

EVALUACIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN AMBIENTE ACUÁTICO CONTAMINADO, SU ACUMULACIÓN EN BIOTA Y APLICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA SU DETECCIÓN

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Bioq. ROCÍO INÉS BONANSEA



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Dto. Bioquímica Clínica - CIBICI
2015

Director de Tesis:
Dra. María Valeria Amé

Comisión de Tesis:
Dr. Daniel A. Wunderlin
Dra. Elba I. Buján
Dr. Gustavo A. Rivas

Evaluador Externo:
María del Carmen Ríos
de Molina

A mi mamá, Cristina, por empujarme
A mi papá, Jorge, por apoyarme

Agradecimientos

A mi directora, Vale, por su gran compromiso en esta tesis, por las miles explicaciones, por enfrentarme a nuevos desafíos, por organizarme las ideas y sobre todas las cosas por enseñarme a confiar en mí.

A Daniel, por transmitirme las ganas de probar con los equipos y que de vos aprendí a no tenerles miedo.

A mis amigas del doctorado, Euge, Mari y Lid por apoyarme en todo momento, reírse y llorar conmigo. Porque con su sinceridad me hicieron mejor persona y me enseñaron a compartir.

A todos mis compañeros de trabajo con quienes compartí el día a día durante estos años, con mates, charlas, risas, enojos y consejos. A Santi, Naty y Lucas por compartir este camino y hacerme sentir que no estaba sola. A Magda, Vero, Turco y Romi por estar siempre dispuestos a ayudarme. A Chani por bancarme como su “tutora”. A Juli por acompañarme a divertirnos en la semana de la ciencia. A Ger y a mi amiga la brasilera, Iara.

A mi gran familia por estar siempre. A mis hermanos Maricel, Eber, Erica y Agustín por entenderme y valorar mis decisiones. A mis sobrinas y sobrinos. A mi nona Cata.

Al grupo de La Plata por hacerme sentir una más entre ustedes, en especial a Damián por sus aportes salvadores en la parte de analítica.

A la gente de biología por compartir su conocimiento y seguir apostando a los trabajos interdisciplinarios, Laurita, Alejo, Mari, Andre, Noe y Ange.

A las personas de CEQUIMAP por permitirme más de una vez utilizar sus equipos.

A mis amigas de toda la vida, por los viajesitos y las juntadas, que me hacían olvidar las preocupaciones de la tesis.

Y a todas las personas que me acompañaron en este camino.

Publicaciones originadas en esta tesis

- “Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina)”. Bonansea, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. *Chemosphere* 90, 1860–1869.
- “Glyphosate and AMPA distribution in Suquía river basin: an ecotoxicological risk assessment”. Bonansea, R.I., Filippi, I., Wunderlin, D.A., Marino D.J.G., Amé, M.V. 2015. Enviado.

Publicaciones de trabajos en colaboración aplicando herramientas originadas en esta tesis

- “Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina)”. Monferrán, M.V.; Galanti, L.N.; Bonansea, R.I.; Amé, M.V.; Wunderlin, D.A., 2011. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 398–409.
- “Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina)”. Maggioni, T.; Hued, A.C.; Monferrán, M.V.; Bonansea, R.I.; Galanti, L.N.; Amé, M.V., 2012. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 337-353.
- “Oxidative stress response induced by Atrazine in *Palaemonetes argentinus*: the protective effect of Vitamin E”. Griboff, J.; Morales, D.; Bertrand, L.; Bonansea, R. I.; Monferrán, M.V.; Asis, R.; Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2014. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 1-8.
- “A multilevel approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle – lower basin of Suquía River”. Rautenberg, G.E.; Amé, M.V.; Monferrán, M.V.; Bonansea, R.I.; Hued, A.C., 2014. *Ecological Indicators* 48, 706-720.

Distinciones y premios

- **“Evaluar la presencia de pesticidas de uso frecuente en distintos compartimentos del hábitat acuático en la cuenca del Río Suquía (Córdoba - ARGENTINA).”**
Bonansea, R.I. y Amé M.V. XX Jornada de jóvenes investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM) La ciudadanía y el desarrollo social. Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, Brasil. Octubre 2012.
- **“Interference of pesticides with Brain Aromatase Expression of a native fish (*Jenynsia multidentata*).** Bonansea, R.I., Guyón, N.F., Wunderlin D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V. 3rd Young environmental scientists meeting Krakow. Polonia, febrero 2013.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
Aspectos generales de la contaminación ambiental con plaguicidas	10
Contaminación ambiental en aguas naturales de la provincia de Córdoba	13
Evaluación de toxicidad de contaminantes ambientales sobre la biota autóctona	16
Objetivos e hipótesis.....	19
CAPÍTULO 1: Evaluación de plaguicidas en agua y sedimentos de la cuenca de río Suquía	20
1.1 ANTECEDENTES	21
1.1.1 Cuenca del río Suquía.....	21
1.1.2 Plaguicidas de uso actual y su medición en muestras ambientales	23
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.2.1 Recolección y conservación de muestras	29
1.2.2 Análisis físico-químico de aguas y sedimentos	31
1.2.3 Desarrollo del método combinado SPE + SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales.....	31
1.2.4 Desarrollo del método HS-SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en sedimentos.....	33
1.2.5 Desarrollo del método GC-MS para la determinación y cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares	34
1.2.6 Extracción y derivatización de glifosato y AMPA en muestras de agua, sedimentos y material particulado en suspensión.....	35
1.2.7 Identificación y cuantificación de glifosato y AMPA.....	35
1.2.8 Análisis de datos.....	36
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
1.3.1 Análisis físico-químico de aguas y sedimentos	38
1.3.2 Método combinado SPE + SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales	39
1.3.3 Método optimizado para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en sedimentos.....	46
1.3.4 Método GC-MS para la cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares	49
1.3.5 Distribución de plaguicidas en aguas, material particulado en suspensión y sedimentos de río Suquía	51

1.4 CONCLUSIONES PARCIALES.....	60
CAPÍTULO 2: Acumulación y efecto tóxico de cipermetrina y clorpirifós en el pez <i>Jenynsia multidentata</i>	61
2.1 ANTECEDENTES	62
2.1.1 Cipermetrina y clorpirifós: aspectos generales.....	62
2.1.2 Mecanismos de acción de cipermetrina y clorpirifós sobre organismos blanco y efectos sobre organismos no blanco	65
2.1.3 Vías de exposición y biotransformación de cipermetrina y clorpirifós en peces	66
2.1.4 <i>Jenynsia multidentata</i> como especie bioindicadora de la contaminación con plaguicidas	71
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
2.2.1 Bioensayo	78
2.2.2 Biomarcadores de exposición: acumulación.....	81
2.2.3 Biomarcadores de efecto: enzimas antioxidantes, biotransformación de Fase II y colinesterasas.....	83
2.2.4 Biomarcadores de efecto: daño oxidativo	85
2.2.5 Biomarcadores de efecto: enzimas de biotransformación y disrupción endócrina	87
2.2.6 Biomarcadores de efecto: comportamiento natatorio.....	88
2.2.7 Análisis de datos.....	89
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
2.3.1 Estabilidad de los compuestos en el agua de ensayo	91
2.3.2 Acumulación y biotransformación	91
2.3.3 Colinesterasas (AChE y BChE).....	102
2.3.4 Estrés oxidativo	106
2.3.5 Comportamiento natatorio.....	112
2.3.6 Disrupción endócrina	120
2.3.7 Evaluación integrada de biomarcadores de efecto y exposición.....	123
2.4 CONCLUSIONES PARCIALES.....	128
CONCLUSIONES FINALES	131
BIBLIOGRAFÍA.....	136

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ASE	Extracción acelerada de solventes (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
BCF	Factor de bioconcentración (<i>Bioconcentration Factor</i>)
BChE	Butirilcolinesterasa
CAR	Carboxeno
ChE	Colinesterasas
CL₅₀	Concentración letal 50 %
CM	Villa Corazón de María
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
CPFO	Clorpirifós-oxón
CYP	Citocromo P450
CYP1A	Citocromo P450 1A
DEP	Dietilfosfato
DETP	Dietiltiofosfato
DL₅₀	Dosis letal 50 %
DVB	Divinilbenceno
ECD	Detección de captura electrónica (<i>Electron Capture Detector</i>)
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
ESI	Ionización de electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FL	Fluorescencia
FMOc	9-Fluorenilmetilcloroformato
GC	Cromatografía Gaseosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-ECD	Cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas
GLY*	Estándar isotópico de glifosato
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
GSTc	Glutación S-transferasa citosólica
GSTm	Glutación S-transferasa microsomal
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detección de masas (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	Espacio de cabeza (<i>Head Space</i>)
LC	La Calera
LD	Límite de detección
LogK_{ow}	Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua
LP	La Para
LPME	Microextracción en fase líquida (<i>Liquid Phase Microextraction</i>)
LPO	Peroxidación lipídica
LQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MDA	Malondialdehído
MPS	Material particulado en suspensión
MS	Espectrometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)

MXR	Sistema de Resistencia a Multixenobióticos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPD	Detección de nitrógeno y fósforo (<i>Nitrogen Phosphorous Detector</i>)
OCs	Organoclorados
PA	Poliacrilamida
PCB	Bifenilopoliclorado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	Polidimetilsiloxano
P-gp	P-Glicoproteína
PLE	Extracción con líquido a baja presión (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PCO	Proteínas carboniladas – Proteínas oxidadas
RIB	Respuesta integrada de biomarcadores
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
RP	Río Primero
RT	Transcripción reversa
SIM	Monitoreo de ión simple (<i>Single Ion Monitoring</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SR	Santa Rosa
TBARs	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCP	Tricloropiridinol
UDPGT	Uridin difosfoglucuroniltransferasa
UPLC-Q-TOF	Cromatografía líquida de ultra alta performance en tándem con detección de espectrometría de masas de alta resolución (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry using a quadrupole time-of-flight detector</i>)
USE	Extracción con solvente y ultrasonido (<i>Ultrasonic Solvent Extraction</i>)
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La importancia de la agricultura en nuestro país ha llevado a un aumento de la cantidad y variedad de químicos de uso agronómico, siendo los ecosistemas acuáticos los principales receptores de estos compuestos. El objetivo de esta tesis fue evaluar la contaminación con plaguicidas de uso frecuente en distintos compartimentos abióticos del hábitat acuático en la cuenca del río Suquía y realizar un análisis integral del efecto y acumulación de dos de los plaguicidas presentes en la cuenca considerados de mayor riesgo para la biota: cipermetrina y clorpirifós en la especie ictícola autóctona *Jenynsia multidentata*.

Para el monitoreo temporal y espacial en la cuenca de río Suquía, fueron seleccionados los plaguicidas más utilizados: atrazina, acetoclor, clorpirifós, alfa-endosulfán, beta-endosulfán, alfa-cipermetrina y glifosato. También se incluyeron dos productos de degradación como endosulfán sulfato, metabolito de endosulfán, y ácido aminometilfosfónico (AMPA), producto de degradación de glifosato. Las muestras se recolectaron en 5 sitios ubicados a lo largo del río Suquía con variado uso del suelo: La Calera, Villa Corazón de María, Río Primero, Santa Rosa de Río Primero y La Para. Los muestreos fueron realizados en períodos de baja y alta aplicación cubriendo la campaña agrícola 2010-2011.

Para la determinación de plaguicidas apolares y semi-polares (atrazina, acetoclor, clorpirifós, alfa-endosulfán, beta-endosulfán, cipermetrina y el producto de degradación de endosulfán, endosulfán sulfato) en muestras de aguas naturales y sedimentos fue necesaria la optimización de la extracción y cuantificación. Para la extracción en muestras de aguas naturales se desarrolló una metodología combinada a partir de dos métodos consecutivos: extracción en fase sólida y microextracción en fase sólida. Para la extracción en sedimentos se ajustó una metodología de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza. La cuantificación de estos analitos se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, para lo cual fue necesaria la optimización de la separación y detección.

La determinación de glifosato y AMPA se realizó en muestras de agua, sedimentos y material particulado en suspensión. Las muestras de agua fueron derivatizadas sin previa extracción, a diferencia de las muestras de sedimentos y material particulado en

suspensión que debieron someterse a una extracción y posterior derivatización. La cuantificación se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

De un total de 140 muestras analizadas el 47 % resultaron positivas. Además, al menos un plaguicida fue cuantificado en todos los sitios de monitoreo. Estos resultados muestran la amplia distribución de plaguicidas en la cuenca del río Suquía, denotando la alta probabilidad de ser encontrados en los distintos compartimentos abióticos de este recurso hídrico. Por otro lado, no se observaron variaciones temporales en relación a las épocas de baja y alta aplicación. Las mayores concentraciones de plaguicidas fueron encontradas en Villa Corazón de María donde se deduce que la contaminación podría provenir de dos fuentes: por su utilización en el cinturón verde y por uso urbano en la ciudad de Córdoba. Glifosato exhibió las mayores concentraciones en todas las matrices evaluadas, mientras que endosulfán, clorpirifós y cipermetrina presentaron valores en agua que sobrepasan los límites establecidos para protección de la biota acuática.

Por medio de bioensayos se evaluó la acumulación y efecto de concentraciones subletales de cipermetrina y clorpirifós en forma individual, mezcla de productos puros y comerciales en hembras de *J. multidentata*. Se determinó la presencia de cipermetrina y clorpirifós acumulados en distintos órganos de los peces expuestos, evidenciando las mayores concentraciones en los órganos de ingreso del contaminante (intestino y branquias) y en el principal órgano de detoxificación (hígado). Además, en músculo se cuantificaron las menores concentraciones mientras que en cerebro y gónadas los niveles fueron siempre menores al límite de detección del método utilizado.

La acumulación cuantificada en peces expuestos a mezclas fue mayor que la observada en peces expuestos a los compuestos de forma individual. Además, la mezcla técnica mostró un patrón de acumulación diferente a la mezcla comercial, siendo mayores las concentraciones acumuladas en este último tratamiento.

La toxicidad de estos insecticidas se determinó a partir de biomarcadores de efecto a distintos niveles de organización. A nivel bioquímico se determinaron respuestas del sistema de biotransformación como la expresión de citocromo P4501A, expresión de P-glicoproteína y actividad de Glutación S-transferasa, pudiendo asociarse estas respuestas con la acumulación observada. Las enzimas colinesterasas (acetilcolinesterasas y butirilcolinesterasas), fueron evaluadas en cerebro y músculo de *J. multidentata*,

observándose cambios en su respuesta tanto a la exposición con clorpirifós, asociada a su mecanismo de acción, como a cipermetrina. Las respuestas indicativas de estrés oxidativo fueron evaluadas por la medición de la actividad de enzimas antioxidantes (Catalasa, Glutación peroxidasa y Glutación reductasa) y la generación de daño oxidativo (niveles de lípidos peroxidados y proteínas carboniladas). Se observó daño oxidativo en los peces expuestos clorpirifós y a las mezclas de compuestos puros y comerciales. A nivel de individuo se determinaron cambios en el comportamiento natatorio de los peces a 24 y 96 h de exposición a dos niveles de concentración mediante la filmación de los individuos, seguido por el procesamiento con un software específico. Finalmente, se evaluó la posibilidad de que estos insecticidas provoquen disrupción endócrina, interfiriendo en el proceso de esteroidogénesis por la alteración en la expresión de la enzima aromatasa.

Considerando los resultados de los biomarcadores, se concluye que *J. multidentata* responde de forma diferente ante la exposición de clorpirifós y cipermetrina en forma individual y en mezclas. Las respuestas de los biomarcadores de efecto, integradas en un índice de respuesta, mostraron mayores cambios en los peces enfrentados a las mezclas en relación a los insecticidas en forma individual.

Éste y otros estudios similares deberían ser considerados en evaluaciones de riesgo de ambientes naturales donde una gran variedad de contaminantes están presentes.

ABSTRACT

The importance of agriculture in our country has led to an increasing number and variety of chemicals for agricultural use; the aquatic ecosystems become the main recipients of these compounds. The aim of this thesis was to evaluate often used pesticide contamination in abiotic compartments of aquatic habitat in the basin of the river Suquía and conduct a comprehensive analysis of the effect and accumulation in the native fish species *Jenynsia multidentata* of cypermethrin and chlorpyrifos, two pesticides present in the basin and considered dangerous to the local biota.

For the temporal and spatial monitoring of Suquía river basin, the most widely used pesticides were selected: atrazine, acetochlor, chlorpyrifos, alpha-endosulfan, beta-endosulfan, alpha-cypermethrin and glifosato. Also two degradation products as the metabolite of endosulfan, endosulfan sulfate, and a degradation product of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), were included. Samples were collected in 5 sites located along the river Suquía with varied land use: La Calera, Villa Corazón de María, Río Primero, Santa Rosa de Río Primero and La Para. The samplings were carried out during periods of low and high application of pesticides covering the crop year 2010-2011.

For measuring semi-polar and nonpolar pesticides (atrazine, acetochlor, chlorpyrifos, endosulfan alpha, beta-endosulfan, cypermethrin and the degradation product endosulfan, endosulfan sulfate) in samples of natural waters and sediments, an optimization procedure was necessary for extraction and quantification stages. For the extraction of these pesticides from natural water samples a combination of two consecutive methods (solid phase extraction and solid phase microextraction) was developed. For the extraction of these pesticides from sediments samples, a head space- solid phase microextraction was adjusted. The optimization of the separation and detection for quantification of these analytes by gas chromatography-mass spectrometry was also necessary.

The measurement of glyphosate and AMPA was performed on samples of water, sediments and suspended particulate matter. Water samples were derivatized without prior extraction. On the contrary, the sediment samples and suspended particulate matter undergone an extraction step followed by a derivatization step. Quantification was performed by liquid chromatography mass spectrometry.

From a total of 140 analyzed samples, 47 % were positive. Furthermore, at least one pesticide was quantified in all monitoring sites. These results show the wide distribution of pesticides in Suquia river basin, denoting high probability of being found in the various abiotic compartments of this water resource. On the other hand, no temporal variations were observed in relation to periods of low and high application. The highest concentrations of pesticides were found in Villa Corazón de María where the contamination could come from two sources: agricultural and urban activities. Glyphosate exhibited the highest concentrations in all matrices tested, while endosulfan, chlorpyrifos and cypermethrin showed values that exceed the existing guidelines for protection of aquatic biota.

Bioassays were conducted in order to study the accumulation and toxic effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos and cypermethrin in female *J. multidentata* exposed to the pesticides individually or in mixture of pure compounds and commercial products. The presence of cypermethrin and chlorpyrifos accumulated in various organs of exposed fish was measured, showing the highest concentrations in the organs of pollutant uptake (intestine and gills) and the main organ of detoxification (liver). Furthermore, lower concentrations were quantified in muscle, while the levels of pesticides in gonads and brain were always below the detection limit of the method used.

The quantified accumulation in fish exposed to mixtures of pesticides was higher than that observed in fish exposed to the compounds individually. Furthermore, the technical mixture showed a different pattern of accumulation when compared to the commercial mixture, with higher concentrations accumulated in the latter treatment.

The toxicity of these insecticides was evaluated by using biomarkers of effect at different levels of organization. The biochemical biotransformation system responses, as the expression of cytochrome P4501A, the expression of P-glycoprotein and activity of glutathione S-transferase, were determined. These responses may be associated with the observed accumulation. Cholinesterase enzyme (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase), were evaluated in brain and muscle *J. multidentata*. Observed changes for both enzymes after the exposure to chlorpyrifos were associated to the mode of action of this compound. Also cypermethrin showed a similar pattern. Biomarkers of oxidative stress responses were assessed by measuring the activity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) and the generation of oxidative damage (levels of peroxidized lipids and carbonylated proteins). Oxidative

damage was observed in fish exposed chlorpyrifos and pure compounds as well as in commercial mixtures. The swimming behavior of the fish after 24 and 96 h exposure to two levels of concentration were followed by processing with specific software. Finally, the potential of these insecticides as endocrine disruptors was evaluated by studying the altered expression of the aromatase enzyme. Altered aromatase activity could interfere in the process of steroidogenesis.

Considering the results of biomarkers, we conclude that *J. multidentata* responds differently to the exposure to chlorpyrifos and cypermethrin either individually or in mixtures. The responses of biomarkers of effect, combined in an integrated biomarker response index, showed larger changes in fish facing mixtures than to insecticides individually.

Finally, this and similar studies should be considered in risk assessments of natural environments where a wide variety of contaminants are present.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de la contaminación ambiental con plaguicidas

La importancia de la actividad agrícola en Argentina se ve reflejada en el gran porcentaje de territorio del país que está destinado a la siembra. Según las estadísticas, en la campaña 2013/14 se sembraron más de 30 millones de hectáreas, de las cuales 20 millones corresponden a soja, 6 millones a maíz, 3,5 millones a trigo y 1,3 millones a girasol y otros cultivos (SIIA, 2013). Esta actividad es uno de los pilares de la economía del país, que ha producido una ampliación en la frontera agrícola duplicando el área sembrada en los últimos 30 años, colocando a Argentina como el principal productor de granos de Latinoamérica (Butinof et al., 2014).

El aumento de la producción, los cambios en la tecnología de labranza como la incorporación de la siembra directa y los desarrollos biotecnológicos que crearon semillas genéticamente modificadas, han traído aparejado un marcado incremento en el uso de agroquímicos, alcanzando un consumo actual de plaguicidas de 281 millones de litros por año (CASAFE, 2013). El mercado de los fitosanitarios abarca compuestos de diferentes propiedades físicas y químicas, modos de acción y usos. Por otra parte los productos comercializados fueron evolucionando debido a la resistencia que generan las plagas y a la intención de utilizar principios activos con menor toxicidad frente a los organismos no blanco.

En los últimos 5 años Argentina ha manifestado cambios en cuanto al uso de plaguicidas. En el año 2008, ocupaban los 10 primeros puestos de ventas los herbicidas glifosato, 2,4 D, atrazina, acetoclor e imazetapir, conjuntamente con los insecticidas clorpirifós, cipermetrina y endosulfán y las combinaciones de fungicidas azoxistrobina con ciproconazol y piraclostrobin con epoxiconazole (CASAFE, 2008). En el último informe del mercado de fitosanitarios las posiciones se modificaron parcialmente, siendo los herbicidas más vendidos glifosato, 2,4-D, atrazina, diclosulam y cletodim, seguidos por la combinación de fungicidas azoxistrobina con cyproconazole, los insecticidas rynaxypyr, clorpirifós, flubendiamide y el herbicida haloxifop (CASAFE, 2013). Cabe destacar el aumento del uso de insecticidas de banda verde como rynaxypyr y flubendiamide, además de la ausencia de endosulfán, por haberse prohibido su venta debido a sus demostrados efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente, así como por su elevada persistencia (SENASA, 2011).

El uso de agroquímicos que incluye plaguicidas, fertilizantes y aditivos tiene como fin maximizar la producción agrícola, la productividad del suelo y la calidad del producto, lo que se refleja en beneficios económicos. Sin embargo, dado a que sólo el 10 % del químico aplicado alcanzaría al organismo blanco, el porcentaje restante se deposita en suelos, aguas y sedimentos lo que podría causar un efecto tóxico sobre organismos no blanco (Ortiz-Hernández et al., 2011).

La dinámica de distribución de un plaguicida en los distintos compartimientos abióticos medioambientales: aire, agua y suelo, depende de las propiedades físico-químicas de su molécula, la forma de trasladarse, así como las características climáticas y la geografía del lugar en que se encuentra (Fig. 1).

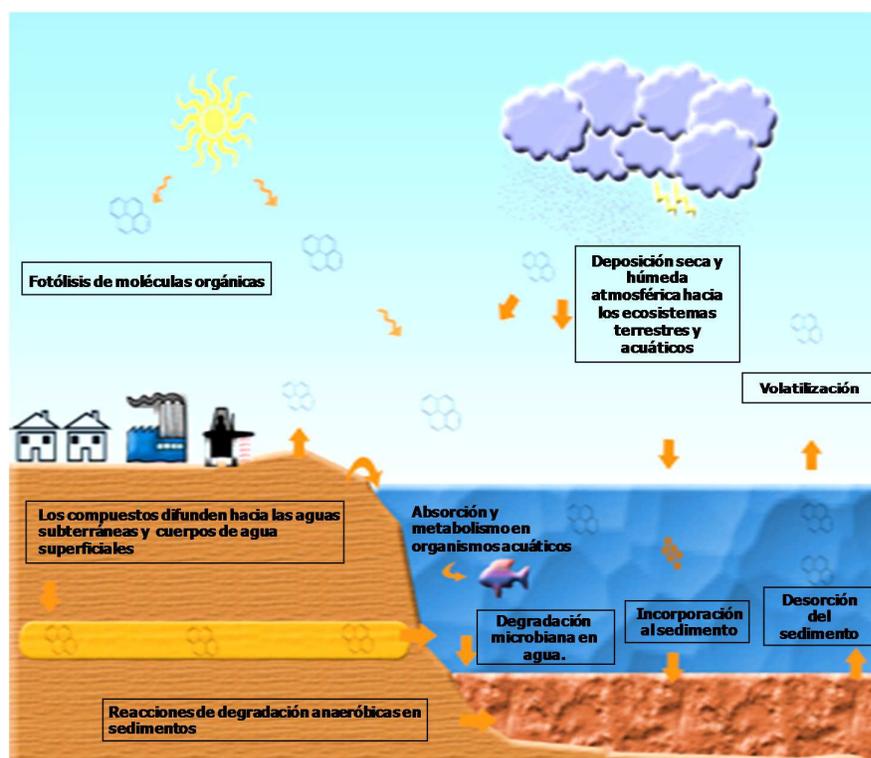


Figura 1: Procesos físicos y químicos que rigen el destino de los contaminantes ambientales (Tomada y modificada de Newman y Unger, 2003).

Un plaguicida ingresa al ambiente por aplicaciones aéreas o terrestres que se realizan sobre grandes extensiones de cultivos de cereales y oleaginosas, como así también en huertas comerciales o familiares, en espacios verdes públicos y jardines domésticos. Cuando los plaguicidas alcanzan el suelo pueden adherirse al mismo, difundir hacia las aguas subterráneas o ser lavados por las lluvias y llegar a los cuerpos de aguas

superficiales. Estas rutas de distribución del plaguicida dependen de su capacidad de adsorción a partículas de la tierra y su solubilidad en agua. Al situarse en los cuerpos de agua, el compuesto se incorpora a los sedimentos, a la biota acuática o permanece soluble en agua. Desde los compartimientos terrestres y acuáticos los compuestos se volatilizan o evaporan contribuyendo a los niveles de contaminación en aire y luego por deposición seca o húmeda vuelven a las áreas anteriores ya sea que estén cerca o lejos. De esta forma ocurre la transferencia continua entre los diferentes compartimientos ambientales.

En el aire, agua o suelo los plaguicidas permanecen inalterados o sufren degradación por acción de la luz solar u otros productos químicos. Así mismo pueden ingresar en los organismos allí presentes y ser metabolizados por microorganismos u otros individuos superiores como peces y plantas. Estos procesos, por lo general, conducen a la formación de productos de descomposición menos dañinos, si bien en algunos casos generan productos más tóxicos. Por otra parte, los plaguicidas menos solubles en agua, tienden a acumularse en los organismos y alcanzan en ellos concentraciones superiores a las presentes en el ambiente que habitan, proceso conocido como bioacumulación. Si este organismo contaminado es a su vez predado por otro superior que también pueda almacenar este plaguicida, se alcanzarán niveles aún mayores del contaminante, proceso conocido como biomagnificación. Este fenómeno representa un riesgo para el humano, debido a que a través de los alimentos puede estar expuesto a altas concentraciones de contaminantes (EXTONET, 1993; Newman y Unger, 2003).

Una vez que el contaminante ingresa a un individuo existe un abanico de posibilidades, entre ellas, que el organismo biotransforme el compuesto y lo elimine o genere respuestas en cadena que comienzan a un nivel molecular y que se pueden extender a nivel subcelular (organelas), celular, en tejidos, sistémico (órganos), individuo, población, comunidad hasta alcanzar una modificación en el ecosistema (van der Oost et al., 2003). Los efectos a niveles superiores están siempre precedidos por cambios tempranos en los procesos biológicos, permitiendo el desarrollo de señales de advertencia temprana o biomarcadores, los cuales detectan respuestas medibles en un organismo a la contaminación ambiental, y pueden ser un indicio sensible de que el tóxico ha entrado, ha sido distribuido en los distintos tejidos y está produciendo un efecto. Si se determinan respuestas biológicas a distintos niveles en un organismo expuesto se hace referencia a biomarcadores de efecto. Si se detecta y mide una sustancia exógena o sus

metabolitos, o un producto de la interacción entre el agente xenobiótico y una molécula o célula blanco, se hace referencia a biomarcadores de exposición (Hirthe et al., 2001). Estos biomarcadores de efecto y exposición son determinados en un organismo que funciona como bioindicador, brindando información de la calidad del hábitat en que se encuentra (van Gastel y van Brummelen, 1994).

Una contribución a la comprensión de las causas y consecuencias del impacto de uso del agroquímicos sobre la salud ambiental requiere, por lo tanto, del estudio de los compartimientos abióticos y del uso de bioindicadores y biomarcadores.

Contaminación ambiental en aguas naturales de la provincia de Córdoba

La provincia de Córdoba, tiene una extensión total de 16,5 millones de hectáreas y debido a que los suelos son fértiles y el clima favorable para la agricultura, cerca de la mitad del territorio está destinado a esta actividad (SIIA, 2013). El uso de agroquímicos en los cultivos, como así también la descarga de efluentes no tratados y químicos utilizados en la industria, ponen en peligro la calidad de las aguas de los recursos hídricos. En Córdoba existe gran abundancia de ríos, arroyos, lagunas y embalses artificiales que son de vital importancia porque se utilizan como fuente de consumo de agua potable, para riego, recreación y pesca, y además, en el caso de los embalses, para obtención de energía.

Las principales cuencas hídricas de la provincia de Córdoba son las que tienen sus nacientes en las Sierras Grandes y de Comechingones: río Primero o Suquía, río Segundo o Xanaes, río Tercero o Ctalamochita, río Cuarto o Chocanchavara y río Quinto o Popopis, este último que nace en las sierras de San Luis. Todos estos ríos se dirigen de oeste a este de la provincia, durante su recorrido atraviesan pequeñas y grandes ciudades, y además transcurren a las orillas de campos sembrados. La contaminación del río Suquía ha sido la más estudiada, encontrándose un marcado deterioro de la calidad físico-química de sus aguas luego de que el río atraviesa la ciudad de Córdoba y recibe los efluentes de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de la misma ciudad (Contardo-Jara et al., 2009; Guyón et al., 2012a; Maggioni et al., 2012; Monferrán et al., 2011; Pesce y Wunderlin, 2000; Valdés et al., 2014; Wunderlin et al., 2001). Por otra parte, en agua y sedimentos a lo largo de la cuenca se detectó presencia de metales pesados provenientes de desechos industriales y bacterias coliformes totales indicativas de contaminación fecal (Merlo et al., 2011). En el mismo estudio se evaluaron

también compuestos orgánicos semivolátiles en aire, destacándose la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos “HPAs” en el sitio de muestreo ubicado en la ciudad de Córdoba, compuestos que están directamente relacionados con la contaminación dada por los automóviles (Merlo et al., 2011). Además, Monferrán et al. (2009) evidenciaron la presencia de diclorobencenos con amplia distribución en la cuenca, siendo mayor su concentración en los sitios contiguos a las ciudades ya que este contaminante se origina principalmente en actividades domésticas por el uso como repelente de polillas y pastillas desodorantes de inodoros.

Sin embargo, estudios sobre la evaluación de contaminantes provenientes de la actividad agrícola en esta cuenca son escasos. Se encontró presencia de lindano en aguas del río Suquía en un único sitio, ubicado inmediatamente después de la descarga de EDAR de la ciudad de Córdoba, por lo que se puede asociar esta contaminación al uso de este insecticida como piojicida (Pesce y Wunderlin, 2000). En otro estudio realizado por Ballesteros et al. (2014) se analizaron compuestos orgánicos persistentes (COPs) en la laguna Mar Chiquita, cuerpo de agua donde desemboca el río Suquía, encontrándose plaguicidas organoclorados (OCs), bifenilos policlorados “PCBs” y polibromodifenil éteres “PBDEs”. Estos dos últimos grupos de compuestos, son usados como aislantes para equipos eléctricos y como retardantes de llamas en plásticos y espumas, respectivamente. Los COPs se encontraron distribuidos en agua, sedimentos, material particulado y tejidos de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). La presencia de estos compuestos en la laguna Mar Chiquita alertó sobre la posible existencia de estos contaminantes en el resto de la cuenca y también de otros plaguicidas de menor persistencia y actualmente más utilizados.

En la cuenca del río Xanaes se detectó la presencia de plaguicidas OCs en agua y en la planta acuática *Myriophyllum aquaticum*. Los resultados mostraron concentraciones bajas de OCs en las matrices analizadas y niveles de contaminación similares tanto en la zona de montaña, zonas no agrícolas, como en zonas agrícolas. La explicación de este hallazgo se fundamentó en que los compuestos OCs no son de uso actual y su presencia podría ser atribuida a la alta persistencia de estos compuestos (Schreiber et al., 2013).

Por otra parte, en los últimos años numerosos estudios de campo demostraron que la presencia de contaminantes en el río Suquía tiene impacto en la biota autóctona. Monferrán et al., (2011) observaron efectos en la especie ictícola nativa *Jenynsia*

multidentata recolectada en sitios de baja y alta contaminación, evidenciándose cambios en la actividad de enzimas antioxidantes y de biotransformación. Particularmente, la respuesta enzimática mostró un aumento en los peces que habitaban el sitio cercano a la descarga de EDAR y esa actividad fue disminuyendo a medida que la calidad de agua mostraba mejoras. En otro estudio, Maggioni et al. (2012) mostraron que las alteraciones en la histopatología de hígados y branquias de *J. multidentata* fueron mayores en los peces de los sitios más contaminados frente a los peces del sitio de referencia. Estos autores evidenciaron también una tendencia similar en la respuesta de enzimas, pero resaltando que en algunos casos los cambios en la actividad enzimática podrían asociarse con contaminantes presentes en menor concentración, como metales o plaguicidas.

En esta misma especie, se evaluaron también biomarcadores de desórdenes reproductivos y disrupción endócrina observándose cambios significativos en la expresión de la enzima esteroidogénica aromatasa y un desfase de un mes en el ciclo reproductivo normal de los peces del sitio contaminado respecto a los peces en el sitio de referencia. En este mismo trabajo se observó el aumento del tamaño del hígado en los peces de los sitios más contaminados, como una respuesta adaptativa para aumentar la capacidad de este órgano para detoxificar compuestos extraños (Guyón, 2013).

Los cambios a nivel molecular, de tejido y de órganos en los peces que habitan un cuerpo de agua contaminado, podrían tener como resultado cambios en la comunidad íctica. Este efecto también fue demostrado en la cuenca del río Suquía, donde los últimos resultados muestran que en la zona más contaminada, a 16 km aguas abajo de la descarga de EDAR, se encuentra la menor diversidad y cantidad de especies de peces en relación al resto de la cuenca. Sólo unas pocas especies como *J. multidentata*, *Gambusia affinis* y *Cnesterodon decemmaculatus* pueden tolerar los bajos niveles de oxígeno disuelto presentes en ese sitio, debido a que cuentan con adaptaciones morfológicas para respirar en la superficie del agua tales como la boca desplazada hacia arriba (Bistoni et al., 1999; Maggioni et al., 2012; Merlo et al., 2011; Hued y Bistoni, 2005)

En la cuenca del río Suquía, la posibilidad de riesgo para la biota acuática asociada a la presencia de plaguicidas es un aspecto aún no estudiado.

Evaluación de toxicidad de contaminantes ambientales sobre la biota autóctona

Los organismos acuáticos están expuestos a un gran número de contaminantes presentes en los ríos, que revelan distintas concentraciones y diferentes grados de toxicidad. La presencia de mezclas de plaguicidas en los ambientes naturales es altamente probable debido al actual interés en el uso de combinaciones de principios activos y a la aplicación simultánea de distintos fitosanitarios en cultivos aledaños al río (Brodeur et al., 2014; Hayes, 2010). El uso de mezclas en la actividad agrícola presenta ventajas sobre los químicos utilizados de forma individual como el incremento de la efectividad, la reducción de las cantidades usadas y la disminución de los costos en la aplicación. El aumento de la efectividad de las mezclas de los distintos químicos se debe a la respuesta aditiva o sinérgica que genera sobre los organismos blanco, que podría extrapolarse a los organismos no blanco, causando cambios o exacerbando las características ecotoxicológicas de los compuestos (Elhalwagy y Zaki, 2009). Las respuestas de la exposición de organismos a una combinación de plaguicidas puede presentar distintas interacciones: a) aditivas: el efecto de la mezcla es la suma de los efectos de los compuestos por separado; b) sinérgicas: el efecto de la mezcla es mayor que la suma del efecto de las sustancias por separado; y c) antagónicas: el efecto de la mezcla es menor que la suma de los efectos de las sustancia por separado.

