–273. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1336-0>
- De Paiva Magalhães, D., da Costa Marques, M.R., Baptista, D.F., Buss, D.F., 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. Environ. Chemist. Lett. 13(1), 69-87. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0491-9>
- Dickinson, D.A., Forman H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol. 64(5-6), 1019-1026. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)
- Di Giulio R.T., Wasburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W., Jewell C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environ. Toxicol. Chem. 8: 1103. <https://doi.org/10.1002/etc.5620081203>
- Dokmak, H.A.A., Hammam, O.A., Ibrahim, A.M., 2024. Impact of *Schistosoma* sp., infection on biological, feeding, physiological, histological, and genotoxicological aspects of *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus* snails. Acta Parasitológica, 69(1), 648-663. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00760-4>
- Domingues, I., Agra, A.R., Monaghan, K., Soares, A.M., Nogueira, A.J., 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. Environ. Toxicol. Chem. 29(1), 5-18. <https://doi.org/10.1002/etc.23>
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Léveque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater

- biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Rev.* 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Duncan, W.P., Idalino, J.J.S., da Silva, A.G., Moda, R.F., da Silva, H.C.M., Matoso, D.A., Gomes, A.L.S., 2020. Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of acetylcholinesterase in *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae). *Aquacult. Int.* 28, 815–830. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00497-w>
- El Ayari, T., Mleiki, A., El Menif, N.T., 2018. Ocular tentacle regeneration and associated malformations in *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiol.* 806, 215–226. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3360-7>
- Ellman, G.L., Courtney K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 397–400. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0919-x>
- EPA (Environment Protection Agency), 2017. Technical overview of ecological risk assessment: risk characterization. US Environ. Prot. Agency Off. Pestic. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-risk>
- Ern, R., 2019. A mechanistic oxygen-and temperature-limited metabolic niche framework. *Philos. Trans. R. S. B.* 374(1778), 20180540. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0540>
- Escalona, A., Betancur, H.C.A., Martínez, A.Y., 2016. Toxicología Veterinaria. ISBN: 978-958-46-8073-0.
- European Chemicals Agency, 2022. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.018.969>
- Fan, R., Zhang, W., Li, L., Jia, L., Zhao, J., Zhao, Z., Peng, S., Yuan, X., Chen, Y., 2021. Individual and synergistic toxic effects of carbendazim and chlorpyrifos on zebrafish embryonic development. *Chemosphere*, 280, 130769. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130769>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2020. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
- Farrell, C., Hassard, F., Jefferson, B., Leziart, T., Nocker, A., Jarvis, P., 2018. Turbidity composition and the relationship with microbial attachment and UV inactivation efficacy. *Sci. Tot. Environ.* 624, 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.173>
- Finney, D.J., 1971. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. 7th edition, Cambridge university press, Cambridge.
- Flores, G.P., Orozco, J.O., Zelaya, F.P., Ángeles, G.A., 2018. Naturaleza y acciones de los plaguicidas organofosforados sobre el ambiente y la salud. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, 35, 151–179. <https://sociedadesruralesojos.xoc.uam.mx/index.php/srpma/article/view/346/344>
- Fried, B., Rao, K.S., Sherma, J., 1992. Fatty acid composition of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) fed hen's egg yolk versus leaf lettuce. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 101(2), 351–352. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90545-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90545-2)
- Froede, H.C., Wilson, I.B., 1971. 5 A cetylcholinesterase. En: F. Tamanoi (Ed). *The enzymes*, pp. 87–114. Cambridge, EEUU: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60088-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60088-8)
- Fulton, M.H., Key P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., Garric, J., 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere*, 71(3), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.048>