En los últimos años se han comenzado a caracterizar los efectos de mezclas de plaguicidas en vertebrados acuáticos. Denton et al. (2003) observaron respuestas sinérgicas en mezclas de esfenvalerato y diazinon sobre las larvas del pez *Pimephales promelas*. También se demostró que atrazina incrementa la toxicidad aguda del clorpirifós en el anfibio *Xenopus laevis* y *P. promelas*, observado en la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y en el aumento de la tasa de adsorción de clorpirifós. Por el contrario, no producen variaciones en la toxicidad sobre el pez *Lepomis macrochirus* ni en el anfibio *Rana clamitans* (Wacksman et al., 2006). En la especie *Cyprinus carpio* expuesta a atrazina y clorpirifós se observaron respuestas diferentes en la actividad de enzimas de biotransformación, cuando el organismo era enfrentado a los compuestos en forma individual o en mezclas (Xing et al., 2012). Cuando se experimentó con alevinos del pez trucha (*Oncorhynchus mykiss*), se observó un efecto de adición parcial o sinérgico en la concentración que produce la muerte del 50 % del grupo de animales de prueba (CL₅₀), luego de 96 h de exposición a la mezcla de

carbofurano y metamidofos (Iannacone et al., 2011). También Brodeur et al., (2014) observaron efectos sinérgicos en el valor de CL_{50} en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a mezclas de glifosato y cipermetrina por 96 h.

Si bien, de acuerdo a los estudios anteriormente referidos, existe información de los efectos de mezclas de plaguicidas sobre organismos acuáticos, no se han publicado trabajos donde se investigue el efecto combinado de los insecticidas clorpirifós y cipermetrina. No obstante, existen algunos datos sobre especies no acuáticas, en la lombriz de suelo, *Eisenia fetida andrei*, que habiendo sido expuesta a la mezcla mencionada, acusó disminución de la velocidad de crecimiento y reproducción en relación a la exposición de los mismos compuestos en forma individual (Zhou et al., 2011). En otro trabajo realizado con plaguicidas pertenecientes a las mismas familias de los compuestos anteriores, se registraron efectos antagónicos en la actividad de enzimas antioxidantes, el metabolismo de los lípidos y la actividad de estererasas no específicas, en ratas a las que se les dosificó diazinon (organofosforado) y deltametrina (piretroide) (Elhalwagy y Zaki, 2009).

Sin embargo, ciertas respuestas establecidas para una especie pueden no ser necesariamente válidas para otras especies (den Besten y Munawar, 2005). Por ejemplo, la CL_{50} a 96 h de exposición a clorpirifós varía desde 0,04 $\mu\text{g/L}$ para el anfípodo *Hyallela azteca*, hasta 1,3 $\mu\text{g/L}$ en el pez luna de agallas azules (*Lepomis macrochirus*), o 280 $\mu\text{g/L}$ para el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (CCME, 1999). Se identifica así la necesidad de comprender el efecto de los plaguicidas sobre especies autóctonas.

En Argentina, es creciente el número de publicaciones en el área de la toxicología y química ambiental. De las realizadas en este país durante el año 2011, el 30 % corresponden a estudios de efectos sobre la biota (Carrquiriborde y Bainy, 2012). Algunos de los estudios realizados exponiendo organismos de especies autóctonas a concentraciones sub-letales de plaguicidas han sido publicados en los últimos años. En *J. multidentata* se observó activación del sistema de biotransformación y antioxidante en varios órganos frente a la exposición a diclorobencenos (Monferrán et al., 2008). Estos mismos compuestos produjeron estrés oxidativo en la macrófita *Ceratophyllum demersum* (Monferrán et al., 2007). Ballesteros et al. (2009a) y Menone et al. (2008) observaron respuestas similares al exponer *J. multidentata* y la macrófita acuática *Myriophyllum quitense* a distintas dosis sub-letales de endosulfán. Exposiciones realizadas también en laboratorio mostraron que el plaguicida lindano se bioacumuló y causó

daños histopatológicos y activación del sistema de biotransformación en diferentes órganos de los peces *Corydoras paleatus* y *J. multidentata* (Pesce et al., 2008).

El uso de especies autóctonas en estos estudios previos confirma la utilidad de peces como bioindicadores y de las respuestas evaluadas como biomarcadores de contaminación. Sin embargo, las investigaciones realizadas a la fecha con plaguicidas aún son escasas, y no aportan datos sobre los compuestos de uso actual. La importancia de generar datos toxicológicos a partir de ensayos con mezclas de plaguicidas deriva de la necesidad de realizar evaluaciones de riesgo y establecer límites para la protección de la biota acuática que se fundamenten en escenarios más reales. Además, contar con información sobre la toxicidad en especies autóctonas permitiría revisar los límites existentes para la protección de la biota acuática, generalmente tomados de legislaciones extranjeras, o de la evaluación de datos disponibles para especies que no habitan los ríos argentinos.

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Evaluar la presencia de plaguicidas de uso frecuente en distintos compartimentos del hábitat acuático en la cuenca del río Suquía (Córdoba), su efecto sobre organismos acuáticos y su acumulación.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Identificar plaguicidas presentes en agua y sedimentos en la cuenca del río Suquía. Con el cumplimiento de este objetivo se procura establecer los niveles de dichos compuestos presentes en las áreas a estudiar y sus variaciones temporales y espaciales.

Objetivo 2: Determinar las posibles vías de ingreso, distribución, biotransformación y acumulación de cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta en la especie ictícola nativa *Jenynsia multidentata*.

Objetivo 3: Evaluar la respuesta de biomarcadores de efecto en la especie ictícola nativa *Jenynsia multidentata* a la exposición a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta, con el fin de evaluar posibles competencias.

Hipótesis de trabajo

Hipótesis 1: Plaguicidas de uso frecuente en actividades agropecuarias se encuentran presentes en muestras de agua y sedimentos del río Suquía, variando su concentración espacial y temporalmente.

Hipótesis 2: La exposición a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta altera el ingreso, la biotransformación y la acumulación de estos compuestos en *Jenynsia multidentata*.

Hipótesis 3: *Jenynsia multidentata* responderá a la exposición a clorpirifós y cipermetrina en forma individual y conjunta, modificando el patrón de respuestas biológicas evaluadas (biomarcadores).

CAPÍTULO 1: Evaluación de plaguicidas en agua y sedimentos de la cuenca de río Suquía

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Cuenca del río Suquía

La cuenca del río Suquía se localiza en la región semi-árida de la provincia de Córdoba (Argentina), nace en el embalse San Roque y corre principalmente de oeste a este atravesando la ciudad de Córdoba a lo largo de 40 km, hasta desembocar en la laguna Mar Chiquita ubicada a 200 km aguas abajo. El caudal medio del río es 9,0 m³/s, presentando valores mínimos de 2,7 m³/s durante la estación seca que abarca los meses de Mayo a Octubre y valores máximos de 15 m³/s durante la estación húmeda que abarca los meses de Noviembre a Abril (Vázquez et al., 1979; Pasquini et al., 2012).

La cuenca del río Suquía cubre una superficie aproximada de 7.700 km² y comprende tres áreas de drenaje (Fig 1.1): la cuenca alta, la cuenca media y la cuenca baja.

La cuenca alta (Fig 1.1, A): tiene una extensión aproximada de 1.700 km², integrada por las cuencas del río Cosquín (827 km²), río San Antonio (500 km²) y otros tributarios menores como el arroyo Los Chorrillos (138 km²) y el arroyo Las Mojarras (89 km²). Está situada en un área montañosa con cabeceras de cuencas en las Sierras Grandes, con ríos de carácter torrencial que desembocan en el embalse San Roque. En la zona se asientan pequeñas poblaciones serranas que aprovechan el río para recreación y en algunos lugares para cría de ganado. En general, el impacto antrópico en esta área no es significativo ya que los ríos presentan buena calidad de sus aguas (Hued y Bistoni, 2005; Wunderlin et al., 2001). En relación al embalse San Roque, podemos resaltar que es la fuente de agua potable más importante de la ciudad de Córdoba, y que presenta un alto nivel de nitrógeno y fósforo en sus aguas, lo que conlleva, a la ocurrencia de florecimientos algales y presencia de cianotoxinas.

La cuenca media (Fig 1.1, B): abarca una superficie aproximada a los 1.200 km², contando con dos áreas de drenaje principales. La superior pertenece a la ladera este de las Sierras Chicas donde nace el río Suquía y se suman las aguas del arroyo Saldán. Esta zona presenta características serranas similares a la cuenca alta y en ella se sitúan poblaciones como La Calera. La siguiente, es el área de drenaje de la ciudad de Córdoba, donde se sitúa el mayor asentamiento de la cuenca con un total de 1,3 millones de habitantes. En este sector, el río recibe el aporte del arroyo La Cañada, el

cual recoge una importante cantidad de desagües pluviales y algunos efluentes industriales. En su tramo urbano y por aproximadamente un recorrido de 6 km, el río se encuentra canalizado disminuyendo su capacidad de infiltración y depuración y alterando las posibilidades de desarrollo de la biota. Más abajo, en la localidad de Bajo Grande se sitúa la EDAR, que realiza el mayor impacto en el río Suquía mediante la descarga de sus efluentes que provienen del tratamiento de los líquidos cloacales de la ciudad de Córdoba. Sumados a los efectos generados por el volcamiento de la planta de Bajo Grande, en esta zona se realiza también extracción intensiva de áridos. Otra de las descargas que recibe el río en su cuenca media es la del canal denominado Interfábricas, el cual recoge los efluentes de grandes industrias de la ciudad de Córdoba. Finalmente, y a 13 km aguas abajo de la EDAR, en la localidad de Villa Corazón de María se desarrolla parte del cinturón verde, lugar de cultivos de frutas y hortalizas.

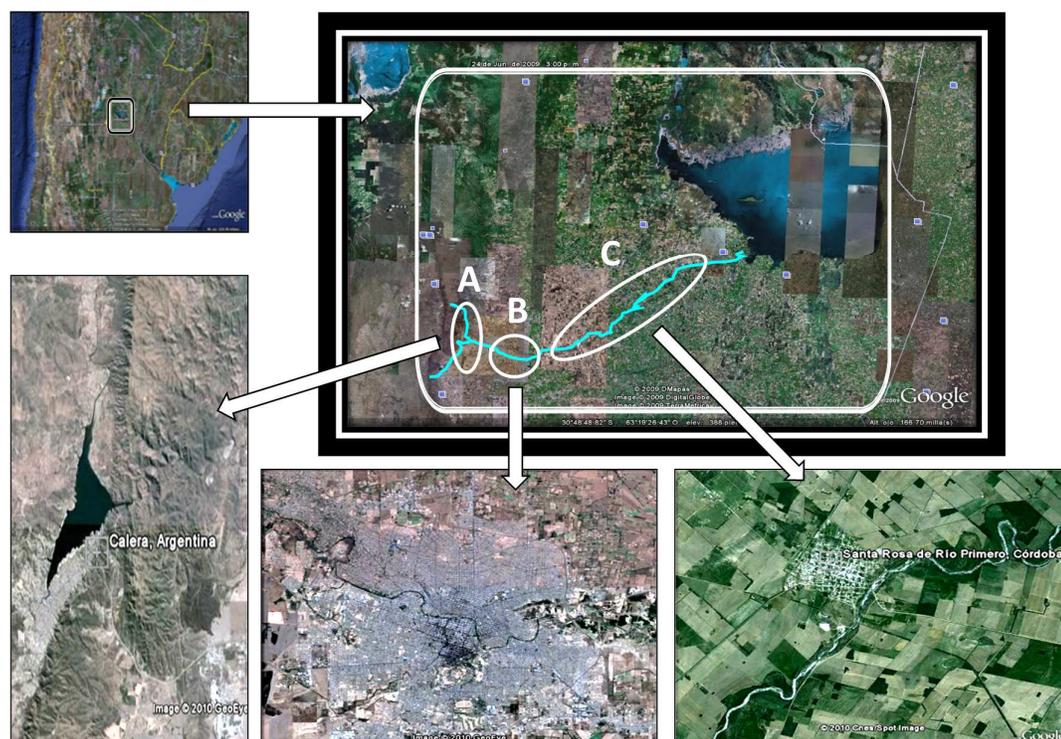


Figura 1.1: Cuenca de río Suquía, A- Cuenca alta, B- Cuenca media y C- Cuenca baja.

La cuenca baja (Fig 1.1, C): cubre una superficie aproximada de 4.800 km² extendiéndose desde las localidades periféricas de la ciudad de Córdoba hasta la laguna Mar Chiquita. Presenta un terreno de llanura, donde el río es poco profundo, de escaso caudal y forma meandros. La geografía y el clima de esta parte de la cuenca propician el uso del suelo para actividad agrícola, presentándose grandes áreas de cultivos principalmente

de cereales y oleaginosas. Como puede observarse en la imagen satelital, el cauce del río se encuentra rodeado de campos y también de algunas ciudades. En esta zona se encuentran, entre otras, las ciudades de Río Primero, Santa Rosa de Río Primero y La Para, donde su principal actividad económica es la agricultura.

Las actividades económicas desarrolladas en cada área permitirían suponer la posible presencia de plaguicidas en las cuencas media y baja.

1.1.2 Plaguicidas de uso actual y su medición en muestras ambientales

La clasificación más común de plaguicidas se realiza en función al tipo de organismo que se desee controlar. Las tres clases distinguidas por su mayor uso son los **herbicidas**, **insecticidas** y **fungicidas**, pero también existen otras clases como rodenticidas, acaricidas, molusquicidas, larvicidas, alguicidas y pediculicidas. Adicionalmente, otros compuestos con finalidad de control de organismos, se pueden categorizar en fitorreguladores (hormonas de plantas), repelentes y atrayentes (feromonas). Asimismo, estas familias se pueden subclasificar atendiendo a su naturaleza química y características toxicológicas. En referencia a los subgrupos considerados por Casarret y Doull's (2008), para los **herbicidas** se pueden enumerar los clorofenoxiácidos, compuestos de amino cuaternario, cloroacetanilidas, triazinas y fosfometil amino ácidos. Para los **insecticidas** se pueden nombrar a los organofosforados, carbamatos, piretroides, OCs, además otros nuevos grupos como los neonicotinoides, formamidinas, fenilpirazoles, avermectinas y el bioplaguicida *Bacillus thuringiensis* "Bt", utilizado en las semillas genéticamente modificadas. Dentro de los **fungicidas** se encuentran los compuestos ftamilidas, ditiocarbamatos, cloronitrilos, benzimidazoles y compuestos inorgánicos y organometálicos.

Los plaguicidas también pueden ser clasificados según el tiempo de permanencia de la sustancia en el ambiente y la capacidad de ser degradados naturalmente (degradación química, fotoquímica, etc.) y/o por microorganismos (biodegradación). Según este criterio se dividen en dos grupos: los **persistentes** y **no persistentes** (Cursi, 1993). Los plaguicidas persistentes se caracterizan por ser sustancias orgánicas de características tóxicas, de vida media larga, lipofílicos, bioacumulables y de baja volatilidad, pero factibles de transportarse por la atmósfera y causar efectos adversos cerca y/o distante de las fuentes de emisión (Miglioranza et al., 2003; Wiberget al., 2001). Dentro de este grupo están los plaguicidas OCs que incluyen los ciclodienos, los hexaclorociclohexanos, los

DDT y sus análogos. Los plaguicidas **no persistentes** se descomponen en tiempos más cortos con la exposición a la luz solar y al agua. En general, no manifiestan la tendencia a bioacumularse ya que se biotransforman y excretan con facilidad. Están incluidos en este último grupo los **insecticidas** organofosforados, carbamatos y piretroides. Los insecticidas organofosforados son derivados de ésteres del ácido fosfórico con los grupos hidroxilos sustituidos por otros radicales. Al igual que los insecticidas carbamatos, son potentes inhibidores de la actividad de AChE, afectando la transmisión del impulso nervioso. Los insecticidas piretroides son compuestos sintéticos que simulan piretrinas naturales con acción plaguicida y muestran efectos neurotóxicos actuando sobre los canales de sodio en las membranas neuronales (Soderlund et al., 2002). También se incluyen dentro de los plaguicidas no persistentes a los **herbicidas** y **fungicidas**. Los herbicidas despiertan preocupación por sus grandes volúmenes de utilización, aunque en términos de toxicología, esta clase de compuestos presentan menor toxicidad aguda comparada con la mayoría de los insecticidas, a excepción de paraquat. Los fungicidas tienen estructuras químicas variadas, desde moléculas simples como compuestos inorgánicos (sulfato de cobre) hasta compuestos orgánicos complejos. Este grupo presenta baja toxicidad en mamíferos, pero en el ambiente causan alteraciones en comunidades de microorganismos (Barr, 2008; Casarret y Doull's, 2008; Spiro y Stigliani, 2003).

La contaminación con plaguicidas está siendo ampliamente estudiada en los ríos de todo el mundo por el amplio uso de estos compuestos para actividades agrícolas y domésticas. Las principales fuentes de ingreso de estos compuestos a los cursos de aguas son establecidas como fuentes difusas o puntuales. La primera de éstas corresponde a la deriva durante la aplicación, las escorrentías y lixiviación. Mientras que en la segunda se puede resaltar la deposición descuidada de contenedores vacíos o el lavado de equipos utilizados en la aplicación (Konstantinou et al., 2006). A pesar de las diversas fuentes de contaminación los plaguicidas en el ambiente están presentes en concentraciones trazas y formando parte de una mezcla compleja de sustancias. Por lo tanto, para su identificación y medición en muestras ambientales, resulta necesario un paso de extracción previa a la etapa de cuantificación.

La extracción tiene como objetivos pre-concentrar los analitos de interés y generar un extracto limpio de otros compuestos que puedan interferir en su análisis. Este procedimiento dependerá de la naturaleza de la muestra: sólida o líquida y de los

plaguicidas que se desea determinar: apolares, semi-polares y polares. Entre los métodos de extracción más utilizados podemos mencionar los tradicionales procedimientos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido (Metcalf y Metcalf, 1997). Estos métodos son todavía los más populares en laboratorios de análisis de rutina, debido a su gran aceptación en organismos de estandarización (AOAC, 1995; USEPA, 1995). Otras ventajas que presentan son la simplicidad, robustez, el mínimo entrenamiento requerido del operador y bajos costos de equipamiento. Por el contrario, estas técnicas requieren grandes volúmenes de solventes de alta pureza, que trae aparejado contaminación y un alto costo en la gestión de residuos así como altos costos de insumos. Otra desventaja son sus largos tiempos de procesado.

Con el objetivo de disminuir la cantidad de solvente y tiempo utilizado, se desarrollaron otras alternativas, que abarcan el uso de equipamiento sencillo o equipos sofisticados. En las primeras, podrían incluirse la extracción en fase sólida (SPE) y extracción con ultrasonido (USE). La SPE es ampliamente utilizada en muestras acuosas, principalmente por su alta reproducibilidad (D'Archivio et al., 2007). Esta técnica se fundamenta en la separación de los plaguicidas por adsorción en una fase polimérica empaquetada en un cartucho, seguida de la elución con pequeños volúmenes de solventes.

Para muestras sólidas de matriz compleja se dispone de equipamientos de extracción más sofisticados, pudiendo nombrarse a la extracción con líquido a baja presión (PLE), extracción acelerada de solventes (ASE) y extracción asistida con microondas (MAE) como los más utilizados (García-Rodríguez et al., 2010; Gfrerer y Lankmayr, 2005; Köck-Schulmeyer et al., 2012).

Tendencias más modernas en química analítica apuntan a la miniaturización de la preparación de la muestra, como la microextracción en fase líquida (LPME) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Cortada et al., 2009; Raposo Júnior y Ré-Poppi, 2007). Estas técnicas presentan las ventajas de reducir a un mínimo el uso de solventes y contar con la posibilidad de ser automatizadas. La SPME se basa en una fibra polimérica, recubierta de distintas fases de adsorción, que pueden ser utilizadas con analitos de distintas características físicas y químicas. La fibra adsorbe los compuestos por medio de dos formas de muestreo: directa y en espacio de cabeza (HS). La primera, se realiza por la inmersión de la fibra en la muestra, mientras que en la segunda la fibra toma contacto con la fase vapor generada por la muestra.

Por último, la combinación de metodologías es otra forma de extracción que está menos desarrollada. Su uso tiene la finalidad principal de obtener una extracción aún más eficiente y, de esta forma, disminuir los límites en la cuantificación. Algunos ejemplos son la determinación de compuestos OCs en muestras de aguas, mediante la combinación de SPE y HS-SPME (Qiu y Cai, 2010) y la medición de OCs en sedimentos por la combinación de MAE y HS-SPME (Carvalho et al., 2008).

La etapa de cuantificación de plaguicidas se realiza frecuentemente por medio de separación por Cromatografía Gaseosa (GC) o Cromatografía Líquida acoplada a una amplia variedad de detectores. La separación a utilizar dependerá de la polaridad, volatilidad y riesgo de descomposición térmica del analito. Para la cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares estables a la temperatura, la metodología de separación más utilizada es GC. Los compuestos polares son preferentemente separados por cromatografía líquida.

Luego, la medición, podrá realizarse por detección de captura electrónica (ECD) para aquellos analitos que contengan halógenos en su molécula, por detección selectiva de nitrógeno y fosforo (NPD), para compuestos organofosforados u otros que contengan nitrógeno en su estructura y, como una alternativa más selectiva para cuantificar estas familias de compuestos en matrices complejas, la detección por Espectrometría de Masas (MS). En particular, la metodología de detección de MS puede utilizarse en modo “full scan”, donde son analizados todos los fragmentos de masas generados por el analito en cuestión. Como otra alternativa, puede utilizarse el modo de monitoreo de ión simple (SIM), donde se seleccionan solo los iones característicos del compuesto de interés. Finalmente, a partir de un espectro de masas generado en modo “full scan” se pueden extraer los iones de interés de los compuestos (iones extraídos), aumentando la confianza de los resultados de los análisis alcanzados (Tahboub et al., 2005).

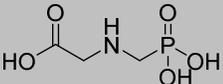
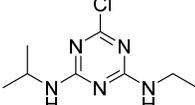
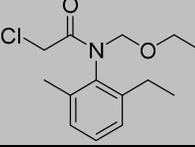
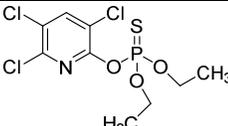
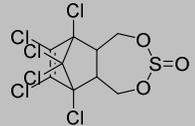
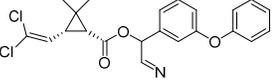
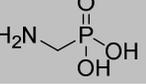
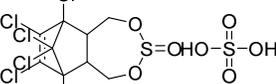
Los límites de detección conseguidos por detectores ECD y NPD son generalmente menores a los encontrados por detección de MS. Por lo tanto, si se pretende medir muestras ambientales con MS es necesario realizar una extracción eficiente para, de esta forma, alcanzar los niveles de sensibilidad requeridos por la legislación de protección de los cuerpos de agua.

En bibliografía es posible encontrar gran variedad de estudios donde se aplican metodologías para la determinación de un grupo de compuestos de estructura similar,

como los OCs o los organofosforados. Actualmente, resulta de interés el desarrollo de procedimientos donde se involucren distintas clases de plaguicidas, con la intención de optimizar los recursos de laboratorio y de generar más cantidad de datos con el procesado de menor número de muestras. Sin embargo, cuando se quieren identificar y cuantificar distintas familias de compuestos en una muestra debe lograrse una condición experimental que favorezca la extracción y cuantificación de todas ellas.

En el presente trabajo, para la evaluación de la contaminación en el río Suquía, se seleccionaron algunos plaguicidas incluidos en la lista de diez más vendidos durante el año 2008 (CASAFE, 2008) y los productos de degradación de dos de estos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Características relevantes de plaguicidas y metabolitos.

Nombre	Fórmula CAS	Estructura	Clase	Solubilidad en agua LogKow
Glifosato	C ₃ H ₈ NO ₅ P 1071-83-6		Herbicida Fosfonometil Amino Ácido	10,500 mg/L -3,4
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅ 1912-24-9		Herbicida Triazina	34,7 mg/L 2,6
Acetoclor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂ 34256-82-1		Herbicida Cloroacetanilida	0,61 mg/L 4,7
Clorpirifós	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS 2921-88-2		Insecticida Organofosforado	2,0 mg/L 4,9
Alfa-endosulfán Beta-endosulfán	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S 115-29-7		Insecticida Organoclorado	0,33 mg/L 3,8
Alfa-cipermetrina	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃ 67375-30-8		Insecticida Piretroide	0,01 mg/L 6,6
AMPA (Ácido amino metilfosfónico)	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₄ 74341-63-2		Metabolito de glifosato	9.600 mg/L 2,8
Endosulfán sulfato	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S 1031-07-8		Metabolito de endosulfán	0,48 mg/L 3,6

LogK_{ow}: Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua; CAS: Número de registro de *Chemical Abstracts Service*.

Sobre la base de estos antecedentes se planteó el siguiente objetivo específico:

Objetivo 1: Identificar plaguicidas presentes en agua y sedimentos en la cuenca del río Suquía. Con el cumplimiento de este objetivo se procura establecer los niveles de dichos compuestos presentes en las áreas a estudiar y sus variaciones temporales y espaciales.

Estrategias para lograr este objetivo específico:

- Desarrollar y validar una metodología para la cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales.
- Desarrollar y validar una metodología para la cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares en sedimentos.
- Evaluar la distribución temporal y espacial de plaguicidas apolares, semi-polares, glifosato y su metabolito el ácido aminometil fosfónico (AMPA), en aguas, sedimentos y material particulado en suspensión recogidos en la cuenca del río Suquía, Córdoba, Argentina.

Hipótesis 1: Plaguicidas de uso frecuente en actividades agropecuaria se encuentran presentes en muestras de agua y sedimentos del río Suquía, variando su concentración espacial y temporalmente.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Recolección y conservación de muestras

Para el monitoreo temporal y espacial en la cuenca del río Suquía, se tomaron muestras de agua superficial (20 cm debajo de la superficie) y sedimentos superficiales (primeros 10 cm) en períodos de baja aplicación (cultivo de verano: julio de 2010; cultivo de invierno: abril de 2011), y de alta-aplicación (cultivo de verano: noviembre de 2010; cultivo de invierno: junio de 2011), cubriendo la campaña agrícola 2010-2011. Para comprender la distribución de plaguicidas a lo largo del río Suquía, las muestras se recolectaron en 5 sitios con variado uso del suelo (Fig 1.2). El primero está ubicado en La Calera (LC): 31°21'24.7" Sur; 64°23'18.7" Oeste, zona de sierra donde no se observan cultivos cercanos al río. Luego, aguas abajo de la ciudad de Córdoba, se encuentra el segundo sitio en Villa Corazón de María (CM): 31°26'50.1" Sur; 63°59'30.6" Oeste, cerca de 13 km después de la descarga de la EDAR y en una zona de cultivo de vegetales (cinturón verde). Posteriormente, en la cuenca baja los tres sitios son Río Primero (RP): 31°20'20.5" Sur; 63°36'35.2" Oeste, Santa Rosa de Río Primero (SR): 31° 9'26.15"Sur; 63°23'38.86"Oeste y La Para (LP): 30°55'1.10"Sur; 62°55'7.42"Oeste, todos ellos se encuentran ubicados en los principales centros agrícolas de la cuenca, donde el río está rodeado de grandes extensiones de superficies sembradas con cereales y oleaginosas.

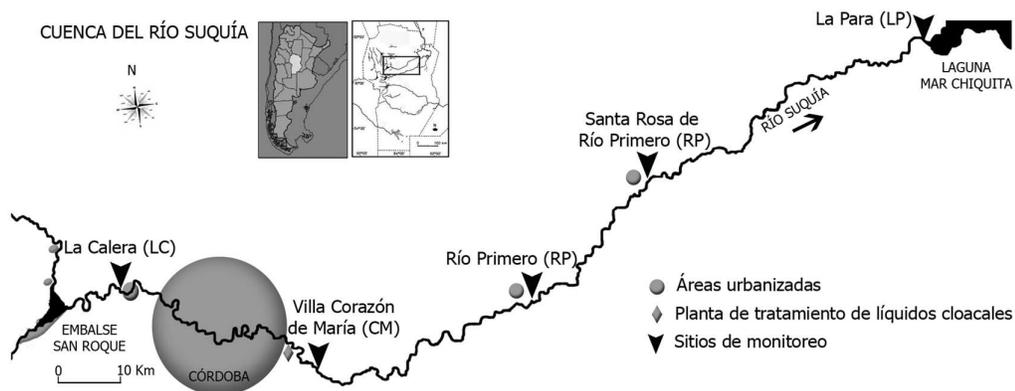


Figura 1.2: Área de estudio, cuenca del río Suquía. Se muestran los cinco puntos de muestreo: LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa y LP: La Para.

Para aportar a la descripción de cada sitio de muestreo se realizó una evaluación de las principales actividades antropogénicas que se practican en sus cercanías. Con ese fin, se consideró un radio de 1,5 km de distancia de cada punto, y se verificó por medio de imágenes satelitales los distintos usos del suelo. En cada área se pudo identificar el territorio urbano, la presencia de fábricas o sitios de extracción de áridos (considerados como actividad industrial); los campos destinados a la agricultura o ganadería (considerado actividad agropecuaria), zonas de vegetación sin aparente uso antrópico (considerada vegetación nativa), y la zona ocupada por los márgenes y el curso del río). Posteriormente, se realizó un cálculo del porcentaje de cada área ocupado por las distintas actividades antropogénicas o usos del suelo, los resultados se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Porcentajes de uso del suelo en las cercanías de cada sitio.

Sitio	% Urbano	% Industrial	% Agropecuaria	% Vegetación nativa	% río
La Calera	42,4	6,7	0,0	46,0	4,8
Villa Corazón de María	0,1	0,2	55,0	33,0	11,6
Río Primero	12,3	4,0	66,0	3,4	14,2
Santa Rosa de Río Primero	30,4	1,0	50,5	7,4	10,8
La Para	0,0	0,0	73,8	21,6	4,6

Las muestras de agua y sedimentos para la medición de plaguicidas apolares y semi-polares fueron recolectadas por duplicado en material de vidrio. Para la medición de glifosato y AMPA las muestras se colocaron en tubos de polipropileno. El material recolectado fue transportado al laboratorio refrigerado en hielo, donde fue procesado para la posterior conservación hasta su análisis. Para preservar los compuestos apolares y semi-polares, las muestras de agua se filtraron por membranas de 0,45 µm. Los filtros que contenían el material particulado en suspensión (MPS) se conservaron a -20 °C, mientras que las aguas filtradas se acidificaron con ácido clorhídrico (HCl) y se guardaron a 4 °C (Cortada et al., 2009). Los sedimentos se liofilizaron y conservaron a -20 °C. Para la medición de glifosato y AMPA las muestras de agua y sedimentos se guardaron sin tratamiento previo a -20 °C.

1.2.2 Análisis físico-químico de aguas y sedimentos

Se realizaron mediciones físicas y químicas para la caracterización de las muestras recolectadas en cada sitio. En agua se evaluó *in situ*: pH, conductividad, temperatura y oxígeno disuelto mediante el empleo de sondas, con un equipo multiparamétrico para trabajo de campo (Multiline F/Set 3), de acuerdo a la metodología estándar APHA, 2005 y AOAC (1995). En los sedimentos se determinó la granulometría, pH, conductividad y contenido de materia orgánica en laboratorio. Para determinar granulometría se utilizó un kit comercial (LaMotte-1067) basado en el principio de decantación. Para la medición de pH y conductividad se realizó una suspensión agua-suelo con una relación 1:2,5, luego se dejó en reposo durante 60 min y en agitación se midió con la sonda correspondiente (Klute, 1986). Para la valoración de la materia orgánica, la muestra se sometió a combustión húmeda con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 1 N y ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado durante 30 min. Posteriormente, el $K_2Cr_2O_7$ residual se tituló con sal de Mohr ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 0,5 N según Walkley y Black (1965).

1.2.3 Desarrollo del método combinado SPE + SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales

Los plaguicidas apolares y semi-polares elegidos para la evaluación de la contaminación agrícola en la cuenca de río Suquía fueron atrazina, acetoclor, clorpirifós, alfa-endosulfán, beta-endosulfán, cipermetrina y el producto de degradación de endosulfán, endosulfán sulfato (Tabla 1.1).

En aguas naturales se validaron dos procedimientos de extracción consecutivos: SPE y SPME. En sedimentos se validó la extracción HS-SPME. Para cumplir este propósito, se prepararon muestras con sobreagregado de los plaguicidas apolares y semipolares elegidos previamente. En aguas se adicionaron dos niveles de concentración 0,035 $\mu\text{g/L}$ para la SPE y 5 $\mu\text{g/L}$ para la SPME. Asimismo, en sedimentos se ensayó un nivel de 25 $\mu\text{g/kg}$. También se agregó PCB#103 como estándar interno.

En primer lugar se realizó la optimización de SPE para aguas, evaluando dos tipos de cartuchos: Licholut C18 (Merck) y Strata X (Phenomenex). Además con el cartucho SPE C18 se evaluó un cambio de solventes en el acondicionamiento del cartucho y en la elución de los analitos. Los cartuchos de SPE fueron acondicionados con 10 mL de diclorometano, seguido de 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua ultrapura (Procedimiento A). La modificación de solvente consistió en el acondicionamiento con

10 mL de diclorometano, seguido de 10 mL de metanol y 10 mL de agua ultrapura (Procedimiento B). Luego de la preparación de las columnas de extracción se procedió al pasaje de 1 litro de muestra de agua sobrealimentada con los estándares, a un flujo aproximado de 10 mL/min con la ayuda de vacío moderado. Los analitos retenidos en el cartucho fueron eluidos con 5 mL de acetonitrilo seguido de 5 mL de metanol (Procedimiento A) o intercambiando el orden de los solventes utilizados, primero 5 mL de metanol y luego 5 mL de acetonitrilo (Procedimiento B).

El paso siguiente fue la optimización del procedimiento de SPME. El mismo se realizó utilizando un muestreador automático Combi PAL (CTC Analytics, Suiza). Para ello, se adosa a este equipo una fibra polimérica que realiza la adsorción de los analitos de interés presentes en la muestra. El inyector posee un sector o estación de extracción, con la posibilidad de variar la velocidad de agitado, el tiempo y temperatura del proceso que favorecen la optimización del proceso de adsorción. Posteriormente, la fibra se desorbe en el inyector del GC-MS (Varian, USA) al que está acoplado. En este equipo se llevan a cabo la separación y detección de los compuestos. Por último, la fibra se limpia en la estación del muestreador automático destinado a tal fin. Este paso resulta importante para evitar la contaminación entre muestras, debida a residuos que puedan haber quedado adsorbidos a la misma. La SPME fue realizada por inmersión de la fibra en los eluatos de SPE, previamente evaporados bajo un flujo de nitrógeno gas y redisoluados con 100 μ L de acetona y 6.900 μ L de agua ultrapura.

Para la optimización del procedimiento SPME se utilizó un diseño factorial fraccionado para establecer con un mínimo número de pruebas la elección de las condiciones más favorables para la extracción. Sin embargo, debieron llevarse a cabo algunos ensayos previos para reducir el número de factores incluidos en el modelo. La primera de estas pruebas preliminares fue la selección del tipo de fibra a usar. Se probaron 4 variedades de fases adsorbentes: PDMS; polidimetilsiloxano (100 μ m), PA; poliacrilamida (85 μ m), CAR-PDMS; carboxeno-polidimetilsiloxano (75 μ m) y CAR-PDMS-DVB; carboxeno-polidimetilsiloxano-divinilbenceno (50 μ m). La segunda prueba se realizó con el fin de evaluar el tiempo y temperatura de desorción de la fibra en el inyector ensayándose dos tiempos: 5 y 10 min, y dos temperaturas: 250 °C y 280 °C. Una vez elegidas las condiciones a partir de estos ensayos previos, se procedió a la optimización simultánea de varios factores, mediante un diseño factorial fraccionado de dos niveles ($2^{(f-1)}$; f= número de factores evaluados). El uso de este tipo de diseño permite evaluar la influencia

e interacción de todos los factores con un menor número de análisis, en relación a un diseño factorial completo (2^f). El diseño factorial utilizado fue $2^{(3-1)}$, donde los factores que se consideraron fueron tres, cada uno con dos niveles: temperatura de adsorción a la fibra (50 °C y 70 °C), tiempo de adsorción a la fibra (20 min y 30 min) y pH de la muestra (pH=2 y pH=6).

1.2.4 Desarrollo del método HS-SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en sedimentos

La optimización del método HS-SPME se realizó sobre la base de algunas condiciones que se tomaron de bibliografía, como la utilización del espacio de cabeza (HS) para evitar que la fibra tome contacto con el sedimento o una suspensión del mismo, ya que son matrices complejas que causan mucha interferencia (Concha-Graña et al., 2010; Lambropoulou et al., 2006). Otra condición fija fue la evaluación de los plaguicidas en sedimentos liofilizados y tamizados para obtener la fracción cuyo tamaño de partícula es menor a 75 μm , debido a que en ese segmento está la mayor cantidad de materia orgánica y se espera encontrar los compuestos adsorbidos (Monferrán et al., 2011). Además, otros parámetros como el tipo de fibra a utilizar, el tiempo y temperatura de desorción en el inyector, se obtuvieron de los resultados de la optimización de la técnica SPME ya realizada en agua.

Por lo tanto, para la extracción de sedimentos se colocó en el vial una cantidad de muestra liofilizada y de fracción menor a 75 μm (tamizada), esta cantidad fue evaluada entre 0,5 y 1 g por un ensayo preliminar (resultados no mostrados). Luego se le agregó una cantidad conveniente de cloruro de sodio (NaCl), que fue optimizada comparando entre 0 y 20 %. Además, para favorecer la extracción se le agregó un volumen de agua, esta cantidad también fue optimizada comparando entre 1 mL y 2 mL. El vial con el sedimento fue colocado en el equipo y por medio del muestreador automático se comenzó el procesado de la muestra. El primer paso es de acondicionamiento, en éste se puede variar el tiempo, la temperatura y la agitación. El parámetro de tiempo de acondicionamiento fue evaluado por medio de ensayos preliminares, comparando entre 2 y 10 min (resultados no mostrados). Luego se introdujo la fibra en el espacio de cabeza y comenzó la extracción de los analitos presentes en la muestra. Finalmente la fibra se desorbió en el inyector del GC-MS para la cuantificación de los plaguicidas. En el proceso de extracción, la temperatura y el tiempo empleado fueron evaluados conjuntamente con la cantidad de NaCl y agua adicionados a la muestra. Para este

ensayo, se utilizó un diseño factorial fraccionado $2^{(4-1)}$, donde se evaluaron cuatro factores con dos niveles en cada uno: temperatura de extracción (70 °C y 100 °C), tiempo de extracción (20 min y 45 min), adición de cloruro de sodio (NaCl) (0 % y 20 %) a la muestra para su extracción y volumen de agua agregado a la muestra para su extracción (1 mL y 2 mL).