- Galic, N., Hawkins, T., Forbes, V.E., 2019.** Adverse impacts of hypoxia on aquatic invertebrates: A meta-analysis. *Sci. Tot. Environ.* 652, 736-743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.225>
- Galloway, T., Handy, R., 2003.** Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicol.* 12, 345-363. <https://doi.org/10.1023/A:1022579416322>
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002.** Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc. *Aquat. Toxicol.* 61, 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00051-6)
- Garate, O.F., Gazzaniga, S., Cochón, A.C., 2020.** A comparative study of enzymatic and immunological parameters in *Planorbarius corneus* and *Biomphalaria glabrata* exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 225, 105544. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105544>
- Giarratano, E., Trovant, B., Hernández-Moresino, R.D., 2024.** Asian clam *Corbicula fluminea* as potential biomonitor of microplastics and metal(oid)s in a Patagonian River. *Mar. Environ. Res.* 198, 106548. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2024.106548>
- Gibson, K.D., Neuberger, A., Scott, J.J., 1955.** The purification and properties of δ-aminolaevulic acid dehydrase. *Biochem. J.* 61(4), 618. <https://doi.org/10.1042%2Fbj0610618>
- Girones, L., Arias, A.H., Oliva, A.L., Recabarren-Villalon, T., Marcovecchio, J.E., 2020.** Occurrence and spatial distribution of organochlorine pesticides in the southwest Buenos Aires using the freshwater snail *Chilina parchappii* as environmental biomonitor. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 33, 100898. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100898>
- Google Earth.** <http://earth.google.com>
- Green, J.W., Springer, T.A., Holbech, H., 2018.** Statistical analysis of ecotoxicity studies. First ed. John Wiley & Sons, Hoboken, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119488798>
- Grinberg, S., Porzionato, N., Bussi, E., Mantiñan, L., Gutiérrez, R., Curutchet, G., 2018.** Agua y sedimentos: testigos clave de una contaminación anunciada. En: Agua + Humedales. San Martín: UNSAM Edita. <https://ri.unsam.edu.ar/handle/123456789/908>
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M., 1998.** Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned. *Biomark.* 3(2), 157-163. <https://doi.org/10.1080/135475098231318>
- Guiñazú, N., Vera, B., Jaureguiberry, M.S., Mestre Citronovitz, A.C., 2021.** Informe técnico-científico sobre los usos e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. 4, 41-89. ISBN 978-987-1560-86-8.
- Habib, M.R., Lv, S., Guo, Y.H., Gu, W.B., Standley, C.J., Caldeira, R.L., Zhou, X.N., 2018.** Morphological and molecular characterization of invasive *Biomphalaria straminea* in southern China. *Infec. Diseas. Pov.* 7(06), 10-23. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0505-5>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Kakoby, W.B., 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hasanuzzaman, M., Rahman, M.A., Islam, M.S., Salam, M.A., Nabi, M.R., 2018.** Pesticide residues analysis in water samples of Nagarpur and Saturia Upazila, Bangladesh. *Appl. Water Sci.* 8. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0655-4>
- Haszprunar, G., Wanninger, A., 2012.** Molluscs. *Curr. Biol.* 22, 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.039>
- He, C., Wang, C., Zhou, Y., Li, J., Zuo, Z., 2012.** Embryonic exposure to benzo(a)pyrene influences neural development and function in rockfish (*Sebastiscus marmoratus*). *Neurotoxicol.* 33(4), 758-762. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.002>
- Herbert, L.T., Castro, J.M., Bianchi, V.A., Cossi, P.F., Luquet, C.M., Kristoff, G., 2018.** Effects of azinphos-methyl on enzymatic activity and cellular immune response in the hemolymph of the freshwater snail *Chilina gibbosa*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 150, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.005>

- Herbert, L.T., Cossi, P.F., Painefilú, J.C., Mengoni Goñalons, C., Luquet, C.M., Kristoff, G., 2021.** Acute neurotoxicity evaluation of two anticholinesterasic insecticides, independently and in mixtures, and a neonicotinoid on a freshwater gastropod. Chemosphere, 265, 129107. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129107>
- Herbert, L., Cossi, P., Tejedor, M.J., Rabuffetti, G., Bianco, K., Raiger Lustman, L., Kristoff, G., 2019.** Ensayos ecotoxicológicos con agua de un arroyo de Buenos Aires, Argentina, en el gasterópodo *Biomphalaria straminea*. Encuentro de saberes para la gestión responsable de ecosistemas acuáticos pampeanos, Libro de resúmenes del X Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos (EMEAP), 345-348.
- Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., 2017.** Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. Arch. Toxicol. 91, 3211-3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- 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. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3984\\_Herrero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3984_Herrero)
- Herrero, A.C., Fresina, M., 2003.** Análisis de la presencia de *Escherichia coli* en la sección epiparaniana. Cuenca del arroyo Las Catonas, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Actas del Congreso Nacional de Hidrogeología. Rosario, Argentina.
- Hossain, M.A., Sarker, T.R., Sutradhar, L., Hussain, M., Iqbal, M.M., 2023.** Toxic effects of chlorpyrifos on the growth, hemocytes counts, and vital organ's histopathology of freshwater mussel, *Lamellidens marginalis*. J. King Saud University-Science, 35(2), 102482. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102482>
- Hou, Z.S., Wen, H.S., Li, J.F., He, F., Li, Y., Qi, X., 2020.** Environmental hypoxia causes growth retardation, osteoclast differentiation and calcium dyshomeostasis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sci. Tot. Environ. 705, 135272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135272>
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006.** Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. Aquat. Toxicol. 76, 69–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.008>
- Hyman, L.H., 1967.** The Invertebrates: Mollusca I. Vol VI. Mc-Graw-Hill: USA. 792
- Ibrahim, A.M., Hussein, A.A., 2022.** Toxicological impact of organophosphorus chlorpyrifos 48% EC pesticide on hemocytes, biochemical disruption, and molecular changes in *Biomphalaria alexandrina* snails. Pestic. Biochem. Physiol. 186, 105154. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105154>
- Informe del Medio Ambiente, 2017.** Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable
- Iturburu, F.G., Bertrand, L., Soursou, V., Scheibler, E.E., Calderon, G., Altamirano, J.C., Amé, M.V., Menone, M.L., Picó, Y., 2024.** Pesticides and PPCPs in aquatic ecosystems of the andean central region: Occurrence and ecological risk assessment in the Uco valley. J. Hazard. Mat. 465, 133274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133274>
- Iummato, M.M., Di Fiori, E., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., Ríos de Molina, M.D.C., Juárez, A.B., 2013.** Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 95, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.024>
- Iummato, M.M., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón A.C., Cataldo D., Ríos de Molina, M.D.C., Juárez, A.B., 2018.** Biochemical responses of the Golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate dietary. Ecotoxicol. Environ. Saf. 163, 69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.046>
- Jacques, M.T., Soares, M.V., Farina, M., Bornhorst, J., Schwerdtle, T., Ávila, D.S., 2023.** Impaired physiological responses and neurotoxicity induced by a chlorpyrifos-based formulation in *Caenorhabditis elegans* are not solely dependent on the active ingredient. Environ. Toxicol. Pharmacol. 101, 104196. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104196>

- Jerves-Cobo, R., Forio, M. A.E., Lock, K., Van Butsel, J., Pauta, G., Cisneros, F., Nopens, I., Goethals, P.L., 2020. Biological water quality in tropical rivers during dry and rainy seasons: A model-based analysis. Ecologic. Indicat. 108, 105769. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105769>
- Ji, Y., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, J., Wu, N., Zhang, H., 2020. Environmental behavior of and gastropod biomarker response to trace metals from a backwater area of Xian'nv lake. Ecotoxicol. Environ. Saf. 194, 110381. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110381>
- Jokanović, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicol. 166, 139-160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Jopp, F., 2006. Comparative studies on the dispersal of the Great Ramshorn (*Planorbarius corneus* L.): A modelling approach. Limnolog. 36, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2005.10.003>
- Kalyabina, V.P., Esimbekova, E.N., Kopylova, K.V., Kratsyuk, V.A., 2021. Pesticides: formulators, distribution pathways and effects on human health—a review. Toxicol. Rep. 8, 1179-1192. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>
- Katz, N., Araújo, N., Coelho, P.M.Z., Morel, C.M., Linde-Arias, A.R., Yamada, T., Horimatsu, Y., Suzuki, K., Sunazuka, T., Ōmura, S., 2017. Ivermectin efficacy against *Biomphalaria*, intermediate host snail vectors of Schistosomiasis. J. Antibiot. 70(5), 680-684. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.31>
- Kaur, R., Choudhary, D., Bali, S., Bandral, S.S., Singh, V., Ahmad, M.A., Rani, N., Singh, T.G., Chandrasekaran, B., 2024. Pesticides: An alarming detrimental to health and environment. Sci. Tot. Environ. 170113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170113>
- Kaur, R., Mavi, G.K., Raghav, S., Khan, I., 2019. Pesticides classification and its impact on environment. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 8(3), 1889-1897. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>
- Kim, Y., Mo, H.h., Son, J., Lee, Y.S., Lee, S.U., Cho, K., 2015. Interactive effects of water pH and hardness levels on the growth and reproduction of *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda). Hydrobiol. 753, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2199-z>
- Klimova, Y.S., Chuiko, G.M., Pesnya, D.S., Ivanova, E.S., 2020. Biomarkers of oxidative stress in freshwater bivalve mollusks (review). Inland Water Biol. 13, 674–683. <https://doi.org/10.1134/S1995082920060073>
- Kristoff, G., 2010. Estudio comparativo de biomarcadores en los invertebrados acuáticos *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus* expuestos a pesticidas de relevancia ambiental. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Kristoff, G., Barrionuevo, D.C., Cacciatore, L.C., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2012. In vivo studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: Analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. Aquat. Toxicol. 112, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.016>
- Kristoff, G., Cacciatore, L.C., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2011. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. Chemosphere, 84(5), 585-591. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.058>
- Kristoff, G., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. Aquat. Toxicol. 96(2), 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.001>
- Kristoff, G., Guerrero, N.V., de D'Angelo, A.M.P., Cochón, A.C. 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicol. 222(3), 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.02.018>
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2008. Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and

- Lumbriculus variegatus.* Chemosphere, 72(9), 1333-1339.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.026>
- Lebrun, J.D., El Kouch, S., Guenne, A., Tournebize, J., 2023. Screening potential toxicity of currently used herbicides in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* based on multi-level biomarker responses to field-realistic exposures. Environ. Poll. 320, 120985.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120985>
- Lei, K., Qiao, F., Liu, Q., Wei, Z., An, L., Qi, H., Ciu, S., LeBlanc, G.A., 2017. Preliminary evidence for snail deformation from a Eutrophic lake. Environ. Toxicol. Pharmacol. 53, 219-226.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.019>
- Li, Y.F., Cai, D.J., Singh, A., 1999. Historical DDT use trend in China and usage data gridding with 1/4° by 1/6° longitude/latitude resolution. Adv. Environ. Res. 2: 497–506.
- Li, Y.F., Cai, D.J., Shan, Z.J., Zhu, Z.L., 2001. Gridded usage inventories of technical Hexachlorocyclohexane and Lindane for China with 1/6° latitude by 1/4° longitude resolution. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 261–266. <https://doi.org/10.1007/s002440010247>
- Lombardi, P.E., Peri, S.I., Guerrero, N.R.V., 2010. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73(7), 1704-1711.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.005>
- Lombardo, R.J., O'Farrell, I., dos Santos Afonso, M., 2010. Spatial and temporal ion dynamics on a complex hydrological system: the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina). Aquat. Geochem. 16, 293-309. <https://doi.org/10.1007/s10498-009-9064-5>
- López-Durán, R.M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., Gómez-Olivares, J.L., 2018. La estructura y función de las colinesterasas: Blanco de los plaguicidas. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 34, 69-80. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp02.06>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Macchi, P., Loewy, R.M., Lares B., Latni L., Monza L., Guiñazú N., Montagna C.M., 2018. The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia, Argentina. Environ. Sci. Poll. Research 1-11.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1330-x>
- Mackay, D., Giesy, J.P., Solomon, K.R., 2014. Fate in the environment and long-range atmospheric transport of the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos and its oxon. Rev. Environ. Contam. Toxicol. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_3)
- Mac Loughlin, T.M., Peluso, M.L., Marino, D.J., 2022. Multiple pesticides occurrence, fate, and environmental risk assessment in a small horticultural stream of Argentina. Sci. Total Environ. 802, 225149893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149893>
- Majumder, R., 2023. Effects of chlorpyrifos on histopathological biomarkers of the freshwater teleost. Fisheries Aquat. Life, 31(4), 207-214. <https://doi.org/10.2478/aopf-2023-0020>
- Majumder, R., Kaviraj, A., 2017. Cypermethrin induced stress and changes in growth of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Int. Aquat. Res. 9, 117–128.  
<https://doi.org/10.1007/s40071-017-0161-6>
- Mali, H., Shah, C., Patel, D.H., Trivedi, U., Subramanian, R.B., 2022. Bio-catalytic system of metallohydrolases for remediation of neurotoxin organophosphates and applications with a future vision. J. Inorg. Biochem. 231, 111771. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111771>
- Maltby, L., Calow, P., 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems: past, present and future. Hydrobiol. 188/189, 65-76. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1896-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1896-2_5)
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks. Microsc. Res. Tech. 56: 358-392.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.10040>