1.2.5 Desarrollo del método GC-MS para la determinación y cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares

La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en un equipo Varian Saturn 2200 (USA). Al cromatógrafo de gases se le colocó una columna capilar HP5 de 30 m de largo por 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de diámetro de partícula. El CG utilizado cuenta además con un inyector modelo 1079 con sello Merlin para trabajar en modo “split/splitless”. En el proceso de optimización de la separación se probaron distintas velocidades del flujo de gas y diferentes rampas de temperatura para lograr la mejor resolución de los picos generados por cada analito. Para la optimización de la identificación y cuantificación de los plaguicidas se varió la corriente de emisión, el tiempo de barrido de iones y el voltaje de amplificación, seleccionando los parámetros que favorecían la señal del grupo de compuestos que se quería determinar.

La detección de los compuestos se realizó en modo barrido completo “full scan” y luego, para la identificación y cuantificación de los plaguicidas, se seleccionaron experimentalmente los dos iones más abundantes y característicos de cada analito (los mismos se detallan en la sección 1.3.4). Las concentraciones de los plaguicidas fueron calculadas a partir de una curva de regresión lineal. Las mismas fueron construidas usando las áreas de los picos obtenidos en los correspondientes cromatogramas de cada analito en la solución estándar. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) del método se evaluaron experimentalmente considerando una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. La precisión se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variación porcentual (CV %) de cinco repeticiones. La linealidad del método fue verificada en un amplio intervalo de concentraciones entre LQ y 10 $\mu\text{g/L}$. Frecuentemente se analizaron blancos, que fueron intercalados entre los estándares y también entre las muestras, con el objetivo de verificar la ausencia de contaminación proveniente del

laboratorio o a residuos en la fibra de una muestra anterior, conocido como efecto memoria.

1.2.6 Extracción y derivatización de glifosato y AMPA en muestras de agua, sedimentos y material particulado en suspensión

Para la cuantificación de glifosato y su metabolito AMPA en muestras de agua, las mismas se derivatizaron sin la necesidad de una extracción previa. Se tomó una submuestra de 1 mL a la cual se le adicionó 50 μ L de solución amortiguadora de borato 400 mM ajustada a pH= 9. Luego se agregó 1 mL de 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) dejándose la mezcla de reacción en reposo toda la noche en oscuridad (Sancho et al., 1996 con modificaciones). Posteriormente se le agregó 2 mL de diclorometano para extraer el exceso del derivatizante. La fase acuosa se filtró por una membrana de 0,22 μ m y se inyectó en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detección de masas (HPLC-MS).

Los sedimentos y MPS debieron someterse a una extracción, para lo cual, se tomó una porción de 8 g de sedimento y los filtros con MPS obtenidos a partir del procesado de un litro de agua. A cada muestra se le agregó 25 mL de solución amortiguadora para la obtención de los compuestos de interés. Del extracto final se tomó 1 mL para realizar la derivatización de la misma forma que la realizada para agua, filtrando e inyectando como se explicó anteriormente. Previo a la derivatización, en todas las muestras se adicionó un estándar isotópico de glifosato (GLY*, 1,2- 13 C, 15 N) en concentración de 100 μ g/L en muestras de agua, 500 μ g/kg en sedimento y 0,5 μ g/L en MPS, usado como control interno.

1.2.7 Identificación y cuantificación de glifosato y AMPA

La cuantificación de glifosato y AMPA en aguas, sedimentos y MPS se realizó por HPLC-MS (Waters). Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Xselect C18 (Waters) a un flujo 0,4 mL/min. La fase móvil fue un gradiente metanol:agua ambos con el agregado de acetato de amonio a una concentración final de 5 mM. El gradiente utilizado en porcentajes de metanol fue el siguiente: 0 min, 10 %; 2,5 min, 10 %; 2,6 min, 90 %; 4,6 min, 90 %; 4,7 min, 10 %; y 10 min, 10 %. Para la detección de los compuestos la fuente de ionización por *electrospray* (ESI) se operó en modo negativo para la cuantificación y positivo para la confirmación de los compuestos. El detector de

MS se fijó en modo SIM siguiendo dos iones característicos para cada complejo con FMOC, siendo las relaciones masa/carga (m/z) monitoreadas 390 y 168 para glifosato-FMOC, 332 y 110 para AMPA-FMOC y 392 y 170 para GLY*-FMOC. Los LD y LQ obtenidos fueron en agua de 0,5 $\mu\text{g/L}$ y 1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, para sedimentos de 3 $\mu\text{g/kg}$ y 10 $\mu\text{g/kg}$ (LD y LQ, respectivamente) y para MPS 0,0003 $\mu\text{g/L}$ y 0,001 $\mu\text{g/L}$ LD y LQ, respectivamente.

El uso de GLY* permitió una mayor precisión en los resultados, debido a que fue cuantificado conjuntamente a los plaguicidas de interés en cada muestra analizada. La principal ventaja de su utilización se basa en la posibilidad de evaluar y corregir el efecto matriz, dicho efecto se refiere a la modificación de la señal del analito, sea aumento o disminución. La supresión iónica (disminución de la señal) es la interferencia más comúnmente informada en los análisis con fuentes ESI, producido por la interacción entre el ión procedente del compuesto de interés con otros iones formados en la cámara de electrospray (Zhao y Metcalfe, 2008). Los valores de supresión iónica observados en las muestras estudiadas fueron del 10 % para glifosato y del 25 % para AMPA. Además, otra ventaja es la posibilidad de evaluar la eficiencia de la extracción y reacción de derivatización en cada muestra analizada. A partir de estos resultados se calcularon los porcentajes de recuperación, variando entre 70 y 106 % para los dos compuestos en todas las matrices estudiadas.

La detección por MS permitió cuantificar los compuestos con gran especificidad, debido a la selección de iones característicos de los analitos de interés. Es por esta ventaja que se resuelve el problema de las interferencias que presentan muestras con alto contenido de materia orgánica, que generalmente afectan las mediciones con otros detectores como los de fluorescencia (FL) y ultravioleta (UV).

1.2.8 Análisis de datos

Se realizó un test de Shapiro-Wilks con el fin de probar la normalidad de los datos y una Prueba de Levene para homogeneidad de varianza de las variables medidas en las muestras ambientales. Dado que los datos no cumplieron con estos supuestos se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Dunn como test a posteriori (Sokal y Rohlf, 1999), utilizando la aplicación informática Infostat, 2002-2008. Las diferencias entre sitios o época de aplicación se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Los diseños factoriales fraccionados ($2^{(3-1)}$ y $2^{(4-1)}$) y el análisis de los resultados mediante

gráficos de Pareto y de interacciones se realizaron utilizando el paquete estadístico STATISTICA 8 (StatSoft Inc.)

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Análisis físico-químico de aguas y sedimentos

Para una comprensión más integral de la situación del río Suquía se evaluaron algunas características físico-químicas del agua y los sedimentos. Los resultados de los parámetros de calidad de agua mostraron variaciones significativas entre los distintos sitios (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Parámetros de calidad del agua medidos en cada sitio de muestreo en la cuenca del río Suquía. Letras diferentes, cuando se muestra, indican diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$).

Sitio	Agua			
	OD (mg/L)	CE (μ S/cm)	pH	Temp. ($^{\circ}$ C)
LC	10 \pm 3 ^C	268 \pm 28 ^A	8,1 \pm 0,2 ^B	17 \pm 7
CM	3 \pm 2 ^A	1388 \pm 156 ^C	7,5 \pm 0,2 ^A	21 \pm 8
RP	7 \pm 1 ^B	1106 \pm 248 ^B	7,7 \pm 0,2 ^{A,B}	21 \pm 9
SR	9 \pm 2 ^{B,C}	992 \pm 302 ^B	8,0 \pm 0,4 ^{A,B}	20 \pm 8
LP	9 \pm 2 ^{B,C}	1253 \pm 69 ^B	8,5 \pm 0,2 ^C	20 \pm 7

OD: Oxígeno Disuelto; CE: Conductividad Eléctrica; Temp: Temperatura; LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa y LP: La Para.

El aumento de la conductividad y la disminución del oxígeno disuelto y el pH, reflejaron el impacto negativo que produce la ciudad de Córdoba sobre la calidad de agua. Estas diferencias se evidenciaron significativamente en CM, como así también en RP, el sitio de monitoreo situado a 50 km aguas abajo de la ciudad de Córdoba. Esto indicó que el río Suquía, incluso a gran distancia de la principal fuente de contaminación (descarga de la EDAR), no pudo recuperar las condiciones detectadas en LC. Estudios previos ya evidenciaron que la descarga de EDAR es un importante ingreso de contaminantes al río, sin bien no el único. El ingreso de un afluente como La Cañada en el tramo del río que atraviesa la ciudad de Córdoba y las escorrentías urbanas también afectan la calidad del agua (Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Wunderlin et al., 2001).

Las características físico-químicas de los sedimentos medidos en cada sitio se muestran en la Tabla 1.4. A partir del análisis de granulometría y de acuerdo a lo indicado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1987), los sedimentos

fueron clasificados de la siguiente manera: CM y SR arenoso, LC y RP areno-limoso y LP limoso.

Tabla 1.4: Características físico-químicas de sedimentos medidos en cada sitio de muestreo en la cuenca del río Suquía. Letras diferentes, cuando se muestra, indican diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$).

Sitio	Sedimentos					
	MO %	CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	Granulometría		
				Arena %	Limo %	Arcilla %
LC	8 \pm 5 ^B	988 \pm 754	6,6 \pm 0,2 ^A	41 \pm 23	53 \pm 23	6 \pm 3
CM	5 \pm 4 ^{AB}	579 \pm 227	6,9 \pm 0,3 ^{AB}	54 \pm 22	40 \pm 25	5 \pm 4
RP	6 \pm 2 ^{AB}	740 \pm 226	6,9 \pm 0,3 ^B	36 \pm 22	63 \pm 22	3 \pm 1
SR	2 \pm 2 ^A	923 \pm 657	7,0 \pm 0,5 ^{BC}	57 \pm 7	39 \pm 5	5 \pm 6
LP	4 \pm 3 ^A	826 \pm 536	7,5 \pm 0,5 ^C	17 \pm 7	75 \pm 5	8 \pm 5

MO: Materia Orgánica; CE: Conductividad Eléctrica; LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa y LP: La Para.

Por otra parte, el mayor porcentaje de materia orgánica (MO %) se observó en LC, pudiendo provenir de la vegetación ribereña. Por el contrario, en SR y LP se encontraron los menores % MO. Además, CM y RP mostraron un % MO intermedio en la cuenca, mereciendo destacar que el sitio CM es un área de características arenosas y sin vegetación sobre los márgenes del río. Por lo tanto, se puede suponer que en este sitio la materia orgánica presente en los sedimentos proviene de la descarga de aguas residuales de EDAR. Por otro lado, los valores promedios de pH y conductividad mostraron un rango de 6,6–7,5 y de 579–988 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente, ambas medidas fueron similares a las reportadas por otros estudios realizados en la cuenca del río Suquía (Merlo et al., 2011).

1.3.2 Método combinado SPE + SPME para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales

Para la optimización de la extracción de plaguicidas en aguas naturales, en primer lugar fue necesario el ajuste del procedimiento de SPE. Los resultados de dichos ensayos se muestran en la Tabla 1.5. A partir de la comparación entre los distintos cartuchos probados, observamos que con Lichrolut C-18 se obtuvieron mayores porcentajes de recuperación que con Strata-X. Los valores alcanzados con Lichrolut C-18 fueron superiores al 60 % para casi todos los plaguicidas evaluados, excepto para cipermetrina

que se obtuvo un porcentaje de entre 24 % y 31 %. Por lo tanto el cartucho Lichrolut C-18 es el más conveniente para realizar la extracción de compuestos apolares y semi-polares en muestras de aguas naturales. Por otra parte, en relación a los procedimientos A y B evaluados se puede notar que los resultados obtenidos son similares por lo que se optó por diclorometano, metanol y agua para el acondicionamiento de los cartuchos, mientras que los solventes de elución fueron metanol y acetonitrilo, en ese orden (Procedimiento B).

Tabla 1.5: Porcentajes de recuperación obtenidos para aguas sobreagregadas con 5 µg/L de plaguicidas durante la comparación de la capacidad de extracción de dos cartuchos (Strata X y Lichrolut C-18) y dos procedimientos (A y B) para SPE.

Plaguicida	Cartucho y procedimiento		
	Strata X Procedimiento A	Lichrolut C18 Procedimiento A	Lichrolut C-18 Procedimiento B
Atrazina	93%	95%	104%
Acetoclor	86%	85%	85%
Clorpirifós	11%	68%	79%
Alfa- endosulfán	6%	60%	63%
Beta- endosulfán	42%	68%	72%
Endosulfán- sulfato	62%	91%	84%
Alfa- cipermetrina	19%	24%	31%

En segundo lugar se optimizó el procedimiento de SPME por medio de experimentos preliminares y luego se realizó un modelo factorial fraccionado. En los ensayos previos se evaluó la adsorción de distintos tipos de fibras (Fig 1.3).

La señal obtenida con la fibra CAR-PDMS-DVB fue mayor para atrazina, acetoclor y endosulfán sulfato, pero alfa-cipermetrina está claramente desfavorecida. Por el contrario, la fibra PDMS es la de mejor desempeño frente a alfa-cipermetrina, aunque la peor para atrazina. Por otro lado, la fibra CAR-PDMS dio las recuperaciones más bajas en todos los analitos ensayados. Finalmente, el uso de la fibra PA favorece la respuesta de clorpirifós, alfa-cipermetrina y muestra valores aceptables en el resto de los compuestos evaluados. Por lo tanto, se seleccionó esta última con el objetivo de beneficiar la extracción de piretroides debido a que presentan menor señal en la detección. Además, se consiguió una sensibilidad aceptable para la extracción simultánea de todos los compuestos investigados.

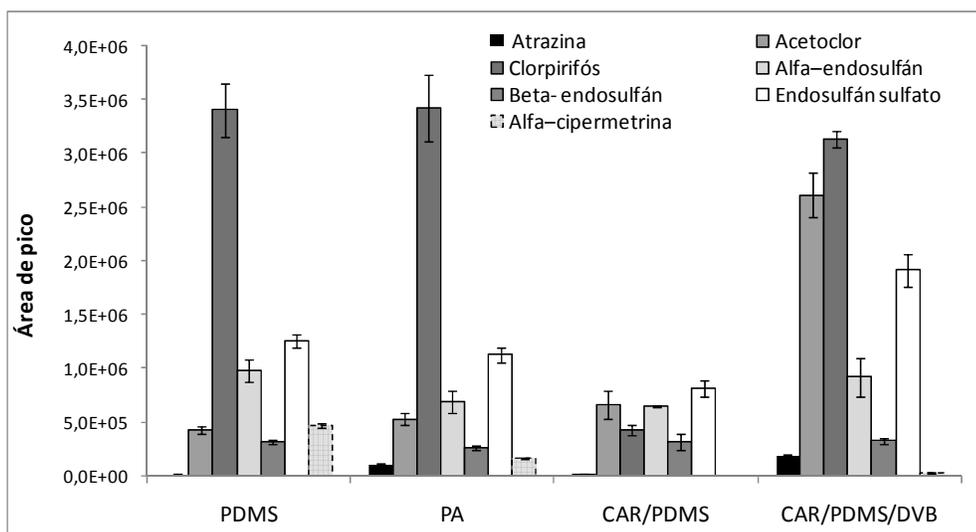


Figura 1.3: Áreas de los picos resultantes para cada plaguicida al utilizar distintos tipos de fibras durante SPME: PDMS; polidimetilsiloxano (100 μ m), PA; poliacrilamida (85 μ m), CAR-PDMS; carboxeno-polidimetilsiloxano (75 μ m) y CAR-PDMS-DVB; carboxeno-polidimetilsiloxano-divinilbenceno (50 μ m).

Posterior a la selección del tipo de fibra apropiada se realizó otro experimento preliminar al modelo factorial fraccionado. El ensayo tuvo la finalidad de establecer el tiempo y temperatura de desorción de la fibra en el inyector del GC-MS y los resultados se muestran en la Figura 1.4.

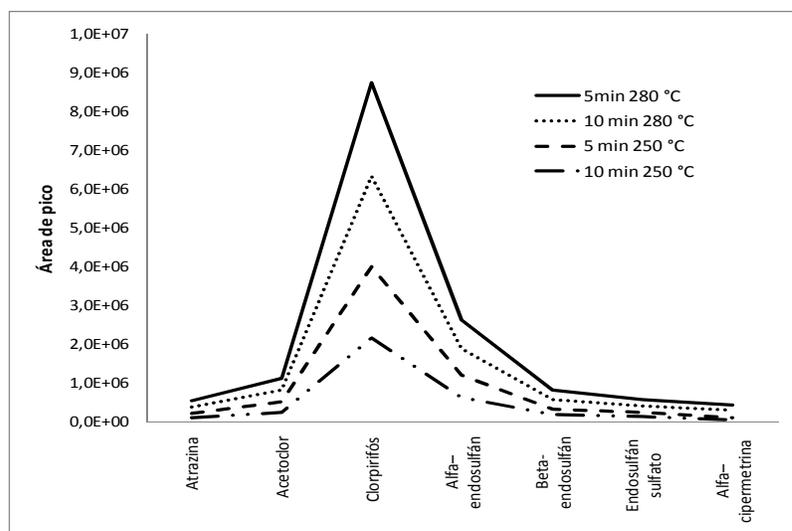


Figura 1.4: Áreas de los picos resultantes para cada plaguicida en comparación a distintos tiempos y temperaturas de desorción de la fibra PA: poliacrilamida (85 μ m).

Se observó que las mayores respuestas de los analitos de interés se obtuvieron en las condiciones 5 min y 280 °C. En tanto que, tiempos más largos de desorción producen una señal más baja, porque una vez que la mayoría de los analitos entraron a la columna del GC la apertura del inyector produce la dilución de la muestra.

A continuación, mediante el diseño factorial fraccionado se evaluaron 3 parámetros adicionales en la etapa de adsorción durante extracción con SPME: temperatura (50 °C y 70 °C), tiempo (20 min y 30 min) y pH de la muestra (pH= 2 y pH= 6). Los resultados fueron analizados en gráficos de Pareto y gráficos de interacciones que facilitaron la interpretación de los mismos, mostrándose los ejemplos más representativos en la Fig. 1.5).

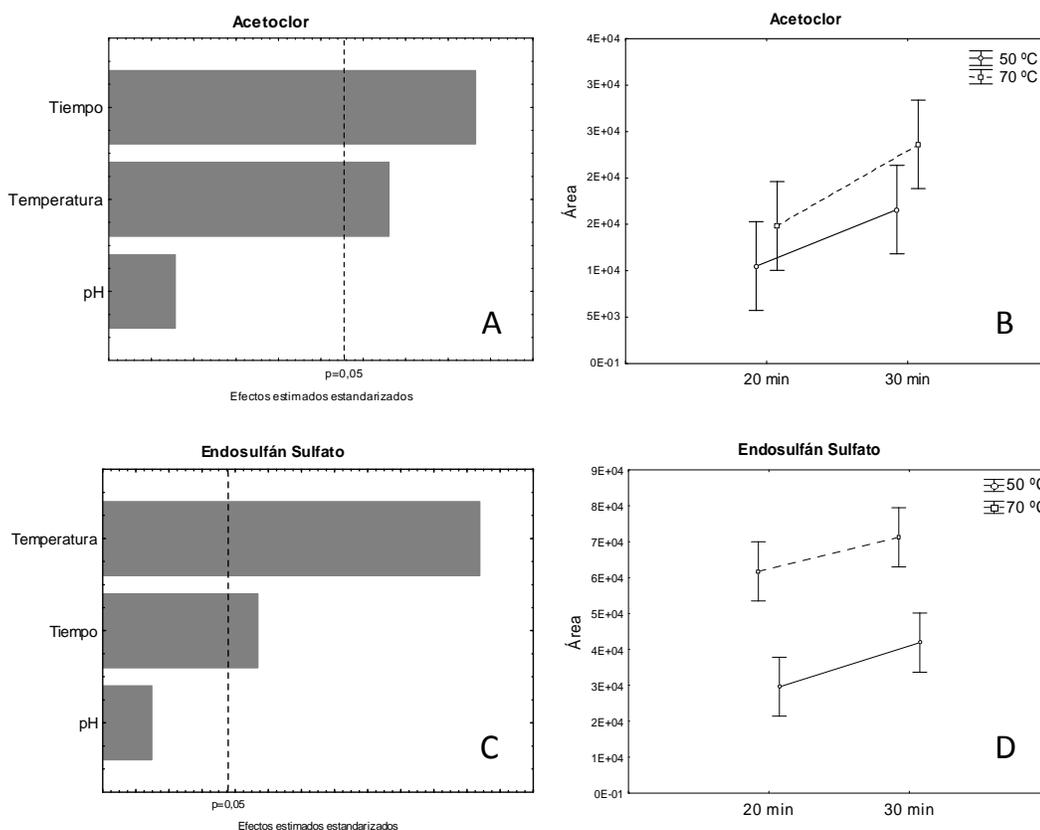


Figura 1.5: Gráficos de Pareto y de interacciones para acetoclor (A y B) y para endosulfán sulfato (C y D).

Los gráficos de Pareto muestran, en barras horizontales, la medida en la que afecta cada factor a la eficiencia del procedimiento estudiado. La longitud de las barras es proporcional al efecto del factor considerado. Además, estos gráficos incluyen una línea

vertical correspondiente al límite de significancia establecido para el nivel de confianza del 95 %. De este modo, se considera significativo todo aquel factor cuya barra supere dicha línea (Fernandez-Alvarez et al., 2008). En los ejemplos presentados se observó que para acetoclor el factor que más influyó en la extracción fue el tiempo seguido de la temperatura, los dos en forma significativa (Fig 1.5 A). Para endosulfán sulfato el factor que más efecto tuvo sobre su extracción fue la temperatura, seguido por el tiempo, también los dos en forma significativa (Fig. 1.5 C).

Los gráficos de interacciones nos dan información por medio de líneas, las cuales unen la respuesta encontrada en los dos niveles estudiados para cada factor. Las pendientes de estas rectas indican qué condición del factor favorece la extracción. Entonces, una pendiente positiva implica un aumento de la eficiencia del proceso estudiado al pasar del nivel bajo al nivel alto. Por el contrario, una pendiente de signo negativo implica que el proceso se ve desfavorecido en ese sentido. Para obtener mayor información, en el mismo gráfico pueden construirse las rectas correspondientes a dos factores. De esta forma, se pueden conocer las variaciones que se dan en la respuesta del segundo factor al modificar el primero o viceversa. En los ejemplos de acetoclor (Fig. 1.5 B) y endosulfán sulfato (Fig. 1.5 D) se graficó la interacción entre el tiempo y la temperatura de extracción. En los dos casos se observó pendiente positiva revelando que el mayor nivel, en este caso 30 min, benefició la extracción de estos analitos. Además, de las dos rectas graficadas, la superior fue la correspondiente a 70 °C, siendo por lo tanto esta temperatura la que incrementa la extracción de los dos plaguicidas en cuestión.

A partir del análisis de los gráficos generados para todos los compuestos evaluados se evidenció que la temperatura fue significativa en todos los casos, siendo este factor el más influyente para la mayoría de los plaguicidas. Al mismo tiempo, la extracción se vio favorecida a 70 °C para todos los compuestos con la excepción de alfa y beta endosulfán que presentaron mayor señal con 50 °C. El siguiente factor en importancia fue el tiempo de extracción, siendo estadísticamente significativo para la mayoría de los plaguicidas y 30 min el nivel más conveniente. Por último, el factor pH reflejó diferencias significativas para atrazina, clorpirifós, alfa-endosulfán y alfa-cipermetrina, siendo el nivel pH= 6 el ventajoso en todos los casos. En conclusión, las condiciones de extracción: 70 °C, 30 min y pH= 6 fueron las seleccionadas a partir del modelo factorial fraccionado porque mostraron ser las más eficaces para la extracción de estos plaguicidas.

Sobre la base de los resultados de la optimización de la metodología SPME, se propone utilizar las siguientes condiciones apropiadas (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Condiciones optimizadas para la extracción de plaguicidas apolares y semi-polares por SPME.

Factores estudiados	Óptimo
Adsorción	
Recubrimiento de fibra	PA
Temperatura de extracción	70 °C
Tiempo de extracción	30 min
pH de extracción	6
Desorción	
Tiempo de inyección	5 min
Temperatura de inyección	280°C
Factores fijos	
Modo de muestreo	Inmersión
Agitación	sí

PA: Poliacrilamida

Teniendo en cuenta las condiciones optimizadas de SPE y SPME se plantea una metodología combinada con la realización de estas técnicas en secuencia (Fig. 1.6).



Figura 1.6: Esquema de la extracción combinada de SPE y SPME para la determinación de plaguicidas apolares y semi-polares en aguas naturales.

La extracción de la muestra de agua comienza con el acondicionamiento de la SPE (Licholut C18) con 10 mL de diclorometano, 10 mL de metanol y 10 mL de agua milliQ a pH= 2. Luego se realiza el pasaje de 1 litro de muestra por la columna y finalmente se realiza la elución de los analitos adsorbidos en el cartucho con 5 mL de metanol y 5 mL de acetonitrilo. El eluato se recolecta en un vial para SPME, donde se evapora con nitrógeno gaseoso hasta sequedad. Los compuestos se redisuelven en 100 μ L de acetona y 6900 μ L de agua milliQ y se ajusta el pH a 6. A esta solución se le aplica la extracción SPME, sumergiendo la fibra PA en el extracto ya diluido, durante 30 min a 70 °C. Luego la fibra es desorbida durante 5 min a 280 °C en el inyector del GC-MS para la cuantificación de los plaguicidas.

Los resultados de la validación analítica del método demuestran la alta sensibilidad y confiabilidad en la cuantificación de los plaguicidas de interés. Los porcentajes de recuperación fueron superiores al 60 %, excepto para alfa-cipermetrina. La desviación encontrada varió entre 1,7 % y 14 % para todos los compuestos evaluados. Se obtuvo un rango lineal entre el LQ de cada plaguicida y 0,5 μ g/L. Los límites de detección y cuantificación fueron obtenidos experimentalmente, siendo la concentración con señal/ruido de 3 el LD y 10 el LQ. Para cada compuesto se definieron los siguientes límites: atrazina: 1,1 y 3,5 ng/L; acetoclor: 0,2 y 0,7 ng/L; clorpirifós: 0,2 y 0,7 ng/L; alfa-endosulfán: 0,1 y 0,5 ng/L; beta-endosulfán: 0,1 y 0,2 ng/L; endosulfán sulfato: 0,2 y 0,6 ng/L; y alfa-cipermetrina: 0,2 y 0,6 ng/L, respectivamente, resultando en todos los casos menores a los valores guía para protección de la biota acuática (CCEM, 2008; SRHN, 2003). Por lo que este método es útil para la realización de monitoreos ambientales que tengan el objetivo de establecer valores para preservar la salud de los organismos del hábitat acuático.

Las principales ventajas de esta técnica desarrollada fue conseguir LQ en el orden de los encontrados con metodologías de extracción simple y detección por GC-ECD (Mmualefe et al., 2009; Tomkins y Barnard, 2008), contando además con la mayor confiabilidad de la detección por GC-MS. Por otra parte, el método propuesto permite la medición de plaguicidas de diferentes familias, incluyendo triazinas, acetamidas, organofosforados, organoclorados y piretroides. Por lo que también se podría aplicar a la cuantificación de otros compuestos que compartan similares estructuras químicas.

1.3.3 Método optimizado para extracción de plaguicidas apolares y semi-polares en sedimentos.

A partir de las pruebas realizadas con diferentes cantidades de muestra de sedimentos, se pudo evidenciar que con 1 g se observan mejoras en la extracción. Si bien la mayor masa utilizada produjo un aumento del efecto matriz, el incremento de la señal de los analitos de interés fue más significativo (datos no mostrados). Por otra parte, fue necesario realizar un acondicionamiento previo a la extracción para aumentar la presencia de los plaguicidas en el espacio de cabeza del vial. Los resultados de los diferentes tiempos probados indican que 10 min de acondicionamiento mejoran la posterior adsorción con la fibra (datos no mostrados).

Una vez seleccionados los parámetros anteriores se procedió a la evaluación con el diseño factorial fraccionado de los siguientes factores: temperatura de extracción (70 °C y 100 °C), tiempo de extracción (20 min y 45 min), adición de NaCl (0 % y 20 %) y volumen de agua agregado a la muestra (1 mL y 2 mL). Los resultados fueron analizados en gráficos de Pareto y gráficos de interacciones, mostrándose los casos más representativos en la Fig. 1.7). Para los plaguicidas evaluados en la extracción de sedimentos, el factor más importante fue la temperatura de extracción, siendo significativo para casi todos los compuestos, excepto para alfa-cipermetrina (Fig. 1.7 A, C y E). En los casos significativos se observó favorecida la extracción a 100 °C (Fig. 1.7 B, D y F). El segundo factor influyente en la metodología fue el tiempo de extracción, resultando significativo para acetoclor (Fig. 1.7 C), alfa-endosulfán y beta-endosulfán. En relación a este último parámetro se demostró que 30 min aumentaba la recuperación de estos tres compuestos (Fig. 1.7 D). La adición de NaCl resultó significativa solamente para atrazina, beneficiando al procedimiento el agregado de 20 % de esta sal (Fig. 1.7 A y B). Esta mayor respuesta observada para atrazina puede ser explicada por el aumento de la fuerza iónica de la solución de la muestra, causado por la presencia de las sales. Dicho cambio produce el pasaje de una mayor cantidad de analito de interés a otras fases del sistema, como el espacio de cabeza y la fibra (Monferrán et al., 2009). En último lugar, el volumen de agua agregado mostró significancia para clorpirifós, siendo mayor el resultado con 2 mL de agua (Fig. 1.7 E y F).

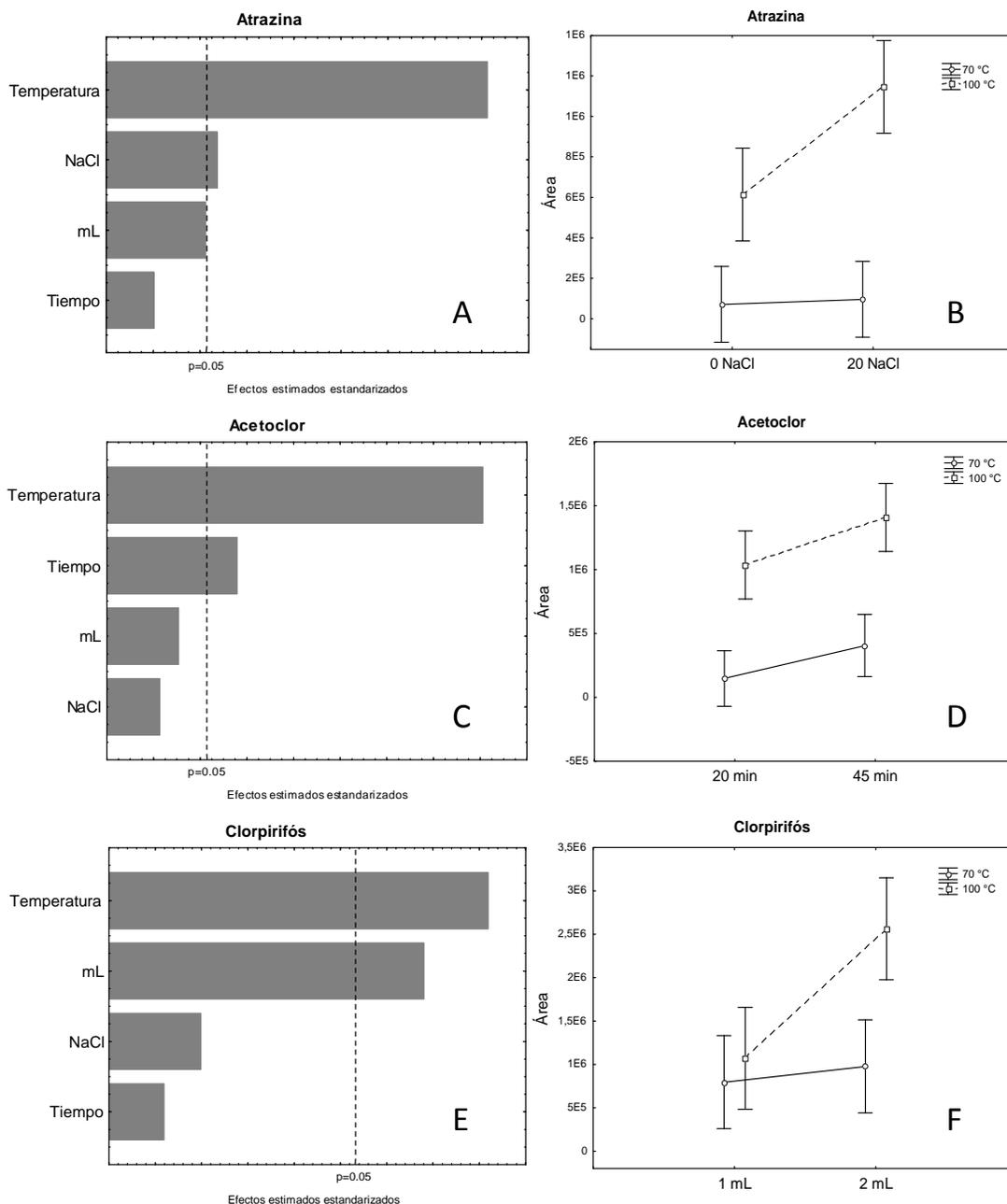


Figura 1.7: Gráficos de Pareto y de interacciones para atrazina (A y B), acetochlor (C y D) y clorpirifós (E y F) en muestras de sedimentos.

Concluyendo, con los resultados observados se plantea una metodología optimizada de HS-SPME para la extracción de plaguicidas en sedimentos (Fig. 1.8). El procedimiento consistió en la toma de una sub-muestra de 1 g de sedimento de la fracción < 75 μm , a la que se le agregó 0.1 g de NaCl y 2 mL de agua ultrapura (NaCl 20 % en un volumen de 2 mL). Se procedió al acondicionamiento a 100 °C durante 10 min, con

agitación. Luego, se introdujo la fibra PA en el espacio de cabeza del vial, que se mantuvo a 100 °C durante 45 min también con agitación. Por último, la desorción en el inyector del GC-MS se realizó a 280 °C durante 5 min para la cuantificación de los plaguicidas.

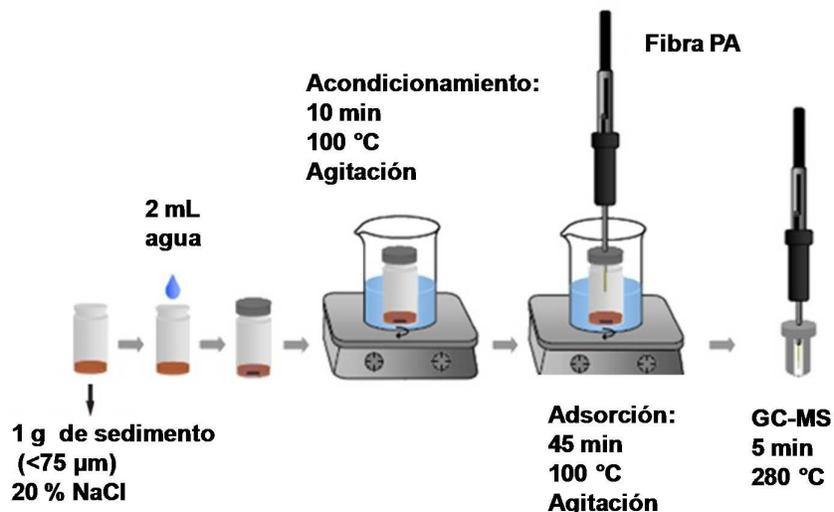


Figura 1.8: Esquema de extracción para la determinación de plaguicidas en sedimentos por HS-SPME.

Los parámetros analíticos de calidad de esta técnica fueron evaluados utilizando una muestra de sedimento con sobreagregado de 25 µg/kg de los plaguicidas de interés. Los porcentajes de recuperación fueron superiores al 70 % para todos los analitos. La desviación encontrada varió entre 2,6 % y 18 % y la respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones entre el LQ de cada plaguicida y 1000 µg/kg. Los límites de detección (señal/ruido= 3) y cuantificación (señal/ruido= 10) alcanzados fueron para atrazina: 0,1 y 1,3 µg/kg; acetoclor: 1,3 y 6,3 µg/kg; clorpirifós: 0,05 y 0,1 µg/kg; alfa-endosulfán: 0,9 y 4,4 µg/kg; beta-endosulfán: 1,9 y 3,8 µg/kg; endosulfán sulfato: 12,5 y 18,8 µg/kg; alfa-cipermetrina: 6,3 y 12,5 µg/kg, respectivamente.