- Marigomez, I., Saez, V., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990.** A planimetric study of the mean epithelial thickness (MET) of the molluscan digestive gland over the tidal cycle and under environmental stress conditions. *Helgolander Meeresun* 44, 81–94. <https://doi.org/10.1007/BF02365432>
- Marigomez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., Cajaraville, M.P., 2006.** Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (monitoring campaign 2003). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 287–304. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.09.026>.
- Marino, D., Ronco, A., 2005.** Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the pampa ondulada. *Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75 (4), 820–826. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0824-7>
- Marques, J.A., Abrantes, D.P., Marangoni, L.F., Bianchini, A., 2020.** Ecotoxicological responses of a reef calcifier exposed to copper, acidification and warming: A multiple biomarker approach. *Environm. Poll.* 257, 113572. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113572>
- Mates, J.M., 2000.** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.* 153(1), 83-104. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00306-1)
- Mauzerall, D., Granick, S., 1956.** The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219, 435-446. <https://www.bilirubin.co.uk/wp-content/uploads/2017/03/Mauzerall-and-Granick>
- Mercado-Garcia, D., Wyseure, G., Goethals, P., 2018.** Freshwater ecosystem services in mining regions: Modelling options for policy development support. *Water,* 10(4), 531. <https://doi.org/10.3390/w10040531>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini G.E., 2014.** Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed. Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/179691>
- Meyer, J.S., Davison, W., Sundby, B., Oris, J.T., Laurén, D.J., Förstner, U., Hong, J., Crosby, D.G., 2024.** Synopsis of discussion session: the effects of variable redox potentials, pH, and light on bioavailability in dynamic water-sediment environments. En: *Bioavailability*, 155-170. CRC Press. ISBN 9781003578895
- Ministerio de Gobierno, Provincia de Buenos Aires, 2025.** [www.gobierno.gba.gov.ar](http://www.gobierno.gba.gov.ar)
- Ministerio de Salud de La República Argentina, 2025.** <https://www.argentina.gob.ar/salud>
- Miraglia, M., 2005.** La historia ambiental y los sistemas complejos en el estudio de los procesos de construcción territorial en las cuencas hidrográficas. Casos de estudio en la provincia de Buenos Aires. *República Argentina. História Ambiental e Migrações*, 103.
- Montoya, J.C., Lopez, S.N., Salvagiotti, F., Mitidieri, M.S., Cid, R., Sasal, M.C., Martens, S.F., Carrancio, L., Aparicio, V.C., Acciaresi, H.A., Papa, J.C., Vigna, M.R., Volante, J.N., Irurueta, M., Trumper, E.V., 2023.** Los productos fitosanitarios en los sistemas productivos de la Argentina. Una mirada desde el INTA. INTA ediciones. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/15505>
- Mora, P., Fournier, D., Narbonne J.F., 1999.** Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122(3), 353-361. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10130-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10130-5)
- Moriarty, F., 1999.** Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems. 3rd ed. London, UK: Academic Press.
- Moura, K.R., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2004.** The functional organization of the salivary gland of *Biomphalaria straminea* (Gastropoda: Planorbidae): secretory mechanisms and enzymatic determinations. *J. Mollus. Stud.* 70(1), 21-29. <https://doi.org/10.1093/mollus/70.1.21>
- Müller, K., Magesan, G.N., Bolan, N.S., 2007.** A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 120 (2-4), 93-116. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.08.016>

- Nahabedian, D.E., 1992.** La estructura y formación de la cápsula de huevos de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Negro, C.L., Collins, P., 2017.** Histopathological effects of chlorpyrifos on the gills, hepatopancreas and gonads of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis*. Persistent effects after exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 140, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.030>
- Newman, M.C., 2014.** Fundamentals of Ecotoxicology. Sci. Poll. 4th. ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781439883129>
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987.** Biological markers in environmental health research. Environ. Health Persp. 74, 3-9.
- Noya Abad, T., Knack de Almeida, H., Minaberry, Y.S., Yusseppone, M.S., Calcagno, J.Á., Sabatini, S.E., 2024.** Effects of metals exposure on morphological and histological structure of the digestive gland in native and invasive clams in the Paraná de las Palmas River (Buenos Aires, Argentina). Aquat. Sci. 86(3), 75. <https://doi.org/10.1007/s00027-024-01087-6>
- OECD, 2010.** OECD Series on testing and assessment Nº 121. Detailed review paper (DRP) on molluscs life-cycle toxicity testing. Organization for Economic Cooperation and Development. [https://doi.org/ENV/JM/MONO\(2007\)10](https://doi.org/ENV/JM/MONO(2007)10)
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003.** Molluscs as bioindicators. En: Trace Metals and other Contaminants in the Environment. 6, 577-635. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)
- Oliveira-Filho, E.C., Filho, J.S., Novais, L.A., 2016.** Effects of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. Environ. Sci. Pollut. Res. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6998-1>
- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgartten, F.J., 2010.** Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere, 81(2), 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.038>
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgartten, F.J.R., 2009a.** Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.008>
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgartten, F.J.R., 2009b.** Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: A multigeneration study. Chemosphere, 75, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.085>
- Onwona Kwakye, M., Peng, F.J., Hoggarh, J.N., Van den Brink, P.J., 2021.** Linking macroinvertebrates and physicochemical parameters for water quality assessment in the lower basin of the Volta River in Ghana. Environ. Managem. 68(6), 928-936. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01535-1>
- Orozco, C., Pérez, A., Gonzalez, N., Rodriguez, F., Alfayate, J., 2003.** Contaminación Ambiental, una vista desde la química, Madrid. España: Editorial Paraninfo.
- Otegui, M.B.P., Fiori, S.M., Menchella, A.G., Dos Santos, E.P., Gimenez, J., 2024.** Histological characterization and morphological alterations in gill and digestive gland in non-native bivalve from the Province of Buenos Aires: spatial and seasonal evaluation. Zoologischer Anzeiger, 312, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2024.07.003>
- Otero, S., Kristoff, G., 2016.** In vitro and in vivo studies of cholinesterases and carboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: Finding the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. Aquat. Toxicol. 180, 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.002>
- Otieno, P.O., Schramm, K.W., Pfister, G., Lalah, J.O., Ojwach, S.O., Virani, M., 2012.** Spatial distribution and temporal trend in concentration of carbofuran, diazinon and chlorpyrifos ethyl residues in sediment and water in Lake Naivasha, Kenya. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 88, 526-532. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0529-7>

- Paithane, K.T., Sonawane, D.L., Bandare, R.Y., More, P.R., 2012. Histopathological changes due to induced dimethoate in the liver of freshwater fish *Channa punctatus* from river shivana, Aurangabad (MS) India. The ecoscan, an international quarterly. J. Environ. Sci. 1, 213-217. ISSN: 0974-0376
- Paredes, M.G., Bianco, K.A., Menéndez-Helman, R.J., Kristoff, G., 2022. Aquatic contamination in Lugano Lake (Lugano Lake Ecological Reserve, Buenos Aires, Argentina) causes negative effects on the reproduction and juvenile survival of the native gastropod *Biomphalaria straminea*. Front. Physiol. 13:954868. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.954868>
- Paredes, M.G., Martini, C., Bianco, K., Vojnov, A., Menéndez Helman, R.J., Kristoff, G., 2024. Comparación fisicoquímica y ecotoxicológica de dos lagos urbanos de la cuenca baja Matanza-Riachuelo. Libro de resúmenes del IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Aún no publicado.
- Paskerová, H., Hilscherová, K., Bláha, L., 2012. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. Environ. Sci. Poll. Res. 19, 2024-2037. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0960-7>
- Pechen, A.M., Venturino, A., 2021a. Informe técnico-científico sobre los usos e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. 1, 11-13. ISBN 978-987-1560-86-8.
- Pechen, A.M., Venturino, A., 2021b. Informe técnico-científico sobre los usos e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. 7, 213-227. ISBN 978-987-1560-86-8.
- Pretty, J., Bharucha, Z.P., 2015. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. Insects, 6, 152-182. <https://doi.org/10.3390/insects6010152>
- Primavesi, A., 2002. Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais. Segunda edición. Editorial Nobel, São Paulo. ISBN 85-213-0004-2
- Programa de Mejora de la Calidad Ambiental del Recurso Hídrico (ProMeCARH). Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. <https://www.minfra.gba.gob.ar/web/Promecarh/promecarh>
- Quintana, M.M., Indaco, M., 2021. Informe técnico-científico sobre los usos e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. 3, 29-40. ISBN 978-987-1560-86-8.
- Rabuffetti, G., 2021. Toxicidad del glifosato principio activo y de la formulación comercial Round Up en el gasterópodo acuático *Biomphalaria straminea*: letalidad, parámetros comportamentales y bioquímicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Rahman, H.U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M.A., Ahmed, A., Khalid, N., 2021. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. Sci. Tot. Environ. 755, 142649. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitoring of trace metals. Mar. Poll. Bull. 26: 593-603. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90497-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90497-8)
- Raiger Lustman, L.J., Almasqué, F.J., Vullo, D.L., 2021. Microbiota diversity change as quality indicator of soils exposed to intensive periurban agriculture. Curr. Microbiol. 78(1), 338-346. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02298-4>
- Randall, C., Hock, W., Crow, E., Hudak-Wise, C., Kasai, J., 2008. National Pesticide Applicator Certification Core Manual. Washington, DC: National Association of State Departments of Agriculture Research Foundation.
- Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B., Ramesh, M., 2018. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. Chemosphere, 213, 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.013>
- Ravi, R., Athisuyambulingam, M., Kanagaraj, S., Tresnakova, N., Impellitteri, F., Viswambaran, G., Faggio, C., 2023. Impact of chlorpyrifos on cytopathological indices in mangrove crab,