La metodología optimizada en esta tesis presenta similar sensibilidad con LQ informados en otros trabajos publicados previamente. Límites mayores (1-150 µg/kg) se obtuvieron en un estudio donde se realizó USE acoplada a detección con GC-MS (Sánchez-Avila et al., 2011). Por otra parte, límites similares (1,4-4,6 µg/kg) se consiguieron con una técnica de extracción de alta eficiencia utilizando PLE acoplada a detección con GC-MS (Schreck et al., 2008). Fernandez-Alvarez et al. (2008) también obtuvieron límites equivalentes (0,01-4 µg/kg) utilizando HS-SPME, pero acoplada a detección con GC-ECD.

La metodología aquí presentada tiene la ventaja de realizar una separación previa de la fracción más importante a ser evaluada para compuestos orgánicos, procedimiento que mejora significativamente los límites de cuantificación.

1.3.4 Método GC-MS para la cuantificación de plaguicidas apolares y semi-polares

A partir de la evaluación de distintas condiciones cromatográficas para lograr la separación de los compuestos de interés y de las condiciones de detección de los mismos, se concluyó en el siguiente método final optimizado: Flujo de gas Helio 1,6 mL/min, rampa de temperatura: inicia a 100 °C donde se mantiene por 1 min; luego aumenta de 100 °C a 150 °C a una velocidad de 25 °C/min, de 150 °C a 200 °C a una velocidad de 10 °C/min, de 200 °C a 250 °C a una velocidad de 30 °C/min manteniéndose a esa temperatura por 10,33 min y finalmente aumenta de 250 °C a 280 °C a una velocidad de 30 °C/min manteniéndose 2 min más, con un tiempo total de corrida de 25 min lográndose la separación de todos los compuestos en estudio (Fig 1.9).

Los parámetros optimizados de la espectrometría de masas fueron: 40 μ A de corriente de emisión, 0,8 s en tiempo de barrido de iones y 200 Volt de amplificación. El modo de monitoreo fue barrido completo “full scan” en un rango entre 100-500 m/z, y para la cuantificación se eligieron dos iones característicos para cada compuesto: atrazina 200 y 215 m/z, acetoclor 146 y 223 m/z, clorpirifós 314 y 258 m/z, alfa-endosulfán y beta-endosulfán 195 y 241 m/z, endosulfán sulfato 272 y 387 m/z, alfa-cipermetrina 163 y 181 m/z. Este método permitió la detección selectiva de los plaguicidas de interés, siendo identificados de una mezcla compleja por su tiempo de retención y la presencia de iones característicos.

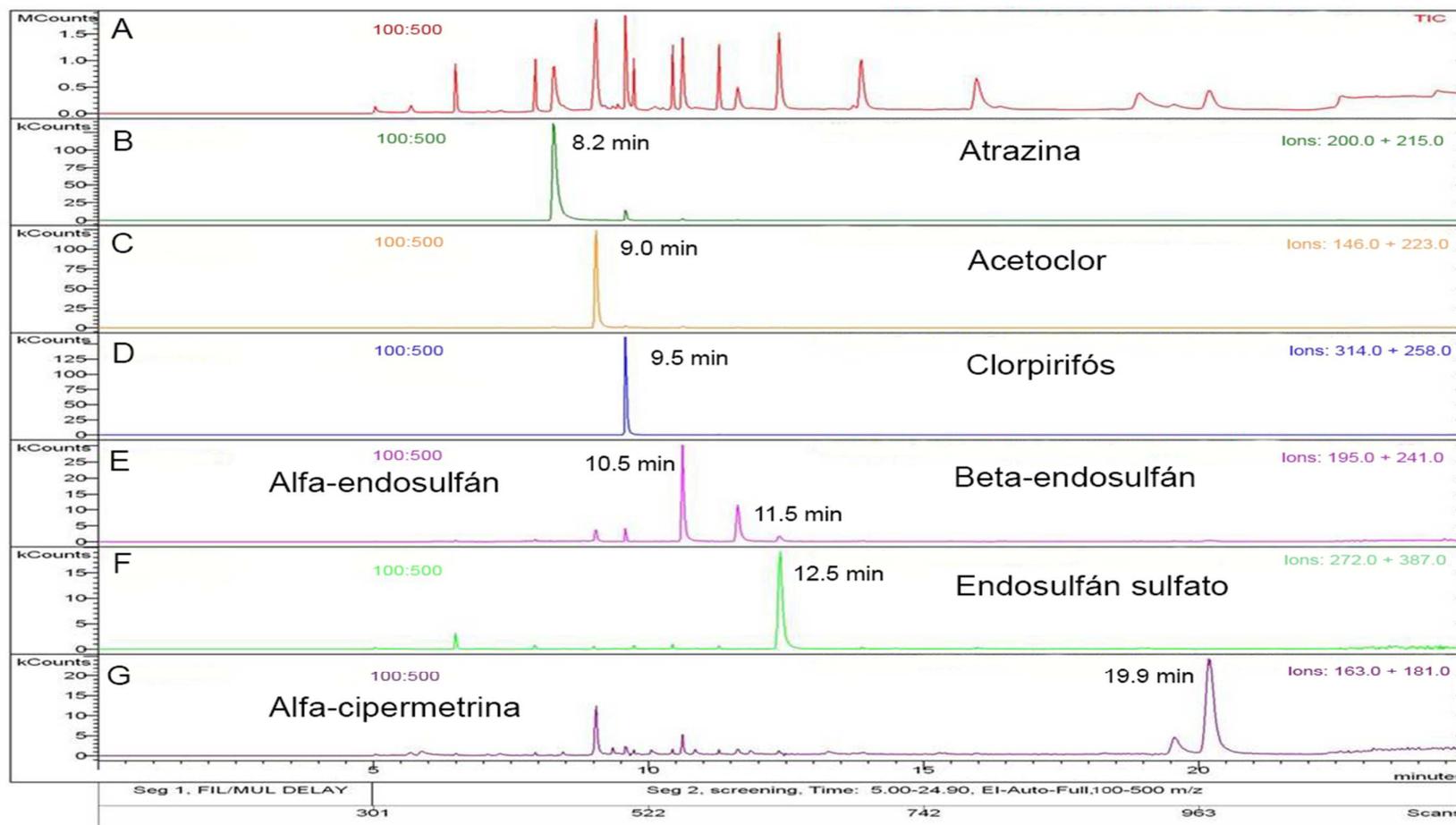


Figura 1.9: Cromatogramas obtenidos del análisis de una mezcla de estándares de los plaguicidas de interés 5 µg/L. (A) full scan 100-500 m/z y (B-G) iones extraídos de cada compuesto con su respectivo tiempo de retención.

1.3.5 Distribución de plaguicidas en aguas, material particulado en suspensión y sedimentos de río Suquía

La distribución temporal y espacial de la contaminación de plaguicidas se evaluó en los 5 sitios a lo largo del río Suquía, durante la campaña agrícola 2010-2011. Los plaguicidas apolares y semi-polares elegidos para el monitoreo fueron atrazina, acetoclor, clorpirifós, alfa-endosulfán, beta-endosulfán, alfa-cipermetrina y el producto de degradación endosulfán sulfato. Por otro lado, se investigó la presencia de glifosato y su producto de degradación AMPA, en agua, MPS y sedimentos. En la Tablas 1.7, 1.8 y 1.9 se muestran los resultados de las concentraciones de plaguicidas presentados como valores medios, mínimos y máximos de las cuatro fechas de muestreo agrupadas como período anual, de baja y alta aplicación para agua, sedimentos y MPS, respectivamente. Además, se muestra la sumatoria de los promedios anuales de todos los compuestos determinados por matriz en cada sitio.

Los resultados revelaron la presencia de al menos uno de los analitos analizados en todos los sitios de monitoreo, concluyéndose que ningún lugar evaluado está libre de contaminación con plaguicidas, incluso LC donde no se desarrolla una actividad agrícola intensiva. Por otro lado, se evidenció que de un total de 140 muestras analizadas, el 47 % fueron positivas, porcentaje que denota la alta probabilidad de encontrar estos contaminantes en el río, a pesar de haberse evaluado sitios con distintos usos de suelo y en diferentes períodos en relación a la aplicación.

Los plaguicidas estudiados fueron cuantificados en concentraciones de distintos órdenes de magnitud en las diferentes matrices ambientales evaluadas. En general, en aguas, el grupo de los compuestos apolares y semi-polares se cuantificaron en el orden de los ng/L, mientras que glifosato y AMPA se encontraron en concentraciones mayores, en el orden de µg/L. En las muestras de sedimentos los analitos detectados alcanzaron en algunos casos niveles de mg/kg. Por otra parte, las concentraciones de glifosato y AMPA encontradas en MPS fueron en el orden de ng/L.

Tabla 1.7: Concentraciones de plaguicidas en aguas de la cuenca de río Suquía. Letras diferentes, cuando se muestran, indican diferencias significativas entre los sitios ($p < 0.05$). Los valores se expresan en ng/L o µg/L.

Plaguicida	Período	Sitio														
		LC			CM			RP			SR			LP		
		Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Atrazina (ng/L)	Anual	0,6	< LD	4,8	8,0	< LD	64,0	47,4	< LD	190,0	95,6	< LD	434,0	15,0	< LD	69,6
	Baja	< LD	< LD	< LD	16,0	< LD	64,0	59,3	< LD	190,0	1,3	< LD	5,4	< LD	< LD	< LD
	Alta	1,2	< LD	4,8	< LD	< LD	< LD	35,4	< LD	76,0	190,0	< LD	434,0	30,0	4,8	69,6
Acetoclor (ng/L)	Anual	2,0	< LD	12,4	4,3	< LD	17,0	7,2	< LD	15,8	6,3	< LD	31,0	3,8	0,5	2,0
	Baja	3,4	0,1	12,4	6,2	1,3	17,0	8,8	3,4	15,8	4,9	0,81	8,8	2,2	1,3	3,2
	Alta	0,7	< LD	1,4	2,4	< LD	6,4	5,6	< LD	10,6	7,8	< LD	31,0	5,4	0,5	9,6
Clorpirifós (ng/L)	Anual	0,6 ^A	< LD	2,6	2,8 ^{B,C}	< LD	5,5	3,5 ^C	2,5	5,6	1,3 ^{AB}	< LD	3,1	0,7 ^A	< LD	2,6
	Baja	<LD ^A	< LD	< LD	2,2 ^{AB}	< LD	5,5	3,2 ^B	2,7	3,6	1,4 ^{AB}	< LD	3,1	< LD ^A	< LD	< LD
	Alta	1,3 ^{AB}	< LD	2,6	3,3 ^C	2,6	5,1	3,9 ^{B,C}	2,5	5,6	1,2 ^B	< LD	2,5	1,3 ^{AB}	< LD	2,6
Alfa-endosulfán (ng/L)	Anual	0,6	< LD	4,6	0,4	< LD	2,0	0,3	< LD	2,0	0,2	< LD	1,5	1,2	< LD	6,4
	Baja	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	1,6	< LD	6,4
	Alta	1,2	< LD	4,6	0,9	< LD	2,0	0,6	< LD	2,0	0,4	< LD	1,5	0,7	< LD	2,7
Beta-endosulfán (ng/L)	Anual	< LD	< LD	< LD	0,7	< LD	4,9	1,8	< LD	9,2	0,1	< LD	0,7	< LD	< LD	< LD
	Baja	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	2,3	< LD	9,2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Alta	< LD	< LD	< LD	1,4	< LD	4,9	1,2	< LD	3,7	0,3	< LD	0,7	< LD	< LD	< LD
Endosulfán sulfato (ng/L)	Anual	5,0	< LD	17,8	5,1	< LD	19,0	7,4	< LD	41,7	1,6	< LD	3,8	15,5	< LD	106,7
	Baja	2,8	< LD	8,7	4,0	< LD	8,0	2,6	< LD	9,6	1,0	< LD	3,2	0,8	< LD	3,2
	Alta	7,3	1,6	17,8	6,3	< LD	19,0	12,2	0,6	41,7	2,2	< LD	3,8	30,2	< LD	106,7
Alfa-cipermetrina (ng/L)	Anual	36,4	< LD	121,7	26,0	< LD	93,0	28,4	< LD	105,0	33,0	< LD	112,0	34,0	< LD	107,0
	Baja	23,1	< LD	91,6	20,0	< LD	81,0	19,4	< LD	77,6	22,0	< LD	85,0	22,0	< LD	89,0
	Alta	49,7	< LD	121,7	32,0	< LD	93,0	37,5	< LD	105,0	45,0	< LD	112,0	45,0	< LD	107,0
Glifosato (µg/L)	Anual	17,5	< LD	70,0	35,2	< LD	125,0	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Baja	35,0	< LD	70,0	62,5	< LD	125,0	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Alta	< LD	< LD	< LD	7,9	< LD	15,8	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
AMPA (µg/L)	Anual	< LD	< LD	< LD	0,6	< LD	2,2	2,1	< LD	4,8	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Baja	< LD	< LD	< LD	1,1	< LD	2,2	1,9	< LD	3,7	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Alta	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	2,4	< LD	4,8	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Σ Plaguicidas (µg/L)	Anual	17,55	< LD	70,16	35,85	< LD	127,40	2,20	0,003	5,17	0,14	< LD	0,59	0,07	0,001	0,29
	Baja	35,03	< LD	70,11	63,65	0,001	127,38	1,95	0,006	4,00	0,03	0,001	0,11	0,03	0,001	0,10
	Alta	0,06	0,002	0,15	7,95	0,003	15,93	2,50	0,003	5,04	0,25	< LD	0,59	0,11	0,005	0,30

LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa; LP: La Para y LD: Límite de detección.

Tabla 1.8: Concentraciones de plaguicidas en sedimentos de la cuenca de río Suquia. Letras diferentes, cuando se muestran, indican diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$). Los valores se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Plaguicida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Período	Sitio														
		LC			CM			RP			SR			LP		
		Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Atrazina	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Acetoclor	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Clorpirifós	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alfa- endosulfán	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Beta- endosulfán	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Endosulfán - sulfate	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alfa-cipermetrina	Anual	<LD	<LD	<LD	4,4	<LD	22,0	37,9	<LD	303,2	27,8	<LD	222,4	172,4	<LD	1378,9
	Baja	<LD	<LD	<LD	5,5	<LD	22,0	75,8	<LD	303,2	55,6	<LD	222,4	344,7	<LD	1378,9
	Alta	<LD	<LD	<LD	3,2	<LD	13,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Glifosato	Anual	<LD	<LD	<LD	615	<LD	1882	62	<LD	169	90	<LD	139	105	<LD	382
	Baja	<LD	<LD	<LD	1231	<LD	1882	39	<LD	79	131	<LD	139	191	<LD	382
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	84	<LD	169	49	<LD	74	19	<LD	38
AMPA	Anual	<LD	<LD	<LD	67	<LD	266	97	<LD	222	73	<LD	196	23	<LD	90
	Baja	<LD	<LD	<LD	133	<LD	266	64	<LD	66	98	<LD	196	45	<LD	90
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	130	<LD	222	48	<LD	72	<LD	<LD	<LD
Σ Plaguicidas	Anual	<LD	<LD	<LD	686,4	<LD	2170,0	196,9	<LD	694,2	190,8	<LD	557,4	300,4	<LD	1850,9
	Baja	<LD	<LD	<LD	1369,5	<LD	2170,0	178,8	<LD	448,2	284,6	<LD	557,4	580,7	<LD	1850,9
	Alta	<LD	<LD	<LD	3,2	<LD	13,0	214,0	<LD	391,0	97,0	<LD	146,0	19,0	<LD	<LD

LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa; LP: La Para y LD: Límite de detección.

Tabla 1.9: Concentraciones de plaguicidas en MPS de la cuenca de río Suquía. Letras diferentes, cuando se muestran, indican diferencias significativas entre los sitios ($p < 0.05$). Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$.

Plaguicida ($\mu\text{g/L}$)	Período	Sitio														
		LC			CM			RP			SR			LP		
		Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Glifosato	Anual	<LD	<LD	<LD	0,009	<LD	0,035	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	0,018	<LD	0,035	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
AMPA	Anual	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,010	<LD	0,038	0,014	<LD	0,056	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,019	<LD	0,038	0,028	<LD	0,056	<LD	<LD	<LD
Σ Plaguicidas	Anual	<LD	<LD	<LD	0,009	<LD	0,035	0,010	<LD	0,038	0,014	<LD	0,056	<LD	<LD	<LD
	Baja	<LD	<LD	<LD	0,010	<LD	0,035	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Alta	<LD	<LD	<LD	<LD8	<LD	<LD	0,010	<LD	0,038	0,028	<LD	0,056	<LD	<LD	<LD

LC: La Calera; CM: Villa Corazón de María; RP: Río Primero; SR: Santa Rosa; LP: La Para y LD: Límite de detección.

Glifosato exhibió las mayores concentraciones en todas las matrices evaluadas, con un máximo en agua de 125 µg/L, en sedimento 1882 µg/kg y en MPS 0,035 µg/L. Este herbicida es el número uno en ventas en nuestro país, donde se emplean 182 millones de litros por año (CASAFE, 2013). Es un compuesto polar, de alta solubilidad en agua (11,6 g/L, 25 °C), características que favorecen la distribución en los sistemas acuáticos. La vida media de glifosato en agua varía entre 2 y 91 días (WHO, 1994). Si bien su persistencia es relativamente corta comparada con otros plaguicidas, cuando se une a partículas de suelo o sedimento, se vuelve más persistente pudiendo estar presente hasta 215 días (Grunewald et al., 2001). El principal producto de la degradación microbiana de glifosato, el AMPA, fue el segundo compuesto más concentrado en agua con un máximo 4,8 µg/L y en MPS con un máximo de 0,056 µg/L. Además, fue el tercero en valores encontrados en sedimentos, presentando un máximo de 266 µg/kg. El AMPA se considera más persistente que su precursor mostrando un rango de vida media en suelo de 76 a 240 días (Annett et al., 2014). Los resultados de las muestras de MPS se mostraron en µg/L, ya que de esta forma, el valor se puede referenciar al compartimiento ambiental, debido a que el MPS está distribuido en la columna de agua. Sin embargo, las concentraciones expresadas en µg/kg fueron similares a las concentraciones encontradas en sedimentos. Por lo tanto, a partir de las mayores concentraciones encontradas en MPS (considerando los resultados en µg/kg) y sedimento en relación al agua, se puede verificar la alta afinidad de glifosato y AMPA a las partículas de los compartimientos sólidos (Wauchope et al., 1992).

El siguiente plaguicida en nivel decreciente de concentración fue alfa-cipermetrina, por ser el segundo compuesto de mayor concentración en sedimentos, presentando un máximo de 1378,9 µg/kg. Además, es el cuarto en valores encontrados en agua con un máximo de 121,7 ng/L. Su presencia puede ser atribuida al uso como insecticida agrícola, pero también a su utilización doméstica para controlar cucarachas, mosquitos entre otros insectos. Cabe destacar que su concentración en sedimentos es muy superior a lo encontrado en agua, lo que confirma su mayor afinidad por este compartimiento ambiental (Mugni et al., 2011). Luego, atrazina mostró una concentración máxima en agua de 434,0 ng/L, pero con niveles por debajo del LD del método en sedimentos. La presencia de atrazina puede deberse a su amplio uso como herbicida agrícola y a su relativa persistencia en aguas superficiales, con una vida media de 159 días (Solomon et al., 2008).

Por otra parte, las concentraciones en agua de endosulfán sulfato mostraron un máximo de 106,7 ng/L, siendo mayores a las de alfa-endosulfán y beta-endosulfán, que presentaron máximos de 6,4 ng/L y 9,2 ng/L, respectivamente. Estos tres compuestos se encontraron por debajo del LD del método en las muestras de sedimentos. Endosulfán, tanto alfa como beta, tiene una vida media en agua de 3 a 7 días, pero su metabolito, que también presenta toxicidad biológica, el endosulfán sulfato, tiene una vida media de varias semanas (Leonard et al., 1999). Esto explicaría las mayores concentraciones encontradas de endosulfán sulfato en agua. Estos resultados son similares a los cuantificados en muestras recolectadas en la laguna Mar Chiquita (Ballesteros et al., 2014).

Las mediciones realizadas de acetoclor revelaron un máximo de 31 ng/L en agua y concentraciones menores al LD en sedimentos. Este agroquímico es un herbicida comúnmente utilizado en todo el mundo y debido a su bajo coeficiente de adsorción en suelos raramente se lo encuentra en esta matriz o una matriz similar, como es el caso de los sedimentos en los ríos. Por el contrario, esta baja afinidad le infiere un riesgo potencial de contaminar ecosistemas acuáticos (Lengyel y Földényi, 2003). Acetoclor estuvo presente en casi la totalidad de las muestras de agua analizadas (92 %) evidenciando la gran distribución que tiene este contaminante en toda la cuenca del río Suquía.

Por último, se encontró clorpirifós con una concentración máxima de 5,6 ng/L en agua y niveles por debajo del LD en sedimentos. La presencia de este insecticida en agua del río puede atribuirse a su amplio uso en los cultivos de cereales, algodón, frutas y verduras así como a su aplicación doméstica como insecticida en césped y plantas ornamentales. En agua este plaguicida tiene una vida media de 35 a 78 días lo que sumado a su frecuente uso favorece su presencia en la columna de agua (EXTOXNET, 1996).

La comparación de las cantidades totales de plaguicidas, mostradas como la suma de los promedios en la Tablas 1.7, 1.8 y 1.9, reflejó que el sitio más contaminado fue CM, con una concentración de plaguicidas en agua de 35,85 µg/L, en sedimentos de 686,4 µg/kg y en MPS de 0,009 µg/L. Esta contaminación se deduce que podría provenir de dos fuentes: por el uso de estos compuestos en los cultivos del cinturón verde y además, por su uso urbano para contrarrestar las plagas del hogar. La llegada de los

plaguicidas de uso doméstico al río podría darse por escorrentía o bien por la descarga de las aguas residuales insuficientemente tratadas por la EDAR de la ciudad de Córdoba.

El sitio siguiente en contaminación fue LP, con una concentración de plaguicidas en agua de 0,07 $\mu\text{g/L}$, en sedimentos de 300,4 $\mu\text{g/kg}$ y por debajo del límite de detección en MPS. Posteriormente, con similar grado de contaminación se posicionaron RP y SR. El primero tuvo una concentración de plaguicidas en agua de 2,20 $\mu\text{g/L}$, en sedimentos de 196,9 $\mu\text{g/kg}$ y en MPS de 0,01 $\mu\text{g/L}$. SR mostró valores de plaguicidas en agua de 0,14 $\mu\text{g/L}$, en sedimento de 190,8 $\mu\text{g/kg}$ y en MPS de 0,014 $\mu\text{g/L}$. Estos tres sitios: LP, RP y SR pertenecen a la cuenca baja del río Suquía y están ubicados en las principales zonas agrícolas de la provincia de Córdoba. En la proximidad de los sitios estudiados se encuentran grandes extensiones de cultivos, fundamentalmente de cereales y oleaginosas, que en algunas zonas llegan hasta una escasa distancia de la orilla del río y que podrían ser la fuente de estos plaguicidas en el agua.

Por último, el sitio menos contaminado fue LC con concentración de plaguicidas en agua de 17,6 $\mu\text{g/L}$ y concentraciones en el sedimento y MPS por debajo del límite de detección. Los compuestos que más contribuyeron a la contaminación fueron glifosato, alfa-cipermetrina y endosulfán sulfato. La presencia de glifosato podría atribuirse a fuentes puntuales, como la limpieza de máquinas de fumigación a la orilla del río, el descarte de los recipientes con restos de herbicidas o al uso doméstico esporádico. Debido a que este herbicida, fue cuantificado sólo en agua, en ausencia de su metabolito AMPA y únicamente en un muestreo. Por otro lado, alfa-cipermetrina podría estar asociada a su uso urbano. Ya que este insecticida estuvo presente en agua en concentraciones similares en todos los sitios de muestreo, y durante los cuatro períodos estudiados. La presencia de endosulfán sulfato puede ser explicada por la persistencia de los compuestos OCs, los mismos, también fueron detectados en zonas no agrícolas en la cuenca del río Xanaes (Schreiber et al., 2013).

En relación a la distribución temporal, no se observaron diferencias significativas entre los períodos de baja y alta aplicación. Esto puede ser debido a que los plaguicidas monitoreados también provienen de fuentes urbanas o por su persistencia. Asimismo, las aplicaciones en el cinturón verde no coinciden con las fechas de las realizadas en los cultivos intensivos, estas últimas fueron las que se consideraron para establecer los períodos de muestreo.

En comparación a estudios llevados a cabo en otras cuencas del mundo, las concentraciones de atrazina encontradas en el río Suquía fueron similares a las determinadas en el río Ebro, ubicado en España (62 ng/L, Navarro et al., 2010). Por el contrario, en este mismo río se encontraron mayores concentraciones de clorpirifós (31 ng/L, Navarro et al., 2010) y menores niveles de cipermetrina (0,73 ng/L a 57,2 ng/L, Feo et al., 2010). Además, en una cuenca de África se reportaron concentraciones de endosulfán y endosulfán sulfato mayores a la cuantificadas en el río Suquía (Kuranchie-Mensah et al., 2012). Por otro lado, Gómez et al. (2012) encontraron similares cantidades de endosulfán (3 ng/L) en muestras de agua pertenecientes al río Henares, en España.

Al comparar los datos obtenidos en la cuenca de río Suquía con otros ríos de Argentina, podemos mencionar que los arroyos Brown y Horqueta localizados en la provincia de Buenos Aires presentan mayores concentraciones de clorpirifós (450,0 ng/L a 10,8 µg/L) y cipermetrina (710 ng/L a 194 µg/L), (Jergentz et al., 2005; Marino y Ronco, 2005). En tanto que Gonzalez et al. (2012) reportaron niveles de endosulfán en el río Quequén Grande en similares proporciones que las encontradas en el río Suquía.

En relación a las concentraciones de glifosato y AMPA medidas en ríos ubicados en zonas agrícolas, se encontraron valores similares al río Suquía en el noroeste de la provincia de Buenos (Peruzzo et al., 2008). Sin embargo, los niveles medidos en la presente tesis fueron más altos que aquellos informados en el sureste de la misma provincia (Aparicio et al., 2013).

La concentración de glifosato en relación a su metabolito AMPA da una indicación del tiempo que ha pasado desde el momento en que se realizó la aplicación del herbicida (Thurman y Fallon, 1992). En LC se detectó glifosato sólo en agua y no en sedimentos, hecho que sumado a la ausencia de su metabolito hace suponer que la contaminación fue reciente. En CM, la contaminación se produce principalmente por glifosato, con menores niveles de AMPA y, además, se extiende en todas las matrices analizadas. Este hecho indicaría un ingreso de glifosato constante en el ecosistema. En RP y SR, fue mayor la concentración AMPA que de glifosato, con un mayor porcentaje en el MPS y los sedimentos en relación a la concentración en agua. Esta situación podría indicar que ya ha pasado un cierto tiempo desde la aplicación de la sustancia química en esos sitios. También podría deberse a la degradación de glifosato que ocurre en el tiempo de transporte de esta sustancia desde un punto de emisión más alejado, como por ejemplo CM. Finalmente, en LP, se observó que la concentración más alta estaba presente

en forma de glifosato, lo que revela una contaminación reciente, pero además el herbicida y su metabolito se detectaron sólo en muestras de sedimentos. Este resultado podría entenderse considerando la granulometría de los sedimentos (Tabla 1.4), donde se observa que de todos los sitios estudiados, el mayor porcentaje de arcilla se encuentra en LP, componente conocido por tener una alta afinidad con el herbicida (Pessagno et al., 2008).

Con respecto a las concentraciones máximas tolerables para la protección de la biota acuática, se evidenció que los valores de endosulfán, clorpirifós y cipermetrina encontrados en aguas del río Suquía (Tabla 1.7) sobrepasan los límites establecidos a nivel internacional y nacional (CCME, 2012; SRHN, 2003; Tabla 1.10).

Tabla 1.10: Niveles guía de concentraciones de plaguicidas en aguas naturales para protección de la biota acuática.

Nivel guía para protección de la biota acuática		
Plaguicida	SRHN (Argentina)	CCME (Canadá)
Atrazina	≤ 3000 ng/L	≤ 1.800 ng/L
Acetoclor	s/d	s/d
Clorpirifós	≤ 6 ng/L	≤ 2 ng/L
Endosulfán	≤ 7 ng/L	≤ 3 ng/L
Endosulfán sulfato	s/d	s/d
Cipermetrina	≤ 0,6 ng/L	s/d
Glifosato	≤ 240 µg/L	≤ 800 µg/L
AMPA	s/d	s/d

s/d: sin datos; SRHN: Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación; CCME: Consejo Canadiense de Ministros de Medio Ambiente.

A partir de todos los resultados explicados anteriormente, es indudable la necesidad de planes de acción correctivos urgentes para una gestión consciente de la cuenca del río Suquía.

1.4 CONCLUSIONES PARCIALES

- Para muestras de aguas naturales, la mejor metodología que resolvió la detección conjunta de plaguicidas apolares y semi-polares fue una combinación de extracciones SPE+SPME y detección por GC-MS. Se obtuvieron límites de cuantificación comparables al uso de detectores selectivos (ECD y NPD).
- Para sedimentos de río, la metodología óptima de medición conjunta de plaguicidas apolares y semi-polares, fue una extracción HS-SPME y detección por GC-MS, obteniendo límites de cuantificación aceptables para estudios ambientales.
- Se identificaron y cuantificaron atrazina, acetoclor, clorpirifós, alfa-endosulfán, beta-endosulfán, endosulfán sulfato y alfa-cipermetrina en muestras de agua del río Suquía, observándose variaciones espaciales asociadas a su uso.
- Se detectó alfa-cipermetrina en muestras de sedimentos del río Suquía, observándose variaciones espaciales que indicarían su alta frecuencia de aplicación, probablemente por uso doméstico y agropecuario.
- Se cuantificó glifosato y AMPA en muestras de agua, sedimentos y MPS en el río Suquía por HPLC-MS, observándose variaciones espaciales, siendo este herbicida y su metabolito los plaguicidas encontrados en mayor concentración.
- El orden decreciente de contaminación en los sitios estudiados del río Suquía fue: CM > LP > RP ~ SR > LC
- Las concentraciones de endosulfán, clorpirifós y cipermetrina cuantificadas en muestras de agua sobrepasaron los límites para la protección de la biota acuática mostrando un potencial riesgo para los organismos que habitan este ecosistema acuático.

CAPÍTULO 2: Acumulación y efecto tóxico de cipermetrina y clorpirifós en el pez *Jenynsia multidentata*

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Cipermetrina y clorpirifós: aspectos generales

El estudio de plaguicidas realizado en la cuenca de río Suquía evidencia el riesgo para la biota acuática asociado a la presencia de cipermetrina, clorpirifós y endosulfán, desde el momento en que las concentraciones encontradas superan en agua los límites establecidos por la CCME (2012) y SRHN (2003). Las concentraciones de cipermetrina encontradas en agua presentan un promedio de 31,5 ng/L en todas las mediciones realizadas en la cuenca, con un valor máximo de 121,7 ng/L. Estos dos niveles superan 50 y 200 veces, respectivamente, el límite de protección para la biota acuática de 0,6 ng/L. Por otro lado, las concentraciones de clorpirifós encontradas en agua presentan un promedio de 1,8 ng/L, con un valor máximo de 5,6 ng/L. El valor máximo determinado resulta cercano al límite establecido por SRHN (≤ 6 ng/L) y supera el establecido por CCME (≤ 2 ng/L). Además, las concentraciones de endosulfán, para la suma de los isómeros alfa y beta, encontradas en agua presentaron un promedio de 1,1 ng/L de todos los valores obtenidos en la cuenca. El valor máximo encontrado fue de 9,2 ng/L superando los límites establecidos por SRHN (≤ 7 ng/L) y CCME (≤ 3 ng/L), expresada para la suma de los isómeros. El efecto tóxico de endosulfán ha sido estudiado sobre distintas especies de peces autóctonos como *J. multidentata* (Ballesteros et al., 2011, 2009a, 2009b; Monserrat et al., 2014), *Prochilodus lineatus* (Bacchetta et al., 2011a), *Cichlasoma dimerus* (Bacchetta et al., 2011b) y también en plantas como *M. quitense* (Menone et al., 2008) y *Bidens laevis* (Pérez et al., 2008), sin embargo no ocurre lo mismo para cipermetrina y clorpirifós.

Cipermetrina y clorpirifós son insecticidas ampliamente utilizados tanto en los hogares como en actividades agropecuarias. En el contexto doméstico pueden encontrarse en los productos utilizados para eliminar moscas, mosquitos, hormigas, cucarachas, garrapatas y pulgas. Por otra parte, en el sector rural, son pulverizados en grandes cantidades para el control de gusanos, polillas, chinches y otros insectos chupadores y masticadores. Estas plagas pueden invadir cultivos de gran escala como la soja y maíz, como así también frutales y hortalizas. En relación a la ganadería, se suele someter a los animales a baños con estos insecticidas para evitar garrapatas y moscas (Guía SATA, 2009).

Cipermetrina y clorpirifós pueden aplicarse en forma individual o en mezclas con el fin de aumentar al máximo el rendimiento del tratamiento contra plagas en cultivos. Cipermetrina se comercializa como concentrado emulsionable o suspensión concentrada (9-25 % de principio activo), o como un polvo (0,1 % de principio activo). Clorpirifós se comercializa como concentrado emulsionable (10,5-48 % del principio activo), granulado (15-75 % de principio activo), polvo (2,5 % de principio activo) o polvo hidratable (50 % de principio activo). La proporción más frecuentemente utilizada cuando se aplican como mezcla es 50 % de clorpirifós y 5 % de cipermetrina. La mezcla puede ser adquirida en forma comercial (Ej. Lorsban Plus de Dow AgroSciences), o se pueden combinar al momento de la fumigación.

En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria permite su uso sin restricciones en la agricultura y a nivel doméstico de cipermetrina y clorpirifós (SENASA, 1998). En E.E.U.U., la Agencia de Protección Ambiental y los productores de clorpirifós han acordado un programa para reducir progresivamente sus aplicaciones domésticas (USEPA, 2000).

Cipermetrina es un piretroide sintético, cuya fórmula molecular es $C_{22}H_{19}O_3NC_{12}$, de peso molecular 416,3 g/mol, su nombre IUPAC es (RS)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS) cis-trans3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato. En forma general, la estructura de cipermetrina presenta un resto ácido, un enlace éster central, y un alcohol radical (Tabla 1.1.). El resto ácido contiene dos carbonos quirales, por lo tanto para este insecticida existen ocho compuestos estereoisómeros (cis y trans). Alfa-cipermetrina comprende dos isómeros: [1*S*, *cis*-, α *R*]-cipermetrina y ([1*R*, *cis*-, α *S*]-cipermetrina). Cipermetrina es poco soluble en agua, presentando una solubilidad de 0,01 mg/L a 25°C. Además, presenta una fuerte afinidad por las partículas de suelo, mostrando un coeficiente de adsorción a esta matriz (Koc) de $10,0 \times 10^4$ mL/g (Wauchope et al., 1992). Debido a estas características, tiene tendencia a permanecer en los suelos, siendo poco probable la lixiviación a aguas subterráneas. Por el contrario, esta molécula sí alcanzaría las aguas superficiales, principalmente por medio de la erosión de los suelos que es la vía primordial para compuestos de Koc mayores a 1000 mL/g, como así también por escurrimiento (Rathore y Nollet, 2012).

Cipermetrina tiene una persistencia moderada en suelos. En condiciones de laboratorio, su biodegradación aeróbica presentó tiempos de vida media de 28 a 56 días (USEPA,

1989), siendo más persistente en condiciones de anaerobiosis. Por lo tanto, llevado al ambiente natural, el compuesto presente en capas más profundas del suelo se biodegradará más lentamente. Por otra parte, su persistencia será mayor cuanto más cantidad de materia orgánica y contenido de arcilla contenga el suelo. Cipermetrina puede sufrir fotodegradación siendo por tanto su persistencia en suelos menor que por biodegradación, con tiempos de vida media de 8 a 16 días (USEPA, 1989). Al alcanzar los cuerpos de agua, este insecticida es relativamente estable. Su persistencia puede estar condicionada por reacciones de hidrólisis, mostrando una vida media de más de 50 días, y por fotodegradación, con tiempos de vida media de más de 100 días (USEPA, 1989). Sin embargo, en este compartimiento las concentraciones disminuyen rápidamente debido a la adsorción a los sedimentos, partículas suspendidas y plantas.

Clorpirifós (CAS: 2921-88-2), es un insecticida organofosforado de amplio espectro, cuya fórmula molecular es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, de peso molecular 359,6 g/mol, su nombre IUPAC es *O,O*-dietil *O*-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato. En forma general, la estructura de este compuesto es un éster del ácido fosfórico con los grupos hidroxilos sustituidos por un grupo homocíclico y dos grupos alquilo, además sustitución de oxígeno por azufre (Tabla 1.1). Clorpirifós presenta una solubilidad en agua de 2,0 mg/L a 25 °C, siendo más soluble que cipermetrina. Su persistencia en suelos es moderada, mostrando tiempos de vida media de 11 a 141 días y su permanencia no se ve afectada por la composición granulométrica del suelo y el contenido de materia orgánica. Este insecticida es prácticamente inmóvil en suelos ($K_{oc} = 6,1 \times 10^3$ mL/g - Wauchope et al., 1992) por lo que es poco probable que alcance las aguas subterráneas. Al igual que cipermetrina, alcanzaría las aguas superficiales por erosión de los suelos (Rathore y Nollet, 2012).

En los cuerpos de agua, el clorpirifós disuelto presenta una fuerte capacidad de volatilizarse y de adsorberse a las partículas de sedimento. Además, al igual que la mayoría de los plaguicidas en agua, puede sufrir transformaciones químicas (principalmente hidrólisis y termólisis) y fotoquímicas. La biodegradación, también contribuye significativamente en la permanencia de este compuesto en el ambiente (Rathore y Nollet, 2012). En relación a estos procesos, el tiempo de vida media de clorpirifós al sufrir hidrólisis es de 35 a 78 días, fotólisis de 21 a 28 días (EXTONET, 1996) y biodegradación de 34 a 46 días (Swati y Singh, 2002).

2.1.2 Mecanismos de acción de cipermetrina y clorpirifós sobre organismos blanco y efectos sobre organismos no blanco

Desde el punto de vista toxicológico, el modo de acción que presentan los insecticidas para afectar a los insectos puede ser el mismo mecanismo que produce toxicidad en organismos no blanco. Cipermetrina produce excitación del sistema nervioso central y periférico modificando la cinética de los canales de sodio sensibles al voltaje. Como consecuencia, se da una menor amplitud de los potenciales de acción en la membrana celular o la obstrucción total de la actividad neural debido a una marcada despolarización de la membrana (Coats, 1989). Además, en general los piretroides actúan sobre algunas isoformas de canales de calcio sensibles al voltaje, suceso que puede contribuir a la liberación de neurotransmisores. Otra acción que contribuye a la excitabilidad es el bloqueo de los canales de cloruro. Estos efectos sobre el sistema nervioso de mamíferos producen salivación seguido de progresivas convulsiones de retorsión (coreoatetosis) conocido como síndrome CS (Soderlund et al., 2002). En peces, la actividad del sistema nervioso central fue correlacionada con respuestas cardiovasculares y variables químicas en sangre como el incremento de oxígeno arterial y disminución de pH (Bradbury et al., 1991).

La principal acción tóxica de clorpirifós es la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE). Esta enzima hidroliza el neurotransmisor acetilcolina (ACh) liberado al espacio intersináptico, finalizando así el proceso de comunicación a nivel de la sinapsis colinérgica (Casarret y Doull's, 2008). La inhibición de AChE conduce a la acumulación del neurotransmisor produciendo la sobreestimulación del sistema nervioso. En mamíferos, el exceso de ACh causa efectos excitatorios e inhibitorios de los receptores. La excitación provoca signos de broncoconstricción y contracción involuntaria de las fibras musculares. Por otra parte, la inhibición genera síntomas como vasodilatación y parálisis muscular (Taylor, 1996). En peces, la hiperactividad colinérgica, produce espasmos de los músculos voluntarios, seguido de parálisis que puede causar la muerte del individuo (Fulton y Key, 2001).

Una forma de interpretar la toxicidad de plaguicidas frente a organismos no blanco es a partir de la evaluación en exposiciones en laboratorio calculando CL_{50} o DL_{50} (concentración o dosis que produce la muerte del 50 % de la población en estudio). Cipermetrina y clorpirifós son considerados muy tóxicos para peces, mostrando LC_{50}

mucho menores que para otros vertebrados. En el caso de cipermetrina la DL_{50} determinada en ratas presenta un rango de 187.000 a 326.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (USEPA, 1989) mientras que la CL_{50} , medida luego de 96 h de exposición en peces es de 21,4 $\mu\text{g}/\text{L}$, valor establecido para la especie *Poecilia reticulata* (Polat et al., 2002). Considerando que ambos parámetros se encuentran en el orden de las ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ y $\mu\text{g}/\text{L}$), se puede evidenciar una significativa diferencia en la sensibilidad de los organismos. En forma similar, para clorpirifós, la DL_{50} en ratas tiene un rango de 95.000 a 270.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Gallo y Lawryk, 1991) mientras que la CL_{50} 96 h en *P. reticulata* es de 176 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Sharbidre et al., 2011). Estos datos señalarían también que frente a peces, cipermetrina es más tóxica que clorpirifós.

Al momento de considerar la toxicidad de estos insecticidas, asociada a las especies que habitan en ríos de Córdoba, existen escasos valores de CL_{50} informados. Para cipermetrina se reportó una CL_{50} (96 h) de 1,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *O. mykiss* (nombre común de la trucha arcoíris; Davies et al., 1994), y una CL_{50} (96h) de 0,43 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *C. decemmaculatus* (Carrquiriborde et al., 2007). Para clorpirifós se reportó una CL_{50} de 8,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *O. mykiss* (Holcombe et al., 1982) y una CL_{50} (96h) de 150,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *G. affinis* (Boone y Chambers, 1996). Es importante destacar que las especies *O. mykiss* y *G. affinis* son introducidas, mientras que *C. decemmaculatus* es una especie autóctona, mostrando esta última una mayor sensibilidad frente al tóxico evaluado.

2.1.3 Vías de exposición y biotransformación de cipermetrina y clorpirifós en peces

Los plaguicidas presentes en el medio acuoso pueden tomar contacto con el pez y ser absorbidos a través de las branquias, por la mucosa gastrointestinal y por la piel. Inicialmente se presentarán en el torrente sanguíneo desde donde serán distribuidos al resto de los tejidos (Barron et al., 1993). Luego, estos compuestos podrán ser biotransformados para su posterior excreción o bien ser eliminados sin metabolizar. Esto último, podría ocurrir a través de las branquias, aunque es un proceso muy lento para compuestos hidrofóbicos como cipermetrina y clorpirifós (Hum et al., 1974). La biotransformación tiene el objetivo de generar metabolitos más hidrosolubles que podrán ser excretados con facilidad por orina, heces y por las branquias (van der Oost et al., 2003; Boelsterli, 2007). Idealmente, los metabolitos generados pueden tener también menor toxicidad. Sin embargo, se conoce que algunos plaguicidas son convertidos en

un compuesto de mayor reactividad, como es el ejemplo de clorpirifós (Hayes, 2010). Las reacciones de metabolización son catalizadas por enzimas presentes principalmente en el hígado, en la fracción soluble (o citosólica) y microsomal, sin bien se ha reportado una actividad importante en otros tejidos como cerebro e intestino (Hayes, 2010).

En forma general, la detoxificación de un compuesto químico puede dividirse en tres etapas, según el tipo de reacciones que se producen. En la fase I ocurren reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis de los compuestos químicos. En esta fase interviene el Sistema Oxidasa de Función Mixta cuyos principales componentes son las Citocromo P450 (CYP), (Castro, 1985). Intracelularmente, estas enzimas se encuentran principalmente en el retículo endoplasmático, e incluyen a un gran número de isoenzimas con variada afinidad por el sustrato. Aunque existen diferencias entre los Sistemas Oxidasa de Función Mixta de los mamíferos y de los peces, las enzimas involucradas y sus características son muy similares. En peces, la isoenzima responsable de la biotransformación de un gran número de xenobióticos es la citocromo P4501A (CYP1A), incluyendo los genes *CYP1A1* y *CYP1A2*, lo que convierte a esta enzima en un buen biomarcador de contaminación ambiental (van der Oost et al., 2003).

Por otra parte, en la Fase II de detoxificación se producen reacciones de conjugación, mediante la adición de moléculas endógenas al compuesto químico contaminante, o a los metabolitos provenientes de la Fase I. Los compuestos polares con los que puede combinarse son: glutatión, ácido glucurónico, glicina, cisteína, sulfatos, entre otros. Las enzimas involucradas en esta etapa son, por ejemplo, Glutatión S-transferasa (GST) y uridin difosfoglucuroniltransferasa (UDPGT). Finalmente, la Fase III incluye reacciones de procesamiento posteriores como depósitos o translocaciones del compuesto modificado o no. La P-glicoproteína (P-gp) es una proteína transportadora perteneciente al Sistema de Resistencia a Multixenobióticos (MXR) que podría considerarse de Fase III y que estaría involucrada en la excreción de compuestos moderadamente hidrofóbicos, planos, productos naturales y metabolitos de la Fase I (Tutundjian et al., 2002). Estas proteínas se encuentran expresadas endógenamente en los tejidos epiteliales especializados, implicados en la secreción y la excreción, tales como el intestino, el hígado y el riñón en mamíferos (Bard, 2000).

El metabolismo endógeno de cipermetrina (Fig 2.1) involucra el clivaje de la unión éster central generando por un lado los ácidos cis y trans metilciclopropano, y por el otro el

alcohol del grupo cianofenoxibencilo. En esta reacción de hidrólisis participan principalmente las carboxilesterasas, los productos generados son de menor toxicidad que el compuesto parental (Wheelock et al., 2005). Posteriormente, los ácidos pueden ser conjugados con ácido glucurónico y excretados. La porción cianofenoxibencilo pierde el grupo ciano que es metabolizado a un ión tiocianato y el fenoxibencilo se convierte a aldehído y luego en ácido 3-fenoxibenzoico. Luego este compuesto se hidroxila y elimina conjugado a sulfato o ácido glucurónico.

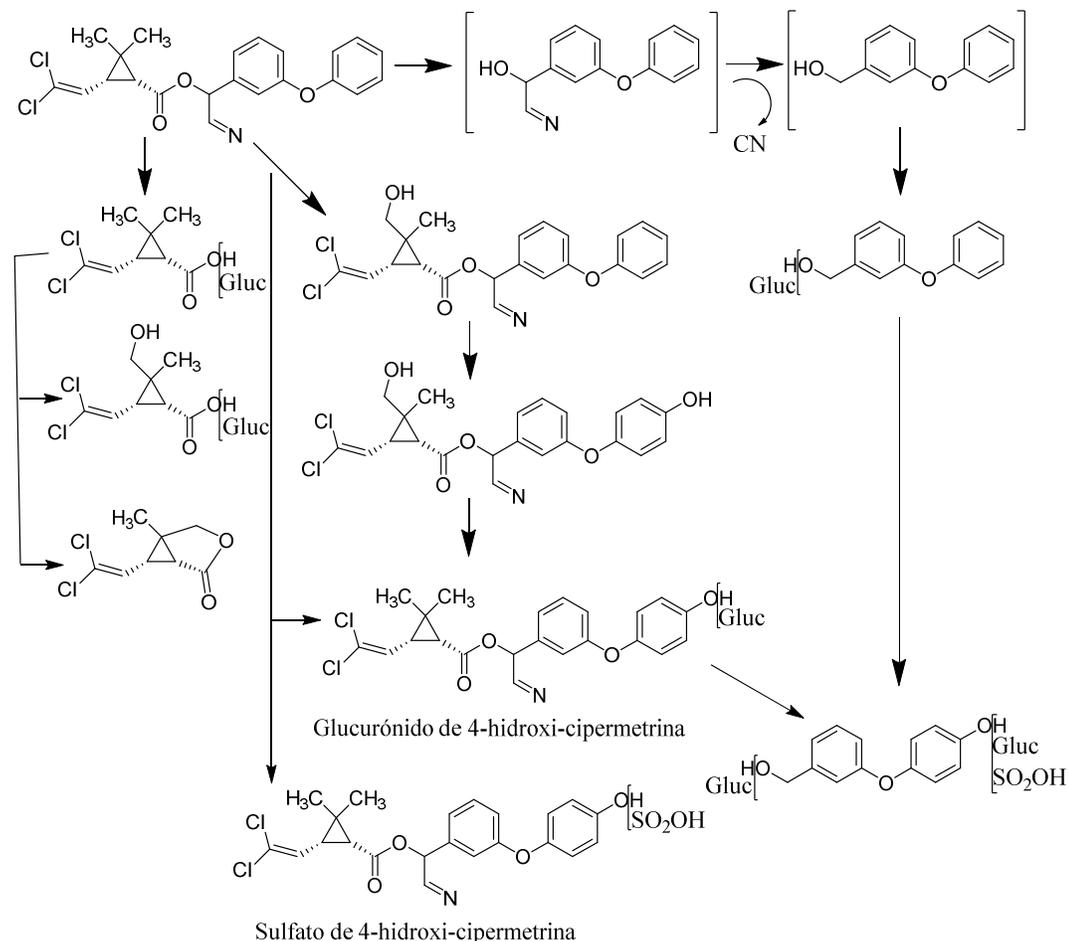


Figura 2.1: Principales vías de metabolización de cipermetrina (tomada de Carriquiriborde et al., 2012).

Asimismo, cipermetrina puede sufrir hidroxilación antes de la escisión de la unión éster. Esta oxidación se produce principalmente en el isómero trans del grupo ciclopropanocarboxilo y en la posición 4 del grupo fenoxibencilo (Crawford et al., 1981). Estas moléculas oxidadas pueden conjugarse con sulfato o ácido glucurónico (Carriquiriborde et al., 2012; Edwards y Millburn, 1987). Además, se demostró que en la

detoxificación de los piretroides también participan algunas isoformas de las citocromo P-450 (Casida y Quistad, 1995).

Las vías de detoxificación planteadas para cipermetrina siguen el mismo mecanismo en peces y mamíferos. Sin embargo, existen diferencias en las reacciones que se proponen como prioritarias. En peces se presentan como principales las reacciones de hidroxilación seguida de la conjugación de la molécula de cipermetrina sin previo clivaje de la unión éster (Carrquiriborde et al., 2012; Edwards y Millburn, 1987). Esto se debería a la baja actividad de enzimas carboxilesterasas en peces al ser enfrentados a distintos piretroides (Wheelock et al., 2005). Este hallazgo podría justificar la alta toxicidad de piretroides en peces.

El metabolismo endógeno de clorpirifós en peces sigue las mismas vías de bioactivación y detoxificación que en mamíferos (Fig 2.2), (Barron et al., 1993, 1991; Hayes, 2010). Al igual que otros plaguicidas organofosforados, el primer mecanismo de metabolización produce la bioactivación de la molécula, mediante la desulfuración oxidativa de la porción tiol (P=S) a una porción oxón (P=O) catalizada por las enzimas CYP resultando en el metabolito clorpirifós-oxón (CPFO). Este metabolito presenta tres órdenes de magnitud mayor afinidad por el sitio de las enzimas colinesterasas (ChEs) y otras hidrolasas, que el compuesto parental (Amitai et al., 1998).

Las reacciones de detoxificación de clorpirifós podrían ser descritas por tres vías principales. En la primera (Fig 2.2 - Vía 1) están involucradas reacciones de desarilación de clorpirifós, también catalizadas por CYP, resultando en metabolitos hidrofílicos e inactivos frente a las ChEs (Tang et al., 2001). Los productos de transformación de esta vía son el 3,5,6 triclopiridinol (TCP) y el dietilfosfato (DETP). Asimismo, CPFO puede ser hidrolizado por esterasas-A (paraoxonasas, PON1) formando, al igual que en las reacciones anteriores, TCP y además, dietilfosfato (DEP). Otra forma de eliminación de CPFO es a partir de la hidrólisis por esterasas-B, como la carboxilesterasa y butirilcolinesterasa (BChE). Posteriormente, los metabolitos como CPFO y TCP pueden continuar siendo detoxificados por reacciones de conjugación (fase II). TCP puede ser conjugado con sulfato, glucurónico o glutatión mediante su correspondiente enzima sulfotransferasa, UDPGT y GST, respectivamente.

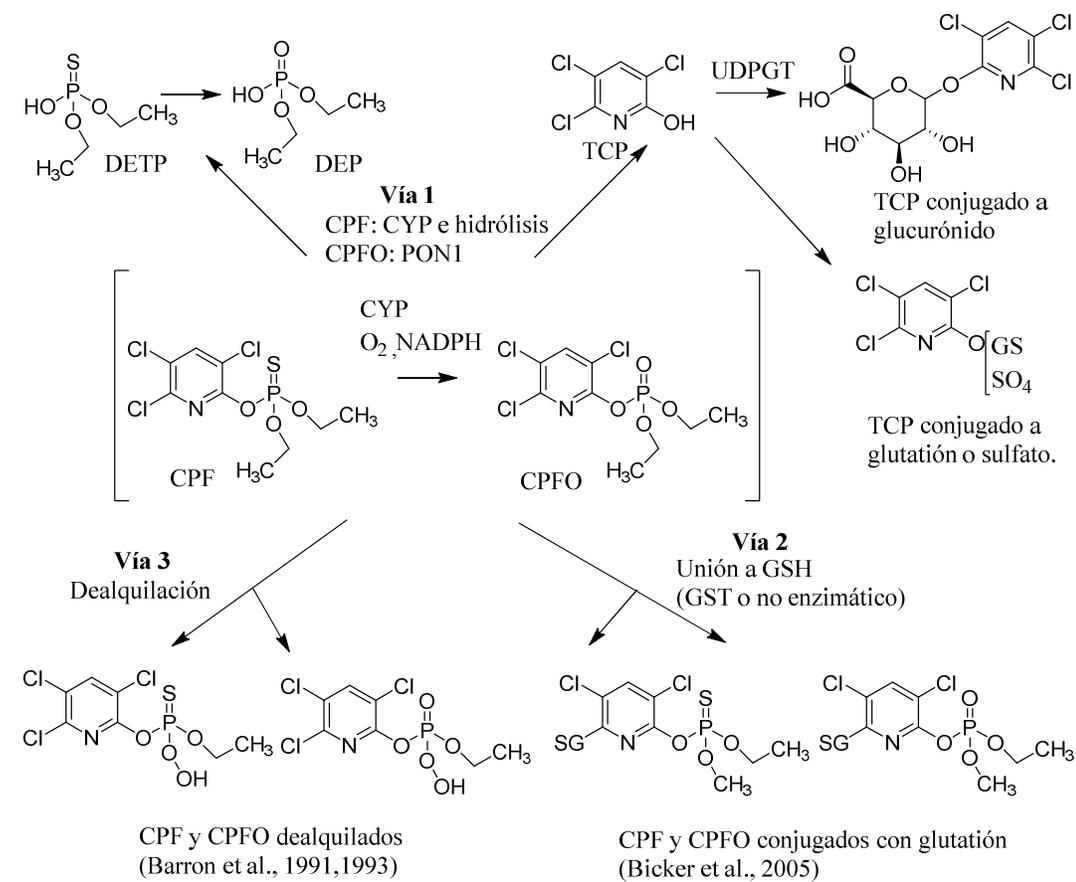


Figura 2.2: Principales vías de metabolización de clorpirifós (tomada de Bicker et al., 2005 y modificada según Barron et al., 1991, 1993 y Hayes, 2010). CPF: Clorpirifós; CPFO: Clorpirifós-oxón; TCP: 3,5,6 Tricloropiridinol; CYP: Citocromo P450; DETP: Dietiltiofosfato; DEP: Dietilfosfato; PON1: Paraoxonasas; UDPGT: Uridin difosfoglucuroniltransferasa; GSH: Glutatión reducido; GST: Glutatión S-transferasa.

La segunda vía propuesta (Fig 2.2 - Vía 2) es la conjugación de clorpirifós y CPFO con glutatión mediante la actividad de GST, o a través de un proceso no enzimático. En estudios realizados en pacientes intoxicados con clorpirifós se detectó este compuesto y CPFO conjugados a glutatión en orina (Bicker et al., 2005). En otro estudio en el pez *Ictalurus punctatus* expuestos a clorpirifós, se observó que el principal metabolito excretado en orina y bilis fue TCP conjugado con glucurónico (Barron et al., 1993).

La tercer vía de detoxificación (Fig 2.2 - Vía 3) involucra reacciones de desalquilación a partir del clivaje del enlace fosfoéster alquilo de clorpirifós y CPFO. Aún se desconoce el sistema enzimático o no enzimático que participa en este mecanismo. Metabolitos de esta vía fueron identificados en orina de pacientes intoxicados y peces expuestos a clorpirifós (Barron et al., 1993, 1991; Bicker et al., 2005).

2.1.4 *Jenynsia multidentata* como especie bioindicadora de la contaminación con plaguicidas

Jenynsia multidentata (Cyprinodontiformes, Anablepidae - Fig 2.3.) es un pez autóctono dulceacuícola de distribución neotropical que está presente en forma abundante en los ríos de Córdoba. Más aún, en la cuenca del río Suquía se observó que esta especie se encontraba en sitios con distinto grado de contaminación (Hued y Bistoni, 2002). Se trata de una especie de reducidas dimensiones (aproximadamente 4 cm), vivípara y con dimorfismo sexual externo. Además, es fácil de transportar y ser mantenida en condiciones de laboratorio. Todas estas características hacen que sea considerado un buen modelo experimental en biología y toxicología (Molero y Pisanó, 1987). *J. multidentata* ha sido utilizada en ensayos de laboratorio para exposiciones a varios contaminantes midiendo tanto biomarcadores de exposición como de efecto.



Figura 2.3: *Jenynsia multidentata*

Los biomarcadores de exposición se refieren a la detección de cualquier sustancia exógena, sus metabolitos o el producto de interacción del xenobiótico con una sustancia endógena en algún compartimiento en el organismo expuesto. Este tipo de biomarcadores pueden ser utilizados para confirmar y evaluar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular. Además proporciona información sobre la relación entre el medio externo (exposición) y el medio interno (medición de la acumulación) brindando también información sobre su distribución en el organismo. En *J. multidentata* se midieron biomarcadores de este tipo luego de exponer a este pez a microcistinas (Cazenave et al., 2005) y a endosulfán (Ballesteros et al., 2011; Monserrat et al., 2014). Los biomarcadores de efecto, en cambio, incluyen la medición de cambios biológicos que

pueden ser bioquímicos, histológicos, fisiológicos, conductuales, de poblaciones, etc., y que pueden asociarse a la exposición o absorción del químico. A nivel bioquímico los biomarcadores de efecto más utilizados en *J. multidentata* son las enzimas involucradas en la biotransformación incluyendo la expresión de *CYP1A*, actividad de GST y expresión de *P-gp*.

Ahora bien, los plaguicidas han sido diseñados para ejercer un efecto tóxico sobre organismos blanco por un modo de acción establecido. Sin embargo, el mismo modo de acción, podría afectar también a un organismo no blanco. Así, la medición de la actividad de ChE es un biomarcador de efecto muy estudiado. Las ChE de vertebrados se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales: la AChE o colinesterasa verdadera y la BChE o pseudocolinesterasa (Villatte y Bachmann, 2002). La AChE es una enzima que hidroliza el neurotransmisor ACh finalizando el proceso de comunicación a nivel de la sinapsis colinérgica, acción que involucra a esta enzima en la regulación del impulso nervioso. Aún no se conoce la función fisiológica de la enzima BChE, pero se sabe de su función de protección, participando en la eliminación de compuestos anticolinesterásicos, como plaguicidas organofosforados y carbamatos, evitando que los mismos actúen sobre la AChE (Yang et al., 2013). Estas enzimas pueden estar unidas a membrana o solubles en el espacio extracelular y su heterogeneidad está dada por varias isoformas (Chatonnet y Lockridge, 1989). AChE de membrana es la molécula que presenta la actividad colinérgica en sistema nervioso y la forma soluble o extracelular de BChE es la que presenta la principal función no colinérgica (Schegg et al., 1992). Las colinesterasas pueden ser distinguidas en un principio por su especificidad frente a un sustrato, AChE hidroliza con mayor velocidad acetilcolina, mientras que BChE hidroliza principalmente butirilcolina. Debido a que esta característica es una preferencia de sustrato y no totalmente específica, para una tipificación de ambas familias debe realizarse la reacción en presencia de inhibidores específicos, tales como el BW284C51 (dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)pentan-3-ona) para la AChE; y el iso-OMPA (tetraisopropil pirofosforamida), para la BChE (Rodríguez-Fuentes et al., 2013).

La medición de la actividad de ChEs es ampliamente utilizada como biomarcador específico de plaguicidas organofosforados y carbamatos, debido a que el mecanismo de acción de estos insecticidas es la inhibición de AChE de los organismos blanco y no blanco (Fulton y Key, 2001). Sin embargo, varios estudios han indicado que las ChE son

también sensibles a otros tipos de contaminantes ambientales, tales como piretroides, metales y mezclas complejas de contaminantes (Frasco et al., 2005; Tu et al., 2012; Wacksman et al., 2006). En *J. multidentata* se ha demostrado que el plaguicida organoclorado endosulfán es también capaz de inhibir AChE (Ballesteros et al., 2009a).

La inhibición de AChE resulta en la acumulación de ACh en el espacio sináptico colinérgico y en la unión neuromuscular con la consecuencia de la activación persistente de los receptores. Esta hiperactividad colinérgica, experimentada en peces a bajas concentraciones puede producir cambios en el comportamiento mientras que a mayores concentraciones produce espasmos de los músculos voluntarios (tetania), seguido de parálisis y la muerte del individuo (Fulton y Key, 2001). Por el contrario la inhibición de BChE no produce una alteración fisiológica, pero sí se corresponde con una respuesta a la exposición de un compuesto anticolinesterásico (Sanchez-Hernandez, 2001).

Existe también la posibilidad de que un compuesto ejerza su toxicidad por más de un mecanismo. Un gran número de contaminantes ambientales (o sus metabolitos) han demostrado efectos tóxicos relacionados al estrés oxidativo, generalmente a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Winston y Di Giulio, 1991). Los productos de reducción del oxígeno molecular (radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical oxhidrilo) son compuestos de alta reactividad que dañan todo tipo de estructuras biológicas incluyendo ácidos nucleicos (induciendo mutagénesis y carcinogénesis), proteínas (produciendo inactivación de enzimas) y membranas (generando peroxidación lipídica) pudiendo causar finalmente la muerte celular. Los sistemas de defensa han evolucionado para combatir la formación de oxirradicales, incluyendo las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), involucrando esta última la actividad de glutatión reductasa (GR).

Si bien existen numerosas fuentes endógenas de radicales de oxígeno, al buscar identificar biomarcadores de contaminación ambiental, el principal interés radica en evaluar la habilidad de inducir el aumento en la producción de radicales en el organismo. Es así que resulta interesante evaluar los productos derivados de la generación de ROS, sean estos provenientes de lípidos, generando lípidos peroxidados (LPO), de la reacción con proteínas, formando proteínas carboniladas (PCO) o al actuar sobre el ADN o ARN produciendo oxidación de bases nucleotídicas (Cui et al., 2006; Kavitha y Venkateswara

Rao, 2007). La respuesta de enzimas antioxidantes es también una evidencia indirecta de la generación de ROS y la medición de la actividad de todas ellas ha sido ampliamente utilizada como biomarcadores de efecto en *J. multidentata*.

Existen también varios indicios de que muchos productos químicos naturales y sintéticos, y entre ellos los plaguicidas, podrían interferir con el sistema endócrino de organismos blanco y no blanco (Hayes, 2010). Una disminución en el éxito de la reproducción, es uno de los signos mejor documentados de alteración endocrina en peces. Los estrógenos son hormonas esteroideas implicadas en el control de importantes procesos relacionados con la reproducción, incluyendo la diferenciación sexual y la maduración, entre otros. Para el buen funcionamiento metabólico de un organismo es necesario un cuidadoso balance espacial y temporal de los estrógenos. En el paso final de la biosíntesis de estrógeno, la citocromo P450 aromatasa, codificada por el gen CYP19, convierte los andrógenos en estrógenos. Por lo tanto, la modulación de la expresión y función de la aromatasa CYP19 puede alterar dramáticamente la tasa de producción de estrógenos y modificar sus niveles locales y sistémicos (Cheshenko et al., 2008). Para peces teleósteos, se han descrito dos genes CYP19 (*CYP19a1* y *cyp19a2*). La CYP19A1, comúnmente conocida como la aromatasa gonadal, se expresa preferentemente en el ovario y juega un papel importante en la diferenciación sexual y el crecimiento de los ovocitos. La CYP19A2, llamada aromatasa cerebral, se expresa constitutivamente en el cerebro y probablemente está implicada en el desarrollo del sistema nervioso central, la supervivencia, morfología, la sinaptogénesis, el sexo y el comportamiento. La expresión de aromatasa es, por lo tanto, otro potencial biomarcador de efecto que se ha estudiado en *J. multidentata* y que puede brindar información sobre mecanismos de toxicidad alternativos de los plaguicidas en organismos no blanco.

Por otra parte, entre los biomarcadores más ampliamente usados a nivel de individuo se encuentran los cambios en el comportamiento. Esto se debe principalmente a que esta respuesta integra numerosos procesos celulares que son esenciales para la viabilidad del organismo, la población y la comunidad. Por lo tanto, las observaciones de los cambios de comportamiento proporcionan una perspectiva toxicológica única uniendo consecuencias de la contaminación ambiental tanto a nivel bioquímico como ecológico (Little et al., 1990). Las alteraciones en el comportamiento normal de un animal pueden llevarlo a un menor bienestar y supervivencia, lo que resulta en cambios no deseados en las poblaciones (Brewer et al., 2001).

A partir de todo lo expuesto anteriormente, se definió un diseño experimental para evaluar los mecanismos de ingreso, distribución, biotransformación, acumulación y efecto tóxico de los insecticidas cipermetrina y clorpirifós sobre un organismo autóctono de la cuenca del río Suquía, *J. multidentata*. No existen para esta especie datos reportados en relación a estos tóxicos, ni tampoco la evaluación de su respuesta frente a mezclas de los mismos.

Las concentraciones ensayadas se basaron en tres criterios principales:

1- Concentraciones ambientalmente relevantes: Para la selección de las concentraciones a utilizar se consideraron los niveles medidos en el río Suquía y los reportados en otros ríos de Argentina: cipermetrina entre 0,05 y 3,5 µg/L y clorpirifós entre 0,21 y 2 µg/L (Jergentz et al., 2005; Marino y Ronco, 2005).

2- Concentraciones subletales: Dado que no se contaba con la CL₅₀ de cipermetrina y clorpirifós para *J. multidentata* se tuvo en cuenta lo ya publicado para la especie *Poecilia reticulata* (perteneciente al mismo orden que *J. multidentata*, Ciprinodontiforme). CL₅₀ (96 h) para cipermetrina: 21,4 µg/L (Polat et al., 2002); CL₅₀ (96 h) para clorpirifós: 176 µg/L (Sharbidre et al., 2011). Se establecieron como concentraciones de exposición 0,2 y 2 % de las respectivas CL₅₀.

3- Concentraciones de los plaguicidas en la mezcla en proporciones iguales a las usadas para la aplicación: Cipermetrina: clorpirifós (5:50).

4- Concentraciones de los plaguicidas en mezclas equitóxicas: Considerando la CL₅₀ de *P. reticulata*, se utilizó una mezcla equitóxica (0,002 y 0,02 UT).

Se plantearon así los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 2: Determinar las posibles vías de ingreso, distribución, biotransformación y acumulación de cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta en la especie ictícola nativa *Jenynsia multidentata*.

Objetivo 3: Evaluar la respuesta de biomarcadores de efecto en la especie ictícola nativa *Jenynsia multidentata* a la exposición a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta, con el fin de evaluar posibles competencias.

Estrategias para lograr estos objetivos específicos:

- Evaluar la acumulación de cipermetrina y clorpirifós en distintos órganos de *Jenynsia multidentata* al exponerla a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta.
- Estudiar la respuesta del sistema de biotransformación en distintos órganos de *Jenynsia multidentata* al exponerla a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta.
- Determinar la actividad de enzimas específicas (AChE y BChE) en cerebro y músculo de *Jenynsia multidentata* al exponerla a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta, para observar los posibles efectos de estos insecticidas sobre el sistema nervioso del pez.
- Verificar la inducción estrés oxidativo producida por la exposición a cipermetrina y clorpirifós mediante la medición de daño oxidativo en lípidos y proteínas, y la respuesta de enzimas antioxidantes en distintos órganos de *Jenynsia multidentata*.
- Establecer cambios conductuales en *Jenynsia multidentata* frente a la exposición con cipermetrina y clorpirifós, este biomarcador permitirá integrar las respuestas de numerosos procesos celulares.

- Corroborar la posible acción de cipermetrina y clorpirifós como disruptores endócrinos, mediante la evaluación de los niveles de expresión de la enzima aromatasa en cerebro y gónadas de *Jenynsia multidentata*.

Hipótesis 2: La exposición a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y conjunta altera el ingreso, la biotransformación y la acumulación de estos compuestos en *Jenynsia multidentata*.

Hipótesis 3: *Jenynsia multidentata* responderá a la exposición a clorpirifós y cipermetrina en forma individual y conjunta, modificando el patrón de respuestas biológicas evaluadas (biomarcadores).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Bioensayo

Recolección, aclimatación y exposición de peces

Se recolectaron con redes de mano hembras adultas *J. multidentata* en un sitio quasi-prístino, Río Yuspe, Córdoba (Hued y Bistoni, 2002) de longitud total promedio $4,2\pm 0,5$ cm y peso promedio $0,8\pm 0,3$ g. Los peces fueron transportados al laboratorio en agua del sitio de recolección y posteriormente aclimatados en el laboratorio durante 15-30 días ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$; 12:12 h luz: oscuridad).

Pasado el período de aclimatación, los peces que se mostraban sanos, o al menos sin signos de enfermedad, fueron expuestos durante 96 h a concentraciones subletales de clorpirifós y cipermetrina en forma individual, en mezcla de compuestos de alta pureza y mezcla de producto comercial. Las exposiciones se realizaron en peceras de 5 litros con agua de acuario preparada en el laboratorio (2 g CaCl_2 , 1,03 g NaHCO_3 y 1 g sal de mar cada 10 litros de agua destilada), conteniendo 5 individuos por pecera (relación 1 pez por litro de agua), manteniendo durante el período de exposición condiciones de temperatura de $23,5\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH de $7,92\pm 0,06$, oxígeno disuelto de $6,73\pm 0,09$ mg/L y conductividad eléctrica de 948 ± 33 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se realizaron recambios de agua con renovación del tóxico cada 24 horas, sobre la base de los resultados de los ensayos de estabilidad obtenidos. A los peces se les suministró diariamente una cantidad mínima de alimento comercial en escamas.

Los animales fueron tratados de acuerdo a los Protocolos Experimentales en el Uso de Animales en los Proyectos Científicos, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC (Expediente 32619/2013).

Bioensayo 1: Evaluación de estrés oxidativo, disrupción endócrina y bioacumulación

Se evaluaron cinco condiciones: Control; alfa-cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ (99 %, Sigma-Aldrich, Estados Unidos); clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ (98 %, Sigma-Aldrich, Estados Unidos); mezcla de compuestos puros de cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ y clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$; y mezcla del producto comercial cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ (Glacoxan, cipermetrina 25 %, Punch Química S.A., Argentina) más clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ (Clorfox, clorpirifós 40 %, GLEBA S.A.,

Argentina - Fig 2.4). Luego de las 96 horas de exposición, se disectaron los peces, conservando a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada órgano individualmente: hígado, intestino, gónada, branquias, cerebro y músculo. En adelante cada tratamiento será identificado de la siguiente forma: alfa-cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ como CIP; clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ como CPF; mezcla de cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ compuestos puros como CIP+CPF; mezcla de cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ de productos comerciales como PRODUCTO.

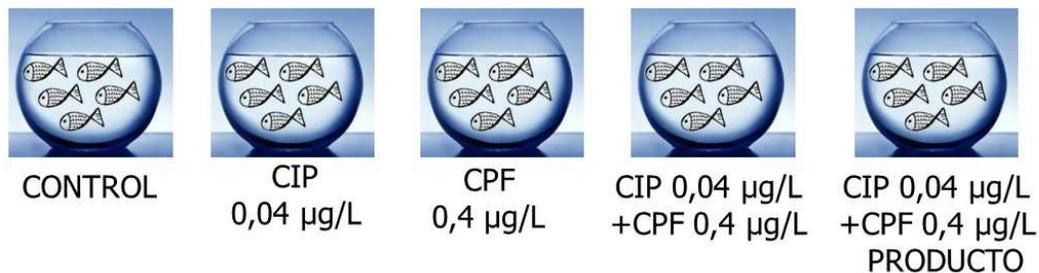


Figura 2.4: Bioensayo 1. CIP: Cipermetrina. CPF: Clorpirifós. Mezcla técnica: mezcla de los compuestos puros. Mezcla productos: mezcla de CIP y CPF de las formulaciones comerciales.

Bioensayo 2: Conducta y actividad de acetilcolinesterasas

Se evaluaron 9 condiciones: Control; sin agregado de tóxico; cuatro condiciones en concentración **baja**: cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$; clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$; mezcla de compuestos puros de cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$; y mezcla del producto comercial Glacoxan $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ (cipermetrina 25 %) más Clorfox $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ (clorpirifós 40 %); y cuatro condiciones en concentración **alta**: cipermetrina $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$; clorpirifós $4\text{ }\mu\text{g/L}$; mezcla de compuestos puros de cipermetrina $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $4\text{ }\mu\text{g/L}$; y mezcla del producto comercial Glacomax $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ (cipermetrina 25 %) más Clorfox $4\text{ }\mu\text{g/L}$ (clorpirifós 40 %) (Fig 2.5). Cada tratamiento realizado se nombrará según lo indicado en el Bioensayo 1. Adicionalmente, cuando se haga referencia a cipermetrina $0,04\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ se indicará como BAJA, mientras que cuando se haga referencia a cipermetrina $0,4\text{ }\mu\text{g/L}$ y clorpirifós $4\text{ }\mu\text{g/L}$ se indicará como ALTA. Este ensayo fue realizado en etapas separadas, por cuestiones de espacio y disponibilidad del equipamiento para medir el comportamiento del pez. Debido a esto, en cada experimento se expusieron peces control, por lo tanto se comparan los resultados de concentración baja y alta con sus respectivos controles.