- Episесarma tetragonum* (Fabricius). Veterinary Sci. 10(1), 53.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci10010053>
- Ribeiro, R.X., da Silva Brito, R., Pereira, A.C., Gonçalves, B.B., Rocha, T.L., 2020. Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. Sci. Tot. Environ. 735, 139036. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139036>
- Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. Aquat. Toxicol. 67, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.004>
- Rigacci, L.N., 2019. Análisis de la capacidad de depuración de la represa Ing. Roggero, Buenos Aires (Argentina). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Comahue. <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncomaid/16116>
- Rivadeneira, P.R., Agrelo, M., Kristoff, G., 2015. Acute exposure of the freshwater snail *planorbarius corneus* to an environmental concentration of chlorpyrifos: recovery studies of enzyme activities in gonads and effects on reproduction. En: Caitlin Mayes(Ed), Chlorpyrifos. Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-63482-111-7
- Rivadeneira, P., Agrelo, M., Otero, S., Kristoff, G., 2013. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. Ecotoxicol. Environ. Saf. 90, 82e88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.013>
- Rocha, J.B.T., Saraiva, R.A., Garcia, S.C., Gravina, F.S., Nogueira, C.W., 2012. Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. Toxicol. Res. 1(2), 85–102. <https://doi.org/10.1039/c2tx20014g>
- Rocha, L., Hegoburu, C., Torremorell, A., Feijoó, C., Navarro, E., Fernández, H.R., 2020. Use of ecosystem health indicators for assessing anthropogenic impacts on freshwaters in Argentina: a review. Environ. Monit. Assess. 192, 611. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08559-w>
- Rosales-Pérez, K.E., SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Orozco-Hernández, J.M., Elizalde-Velázquez, G.A., García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Santillán-Benítez, J.G., 2024. Molecular insights: zebrafish embryo damage linked to hospital effluent. Environ. Sci. Poll. Res. 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35533-7>
- Ruggerio, C.A., 2005. Análisis del impacto de la actividad industrial sobre el recurso hídrico: cuenca del arroyo Las Catonas: Región Metropolitana de Buenos Aires. Tesis de licenciatura en ecología urbana. Universidad Nacional de General Sarmiento. [http://observatorioconurbano.ungs.edu.ar/wp-content/uploads/documentos/2005\\_Carlos%20Ruggerio.pdf](http://observatorioconurbano.ungs.edu.ar/wp-content/uploads/documentos/2005_Carlos%20Ruggerio.pdf)
- Rumi, A., Gutiérrez Gregoric, D.E., Núñez, V., Darrigan, G.A., 2008. Malacología Latinoamericana: Moluscos de agua dulce de Argentina. Rev. Biol. Trop. 56(1), 77-111. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442008000100006&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442008000100006&script=sci_arttext)
- Salice, C.J., Roesijadi, G., 2002. Resistance to cadmium and parasite infection are inversely related in two strains of a freshwater gastropod. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1398–1403. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210710>
- Sanchez-Hernandez, J., 2007. Ecotoxicological perspectives of b-esterases in the assessment of pesticide contamination. En: Plattenberg, R.H. (Ed.), Environmental Pollution: New Research. Nova Science Publishers, Inc. 1-45. ISBN: 1-60021-285-9.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Wheelock, C.E., 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Environ. Poll. 157, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.041>
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Borja, R.P.P., Luja-Mondragón, M., Orozco-Hernández, J.M., Heredia-García, G., Islas-Flores, H., Galar-Martínez, M., Escobar-Huérfano, F., 2020. Survival and malformation rate in oocytes and larvae of *Cyprinus carpio* by exposure to an industrial effluent. Environ. Res. 182, 108992. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108992>

- Sanz Lanzas, C., 2017. Efecto de nanoplásticos de poliestireno carboxílicos sobre algunos aspectos fisiológicos y bioquímicos en *Artemia parthenogenetica*. Trabajo fin de Máster. Universitat de València, España. <http://hdl.handle.net/10261/191836>
- Sawasdee, B., Köhler, H.R., 2009. Embriotoxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). Chemosphere, 75(11), 1539-1547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.085>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 2020. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 2021. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-414-2021-352683>
- Sharpe, R.T., Livesey, C.T., Davies, I.H., Jones, J.R., Jones, A., 2006. Diazinon toxicity in sheep and cattle arising from the misuse of unlicensed and out-of-date products. Vet. Rec. 159(1), 16-19. <https://doi.org/10.1136/vr.159.1.16>
- Sharma, R., Kumar, R., Satapathy, S.C., Al-Ansari, N., Singh, K.K., Mahapatra, R.P., Agarwal, A.K., Le, H.V., Pham, B.T., 2020. Analysis of water pollution using different physicochemical parameters: A study of Yamuna River. Front. Environ. Sci. 8, 581591. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.581591>
- Schmuck, R., Pflüger, W., Grau, R., Hollihn, U., Fischer, R., 1994. Comparison of short-term aquatic toxicity: formulation vs active ingredients of pesticides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 240-250. <https://doi.org/10.1007/BF00224811>
- Silva, H.A.M.F., Siqueira, W.N., Sá, J.L.F., Silva, L.R.S., Martins, M.C.B., Aires, A.L., Amâncio,F.F., Pereira, E.C., Albuquerque, M.C.P.A., Melo, A.M.M.A., Silva, N.H., 2018. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop. 178, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.019>
- Singh, B., 2014. Review on microbial carboxylesterase: general properties and role in organophosphate pesticides degradation. Biochem. Mol. Biol. 2, 1-6. <http://dx.doi.org/10.12966/bmb.03.01.2014>
- Siregar, P., Suryanto, M.E., Chen, K.H.C., Huang, J.C., Chen, H.M., Kurnia, K.A., Santoso, F., Hussain, A., Hieu, B.T.N., Saputra, F., Audira, G., Roldan., M.J., Fernandez, R.A., Macabeo, A.P.G., Lai, H.T., Hsiao, C. D., 2021. Exploiting the freshwater shrimp *Neocaridina denticulata* as aquatic invertebrate model to evaluate non targeted pesticide induced toxicity by investigating physiologic and biochemical parameters. Antioxidants, 10(3), 391. <https://doi.org/10.3390/antiox10030391>
- Smirthwaite, J.J., 2008. Developmental sequences in freshwater pulmonate gastropods. Tesis. University of Plymouth. <https://doi.org/10.24382/3607>
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environ. Poll. 100(1-3), 179-196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)
- Solé, M., Sanchez-Hernandez, J.C., 2018. Elucidating the importance of mussel carboxylesterase activity as exposure biomarker of environmental contaminants of current concern: An *in vitro* study. Ecol. Indic. 85, 432-439. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.046>
- Song, Y.Q., Jin, Q., Wang, D.D., Hou, J., Zou, L.W., Ge, G.B., 2021. Carboxylesterase inhibitors from clinically available medicines and their impact on drug metabolism. Chemico-Biolog. Interact. 345, 109566. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109566>
- Soto-Mancera, F., Arellano, J.M., Albendín, M.G., 2020. Carboxylesterase in *Sparus aurata*: Characterisation and sensitivity to organophosphorus pesticides and pharmaceutical products. Ecolog. Indicat. 109, 105603. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105603>
- Sotomayor V, Chiriotto TS, Pechen AM, Venturino A. 2015. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate