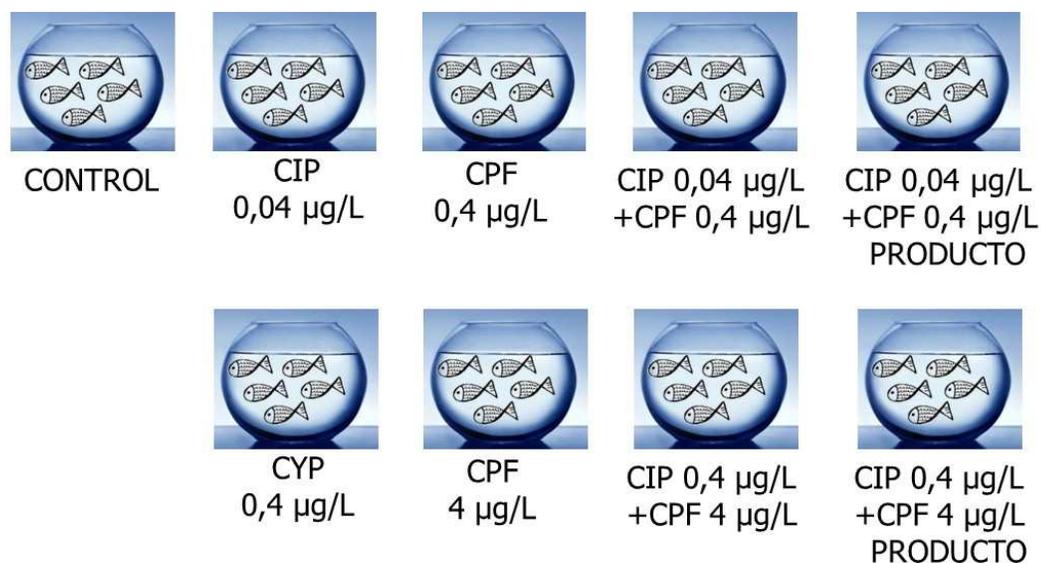


Figura 2.5: Bioensayo 2. CIP: Cipermetrina. CPF: Clorpirifós. Mezcla técnica: mezcla de los compuestos puros. Mezcla productos: mezcla de CIP y CPF de las formulaciones comerciales.

La evaluación de comportamiento natatorio fue realizada a las 24 y 96 h de exposición. Cumplidas las 96 horas de exposición, se disectaron los peces, conservando a -80°C cada órgano individualmente: hígado, intestino, gónada, branquias, cerebro y músculo. Los músculos y cerebros fueron utilizados para la medición de actividad de acetilcolinesterasas.

Exposiciones y réplicas

Se hicieron 7 exposiciones para todas las condiciones ($n= 175$). En 3 exposiciones se evaluó el comportamiento natatorio en 3 peces ($n= 9$). Como la medición de este biomarcador no requiere el sacrificio de los organismos, estos fueron también utilizados para otras determinaciones. La medición de los otros biomarcadores de efecto se realizó sobre un $n=5$, siendo estos organismos tomados al azar de al menos 3 exposiciones (peceras) distintas. Para la medición de acumulación se utilizaron 15 peces por condición, tomados también al azar, de al menos 3 exposiciones. Para la evaluación de la acumulación se realizó un pool de 5 organismos para cada medición, por lo tanto se trabajó con un $n=3$. Para la medición de comportamiento y acetilcolinesterasas en el bioensayo 2 se realizaron las exposiciones por triplicado, cada una con 3 peces por condición manteniendo la relación de 1 pez por L de medio de exposición ($n=9$ para comportamiento; $n= 5$ para AChE).

Estabilidad de los compuestos en el agua de ensayo

Para evaluar la estabilidad de los compuestos en agua de ensayo se realizó una prueba preliminar en las mismas condiciones de exposición y se midieron las concentraciones de plaguicidas en el medio acuoso. Además, en cada ensayo realizado para la posterior medición de biomarcadores, se verificaron las concentraciones experimentales de cipermetrina y clorpirifós. Para ello, se tomó 1 L de agua de pecera de cada tratamiento al comienzo de la exposición (0 h) y 1 L a las 24 horas. Para la evaluación a las 0 h, se preparó un litro excedente en cada pecera y luego de media hora de mezclado en presencia de los peces se obtuvo la muestra para la determinación. La muestra a las 24 h se recolectó antes del recambio de agua diario. Las muestras obtenidas fueron procesadas con la metodología de extracción y detección explicada anteriormente para aguas (sección 1.3.2 y 1.3.4).

2.2.2 Biomarcadores de exposición: acumulación

La evaluación de residuos de plaguicidas en los órganos de los peces de ensayo, se realizaron a partir de un pool de 5 órganos de intestino, hígado, branquias, cerebro, músculo y gónadas, que hacen un peso húmedo de órganos de entre 10 y 500 mg, obteniendo un n=3. La extracción se realizó mediante la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (Matrix Solid Phase Dispersión - MSPD). Para ello los órganos conservados a -80°C se disgregaron en un mortero de porcelana con 3 g de sulfato de sodio anhidro, previamente secado a 110°C en estufa durante 24 h, para que absorba el agua de la muestra. Luego, se homogeneizaron con 2 g de fluorisil (60-100 mesh), activado previamente en mufla a 500°C durante 2 h, fase que contiene sitios activos para la adsorción de los compuestos de interés. Con las fases y la muestra ya en forma de polvo se procedió al armado del cartucho (utilizando jeringas de 10 mL), colocando en la parte inferior 3 g de alúmina (Al_2O_3) para la limpieza del extracto. La alúmina cumple la función principal de retención de lípidos. En la parte inferior, superior y entre las fases del cartucho se colocó papel de filtro (lavado previamente con acetato de etilo). Finalmente los compuestos se eluyeron con 10 mL de acetato de etilo (calidad para cromatografía). Los extractos fueron evaporados con nitrógeno gas y redissueltos en 490 μ L de acetato de etilo, con el agregado de 10 μ L de PCB#103 como estándar interno. El análisis de los compuestos se realizó por cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD) y la confirmación de la identidad de los compuestos se

realizó por cromatografía líquida de ultra alta performance en tándem con detección por espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-Q-TOF). Luego de la cuantificación por GC-ECD los extractos fueron evaporados y redisueltos en 300 μL de acetonitrilo:agua (70:30) para la identificación por UPLC-Q-TOF. Previamente a la inyección de las muestras se fue necesario el filtrado de las mismas por membrana de 0,22 μm .

Para la evaluación de la calidad analítica de la metodología se ensayaron órganos de pez con agregado de cipermetrina y clorpirifós en dos concentraciones 6.667 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 667 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los porcentajes de recuperación encontrados para cipermetrina y clorpirifós fueron $71\pm 3\%$ y $84\pm 4\%$, respectivamente. Para el análisis de los compuestos por GC-ECD se obtuvieron las siguientes curvas de calibración y coeficientes de correlación (r^2): cipermetrina: $y = 28754 X + 30823$, $r^2 = 0,998$; clorpirifós $y = 31917 X + 11979$ $r^2 = 0,991$. Las condiciones de la cromatografía gaseosa fueron: 160 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min; 200 $^{\circ}\text{C}$ a 17 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 270 $^{\circ}\text{C}$ a 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por 4 min; tiempo total: 19,02 min; gas helio a flujo 7 mL/min; detector Captura electrónica. Los valores de LD y LQ fueron 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente.

Para la confirmación UPLC-Q-TOF se utilizaron las siguientes condiciones: Columna C18 (Kinetex - Phenomenex), fase móvil acetonitrilo con ácido fórmico 1 % (solvente A) y ácido fórmico al 1 % en agua (solvente B), flujo 0,3 mL/min, gradiente solvente A tiempo 0 min: 65 %, tiempo 15 min: 15 %, tiempo 20 min: 15 %, tiempo 21 min: 65 %, tiempo 25 min: 65 %. Fuente ESI, volumen de inyección 40 μL . Rango de masas monitoreadas: 80-800 m/z. Tiempos de retención (t_R) encontrados para cipermetrina $t_R = 16,6$ y clorpirifós $t_R = 14,3$ min. Los iones extraídos para cada compuesto a partir de la masa exacta experimental fueron para cipermetrina: 416,084 m/z y 418,081 m/z, y clorpirifós: 349,936 m/z y 351,933 m/z, con desviaciones de masas < 10 ppm. Se realizó calibración interna de cada corrida entre el min 10-11,6, con formiato de sodio 20 mM flujo 0,2 mL/min. Los límites para cipermetrina fueron LD= 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y LQ= 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para clorpirifós fueron LD= 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y LQ= 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cada muestra se analizó por duplicado.

2.2.3 Biomarcadores de efecto: enzimas antioxidantes, biotransformación de Fase II y colinesterasas

Extracción y determinación de actividad enzimática

La extracción de las enzimas se realizó según Cazenave et al. (2006) con modificaciones. Cada órgano, hígado, intestino, branquias, cerebro y músculo, se homogeneizó en homogeneizador de vidrio con 2 mL de solución de ruptura (80 mL solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,1 M, pH= 6,5, glicerol 20 mL, 0,045 g de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y 0,022 g de ditioeritritol (DTE) en hielo. Luego se centrifugó durante 10 min a 6.813 *g* a 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a tubos para ultracentrífuga y se centrifugó durante 1 h a 100.000 *g* a 4 °C para la separación de la fracción citosólica (sobrenadante) y microsomal (precipitado). Una vez separado el sobrenadante la fracción microsomal fue resuspendida con la ayuda de un homogeneizador en 500 μ L de solución microsomal (40 mL solución amortiguadora fosfato de sodio 20 mM, pH= 7,0, glicerol 10 mL y 0,01 g DTE). Las fracciones citosólica y microsomal se almacenaron en tubos plásticos a -80 °C previo congelamiento con aire líquido hasta su procesamiento.

Las actividades de glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinestresasa (BChE) fueron determinadas por medio de cinética enzimática frente a sus respectivos sustratos seguida por espectrofotometría UV/visible utilizando un lector multiplaca (Synergy BioTek, USA). La actividad de enzimas antioxidantes: GST, CAT, GR y GPx se realizó en intestino, hígado, branquias, cerebro y músculo. La actividad de enzimas colinesterasas se realizó en músculo y cerebro. Todas las mediciones espectrofotométricas se realizaron por triplicado.

La actividad de GST fue determinada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) y glutatión reducido (GSH), como sustratos. Se midió a 340 nm la formación del conjugado formado por el CDNB y GSH en presencia de GST de la muestra (Fig 2.6. - Habig et al., 1974). El compuesto CDNB-conjugado presenta un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 9,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad de esta enzima se midió en las fracciones citosólica y microsomal (GSTc y GSTm, respectivamente).

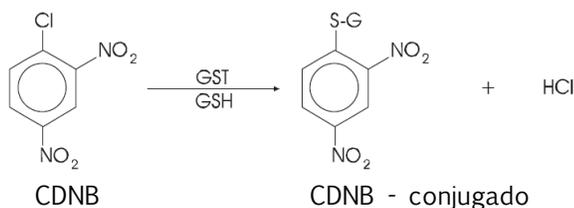


Figura 2.6: Reacción de conjugación de CDNB con glutatión en presencia de la enzima GST.

La actividad de CAT se determinó según Beutler (1982), utilizando H_2O_2 como sustrato. La cinética de la reacción se realizó midiendo la disminución de H_2O_2 a 240 nm, cuyo coeficiente de extinción molar es $0,071 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad de esta enzima se evaluó en la fracción citosólica.

La actividad de GR fue medida según Carlberg y Mannervik (1985), utilizando como sustrato glutatión oxidado (GSSG) que se reduce a glutatión reducido (GSH) consumiendo estequiométricamente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) agregado. Se midió la disminución de NADPH a 340 nm. La actividad de esta enzima se determinó en la fracción citosólica.

La actividad de GPx fue evaluada de acuerdo con Livingstone et al. (1992). La GPx reduce H_2O_2 oxidando GSH a GSSG. El GSSG es reducido nuevamente a GSH por adición de GR. La detección se basa, al igual que en la determinación de GR, en la reducción de GSSG en presencia de NADPH, siguiendo la disminución del contenido de NADPH a 340 nm. La actividad de esta enzima se determinó en la fracción citosólica. Para la evaluación de ambas enzimas (GR y GPx), el coeficiente de extinción molar del sustrato NADPH es de $6,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La actividad de AChE se midió según Ellman et al. (1961) frente al sustrato yoduro de acetilcolina (0,075 M). Como producto de la hidrólisis se genera tiocolina que reacciona con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) agregado (0,01 M), produciendo el compuesto 2-nitro-5-mercaptobenzoato cuya absorbancia se mide a 412 nm y presenta el coeficiente de extinción molar de $14,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad de esta enzima se determinó en fracción microsomal.

Por otra parte, la actividad de BChE se midió de la misma manera que AChE cambiando el sustrato, que en este caso fue yoduro de butirilcolina (22,58 mg/mL). La actividad de esta enzima se midió en fracción citosólica.

La actividad enzimática se expresó en unidades de nkat/mg de proteínas, donde 1 nkat= 1 nanokatal y se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar un nanomol de sustrato por segundo. Las actividades enzimáticas de GST, CAT, GR, GPx y AChE se calculó utilizando la siguiente Fórmula 1:

Fórmula 1:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(\Delta E \times V \times 1000 \times 1 \text{ min})}{\epsilon \times b \times \Delta t \times v \times c \times 60 \text{ s}}$$

Donde:

ΔE = diferencia de absorbancia

V= Volumen de reacción (μL)

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b= paso óptico (cm)

Δt = tiempo de la cinética de reacción realizada (min)

v= volumen del extracto de la muestra (μL)

c= contenido de proteínas del extracto de la muestra (mg/mL)

Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas se midió en las fracciones citosólica y microsomal. El contenido proteico de cada extracto se determinó según el ensayo de Bradford (1976). Este método se basa en la formación de un complejo color azul entre el reactivo azul brillante coomassie G-250 y las proteínas, éste se mide a 595 nm. Para la curva de calibración se utilizó albúmina sérica bovina en un rango de 0,001 a 0,1 $\mu\text{g/L}$. Las mediciones se realizaron por triplicado.

2.2.4 Biomarcadores de efecto: daño oxidativo

Extracción y medición de proteínas carboniladas

La evaluación del daño oxidativo en proteínas, mediante la determinación de PCO, se realizó a partir del método desarrollado por Levine et al. (1990) con modificaciones. Para ello, la extracción de los distintos órganos: intestino, hígado, branquias, cerebro y

músculo, se realizó con el agregado de 1 mL de solución amortiguadora fosfato de sodio 50 mM, pH= 7,4. El homogenato obtenido se centrifugó a 11.000 g por 5 min, separándose del sobrenadante una alícuota para la determinación de proteínas totales por Bradford. Al resto del sobrenadante (aproximadamente 600 μ L) se le agregó 1 % de protamina (0,1 g/mL), se incubó por 30 min a 4 °C y se centrifugó a 11.000 g por 5 min para precipitar y separar ácidos nucleicos que puedan interferir en la reacción. El sobrenadante tratado se separó en dos alícuotas de 250 μ L. A la alícuota 1 (blanco), se agregaron 250 μ L de solución amortiguadora fosfato de sodio 50 mM, pH=7,4 y 500 μ L de HCl 2 M. A la alícuota 2 (muestra) se agregaron 250 μ L de solución amortiguadora y 500 μ L de 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNP) 10 mM preparada en HCl 2 M. Las alícuotas 1 y 2 se incubaron durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente, agitando con vórtex cada 10 min. Luego, se detuvo la reacción con el agregado de 500 μ L de TCA al 20 %, se dejó en reposo 5 min en frío y se centrifugó durante 3 min a 11.000 g. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol y acetato de etilo (1:1). Luego de cada lavado se centrifugó durante 3 min a 11.000 g. El pellet lavado se redisolvió con 320 μ L de guanidina 6 M preparada en solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH= 2,3 con HCl 2M y se incubó en un baño a 37 °C durante 15 min. Finalmente se agitó para asegurar la completa disolución y se midió espectrofotométricamente a 366 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado para este ensayo fue de 22000 M⁻¹cm⁻¹. El resultado se expresó como nmoles/mg de proteína. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron por duplicado.

Extracción y medición de la peroxidación lipídica

Para evaluar la peroxidación lipídica (LPO) en los órganos de *J. multidentata*, se aplicó el método descrito por Fatima et al. (2000) modificado por Cazenave et al. (2006). El mismo se basa en la medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), entre las que se encuentra el malondialdehído (MDA), principal producto de la oxidación de los lípidos poliinsaturados. Para ello, intestino, hígado, branquias, cerebro y músculo, se homogeneizaron individualmente con 1 mL de solución de cloruro de potasio 0,15 M en un homogeneizador de vidrio. El homogenato obtenido se separó en tres alícuotas de 0,3 mL alícuota 1: blanco de muestra; alícuota 2: muestra; alícuota 3: medición de proteínas totales (Bradford, 1976). Las alícuotas 1 y 2 se incubaron durante 1 h a 37 °C, con agitación continua. Luego se les agregó 0,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5 % a cada tubo, seguido del agregado de 0,3 mL de agua al blanco y 0,3 mL de TBA

0,67 % a la muestra. La mezcla de reacción se agitó y centrifugó a 11.000 g durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos se llevaron a ebullición durante 10 min y pasado ese tiempo se dejaron enfriar para su posterior medición espectrofotométrica a 535 nm. La LPO se expresó como nanomoles de TBARS formadas por hora, por miligramo de proteínas (nmol TBARS/mg proteínas), usando un coeficiente de extinción molar de $156000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El contenido final de TBARS en la muestra se calculó descontando el contenido obtenido en el blanco de muestra. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron por duplicado.

2.2.5 Biomarcadores de efecto: enzimas de biotransformación y disrupción endócrina

Extracción de ARN y medición de la expresión relativa de CYP1A, P-gp y Aromatasa

Se obtuvo el ARN total de intestino, hígado, branquias, cerebro y gónadas utilizando el método de extracción de guanidina tiocianato-fenol cloroformo, de acuerdo con Chomczynski y Sacchi (1987). Posteriormente se realizó una transcripción reversa (RT) no específica con 1 μg de ARN de cada muestra utilizando un método de síntesis de ADN complementario (ADNc) catalizado por la enzima transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) y usando cebadores oligo (dT)₁₅ (Biodynamics S.R.L.) (Amé et al., 2009). El ADNc resultante fue utilizado para amplificar y medir la abundancia de transcritos usando una estrategia de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) medida en tiempo real. Se realizó la amplificación y cuantificación en los órganos: intestino, hígado, branquias y cerebro de citocromo P450 (*cyp1a1*) y la proteína de membrana del sistema MXR (P-gp). La abundancia de transcritos para aromatasa fueron: *cyp19a2* (*cyp19a1b*) en cerebro y *cyp19a1* (*cyp19a1a*) en gónadas. La reacción de PCR fue realizada en el ciclador BioRad iQ cycler con 1 μL de una dilución $\frac{1}{2}$ de ADNc (25 ng ARN total retrotranscrito), Master Mix de PCR de Syber Green (conteniendo buffer Tris, Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5mM MgCl_2 , pH= 8,7) con adición de fluoresceína 10 nM final (Applied Biosystems) y 5 pmol de oligonucleótidos en un volumen final de 15 μL . Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 x 95°C, 15 min; 45 x [94°C, 15 s, temperatura de hibridación específica de cada gen (Tabla 2.1), 30 s y 72°C, 30 s]. La secuencia de oligonucleótidos, los números de acceso genbank de la secuencia molde y la temperatura de hibridación de la reacción de PCR utilizados se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Secuencia de oligonucleótidos, números de acceso genbank de la secuencia molde y temperatura de hibridación específica.

Gen blanco	Secuencia de oligonucleótidos	Número de acceso	Temperatura hibridación (°C)	Referencia
<i>CYP1A1</i>	Sentido 5'-CTGGATCGAACTCCTACTATCACTGA-3'	EF362746	58,7	Amé et al., 2008
	Anti-sentido 5'-GCAGTGTGGGATTGTGAAAGTA-3'			
<i>P-gp</i>	Sentido 5'-CTGCACGCTAGCGGAAAAC-3'	EF362745	58,7	Amé et al., 2009
	Anti-sentido 5'-CCTCTATCTCCTCCATGGTCACA-3'			
<i>cyp19a1</i>	Sentido 5'-CAAAGGCACAAATATCATCTTGA-3'	FJ169945	58,7	Guyón et al., 2012b
	Anti-sentido 5'-CGGGCTGGTGAAGAAGCTC-3'			
<i>cyp19a2</i>	Sentido 5'-GAAACATCATTAAACAAAAGTGA-3'	EU851873	61,2	Guyón et al., 2012a
	Anti-sentido 5'-GAGAGCTCCCCATGGTTCTG-3'			
β -actin	Sentido 5'-AAAGCCAACAGGGAGAAGATGAC-3'	EF362747	58,7	Amé et al., 2009
	Antisentido 5'-GCCTGGATGGCAACGTACA-3'			

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por duplicado para cada muestra de ADNc. Se llevaron a cabo curvas de disociación para monitorear la ausencia de dímeros de primers. Los productos de amplificación fueron cuantificados por comparación con un Ct experimental (threshold cycle) definido como el ciclo de PCR donde ocurre un aumento en la fluorescencia sobre el nivel de fondo. Para estimar las eficiencias de amplificación se realizó una curva estándar para cada par de oligonucleótidos basadas en cantidades conocidas de ADNc (diluciones decimales seriales correspondientes a ADNc transcripto de 100 a 0,01 ng de ARN total). Como gen control se utilizó β -actina de *J. multidentata* (Amé et al., 2009).

2.2.6 Biomarcadores de efecto: comportamiento natatorio

La evaluación de comportamiento natatorio fue realizada a las 24 h y 96 h de exposición según el bioensayo 2, transcurrido ese tiempo en la misma franja horaria del día (entre las 9:00 am y 2:00 pm). Los peces fueron colocados en la pecera de filmación en forma individual. Se filmó la actividad natatoria del pez con una cámara estándar durante 10 min y luego los videos fueron procesados por el software ANY-maze (Stoelting CO, USA). El programa de seguimiento del animal fue ajustado dividiendo la pecera en zonas: arriba, abajo, centro y costados. Las mediciones que se tomaron en consideración fueron

para evaluar la exploración vertical y lateral del pez, como tiempo y cantidad de ingresos en cada zona. Además, se consideraron medidas del comportamiento en el total de la pecera como la distancia recorrida, la velocidad promedio, el tiempo móvil y los episodios de inmovilidad. Cada medida se evaluó en tres segmentos de dos minutos para comparar diferencias en el comportamiento de los peces expuestos en relación a los peces control. Se consideraron los últimos 6 minutos ya que se sabe que al ingresar a una pecera desconocida el pez tiene una conducta exploratoria (que se dio durante los primeros 4 min) y sus posibles diferencias escapan al objetivo de este trabajo. Luego se promedió la medida de los tres segmentos de dos minutos considerados.

2.2.7 Análisis de datos

Estadística univariada

Se realizó un test de Shapiro-Wilks con el fin de probar la normalidad de los datos y una Prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó un test de ANOVA ($p < 0,05$) y como test a posteriori se utilizó el Test de Tukey. Para datos no normales o no homogéneos se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y como test a posteriori el de Dunn (Sokal y Rohlf, 1999). Para estos análisis se utilizó la aplicación informática Infostat, 2002-2008. En el análisis de los datos de comportamiento se testeó la normalidad y homogeneidad de varianza como se explicó anteriormente. Luego para verificar si existían diferencias se aplicó un test de ANOVA de medidas repetidas para datos que cumplían con los supuestos y modelo mixto lineal para los datos que no los cumplían, utilizando el paquete estadístico SPSS Statistica 20 (IBM).

Estadística multivariada

Se utilizaron dos técnicas multivariadas: análisis de conglomerados y análisis discriminante. El análisis de conglomerados se utilizó para evaluar con carácter exploratorio las diferencias entre tratamientos, considerando todos los biomarcadores de efecto medidos en esta tesis. El resultado puede representarse en un dendrograma, que resume de forma visual el proceso de agrupamiento de los casos de estudio (individuos), mostrando los conglomerados formados y su proximidad. Por otro lado, se utilizó análisis discriminante con el objetivo de seleccionar los biomarcadores de efecto que mejor explican la variabilidad entre tratamientos. Este análisis fue realizado por

órgano, para seleccionar las respuestas que luego fueron incluidas en el cálculo de la respuesta integrada de biomarcadores (RIB) para cada tratamiento.

Las técnicas fueron realizadas sobre los datos normalizados a media cero y varianza uno (datos estandarizados), para evitar errores en la clasificación de los casos de estudio debidos a los diferentes órdenes de magnitud tanto del valor numérico como de la varianza de los parámetros analizados (Johnson y Wichern, 1992; Vega et al., 1998).

Respuesta integrada de biomarcadores

Para combinar todas las respuestas de los biomarcadores de efecto indicados por el análisis discriminante, se calculó un índice de estrés general denominado respuesta integrada de biomarcadores (RIB) (Beliaeff y Burgeot, 2002). El procedimiento del cálculo de RIB se describe a continuación: **1-** Los datos se estandarizaron según la fórmula $Y = (X - M) / DE$, donde X es el valor de cada respuesta biomarcador, M es el valor medio del biomarcador y DE es la desviación estándar del biomarcador. **2-** Utilizando los datos estandarizados, se calculó Z como $Z = Y$ en el caso de activación o $Z = -Y$ en el caso de la inhibición. Por lo tanto se obtuvo un valor mínimo (Min) para cada biomarcador. **3-** La puntuación (S) se calcula como $S = Z + |\text{Min}|$, donde $S \geq 0$ y $|\text{Min}|$ es el valor absoluto del Min. **4-** El valor obtenido de cada biomarcador (S_1) se multiplica por el valor del siguiente biomarcador (S_2), dividiendo por dos. **5-** Finalmente, se resumen todos los valores en el índice de la siguiente manera $RIB = \{(S_1 \times S_2) / 2\} + \{(S_2 \times S_3) / 2\} + \{(S_3 \times S_4) / 2\} + \{(S_4 \times S_1) / 2\}$, se generarán tantos valores de S como biomarcadores sean tenidos en cuenta. Para este estudio se calculó un valor de RIB para cada tratamiento.

Análisis de correlación

El análisis de correlación de Spearman, fue utilizado para evaluar la asociación entre la acumulación de cipermetrina y clorpirifós en los órganos de *J. multidentata* (independientemente del tratamiento realizado) y los valores de RIB calculados para cada tratamiento. El coeficiente de correlación de Spearman es una medida de la asociación lineal entre dos variables (en este caso no paramétricas) que no depende de las unidades de medida de las variables. El cálculo se realizó también para la suma de los plaguicidas medidos en los tejidos.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Estabilidad de los compuestos en el agua de ensayo

A tiempo inicial (0 h) se realizó la medición de las concentraciones de los insecticidas en el agua de ensayo y se corroboró que las mismas son cercanas a las concentraciones nominales y por lo tanto aceptables. Por otra parte, para evaluar la estabilidad de estas sustancias se realizó la medición de las concentraciones a las 24 h de exposición y se observó que la degradación o pérdida fue del 49 % y del 81 % para cipermetrina y clorpirifós, respectivamente. Debido a los resultados encontrados se realizaron cambios totales del agua de pecera cada 24 h. Porcentajes de decaimiento similares fueron reportados en estudios previos, donde los autores arribaron también a la conclusión de la necesidad de renovar el medio de exposición cada 24 h (Brodeur et al., 2014; Tilton et al., 2011). Las concentraciones informadas (Tabla 2.2) corresponden al promedio de seis muestras independientes, pertenecientes a duplicados de cada tratamiento.

Tabla 2.2: Concentración de cipermetrina y clorpirifós ($\mu\text{g/L}$) en el medio de exposición

Tiempo de exposición	Concentración nominal	Concentración medida		
		Media \pm DE	Mínimo	Máximo
Cipermetrina				
Inicial (tiempo 0)	0,04	0,04 \pm 0,01	0,03	0,05
Luego de 24 h		0,02 \pm 0,01	0,01	0,03
Clorpirifós				
Inicial (tiempo 0)	0,4	0,31 \pm 0,03	0,28	0,34
Luego de 24 h		0,06 \pm 0,02	0,04	0,08

DE: desviación estándar

2.3.2 Acumulación y biotransformación

Acumulación y distribución de los plaguicidas

En los ambientes acuáticos contaminados con plaguicidas, estos compuestos y sus productos de degradación se distribuyen entre los verdaderamente disueltos en agua y aquellos adsorbidos o incorporados en los sedimentos, detritos en suspensión, invertebrados bentónicos, plantas acuáticas, plancton, invertebrados acuáticos y peces. Así, los peces pueden estar expuestos a partir de tres vías principales: 1- por vía dérmica,

a través de la directa absorción por piel al nadar en aguas contaminadas. 2- durante la respiración, por la absorción directa de los plaguicidas a través de las branquias y 3- por vía oral, por el agua bebida contaminada o alimentación con organismos que contengan residuos de plaguicidas (Rathore y Nollet, 2012). Una vez que los plaguicidas fueron absorbidos, pueden llegar a varios tejidos del organismo a través del torrente sanguíneo. Estos químicos se distribuyen especialmente en aquellos órganos altamente irrigados como branquias, hígado, intestino, riñón, etc. En los diferentes órganos pueden ser biotransformados para posteriormente ser eliminados, o bien, bioacumularse (Ibelings y Chorus, 2007). Cuando la velocidad de ingreso del contaminante es significativamente mayor a los niveles de metabolización y eliminación, puede ocurrir su bioacumulación (van der Oost et al., 2003).

La especie *J. multidentata* expuesta a CIP y CPF en condiciones de laboratorio mostró que los dos insecticidas fueron bioacumulados en intestino, hígado, branquias y músculo. Por el contrario, los compuestos no se encontraron en cerebro y gónadas de los peces expuestos a los distintos tratamientos. Asimismo, la distribución de estos plaguicidas en los distintos órganos evaluados resultó diferente dependiendo si la exposición al tóxico se realizó en forma individual o en mezclas.

Las concentraciones medidas de CIP y CPF en distintos órganos de *J. multidentata* expuesta a los tratamientos CIP 0,04 µg/L, CPF 0,4 µg/L, CIP+CPF y PRODUCTO se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Concentración de cipermetrina y clorpirifós por órgano de *Jenynsia multidentata* expuestos a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas. Los valores están expresados como media ± desvío estándar (µg/kg).

Tratamiento	Plaguicida	Intestino	Hígado	Branquias	Cerebro	Músculo	Gónadas
CONTROL	CIP	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	CPF	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
CIP 0,04 µg/L	CIP	<LD	<LD	<LD	<LD	9±5	<LD
	CPF	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
CPF 0,4 µg/L	CIP	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	CPF	67±49	58±25	42±31	<LD	<LD	<LD
CIP+CPF	CIP	52±30	156±35	8±5	<LD	<LD	<LD
	CPF	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
PRODUCTO	CIP	116±67	<LD	52±30	<LD	<LD	<LD
	CPF	50±29	323±187	11±6	<LD	8±5	<LD

LD: Límite de detección

En los individuos expuestos a **CIP 0,04 µg/L** durante 96 h, sólo se observó acumulación de este insecticida en músculo. La distribución de cipermetrina medida en el pez trucha *Salmo gairdneri* expuesto a este plaguicida por 24 h mostró mayores concentraciones en las vísceras del pez que en las observadas en el resto del cuerpo donde se incluye al músculo (Edwards y Millburn, 1987). Esta disparidad podría deberse a que en *J. multidentata* la cipermetrina presente en otros órganos ya haya sido metabolizada. Por el contrario, se encuentra en músculo porque éste órgano tiene una menor capacidad de biotransformación. Esta diferencia entre el perfil de acumulación de los distintos tejidos fue observado con microcistina en *O. bonariensis* recolectados en campo. En los peces se detectó bioacumulación en hígado y músculo durante el período de presencia del tóxico en agua, mientras que sólo se detectó acumulación en músculo en el período que microcistina no fue detectada en agua (Amé et al., 2010).

Los peces expuestos a **CPF 0,4 µg/L** mostraron concentraciones de este plaguicida en el siguiente orden decreciente: intestino > hígado > branquias (Tabla 2.3). La distribución del clorpirifós bioacumulado en los distintos tejidos de *J. multidentata* presentó un patrón típico de compuestos hidrofóbicos. Una distribución similar fue reportada en las especies *I. punctatus* y *G. affinis* expuestas al mismo insecticida (Barron et al., 1993; Rao et al., 2005). La presencia de clorpirifós en intestino y branquias puede deberse al ingreso directo del compuesto por estas vías. En cuanto al intestino, se debería principalmente a la ingestión de agua contaminada ya que durante este ensayo, el alimento no se considera como medio de incorporación porque su consumo fue rápido y en mínimas cantidades. En intestino, otra posibilidad es que el contaminante sea reabsorbido en este órgano luego de ser excretado por el sistema circulatorio o la vesícula biliar. Este mecanismo tiene el objetivo de eliminar el contaminante por medio de las heces si bien la tasa de excreción del compuesto sin metabolizar es despreciable en relación a los procesos de biotransformación (Welling y de Vries, 1992). En branquias, la presencia del plaguicida también podría deberse a una llegada al tejido a través del sistema circulatorio. Por otra parte, el hígado es el principal órgano de detoxificación de xenobióticos y se encuentra en una posición estratégica dentro de los organismos recibiendo una gran cantidad de sangre, principalmente proveniente del intestino (Ballesteros et al., 2011). En exposiciones agudas a plaguicidas se puede saturar la capacidad de depuración de este órgano con la consecuente acumulación de los contaminantes.

En peces expuestos a **CIP+CPF** se observó acumulación solamente de cipermetrina, mostrando una distribución en los distintos órganos en el siguiente orden decreciente: hígado > intestino > branquias (Tabla 2.3). Así la cipermetrina en presencia de clorpirifós exhibió un patrón de bioacumulación diferente a lo mostrado en las exposiciones en forma individual. Luego de este tratamiento la distribución de cipermetrina bioacumulada en los distintos tejidos de *J. multidentata* resultó similar a lo informado por Edwards y Millburn, (1987) con mayores concentraciones en las vísceras que en el resto del cuerpo. Como se explicó anteriormente, se puede asociar la presencia de este plaguicida en intestino y branquias a las principales vías de ingreso de contaminantes o a una llegada por vía circulatoria. La alta concentración acumulada en hígado podría indicar una menor capacidad de biotransformación de cipermetrina en presencia de clorpirifós. Por el contrario, al no observarse una bioacumulación de clorpirifós en ninguno de los órganos evaluados podría hipotetizarse que se debe a un aumento de la biotransformación del mismo. Hayes (2010) indica que una consecuencia de la interacción entre insecticidas piretroides y organofosforados produce la inhibición por parte del organofosforado de las enzimas carboxilesterasas. Estas enzimas son las responsables, entre otros factores, del clivaje de la unión éster de la cipermetrina, paso necesario para su detoxificación (Hayes et al., 2010). Por lo tanto, una inhibición en la metabolización del plaguicida favorecería su acumulación con su estructura química original, sin metabolizar. Por el contrario, la ausencia de acumulación de clorpirifós en los peces expuestos a la mezcla técnica podría deberse al aumento de la oxidación de este insecticida para formar derivados oxidados no medidos en este estudio. Esta oxidación podría atribuirse a la presencia de cipermetrina, que se conoce capaz de generar un aumento de las especies reactivas de oxígeno (David et al., 2012).

Los peces expuestos a **PRODUCTO** mostraron concentraciones de ambos plaguicidas bioacumulados en los distintos tejidos de *J. multidentata*. En cuanto a cipermetrina se observó en el siguiente orden decreciente: intestino > branquias (Tabla 2.3), mostrando acumulación de este insecticida sólo en los órganos de ingreso del contaminante. A diferencia de los resultados obtenidos para la mezcla técnica, no se observó acumulación en hígado. Con respecto a la bioacumulación de clorpirifós, este plaguicida mostró el siguiente orden decreciente: hígado > intestino > branquias > músculo (Tabla 2.3), revelando una gran distribución de este insecticida en los distintos órganos de *J. multidentata*. Al igual que en CPF 0,4 µg/L el insecticida se acumuló en los principales

órganos de ingreso del contaminante (intestino y branquias) y en el hígado del pez. Sumado a esto, en la exposición a PRODUCTO se observa bioacumulación de clorpirifós en músculo. Esta diferencia podría deberse a que el clorpirifós adquiera una mayor capacidad para penetrar las membranas cuando se encuentra acompañado de compuestos coadyuvantes presentes en las formulaciones comerciales.

A partir de las cantidades de cipermetrina y clorpirifós cuantificadas en cada órgano se estimó la concentración del insecticida presente en todo el pez, considerando en este cálculo las concentraciones promedio cuantificada ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y el peso promedio de cada órgano (kg). El cálculo se realizó con la Fórmula 2 y los resultados de este cálculo se muestran en la Figura 2.7 para cada tratamiento.

Fórmula 2:

$$\mu\text{g}/\text{kg pez} = \frac{(H \times h) + (I \times i) + (B \times b) + (C \times c) + (M \times m) + (G \times g)}{(h + i + b + c + m + g)}$$

H= Concentración del plaguicida en hígado.

h= Peso del hígado.

I= Concentración del plaguicida en intestino.

i= Peso del intestino.

B= Concentración del plaguicida en branquias.

b= Peso de las branquias.

C= Concentración del plaguicida en cerebro.

c= Peso del cerebro.

M= Concentración del plaguicida en músculo.

m= Peso del músculo.

G= Concentración del plaguicida en gónadas.

g= Peso de las gónadas.