- chlorpyrifos. Pestic. Biochem. Physiol. 119, 48–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.006>
- Souza da Silva, R., de Paula Cognato, G., Vuaden, F.C., Rezende, M.F.S., Thiesen, F.V., da Graça Fauth, M., Dias, R.D., 2003. Different sensitivity of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 135(2), 215-220. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00109-1)
- Spence, A., Simpson, A.J., McNally, D.J., Moran, B.W., Mc-Caul, M.V., Hart, K., Paull, B. Kelleher, B.P., 2011. The degradation characteristics of microbial biomass in soil. Geochimica et Cosmochimical Acta 75, 2571-2581. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.03.012>
- Steffens, C., Steffens, J., Marcia Graboski, A., Manzoli, A., Lima Leite, F., 2017. Nanosensors for detection of pesticides in water. New Pestic. Soil Sensors, 595-635. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00017-5>
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos. Buenos Aires, Argentina. <https://www.mininterior.gov.ar/obras-publicas/pdf/DOCUMENTO35.pdf>
- Summers, E.J., Ryder, J.L., 2023. A critical review of operational strategies for the management of harmful algal blooms (HABs) in inland reservoirs. J. Environ. Manag. 330, 117141. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117141>
- Swann, J.M., Schultz, T.W., Kennedy, J.R., 1996. The effects of the organophosphorus insecticides Dursban and Lorsban on the ciliated epithelium of the frog palate *in vitro*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30, 188-194. <https://doi.org/10.1007/BF00215797>
- Tallarico, L.F., Borrely, S.I., Hamada, N., Grazeffe, V.S., Ohlweiler, F.P., Okazaki, K., Granatelli, A.T., Pereira, I.W., Pereira, C.A.B., Nakano, E., 2014. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. Ecotoxicol. Environ. Saf. 110, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.005>
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., Hodgson, E., 2001. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. Drug Metab. Dispos. 29: 1201-1204. <https://dmd.aspetjournals.org/content/29/9/1201.short>
- Tejedor, M.J., 2019. Efectos tóxicos sobre distintos biomarcadores en *Chilina gibbosa* y *Biomphalaria straminea* expuestos al insecticida organofosforado clorpirifos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de San Martín.
- Tejedor, M.J., Kristoff, G., 2020. Efectos tóxicos sobre biomarcadores por exposición a clorpirifos. Editorial Académica Española. <https://eldar.ch/efectos-toxicos-sobre-biomarcadores-por-exposicion-a-clorpirifos-978-620-0-42716-8-7N5G3YE>
- Thullberg, M.D., 2006. Genomic analysis of human neuroblastoma cells in response to paraoxon exposure. Tesis de maestría. Universidad de Montana, EE.UU., Missoula. <https://scholarworks.umt.edu/etd/8210>
- Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol. Environ. Saf. 1 (2) 151-173. ISSN 0147-6513. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)
- Torres, M., Pozo, K., Días, V., 2021. Influencia de la degradación del clorpirifos en la detección analítica utilizando biosensores: revisión del estado actual y aspectos futuros. Entre Ciencia e Ingeniería 15(30): 9-21. <https://doi.org/10.31908/19098367.2102>
- Tostado, L., Bollmohr, S., 2023. Atlas de los pesticidas: hechos y cifras sobre químicos tóxicos en nuestra agricultura. Fundación Heinrich Böll, Berlín, Alemania. ISBN: 978-9-46400747-3. <https://www.tierra.org//wp-content/uploads/2023/04/Atlas-pesticidas-Amigos-Tierra.pdf>
- Townsend, C.R., 1974. The chemoreceptor sites involved in food-finding by the freshwater pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata* (Say), with particular reference to the function of the tentacles. Behavioral Biol. 11.4, 511-523. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(74\)90830-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(74)90830-X)

- Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369-7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- Tuomainen, U., Candolin, U., 2011. Behavioral responses to human-induced environmental change. *Biologic. Rev.* 86(3), 640-657. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00164.x>
- Usheva, L.N., Vaschenko, M.A., Durkina, V.B., 2006. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ. J. Marin. Biol.* 32(3): 166-172. <https://doi.org/10.1134/S1063074006030047>
- Ustaoğlu, F., Taş, B., Tepe, Y., Topaldemir, H., 2021. Comprehensive assessment of water quality and associated health risk by using physicochemical quality indices and multivariate analysis in Terme River, Turkey. *Environ. Sci. Poll. Res.* 28(44), 62736-62754. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15135-3>
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vannuci-Silva, M., Kohler, S., Umbuzeiro, G.D.A., Ford, A.T., 2019. Behavioural effects on marine amphipods exposed to silver ions and silver nanoparticles. *Environ. Poll.* 252, 1051-1058. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.005>
- Van Toan, P., Sebesvari, Z., Bläsing, M., Rosendahl, I., Renaud, F.G., 2013. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam. *Sci. Tot. Environ.* 452, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.026>
- Varò, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 75, 61-72. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00019-1)
- Vega, M.M., Marigomez, J.A., Angulo, E., 1989. Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.* 103, 547-553. <https://doi.org/10.1007/BF00399587>
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., de D'Angelo, A.M.P., 2001. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 130(2), 191-198. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00241-1)
- Vera-Ardila, M.L., Linares, E.L., 2005. Gastrópodos de la región subxerofítica de La Herrera, Mosquera, Cundinamarca, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 29(112), 439-456. [https://doi.org/10.18257/raccefyn.29\(112\).2005.2178](https://doi.org/10.18257/raccefyn.29(112).2005.2178)
- Vignale, F.A., Bernal Rey, D., Pardo, A.M., Almasqué, F.J., Ibarra, J.G., Fernández Do Porto, D., Turjanski, A.G., López, N.I., Menéndez-Helman, R.J., Raiger Iustamn, L.J., 2022. Spatial and seasonal variations in the bacterial community of an anthropogenic impacted urban stream. *Microb. Ecol.* 85:862-874. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02055-z>
- Villarreal-Reyes, C., de León-Martínez, L.D., Flores-Ramírez, R., González-Lara, F., Villarreal-Lucio, S., Vargas-Berrones, K.X., 2022. Ecotoxicological impacts caused by high demand surfactants in Latin America and a technological and innovative perspective for their substitution. *Sci. Tot. Environ.* 816, 151661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151661>
- Vudamala, K., Chakraborty, P., Chatragadda, R., Tiwari, A.K., Qureshi, A., 2023. Distribution of organochlorine pesticides in surface and deep waters of the Southern Indian Ocean and coastal Antarctic waters. *Environ. Pollut.* 321, 121206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121206>
- Wang, T., Marle, P., Slaveykova, V.I., Schirmer, K., Liu, W., 2022. Comparative study of the sensitivity of two freshwater gastropods, *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus*, to silver nanoparticles: bioaccumulation and toxicity. *Environ. Poll.* 312, 119999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119999>
- Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, 746 L., Wang, J., 2016. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 144, 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.004>

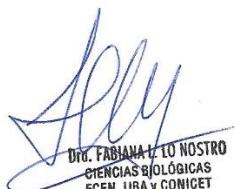
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). Rev. Environ. Contam. Toxicol. 195(11).  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-0-387-77030-7.pdf#page=123>
- WHO (World Health Organization), 2024. Chlorpyrifos in drinking water. 2004.  
[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/chlorpyrifos](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chlorpyrifos)
- Wu, C., Zhang, A., Liu, W., 2013. Risks from sediments contaminated with organochlorine pesticides in Hangzhou, China. Chemosphere, 90(9), 2341-2346.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.023>
- Wu, J.P., Li, M.H., 2015. Inhibitory effects of pain relief drugs on neurological enzymes: implications on their potential neurotoxicity to aquatic animals. Environ. Toxicol. Pharmacol. 39(2), 898-905. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.022>
- Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., Georgieva, E., 2016. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. Appl. Ecol. Environ. Res. 14(1), 47-75. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401\\_047075](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401_047075)
- Yang, Y., Cheng, W., Wu, X., Huang, S., Deng, Z., Zeng, X., Yuan, D., Yang, Y., Wu, Z., Chen, Y., Zhou, Y., Jiang, Q., 2018. Prediction of the potential global distribution for *Biomphalaria straminea*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. PLoS. Negl. Trop. Dis. 12(5): 0006548.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006548>
- Yin, X.W., Niu, C.J., 2008. Effect of pH on survival, reproduction, egg viability and growth rate of five closely related rotifer species. Aquat. Ecol. 42, 607–616. <https://doi.org/10.1007/s10452-007-9136-9>
- Yipp, W., 1983. The ecology of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (gastropoda: Pulmonata) introduced into Hong Kong. Tesis Doctoral. University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong. [http://refhub.elsevier.com/S0147-6513\(20\)30087-7/sref84](http://refhub.elsevier.com/S0147-6513(20)30087-7/sref84)
- Zhao, S., Zhao, Y., Cui, Z., Zhang, H., Zhang, J., 2024. Effect of pH, temperature, and salinity levels on heavy metal fraction in lake sediments. Toxics, 12(7), 494.  
<https://doi.org/10.3390/toxics12070494>



Lic. Karina A. Bianco



Dra. Gisela Kristoff



DRA. FABIANA LO NOSTRO  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FCEN, UBA Y CONICET