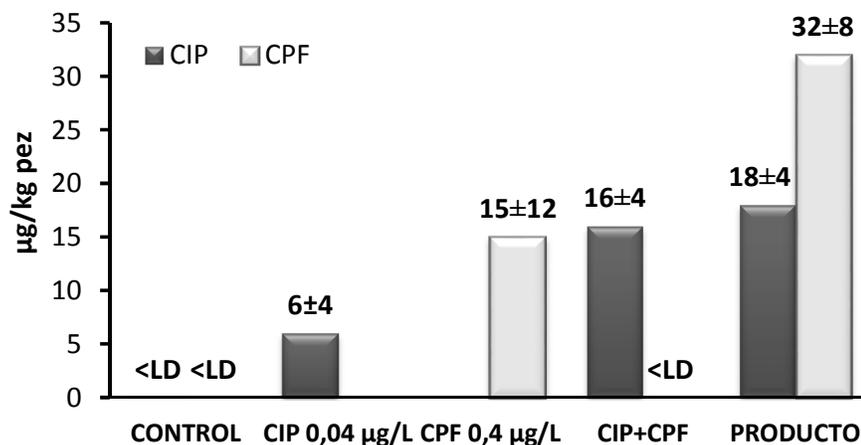


Figura 2.7: Concentraciones promedio estimadas de cipermetrina y clorpirifós en *Jenynsia multidentata* total para cada tratamiento.

A partir de las concentraciones obtenidas de cada plaguicida en el pez (Fig. 2.7) y en relación a la concentración de exposición medida en el agua de ensayo (Tabla 2.2) se pueden estimar factores de bioconcentración (BCF) para cipermetrina y clorpirifós en *J. multidentata*, los mismos fueron calculados como se muestra en la fórmula 3 (Casarett y Doull's, 2008). Los resultados se muestran en la Tabla 2.4.

Fórmula 3:

$$BCF = \frac{C_{pez}}{C_{agua}}$$

C_{pez} = Concentración del plaguicida en el pez (µg/kg).

C_{agua} = Concentración del plaguicida en el agua (µg/L).

En los peces expuestos a los insecticidas de forma individual se obtuvieron los valores de BCF= 160 L/kg para cipermetrina y BCF= 50 L/kg para clorpirifós, lo que indica que los dos compuestos presentan la capacidad de bioconcentrarse en *J. multidentata*. Este resultado coincide en el hecho de que ambos insecticidas poseen valores de $\log K_{ow}$ mayores que 3 ($\log K_{ow}$ CIP=6.6; $\log K_{ow}$ CPF= 4.9, Tabla 1.1), valor por encima del cual se considera un compuesto bioacumulable en un organismo. Además, cipermetrina presenta un mayor valor de $\log K_{ow}$, por lo tanto, como era esperado, se bioconcentra más en el pez que clorpirifós.

Por otra parte, en los peces expuestos a la mezcla de estos insecticidas puros, CIP+CPF, sólo se acumuló cipermetrina y no se cuantificó clorpirifós. El valor obtenido para el

insecticida acumulado fue $BCF= 430 \text{ L/kg}$, siendo este factor casi 3 veces mayor al encontrado en peces expuestos a cipermetrina en forma individual. Este comportamiento de los compuestos en forma conjunta, como se explicó anteriormente, puede deberse a los procesos de biotransformación disminuidos para cipermetrina y aumentados para clorpirifós o a otros fenómenos no medidos en esta tesis.

Los peces expuestos a PRODUCTO mostraron los valores de $BCF= 478 \text{ L/kg}$ para cipermetrina y $BCF= 103 \text{ L/kg}$ para clorpirifós. En cuanto a cipermetrina, este factor resultó similar al encontrado en la exposición con CIP+CPF. Para clorpirifós, el resultado obtenido fue mayor que en los peces expuestos a CIP+CPF (donde no fue detectado), y el doble que el valor obtenido en los peces expuestos a CPF en forma individual. Además, en la exposición a PRODUCTO se observó que los peces bioconcentraron ambos compuestos, a diferencia de los peces expuestos a la mezcla de los insecticidas puros. Esto podría asociarse con la presencia de sustancias coadyuvantes, generalmente solventes y emulsionantes, que se incluyen en las formulaciones de insecticidas comerciales para aumentar su eficiencia.

La acumulación de los plaguicidas encontrada en el músculo de *J. multidentata* podría significar un riesgo para la salud humana, principalmente debido a que otras especies de interés alimentario podrían bioconcentrar estos insecticidas de forma similar. La Organización Mundial de la Salud (OMS) conjuntamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) establecieron valores de ingesta diaria aceptable (IDA), para cipermetrina de $20 \mu\text{g/kg}$ peso corporal por día (FAO/WHO, 2004a) y para clorpirifós de $10 \mu\text{g/kg}$ peso corporal por día (FAO/WHO, 2004b). Considerando el valor promedio de cipermetrina y clorpirifós hallado en el músculo del pez (Tabla 2.3) y asumiendo que un adulto de 70 kg ingiere 100 g de pez por día, el cálculo revela un consumo $0,01 \mu\text{g/kg}$ de peso corporal por día, tanto de cipermetrina como de clorpirifós. La concentración de ingesta diaria calculada resultó menor que el valor de IDA, indicando que no habría riesgo asociado al consumo de peces expuestos a estas concentraciones. Sin embargo, en esta aproximación no se está considerando la biomagnificación que posiblemente ocurra en condiciones ambientales. Este proceso, se refiere a una mayor concentración bioacumulada en organismos que se encuentran en niveles superiores de la cadena alimentaria, como por ejemplo el pejerrey, que consumen organismos menores contaminados, como podría ser *J. multidentata*. A partir

de éstos resultados, surge la necesidad de contar con estudios de acumulación de cipermetrina y clorpirifós en organismos de importancia para la alimentación humana.

Biotransformación

La capacidad de un organismo de eliminar un plaguicida va a depender, entre otras cosas, de la función del sistema de biotransformación. Sin embargo, cuando la velocidad de ingreso del contaminante es significativamente mayor a los niveles de metabolización y eliminación, puede ocurrir la bioacumulación del compuesto (van der Oost et al., 2003). Ante el ingreso del xenobiótico a la célula, las enzimas involucradas en los procesos de detoxificación pueden aumentar su actividad a partir de la activación de las enzimas existentes o por una nueva síntesis enzimática (Sijm y Opperhuizen, 1989).

Para aportar a la comprensión de los mecanismos implicados en la detoxificación de cipermetrina y clorpirifós en los distintos órganos de *J. multidentata* se evaluaron enzimas de fase I, II y III; los resultados se muestran en la Tabla 2.4. La actividad de la enzima de fase II, GST, se midió en fracción citosólica y microsomal, basado en trabajos previos donde se muestra que la GSTc responde más claramente a la presencia del contaminante que la fracción microsomal (Pflugmacher, 2004). En *J. multidentata* expuesta a cipermetrina y clorpirifós se observó que en general responden de forma similar, evidenciando mayores diferencias significativas en la actividad de GSTm en relación GSTc frente al control.

En los peces expuestos a **CIP 0,04 µg/L** se observó aumento significativo de la expresión de *CYP1A* en hígado. Además, se evidenció una disminución significativa de la actividad GSTc y GSTm en intestino, cerebro y músculo y de GSTm en hígado. La expresión de *P-gp* no indicó diferencias significativas frente al control en ninguno de los órganos estudiados. En peces, la principal vía de biotransformación de CIP descrita por otros autores es por reacciones de hidroxilación que se dan previamente a la conjugación con sulfato o glucurónico (Fig 2.1 -Edwards et al., 1987; Carriquiriborde et al., 2012). Esta oxidación podría estar mediada por las enzimas CYP, participando la isoforma CYP1A debido a la evidencia de que cipermetrina es un buen sustrato de esta isoforma (Scollon et al., 2009). Este mecanismo de metabolización podría estar ocurriendo en *J. multidentata* asociado al aumento de la expresión *CYP1A* en hígado. Este aumento sería suficiente para que la acumulación del insecticida en hígado y otros órganos no sea detectable.

Tabla 2.4 Expresión génica de *CYP1A* relativa a β -actina, actividad de GST citosólica y GST microsomal (nkat/mg proteínas) y expresión génica de *P-gp* relativa a β -actina en *Jenynsia multidentata* expuestas a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas. Los valores están expresados como media \pm desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

<i>CYP1A</i>/β-actina					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	0,6 \pm 0,1 ^{BC}	0,7 \pm 0,2 ^B	1,7 \pm 0,7 ^B	0,8 \pm 0,3 ^A	s/d
CIP 0,04 μ g/L	0,6 \pm 0,2 ^{BC}	2,0 \pm 0,1 ^D	1,4 \pm 0,2 ^{AB}	0,4 \pm 0,1 ^A	s/d
CPF 0,4 μ g/L	0,42 \pm 0,09 ^{AB}	0,8 \pm 0,2 ^B	1,7 \pm 0,5 ^B	0,6 \pm 0,2 ^A	s/d
CIP+CPF	0,61 \pm 0,06 ^C	1,3 \pm 0,3 ^C	0,9 \pm 0,5 ^A	0,6 \pm 0,1 ^A	s/d
PRODUCTO	0,24 \pm 0,03 ^A	0,25 \pm 0,07 ^A	2,0 \pm 0,3 ^B	1,4 \pm 0,6 ^B	s/d
GST citosólica (nkat/mg proteína)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	4 \pm 1 ^C	3,8 \pm 0,6	1,3 \pm 0,2	5 \pm 2 ^B	0,4 \pm 0,1 ^C
CIP 0,04 μ g/L	2 \pm 1 ^A	3,6 \pm 0,8	1,2 \pm 0,2	3 \pm 1 ^A	0,3 \pm 0,1 ^A
CPF 0,4 μ g/L	2 \pm 1 ^A	3,4 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	3,1 \pm 0,3 ^A	0,3 \pm 0,1 ^{BC}
CIP+CPF	3 \pm 1 ^{AB}	4,1 \pm 0,6	1,1 \pm 0,2	3,2 \pm 0,6 ^A	0,3 \pm 0,1 ^{AB}
PRODUCTO	3 \pm 1 ^{BC}	4,5 \pm 0,8	1,0 \pm 0,2	3,8 \pm 0,5 ^B	0,3 \pm 0,1 ^{AB}
GST microsomal (nkat/mg proteína)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	2,0 \pm 0,5 ^B	2,4 \pm 0,3 ^B	0,5 \pm 0,1 ^B	2,0 \pm 0,5 ^B	0,4 \pm 0,1 ^C
CIP 0,04 μ g/L	0,9 \pm 0,2 ^A	1,4 \pm 0,7 ^A	0,6 \pm 0,1 ^{BC}	1,1 \pm 0,4 ^A	0,2 \pm 0,1 ^{AB}
CPF 0,4 μ g/L	0,8 \pm 0,2 ^A	1,3 \pm 0,2 ^A	0,6 \pm 0,1 ^C	1,2 \pm 0,1 ^A	0,2 \pm 0,1 ^A
CIP+CPF	1,6 \pm 0,4 ^B	1,5 \pm 0,3 ^A	0,3 \pm 0,1 ^A	2,2 \pm 0,7 ^B	0,3 \pm 0,1 ^A
PRODUCTO	1,0 \pm 0,1 ^A	2,2 \pm 0,4 ^B	0,3 \pm 0,1 ^A	1,8 \pm 0,3 ^B	0,10 \pm 0,01 ^{AB}
<i>P-gp</i>/β-actina					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	1,0 \pm 0,2 ^B	1,0 \pm 0,4 ^A	1,8 \pm 0,5 ^B	0,5 \pm 0,1 ^{AB}	s/d
CIP 0,04 μ g/L	1,0 \pm 0,2 ^B	0,8 \pm 0,2 ^A	1,4 \pm 0,4 ^{AB}	0,6 \pm 0,1 ^{BC}	s/d
CPF 0,4 μ g/L	0,9 \pm 0,2 ^{AB}	1,7 \pm 0,6 ^B	1,3 \pm 0,2 ^{AB}	0,57 \pm 0,05 ^{BC}	s/d
CIP+CPF	1,0 \pm 0,2 ^B	0,9 \pm 0,2 ^A	0,9 \pm 0,4 ^A	0,41 \pm 0,03 ^A	s/d
PRODUCTO	0,6 \pm 0,1 ^A	0,9 \pm 0,1 ^A	1,8 \pm 0,4 ^B	0,64 \pm 0,03 ^C	s/d

CYP1A: Citocromo P-450 1A; GST: Glutatión S-transferasa; *P-gp*: Glicoproteína P

La presencia en músculo de cipermetrina podría asociarse a la menor capacidad general de biotransformación que tiene este órgano al ser comparado con otros tejidos, como ya se explicó anteriormente y como se evidencia aquí con una expresión no detectable de *CYP1A* y *P-gp*. La vía de conjugación con glutatión mediada por la enzima GST no

ha sido reportada en los trabajos de metabolización de cipermetrina tanto en mamíferos como en peces (Carriquiriborde et al., 2012; Crawford et al., 1981; Edwards y Millburn, 1987). Este mecanismo no se observó aumentado en *J. multidentata* razón por la cual podría no estar involucrado en la detoxificación de este compuesto. Por otra parte la inhibición de GST encontrada en los diferentes órganos puede deberse a la unión de cipermetrina o sus metabolitos a los sitios activos de la enzima o a una disminución en la síntesis de las proteínas de GST debido al daño generado en las células por el aumento de ROS producido por este insecticida (Sharma et al., 2014). La inhibición podría también estar caracterizada por una modificación covalente de la enzima, llevando a una pérdida irreversible de la actividad (Cazenave et al., 2006). Resultados similares fueron observados en cerebro de ratas expuestas a cipermetrina (Sharma et al., 2014). Por el contrario, en peces expuestos a este mismo insecticida se observó activación de GST (Davies et al., 1994).

En los peces expuestos a **CPF 0,4 µg/L** no se evidenciaron cambios en la expresión de *CYP1A* en ninguno de los órganos con respecto al control. Por otro lado, se observó una disminución significativa de la actividad de GSTc y GSTm en intestino y cerebro y de la actividad de GSTm en hígado y músculo con respecto a la actividad del control. En cambio, en branquias la actividad de GSTm aumentó significativamente, mientras que en hígado se observó un aumento significativo en la expresión de *P-gp*. La actividad de enzimas de Fase I sería la principal etapa en la biotransformación de CPF. En mamíferos se demostró que CYP1A conjuntamente con otras isoformas de CYP están involucradas en esta vía (Tang et al., 2001). En estudios en peces se observó disminución en los niveles de proteína de CYP1A en la especie *Oncorhynchus tshawytscha* (Wheelock et al., 2005). Contrariamente, se indujo la expresión de *CYP1A* y la actividad de las enzimas CYP en la especie *Cyprinus carpio* (Xing et al., 2014). Dado que en *J. multidentata* sólo se midió la expresión de una isoforma del sistema CYP, no puede descartarse que clorpirifós esté sufriendo reacciones de fase I. Para confirmar este mecanismo en la especie estudiada, una alternativa sería medir la actividad de EROD. La conjugación de fase II por medio de la enzima GST se ha reportado como importante vía de metabolización de clorpirifós en peces (Barron et al., 1993). Además, la proteína P-gp cumpliría un rol adicional en la detoxificación de este insecticida, transportando el CPFO al espacio extracelular (Lanning et al., 1996). Estos mecanismos de biotransformación de fase II y III podrían estar ocurriendo en *J. multidentata* asociado al aumento de la

actividad de GSTm en branquias y expresión de *P-gp* en hígado. Sin embargo, este aumento en la detoxificación no fue suficiente para evitar la acumulación, también favorecida por la inhibición de la actividad de GSTc en el resto de los órganos evaluados. La inhibición de esta enzima causada por clorpirifós podría deberse a los mismos mecanismos presentados para cipermetrina, debido a que ésta, es una respuesta general encontrada para compuestos hidrofóbicos (Ballesteros et al., 2011; Cazenave et al., 2006).

En los peces expuestos a la mezcla técnica de **CIP+CPF** se observó un aumento significativo de la expresión de *CYP1A* en hígado y una disminución en branquias con respecto al control. Además, se evidenciaron diferencias significativas con disminución en la actividad de GSTc y GSTm en músculo, de GSTc en intestino y cerebro y GSTm en hígado y branquias. También se observó una disminución significativa de la expresión de *P-gp* en branquias. Como se discutió previamente, la acumulación de cipermetrina frente a la exposición a la mezcla de insecticidas podría estar asociada con la inhibición de carboxilesterasas por la presencia de clorpirifós. Por el contrario, la ausencia de clorpirifós, podría asociarse con la ocurrencia de estrés oxidativo por cipermetrina. El aumento de *CYP1A* en hígado podría deberse a un intento del organismo de metabolizar la cipermetrina, que resulta insuficiente ya que el insecticida se bioacumuló en ese órgano, en intestino y branquias. En los órganos donde podría ocurrir el contacto directo con el insecticida la inhibición de GSTc en intestino y de enzimas de fase I, II y III en branquias podría favorecer la acumulación en estos órganos. La inhibición generalizada de GST podría afectar la metabolización de clorpirifós, sin embargo este insecticida no se encontró bioacumulado. Por lo tanto, podría suponerse que la oxidación producida por los ROS está primando en la biotransformación de CPF en *J. multidentata* expuesta a mezclas.

En los peces expuestos a **PRODUCTO** se observaron cambios en el patrón de respuesta en relación a CIP+CPF. Así, mostraron diferencias significativas con disminución en la expresión de *CYP1A* en intestino e hígado y aumento significativo en cerebro con respecto al control. Además, se observó una disminución significativa de la actividad de GSTc y GSTm en músculo y de GSTm en intestino y branquias. En cuanto a *P-gp*, su expresión relativa disminuyó en intestino y aumentó en cerebro. La inhibición de *CYP1A* observada en hígado podría ser la responsable de la acumulación de clorpirifós por una menor detoxificación por medio de esa vía. Asimismo, esta respuesta podría deberse a

que en el proceso de desulfuración de clorpirifós mediado por CYP se produce CPFO y el ión azufre liberado puede suprimir la actividad de CYP a través de la unión al grupo hemo (Tang et al., 2002). En intestino se observó inhibición del sistema de biotransformación de fase I, II y III, que podría asociarse a la acumulación de los dos insecticidas. Por el contrario, en branquias donde también se acumularon los dos insecticidas, solamente se observó inhibición de GST, pudiendo deberse a una diferencia en la cantidades acumuladas, mayores en intestino que en branquias, o a una respuesta diferencial de cada tejido. La disminución de la actividad de GST en músculo puede estar disminuyendo la capacidad de detoxificación de clorpirifós provocando así la acumulación en este órgano. El aumento de las enzimas de biotransformación de fase I y III observado en cerebro podría deberse a la presencia de los insecticidas que están siendo metabolizados eficazmente evitando su acumulación. Resumiendo, los peces expuestos a PRODUCTO mostraron inhibición del sistema de biotransformación de fase I, II y III en intestino, hígado, branquias y músculo provocando la acumulación de uno o los dos insecticidas en estos órganos. Por el contrario, se observó un aumento del sistema de biotransformación de fase I y III en cerebro evitando la acumulación.

2.3.3 Colinesterasas (AChE y BChE)

En peces la mayor actividad de AChE se encuentra en cerebro y músculo, mientras que BChE está presente principalmente en hígado y en plasma (Fulton y Key, 2001). En estudios de caracterización de ChE en cerebro y plasma de 16 especies de peces teleósteos de agua dulce pertenecientes a 4 familias: *Cyprinidae*, *Percidae*, *Esocidae* y *Lotidae*, se comprobó actividad de la enzima AChE en ambos tejidos de todas las especies estudiadas. Además se informó actividad de BChE en plasma en el 30 % de especies estudiadas y ninguna especie mostró actividad de BChE en cerebro (Chuiko et al., 2003). Por otra parte se confirmó la significativa actividad de BChE en músculo de peces teleosteos, mediante la caracterización de las ChE en 4 especies de peces marinos, reportándose en este trabajo niveles de AChE en cerebro comparables con las especies de agua dulce y actividad de AChE y BChE en músculo (Sturm et al., 1999).

Si bien existen diferencias entre las distintas familias de peces estudiadas, basándonos en resultados anteriormente explicados, en *J. multidentata*, pez teleósteo de agua dulce, familia Anablepidae, se midió actividad de AChE unida a membrana o microsomal (m) en cerebro y músculo, además BChE citosólica (c) o soluble en músculo. Además, a

diferencia de otras especies reportadas, se detectó actividad de BChE en cerebro de *J. multidentata*. Sin embargo, se requieren estudios adicionales, como evaluación de la actividad de BChE en presencia de inhibidores, para confirmar la misma.

En las Fig 2.8 y 2.9 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de las enzimas AChE microsomal (A) y BChE citosólica (B). Estas actividades fueron evaluadas en músculo y cerebro de peces expuestos según el diseño experimental 1 y 2 (baja y alta concentración de plaguicidas, respectivamente).

La exposición de *J. multidentata* al insecticida **CIP** a baja concentración provocó sólo una inhibición significativa de BChE del 64 % en cerebro frente al control, lo que mostraría que el insecticida interaccionó con la enzima de protección, evitando la inhibición de AChE. Por el contrario, en la exposición a alta concentración de CIP no se observó respuesta de la enzima de protección y el insecticida produjo una inhibición significativa de AChE del 67 % en músculo frente al control. Se conoce que los piretroides puede interaccionar con los aminoácidos aromáticos de las ChEs, produciendo la inhibición de estas enzimas (Rao et al., 2005). En forma coincidente, estudios de exposición a cipermetrina realizados en los peces *Channa punctatus* y *C. carpio* mostraron inhibición de la actividad de AChE en músculo de los peces expuestos frente a los peces control (Kumar et al., 2009; Reddy y Philip, 1994).

En los peces expuestos a **CPF** a baja concentración se observó una inhibición significativa de BChE en cerebro del 58 % y un aumento significativo de la actividad de BChE en músculo frente al control. Dicho aumento puede deberse a la síntesis de novo de esta enzima por el llamado *metabolismo de compensación*, que se da como respuesta a la presencia de compuestos anticolinesterásicos para subsanar defectos funcionales en el sistema colinérgico (Yang et al., 2013). La respuesta de la enzima de protección en los dos órganos evaluados podría asociarse con la falta de efectos observados sobre la AChE. Por otra parte a la alta concentración de CPF se observó inhibición de AChE del 12 % en cerebro, aunque esta diferencia no fue significativa frente al control. Además se observó inhibición significativa de AChE del 76 % en músculo frente al control, mostrando que a alta concentración del insecticida la actividad de protección de BChE fue insuficiente para evitar la inhibición de AChE en los dos órganos evaluados.

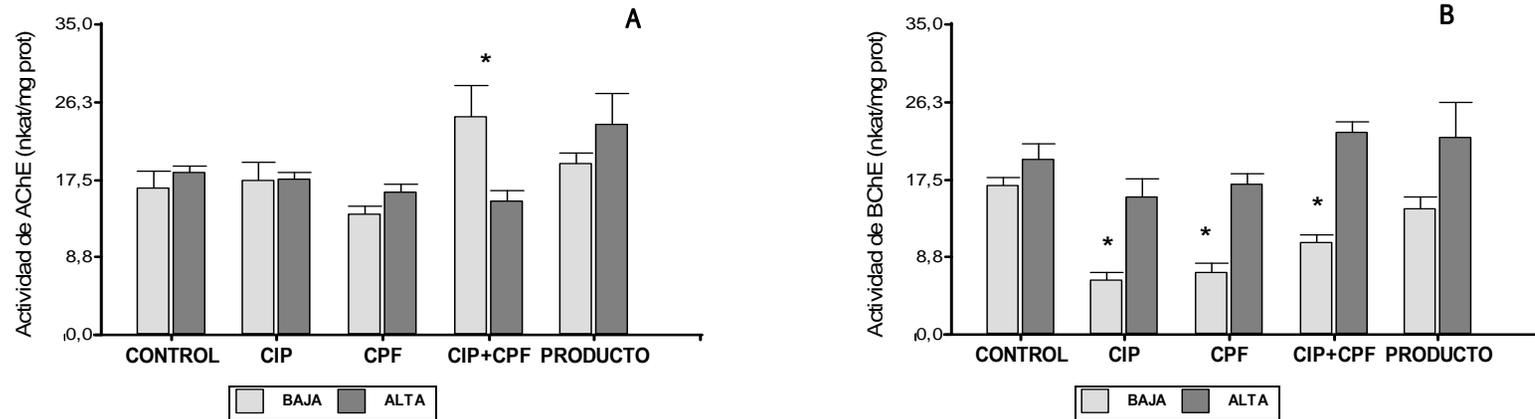


Fig 2.8 Actividad de AChE (A) y BChE (B) (nkat/mg prot) en **cerebro** de *Jenynsia multidentata*, expuestos a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

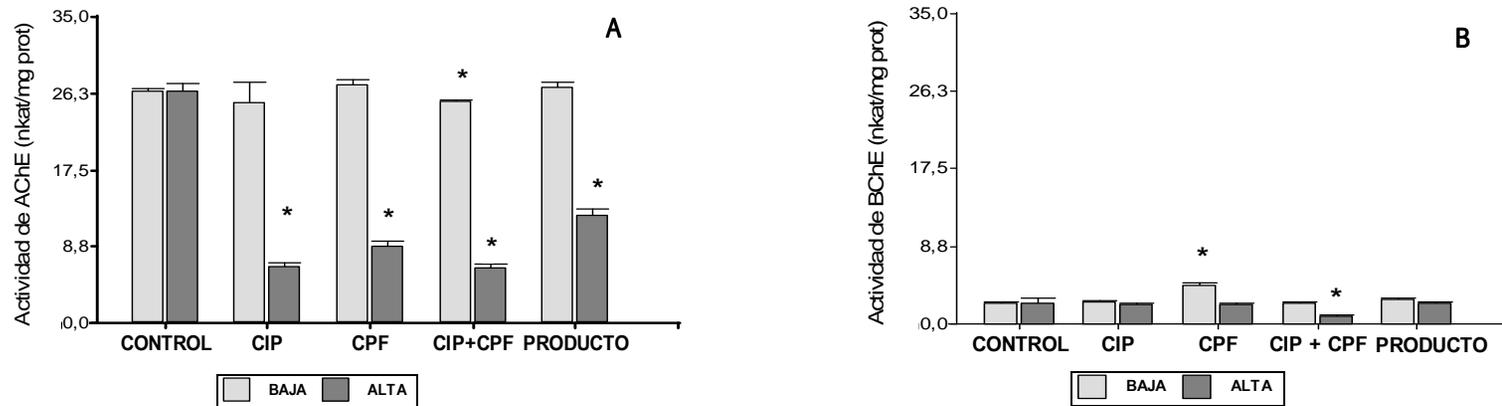


Fig 2.9. Actividad de AChE (A) y BChE (B) (nkat/mg prot) en **músculo** de *Jenynsia multidentata*, expuestos a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en *J. multidentata* son similares a los reportados en otros estudios de efecto de clorpirifós donde se observó inhibición de AChE en cerebro de *G. affinis* y en músculo de *Acanthochromis polyacanthus* frente a los peces control (Botté et al., 2012; Kavitha y Venkateswara Rao, 2008).

En los peces expuestos a **CIP+CPF** a baja concentración se observó un aumento significativo de AChE en cerebro e inhibición de BChE del 38 % en este mismo órgano frente al control. Además, la mezcla provocó inhibición significativa de AChE del 5 % en músculo frente al control. Por otra parte a altas concentraciones de la mezcla técnica se observó inhibición significativa de AChE del 76 % en músculo y de BChE del 61 % en este mismo órgano frente al control. Asimismo, se demostró que los efectos en los peces expuestos a la mezcla técnica se observaron a concentraciones menores que en los peces expuestos a los insecticidas de forma individual. Se mostró que a las dos concentraciones de mezcla técnica ensayadas, si bien los insecticidas reaccionaron con la enzima de protección, fue insuficiente ya que se observó inhibición de AChE. También se observó una respuesta de aumento de AChE en cerebro que puede deberse a la aceleración en la síntesis de la enzima causado por una inhibición previa no detectada (Yang et al., 2013).

En los peces expuestos a baja concentración de **PRODUCTO** sólo se observó una inhibición no significativa de BChE del 15 % en cerebro frente al control. Por otra parte en los peces expuestos a alta concentración sólo se observó inhibición significativa de AChE del 54 % en músculo frente al control. En comparación con las respuestas detectadas para la mezcla técnica, se observó que la mezcla comercial produjo menores efectos en las enzimas ChEs. Esto puede deberse a que los efectos producidos por mezclas complejas, donde están presentes además de los principios activos (CIP y CPF) compuestos coadyuvantes y detergentes, sean distintos que los efectos estudiados con compuestos puros.

Por otra parte, según la respuesta observada en los dos órganos en todos los tratamientos, se puede concluir que en *J. multidentata* la actividad de AChE en músculo es más sensible que en cerebro a la exposición a CIP, CPF y a sus mezclas. Esto concuerda con lo encontrado en otras especies donde la AChE en músculo fue un mejor predictor de la exposición a OPs que la actividad de AChE en cerebro (Fulton y Key, 2001).

2.3.4 Estrés oxidativo

Daño oxidativo y enzimas antioxidantes

La inducción de estrés oxidativo por plaguicidas es considerado un mecanismo de toxicidad significativo, permitiendo su uso como herramienta para predecir el impacto de los contaminantes sobre los organismos expuestos (Abdollahi et al., 2004).

La formación de ROS generado por un plaguicida (Fig 2.10 – flechas grises) es el resultado de un proceso cíclico de oxidación-reducción, en el cual, al ser biotransformado el plaguicida, sufre la reducción por un electrón donado por el NADPH (la mayor fuente de equivalentes reducidos), transformándose luego en un intermediario o especie reactiva que puede ser un radical libre (Winston y Di Giulio, 1991).

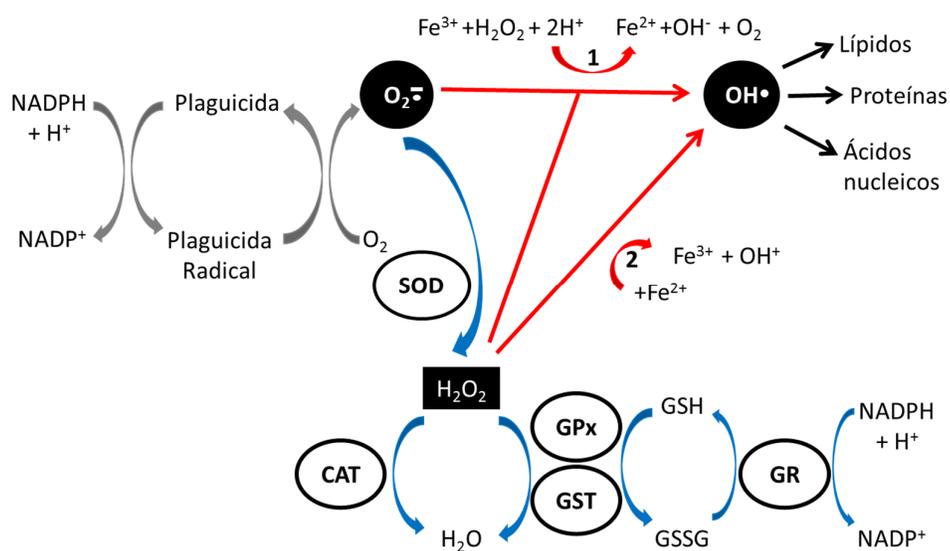


Figura 2.10: Generación de ROS en la célula y mecanismos de remoción enzimáticos antioxidantes. Las flechas grises representan el proceso cíclico de oxidación-reducción, fase inicial de la generación de ROS por un plaguicida. Las flechas rojas corresponden a la generación de los ROS, indicado con (1) las reacciones de Haber-Weiss y (2) la reacción de Fenton. Las flechas azules representan el sistema simplificado de la función de las enzimas antioxidantes. Adaptado de Kelly et al., 1998.

Esta especie reactiva, al intentar recuperar su configuración original, reacciona con el oxígeno (O_2) transformándose en el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de metales de transición como el hierro

pueden ser convertidos en radical oxhidrilo ($\text{OH}\cdot$), por medio de la reacción de Haber-Weiss. Además el H_2O_2 , que si bien, es menos reactivo podría generar el $\text{OH}\cdot$ por medio de la reacción de Fenton y consecuentemente generar daño oxidativo (Fig 2.10 – flechas rojas, Kelly et al., 1998). El $\text{OH}\cdot$ es la especie más reactiva entre las ROS, responsable de la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que al ser modificados pueden alterar la estructura de las membranas o, en el caso de las enzimas, producir la pérdida de su función biológica (Winston y Di Giulio, 1991; Chovanec et al., 2003). Sin embargo, las células poseen un sistema de defensas contra los ROS de tipo enzimática (ej. SOD, CAT, GPx y GR) o no enzimática (ej. GSH, vitamina E) para prevenir o contrarrestar el daño oxidativo (Fig 2.10–flechas azules).

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) es transformado a H_2O_2 por la SOD el cual a su vez puede ser tomado por la enzima CAT que convierte H_2O_2 en agua y oxígeno o por la enzima GPx que cataliza la reducción de H_2O_2 a agua. GPx puede también reducir peróxidos lipídicos o hidroperóxidos a los alcoholes correspondientes, con la concomitante oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Por su parte, la enzima GR juega un rol importante en la protección celular antioxidante y en la regulación de los procesos metabólicos. Esta enzima cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) al reducido (GSH) en una reacción NADPH dependiente (Livingstone, 2003; Winston y Di Giulio, 1991).

Sumado a esto, debe considerarse también que las GST son una familia de enzimas que pueden tener un rol de protección dual para el organismo. Por una lado conjugando GSH con compuestos electrofílicos (o metabolitos de Fase I, como ya se explicó anteriormente) y por otro, con una acción antioxidante directa, llevada a cabo por las GST clase α , catalizando la reducción de hidroperóxidos orgánicos con GSH (Pereira et al., 2009). La metodología utilizada en este trabajo para determinar la actividad GST incluye la acción antioxidante llevada a cabo por GST de clase α (Wang y Ballatori, 1998), por lo que los cambios medidos en la actividad de GST (Tabla 2.4) también serán discutidos en la presente sección.

Entonces, el daño sobre biomoléculas como lípidos y proteínas ocurrirá si la actividad de los sistemas de defensa antioxidante disminuyen o se incrementa la producción de ROS (Moreno et al., 2005). La actividad de las enzimas antioxidantes, contenido de lípidos peroxidados (LPO) y niveles de proteínas carboniladas (PCO) medidos en los

distintos órganos de *J. multidentata* expuestas a cipermetrina y clorpirifós se muestran en la Tabla 2.5.

En los peces expuestos a **CIP 0,04 µg/L** no se observaron respuestas que evidencien daño oxidativo ya que los LPO y PCO no mostraron aumento significativo en ninguno de los órganos evaluados frente al control. Sólo se evidenció que el contenido de PCO en cerebro de los peces expuestos disminuyó significativamente al ser comparado con el control. Por otra parte, al evaluar la actividad de enzimas antioxidantes sólo se observó un aumento significativo de GR en hígado e inhibición significativa de la actividad de GPx en intestino y branquias. La actividad de GST tanto en fracción citosólica como en fracción microsomal se mostró inhibida en la mayoría de los órganos evaluados (Tabla 2.4). La disminución del nivel de PCO en cerebro podría explicarse por una producción aumentada de PCO a tiempos más cortos de exposición que luego fueron conducidas a proteólisis siendo reemplazadas por proteínas de nueva síntesis no oxidadas. Esta hipótesis debería ser comprobada con la evaluación de daño oxidativo a menores tiempos de exposición y podría estar sustentada en un estudio realizado en peces expuestos a deltametrina, otro plaguicida piretroide. En ese estudio Parvez y Raisuddin (2005) observaron un aumento significativo de PCO a las 12 h de ensayo, cuyos niveles fueron disminuyendo con tiempos más largos de exposición, siendo esta disminución justificada por la proteólisis de las proteínas oxidadas. La inhibición de la actividad de GPx y GST sumada a la de CAT fue reportada en ratas expuestas a cipermetrina por Sharma et al. (2014). A diferencia de lo observado en *J. multidentata* en ratas se describió un aumento de LPO. Por lo tanto, en *J. multidentata* la respuesta antioxidante generada fue suficiente para preservar a los órganos estudiados de la oxidación generada luego de 96 h de exposición a cipermetrina.

Luego de la exposición a **CPF 0,4 µg/L** se observó daño oxidativo en *J. multidentata* evidenciado por el aumento de los niveles de PCO en branquias, también disminuyó significativamente el contenido de PCO en intestino y cerebro. Contrariamente, los LPO no mostraron diferencias frente al control en ninguno de los órganos evaluados. Por otro lado, las enzimas antioxidantes manifestaron un aumento significativo de CAT en hígado, sin encontrarse diferencias en la actividad de esta enzima en el resto de los órganos estudiados.

Tabla 2.5: Actividad de CAT, GPx y GR (nkat/mg proteínas), niveles de LPO (nmol TBARS/mg proteínas) y niveles de PO (nmol carbonilos/mg proteínas) en distintos órganos de *Jenynsia multidentata*, expuestos a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas. Los valores están expresados como media \pm desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$.

CAT (nkat/mg proteínas)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	54 \pm 19 ^{BC}	89 \pm 27 ^{AB}	24 \pm 10	82 \pm 22	15 \pm 11
CIP 0,04 μ g/L	39 \pm 11 ^{AB}	55 \pm 23 ^A	24 \pm 13	61 \pm 21	19 \pm 8
CPF 0,4 μ g/L	47 \pm 8 ^{BC}	138 \pm 30 ^C	28 \pm 3	70 \pm 16	14 \pm 5
CIP+CPF	53 \pm 18 ^C	82 \pm 45 ^{AB}	30 \pm 7	97 \pm 25	13 \pm 5
PRODUCTO	34 \pm 11 ^A	101 \pm 15 ^{BC}	34 \pm 11	98 \pm 16	9 \pm 6
GPx (nkat/mg proteínas)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	0,5 \pm 0,2 ^B	<LD	0,6 \pm 0,1 ^B	0,4 \pm 0,2 ^A	0,07 \pm 0,03
CIP 0,04 μ g/L	0,2 \pm 0,1 ^A	<LD	0,4 \pm 0,1 ^A	0,5 \pm 0,1 ^{AB}	0,06 \pm 0,03
CPF 0,4 μ g/L	0,2 \pm 0,1 ^A	<LD	0,3 \pm 0,1 ^A	0,6 \pm 0,1 ^{AB}	0,06 \pm 0,01
CIP+CPF	0,2 \pm 0,1 ^A	<LD	0,4 \pm 0,2 ^A	0,7 \pm 0,2 ^{BC}	0,06 \pm 0,03
PRODUCTO	0,2 \pm 0,2 ^A	<LD	0,4 \pm 0,1 ^A	0,9 \pm 0,2 ^C	0,05 \pm 0,02
GR (nkat/mg proteínas)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	0,23 \pm 0,04 ^B	0,10 \pm 0,04 ^A	0,14 \pm 0,05	<LD	<LD
CIP 0,04 μ g/L	0,17 \pm 0,05 ^A	0,16 \pm 0,03 ^{BC}	0,14 \pm 0,06	<LD	<LD
CPF 0,4 μ g/L	0,17 \pm 0,04 ^A	0,15 \pm 0,02 ^{AB}	0,11 \pm 0,03	<LD	<LD
CIP+CPF	0,19 \pm 0,08 ^{AB}	0,17 \pm 0,07 ^{BC}	0,11 \pm 0,01	<LD	<LD
PRODUCTO	0,17 \pm 0,06 ^A	0,25 \pm 0,09 ^{BC}	0,10 \pm 0,04	<LD	<LD
LPO (nmol TBARS/mg proteínas)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	2 \pm 1	0,3 \pm 0,3 ^A	0,8 \pm 0,5	4 \pm 2	0,07 \pm 0,07
CIP 0,04 μ g/L	2 \pm 1	0,3 \pm 0,2 ^{AB}	0,3 \pm 0,2	2 \pm 4	0,04 \pm 0,08
CPF 0,4 μ g/L	1,1 \pm 0,7	0,2 \pm 0,1 ^{AB}	0,7 \pm 0,5	2 \pm 1	0,01 \pm 0,01
CIP+CPF	0,8 \pm 0,7	0,6 \pm 0,3 ^B	0,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,9	0,27 \pm 0,40
PRODUCTO	0,4 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2 ^A	0,4 \pm 0,2	0,9 \pm 0,6	0,09 \pm 0,09
PO (nmol carbonilos/mg proteínas)					
TRATAMIENTO	INTESTINO	HÍGADO	BRANQUIAS	CEREBRO	MÚSCULO
CONTROL	4 \pm 2 ^C	6 \pm 1 ^B	3 \pm 1 ^A	1,5 \pm 0,5 ^B	0,7 \pm 0,2 ^A
CIP 0,04 μ g/L	3 \pm 1 ^{BC}	5 \pm 3 ^B	3,3 \pm 0,7 ^{AB}	0,8 \pm 0,4 ^A	0,8 \pm 0,3 ^A
CPF 0,4 μ g/L	2 \pm 1 ^{AB}	6 \pm 1 ^B	4,8 \pm 0,6 ^C	0,8 \pm 0,5 ^A	1,0 \pm 0,6 ^{AB}
CIP+CPF	2 \pm 1 ^{AB}	6 \pm 5 ^B	4 \pm 1 ^{BC}	0,8 \pm 0,2 ^A	1,5 \pm 0,7 ^{BC}
PRODUCTO	1 \pm 1 ^A	2 \pm 1 ^A	3,1 \pm 0,6 ^A	0,8 \pm 0,3 ^A	1,7 \pm 0,7 ^C

LD: Límite de detección; CAT: Catalasa; GPx: Glutación peroxidasa; GR: Glutación reductasa; LPO: Peroxidación lipídica; PO Proteinas Carboniladas; TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

La actividad de GPx sólo se mostró significativamente inhibida en intestino y branquias. La actividad de GR sólo se inhibió en intestino con respecto al control. Ante la disminución de GPx en branquias podría estar respondiendo la enzima GSTm, hecho evidenciado por el aumento de su actividad (Tabla 2.4). GST en su función como enzima antioxidante presenta un mecanismo similar a GPx, pudiendo reducir de forma eficiente los peróxidos de ácidos grasos libres y fosfolípidos, así como hidroperóxidos de colesterol (Lushchak, 2011). Por tanto, los resultados obtenidos sugerirían que podría haberse producido un exceso de ROS por la presencia de CPF causando una activación en el sistema antioxidante, evidenciada por el aumento de CAT y GSTm en hígado y branquias respectivamente. A pesar de esa respuesta el exceso de ROS no pudo ser neutralizado y genera el evidente daño oxidativo por el aumento de PCO en las branquias. A diferencia de los otros órganos evaluados, las branquias podrían ser más susceptibles a sufrir daño oxidativo debido a que están en contacto directo con el plaguicida y en forma permanente por su función respiratoria. La evidencia de daño oxidativo producido por CPF también fue reportado en la especie *G. affinis* a partir del aumento de LPO (Kavitha et al., 2008). En otros trabajos se observó el mismo efecto tóxico por el aumento de LPO en las especies *C. carpio* e *Ictalurus nebulosus* expuestas al organofosforado diclorvos (Hai et al., 1997).

En la exposición a **CIP+CPF** se observaron respuestas que evidenciaron el daño oxidativo mediante el aumento de PCO en branquias y músculo, aunque también se observó una disminución de PCO en intestino y cerebro. Además, el daño fue demostrado por el aumento de LPO sólo en hígado. El sistema antioxidante de los peces expuestos a este tratamiento se mostró sin diferencias significativas en la actividad de CAT en los órganos evaluados frente al control. La actividad de GPx mostró un aumento significativo en cerebro y una disminución en intestino y branquias para el mismo tratamiento. Además, la enzima GR aumentó su actividad de forma significativa sólo en hígado frente al control. El daño manifestado en branquias podría asociarse a la inhibición de GPx y GSTm (Tabla 2.4). La inhibición del sistema antioxidante podría resultar en un aumento de los ROS que estarían produciendo la oxidación de las proteínas, generando PCO. Además ese aumento de ROS puede ser el responsable de causar la oxidación de las enzimas con su correspondiente pérdida de la función (Schlezinger y Stegeman, 2001). De forma similar, el daño evidenciado en músculo podría ser asociado a la inhibición de GSTc y GSTm observados en ese órgano (Tabla 2.4). Contrariamente, en cerebro se

produjo una activación del sistema antioxidante por el aumento de GPx que resultó efectivo en la eliminación de los ROS, evitando que se genere daño oxidativo en ese órgano, a pesar de la inhibición de GSTc (Tabla 2.4). Los resultados mostraron que la activación del sistema antioxidante evidenciada por el aumento de GPx en cerebro y GR en hígado no fue suficiente para evitar que se produzca el daño oxidativo, observado por el aumento de PCO en branquias y músculo y LPO en hígado. La exposición de *J. multidentata* a la mezcla de cipermetrina y clorpirifós causó mayor efecto que la exposición a los plaguicidas de forma individual, demostrado por mayor daño oxidativo y mayores respuestas en el sistema antioxidante.

Finalmente, en los peces expuestos a **PRODUCTO** se evidenció daño oxidativo por el aumento de los niveles de PCO en músculo. Además, estos niveles se mostraron disminuidos en intestino, hígado y cerebro en *J. multidentata* y sin diferencias en branquias frente al control. Por otro lado los niveles de LPO resultaron sin diferencias en los órganos estudiados. El sistema antioxidante de los peces expuestos a este tratamiento mostró una inhibición significativa de la actividad de CAT sólo en intestino. La actividad de GPx mostró un aumento significativo en cerebro y una disminución en intestino y branquias. La enzima GR sólo se observó aumentada en hígado y disminuida en intestino. El daño oxidativo evidenciado en músculo podría ser asociado a la inhibición de GSTc y GSTm observado en ese tejido (Tabla 2.4), indicando un exceso de ROS que produciría tanto la inhibición de estas enzimas como el aumento de los niveles de PCO. Por el contrario, la activación del sistema antioxidante observado por el aumento de GR en hígado y GPx en cerebro estaría eliminando los ROS, evitando la producción de daño oxidativo en esos órganos. La marcada inhibición del sistema antioxidante observado en intestino fue sin embargo acompañado por una disminución en los niveles de PCO. Estas respuestas podrían deberse a dos mecanismos diferentes, ocurriendo éstos en forma simultánea o consecutiva. Por un lado, la inhibición enzimática sería una consecuencia de la acción directa de las ROS sobre su estructura, afectando, así su actividad. Por otro lado, las menores cantidades PCO en relación a organismos control, podrían deberse a mecanismos de proteólisis activados por el aumento de PCO (no medidos), a tiempos más cortos de exposición. Las enzimas antioxidantes, en cambio, no pudieron recuperar su actividad, ya que reaccionan constantemente frente a los ROS. En intestino, estos radicales podrían ser producidos en forma permanente, debido a que es un órgano de ingreso de contaminantes. Resumiendo, los resultados mostraron que la activación del

sistema antioxidante evidenciada por el aumento de GR en hígado y GPx en cerebro no fue suficiente para evitar que se produzca el daño oxidativo observado por el aumento de PCO en músculo.

2.3.5 Comportamiento natatorio

La actividad locomotora del pez fue evaluada en la totalidad de la pecera de filmación calculando diferentes medidas del comportamiento a las 24 y 96 h de exposición. Los parámetros evaluados fueron: el total de la distancia recorrida (Fig 2.11), la velocidad media (Fig 2.12), el tiempo que el individuo permaneció móvil (Fig 2.13) y los episodios de inmovilidad (Fig 2.14). Estas medidas se calcularon a partir de la segmentación, en períodos de 2 min, del tiempo total de filmación (10 min), y se consideraron para el análisis los últimos 6 min de actividad natatoria grabada (Sección 2.2.6).

La exposición de *J. multidentata* a **CIP** a baja y alta concentración no provocó diferencias significativas del comportamiento natatorio de los peces expuestos a 24 y 96 h frente a los peces control.

En los peces expuestos a **CPF** a baja concentración sólo se observó una disminución significativa de la cantidad de episodios en que los organismos permanecen inmóviles luego de 96 h de exposición (Fig 2.14 B), sin encontrarse diferencias significativas en los otros parámetros de actividad natatoria evaluados. Resultados similares se observaron luego de 24 h de exposición. En cambio, en los peces expuestos a altas concentraciones de CPF se observaron cambios significativos en la disminución de la distancia recorrida, la velocidad y el tiempo que el pez permanece móvil a las 24 y 96 h de exposición. Además, se evidenció un aumento significativo de los episodios de inmovilidad a las 24 h de exposición. Estos resultados indicarían que la exposición a alta concentración de CPF provoca disminución significativa de la actividad natatoria de *J. multidentata*.

En los peces expuestos a la mezcla técnica de **CIP+CPF** a baja concentración se observó un aumento significativo de la distancia recorrida y de la velocidad promedio luego de 96 h, sin mostrar diferencias en el tiempo móvil y los episodios de inmovilidad con respecto a los organismos control. Por otra parte, a la alta concentración de exposición se observó disminución significativa de la distancia recorrida, de la velocidad y del tiempo móvil a las 24 y 96 h de exposición, y aumento significativo del número de episodios inmóviles a las 24 h. Esto denota un efecto diferencial en la actividad natatoria

del pez según la concentración de exposición de la mezcla técnica, siendo a baja concentración un efecto de activación en el comportamiento natatorio y a alta concentración un efecto de inhibición.

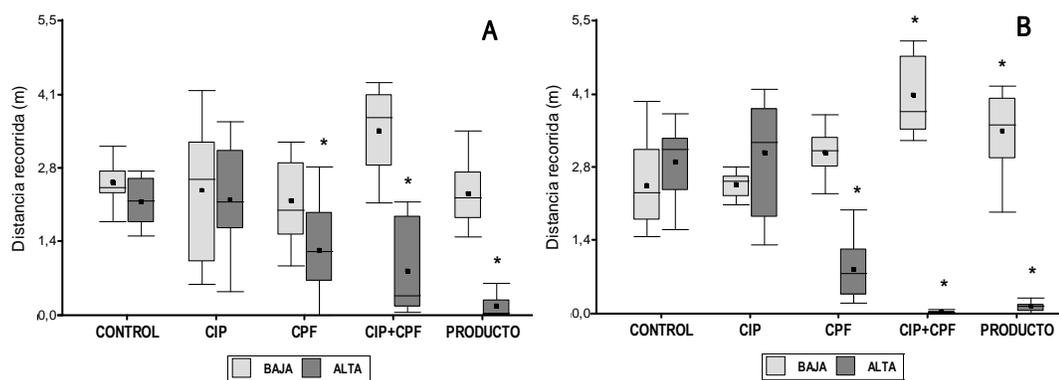


Fig 2.11. Distancia recorrida (m). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

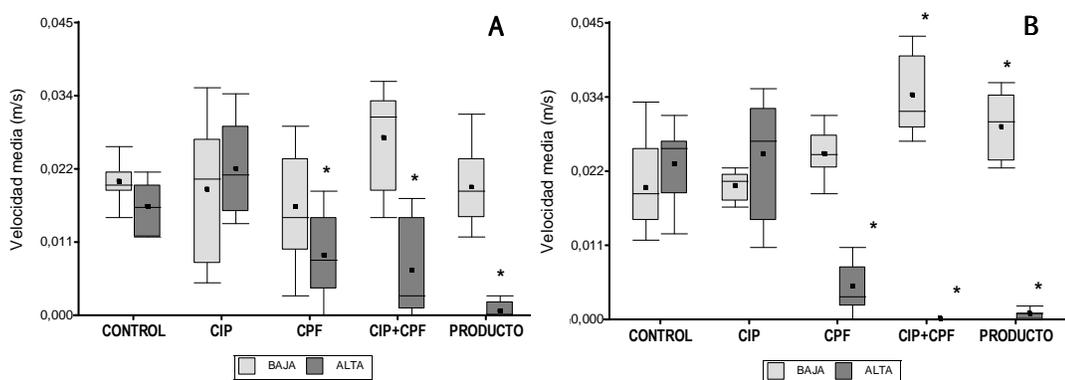


Fig 2.12. Velocidad media (m/s). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

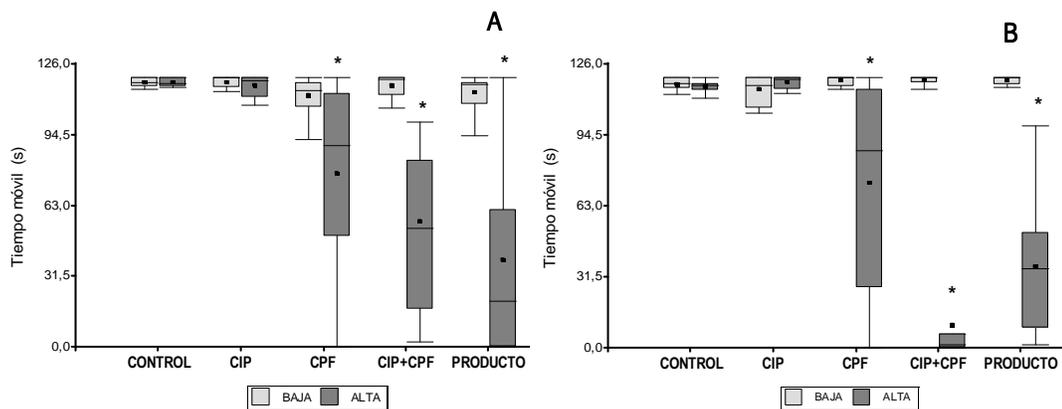


Fig 2.13 Tiempo móvil (s). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

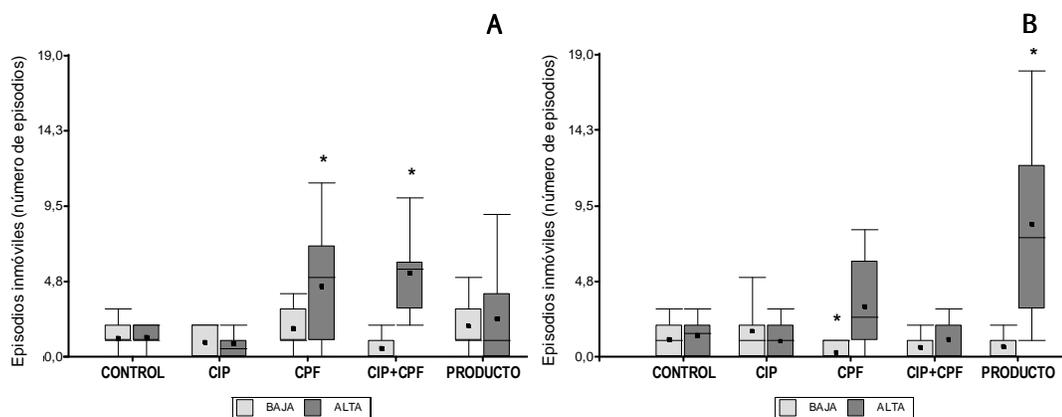


Fig 2.14 Episodios inmóviles (número de episodios). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

En los peces expuestos a **PRODUCTO** a baja concentración se observó un aumento significativo en la distancia recorrida y de la velocidad luego de 96 h de exposición. Por el contrario no se observaron diferencias significativas para estos parámetros luego de 24 h, ni tampoco para el tiempo móvil y los episodios de inmovilidad a las 24 y 96 h de exposición. A alta concentración se observó disminución significativa de la distancia recorrida, de la velocidad de nado y del tiempo que el individuo permanece en movimiento a las 24 y 96 h de exposición. El número de episodios de inmovilidad se

observó disminuido significativamente a las 96 h pero sin diferencias a las 24 h. El comportamiento de los peces expuestos al PRODUCTO fue similar a lo observado en la mezcla técnica donde a baja concentración se da una activación y a alta concentración una inhibición, pero en este último tratamiento este efecto se observa desde las 24 h de exposición y con una magnitud similar a la observada para la mezcla técnica a las 96 h de exposición. Se observa también que a mayor cantidad de horas de exposición se ven afectados también los episodios de inmovilidad, siendo estos significativamente mayores.

Sumado al análisis anterior, se evaluó el comportamiento espacio-temporal de *J. multidentata* en peces control y expuestos por 24 y 96 h a los distintos tratamientos. Para evaluar la preferencia del pez en las distintas zonas de la pecera se tuvieron en cuenta la cantidad de entradas en zona superior (arriba) o inferior (abajo), contabilizando también el tiempo que permaneció en cada zona. No se discute la cantidad de entradas y permanencia en la zona centro de la pecera, ya que es utilizada como un área de transición donde el pez prácticamente no explora (Rosemberg et al., 2011). En las Fig. 2.15 y 2.16 se muestran el número de entradas en la zona de arriba y el tiempo en esta zona. En las Fig. 2.17 y 2.18 se muestran la cantidad de entradas en la zona de abajo y el tiempo en la zona abajo.

Los peces control presentan preferencia por la zona de abajo, ocupando su mayor parte del tiempo esta zona (Fig 2.15), presentando una permanencia promedio de 37,8 y 46,0 s en la zona de abajo y 2,9 y 3,3 s en la zona de arriba a las 24 y 96 h de exposición respectivamente. Además presentan mayor cantidad de entradas en la zona abajo con un promedio de 14,8 y 10,4 s en relación a las entradas arriba con un promedio de 1,3 y 3,0 s a las 24 y 96 h de exposición respectivamente.

En los peces expuestos a **CIP** a baja concentración se observó un aumento significativo frente al control en el número de entradas en la zona arriba a las 24 y 96 h y en el tiempo transcurrido en esa zona a las 24 h. No se observaron diferencias en el tiempo transcurrido en la zona de arriba luego de 96 h. Por otra parte, se observó disminución significativa del tiempo transcurrido en la zona de abajo a 24 y 96 h de exposición. Cuando los peces se expusieron a alta concentración de CIP se observó un aumento significativo en el tiempo transcurrido en la zona de arriba y en la cantidad de entradas en esta zona luego de 96 h de exposición. Estas diferencias no se observaron a las 24

h. Además, se registró una disminución significativa del tiempo transcurrido en la zona abajo en relación al control a las 96 h de exposición. Estos resultados, indican que este insecticida a las dos concentraciones ensayadas aumenta la actividad exploratoria de *J. multidentata* en la parte superior de la pecera.

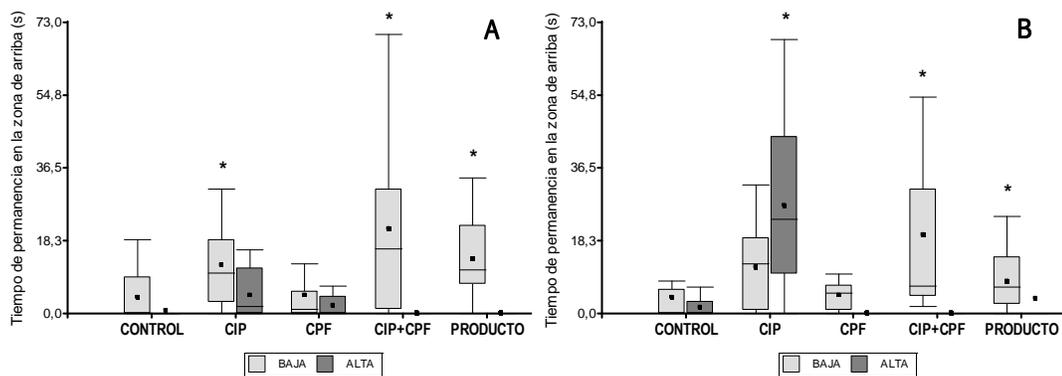


Fig 2.15 Tiempo de permanencia en la zona de arriba (s). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

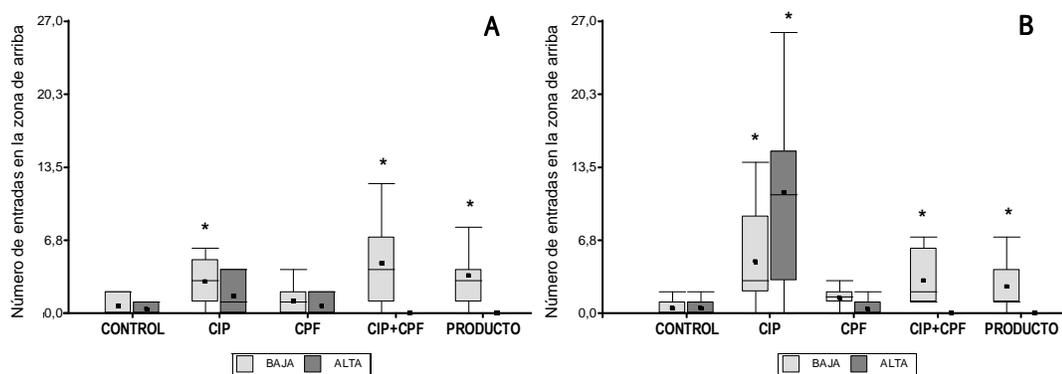


Fig 2.16 Número de entradas en la zona de arriba. Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio \pm DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

En los peces expuestos a **CPF** a baja concentración no se observaron diferencias significativas en el tiempo transcurrido en la zona arriba y en la cantidad de entradas a esa zona luego de 24 y 96 h de exposición. Además no se observaron diferencias significativas en el tiempo transcurrido en la zona de abajo a las 24 y 96 h de exposición y en la cantidad de entradas en esa zona a las 96 h de exposición. Sin embargo, se

observó una disminución significativa en las entradas en la zona de abajo luego de 24 h de exposición. En los peces expuestos a alta concentración de CPF, no se observaron diferencias significativas en la zona arriba luego de 24 y 96 h de exposición. No obstante, en la zona de abajo, se observó un aumento del tiempo transcurrido con una disminución de la cantidad de entradas en esa zona luego de 24 y 96 h de exposición. Estos resultados muestran que los peces expuestos a CPF a la concentración alta abandonan con menos frecuencia el fondo.

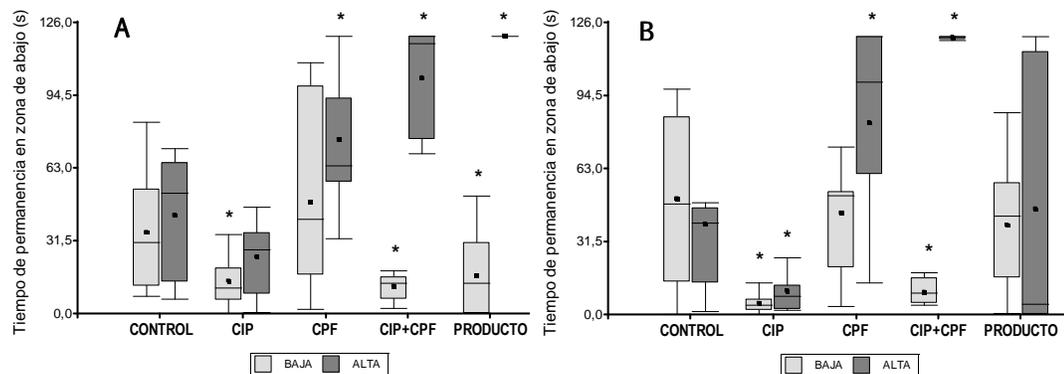


Fig 2.17: Tiempo de permanencia en zona de abajo (s). Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio ± DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

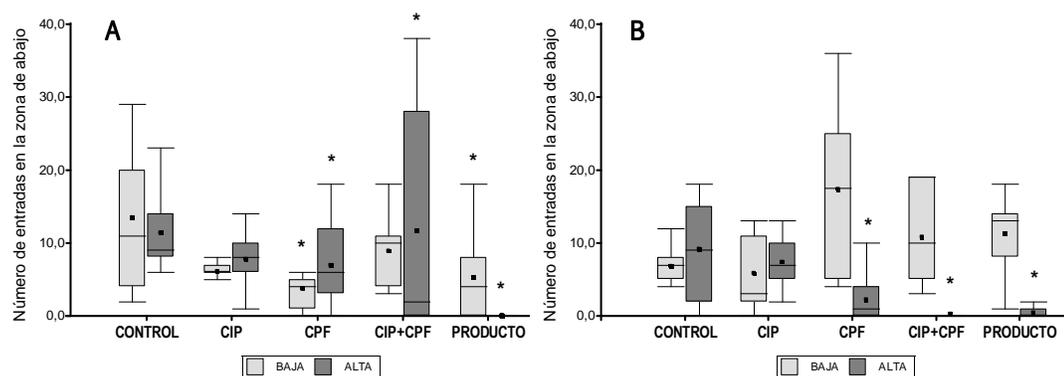


Fig 2.18 Número de entradas en la zona de abajo. Durante 24 h (A) y 96 h (B) de exposición. Se muestra el promedio ± DE para todos los peces de cada tratamiento. Tiempo total evaluado= 6 min, separados en tres segmentos de 2 min que se promedian para obtener el valor de cada individuo. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

Los peces expuestos a la mezcla técnica **CIP+CPF** mostraron diferente comportamiento en función de la concentración de exposición. A bajas concentraciones de la mezcla

se observó aumento significativo en el tiempo transcurrido y en la cantidad de entradas en la zona arriba luego de 24 y 96 h de exposición. Además, se observó una disminución significativa en el tiempo transcurrido en la zona de abajo a 24 y 96 h. En cambio, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de entradas a esta zona en ninguno de los tiempos de exposición. Estos resultados indicarían un aumento de la actividad exploratoria de la parte superior de la pecera. A altas concentraciones de la mezcla técnica no se observaron diferencias significativas en el tiempo transcurrido y la cantidad de entradas en la zona de arriba luego de 24 y 96 h. Sin embargo se observó un aumento significativo en el tiempo transcurrido en la zona abajo luego de 24 y 96 h de exposición, sumado a aumento, también significativo, en la cantidad de entradas a la zona abajo a las 24 h y una disminución de la cantidad de entradas a esta zona a las 96 h. Estos resultados indican que los peces expuestos a concentraciones altas de mezcla técnica de CYP y CPF tienen preferencia por las zonas de abajo de la pecera, efecto que se observó en forma más marcada a las 96 h donde los peces expuestos están casi la totalidad del tiempo en el fondo de la pecera y la cantidad de entradas en la zona abajo y arriba es cero, indicando que no cambiaron de área durante los 6 min de filmación.

En los peces expuestos a bajas concentraciones de **PRODUCTO** se observó un aumento significativo del tiempo y cantidad de entradas a la zona de arriba luego de 24 y 96 h de exposición. Además, a las 24 h de exposición se observó una disminución significativa del tiempo transcurrido y de la cantidad de entradas en la zona de abajo. En cambio, no hubo diferencias en esta última zona a las 96 h. En los peces expuestos a altas concentraciones de la mezcla de producto comercial, el tiempo transcurrido y la cantidad de entradas en la zona de arriba fueron aproximadamente cero a las 24 y 96 h de exposición. En contraste, en la zona de abajo, a las 24 h de exposición se observó un aumento en el tiempo de permanencia y disminución de entradas, siendo éstas aproximadamente cero, mientras que pasadas las 96 h de exposición sólo se observó una disminución significativa de las entradas en esta zona pero con un tiempo transcurrido sin diferencias frente al control. Los datos corresponden a dos grupos diferentes de individuos, generados por peces que se mantuvieron arriba durante todo el tiempo de filmación y peces que se quedaron al fondo de la pecera, en los dos casos, casi sin movimiento. Consecuentemente, los peces expuestos al **PRODUCTO** durante 24 h muestran un comportamiento similar a lo observado para la mezcla técnica

de estos compuestos, con un aumento de la actividad exploratoria en la zona de arriba a las concentraciones bajas ensayadas. Los peces expuestos a concentraciones altas ocuparon la totalidad del tiempo transcurrido la zona de abajo sin hacer cambios de área. En el caso de los peces expuestos a la mezcla del producto comercial durante tiempos más prolongados (96 h) se observaron individuos casi sin movilidad, razón por lo que la zona que ocuparon al ingresar a la pecera de filmación, sea arriba o abajo, fue el lugar que mantuvieron durante toda la filmación.

La exposición de *J. multidentata* al insecticida CIP a baja y alta concentración solo se observó una preferencia de ocupar la zona de arriba de la pecera, estos resultados podrían ser interpretados como una conducta de huida del pez que fue reportada de forma similar en otras especies *Labeo rohita* y *P. reticulata* en las primeras horas de exposición a concentraciones de CYP cercanas a LC50 de cada especie (Marigoudar et al., 2009; Yilmaz et al., 2004). Los peces expuestos a CPF a alta concentración mostraron disminución de la actividad natatoria con aumento del tiempo transcurrido en el fondo de la pecera, estos resultados de hipoactividad coinciden con los reportados en la especie medaka (*Oryzias latipes*) expuesta a 18 µg/L, 55 µg/L y 166 µg/L de clorpirifós durante 96 h (Khalil et al., 2013). También se observaron cambios similares en el comportamiento de larvas de zebrafish expuestas a 35 µg/L y 3,5 µg/L de CPF durante el desarrollo (Richendrfer et al., 2012). En la exposición a mezclas técnica y PRODUCTO a baja concentración se observó aumento de la actividad natatoria con preferencia de ocupar la zona de arriba de la pecera y a alta concentración de exposición se observó disminución de la actividad natatoria con preferencia de ocupar la zona de abajo de la pecera, no se encontraron trabajos previos donde se reporten resultados en mezclas de estos insecticidas.

Las alteraciones del comportamiento observadas en los distintos tratamientos muestran un potencial riesgo para las especies expuestas en los cursos de aguas contaminadas, debido a que tanto la hiperactividad como la hipoactividad pueden causar menor supervivencia de los individuos. El aumento de la actividad natatoria incrementa la vulnerabilidad de un organismo a ser presa mientras que una menor actividad natatoria está asociada a una menor capacidad de conseguir alimento (Christensen et al., 2005). Por otra parte el comportamiento de ocupar la zona de arriba de la pecera que fue observado en los peces expuestos, podría indicar que los individuos se desplazan a la

superficie para conseguir la respiración aérea y evitar el contacto del plaguicida con las branquias (Santhakumar et al., 2000).

Tanto la hipoactividad como la hiperactividad pueden estar asociadas a la inhibición del funcionamiento de la AChE, ya que esto conduce a la acumulación de acetilcolina, que puede causar excitación postsináptica prolongada causando esto hiperactividad y, posteriormente, el bloqueo de los receptores del sistema colinérgico dando como resultado la hipoactividad (Marigoudar et al., 2009).

En *J. multidentata* se observó que los cambios conductuales de los peces expuestos se vieron acompañados con inhibición de AChE en músculo en algunos tratamientos y sin diferencias en AChE en cerebro. Un resultado similar se mostró en esta misma especie expuesta a concentraciones subletales de endosulfán donde la inhibición de AChE en músculo correlacionó con la disminución de la actividad natatoria (Ballesteros et al., 2009b). Por el contrario estudios en la especie *G. affinis* expuesta a CPF mostraron disminución en el comportamiento natatorio asociado a la inhibición de AChE en cerebro (Rao et al., 2005).

2.3.6 Disrupción endócrina

En peces, algunos estudios demuestran que los plaguicidas interfieren la actividad de la aromatasa. Este mecanismo es bien conocido para los fungicidas. Ankley et al. (2005) observaron la inhibición de esta enzima *in vitro* en cerebro y ovario de hembras *P. promelas* frente a procloraz y fenarimol. Además, Hinfray et al. (2006) demostraron que tanto los fungicidas imidazólicos (clotrimazol, imazalil, procloraz), como los triazoles (difenoconazole, fenbuconazol, propiconazol, triadimenol) y el fungicida pirimidina fenarimol, fueron capaces de inhibir las actividades de la aromatasa *in vitro* en cerebro y ovario de hembras *O. mykiss*. Por otra parte, la capacidad de los insecticidas cipermetrina y clorpirifós de actuar como disruptores endócrinos se basa en su capacidad antiestrogénica, según los estudios realizados hasta la fecha (Tyler et al., 2000; Andersen et al., 2001).

Teniendo en cuenta el papel fundamental de la aromatasa en los procesos de diferenciación sexual y la reproducción en peces (Trant et al., 2001), se evaluó en *J. multidentata* la expresión génica de *CYP19a1* presente en gónadas (aromatasa gonadal – Fig 2.19 A) y *cyp19a2* presente en cerebro (aromatasa cerebral – Fig 2.19 B).

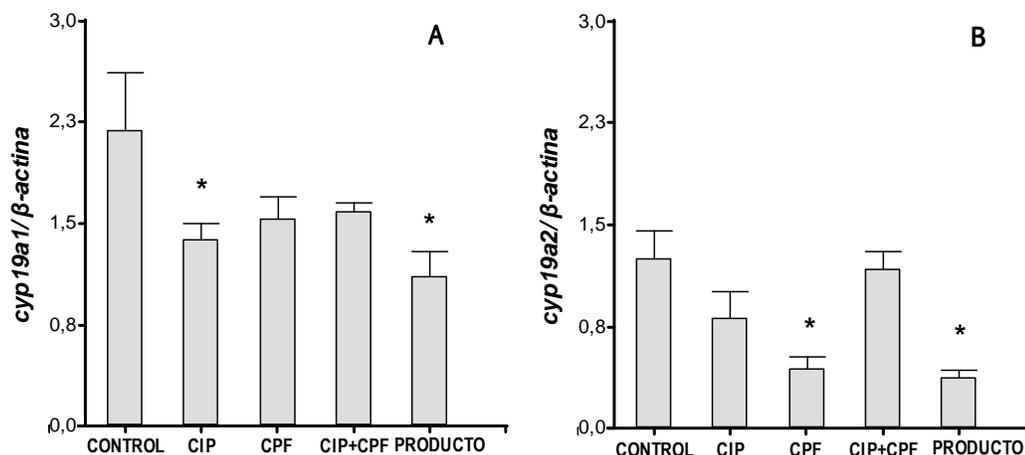


Figura 2.19 Expresión de los genes *cyp19a1* relativa a la β -actina en **gónadas (A)** y de los genes *cyp19a2* relativa a la β -actina en **cerebro (B)** de hembras de *Jenynsia multidentata* expuestas a CIP y CPF en forma individual y en mezclas. (*) indican diferencias estadísticamente significativas frente al control $p < 0,05$.

En los peces expuestos a **CIP 0,04 $\mu\text{g/L}$** sólo se observó inhibición significativa de la expresión de aromatasa gonadal con respecto al control. Contrariamente a lo observado en gónada de la especie *L. rohita* que luego de la exposición al mismo insecticida no mostró diferencias en la actividad de esta enzima (Tarigopula y Philip, 2014). La diferencia podría atribuirse a una mayor sensibilidad de *J. multidentata* ya que las concentraciones de exposición de la especie *L. rohita* fueron superiores (20 $\mu\text{g/L}$) a las ensayadas en esta tesis. En las gónadas, la transcripción del gen de la aromatasa ha sido propuesta como un paso clave en el proceso de diferenciación del ovario. Por ejemplo, en la trucha arco iris (*O. mykiss*), la inhibición de la aromatasa en ovario de hembras indiferenciadas resultó en una completa masculinización de la población en estudio (Guiguen et al., 1999). Sin embargo, para conocer las consecuencias de la inhibición de aromatasa gonadal en *J. multidentata* se debería apoyar este estudio con la evaluación de niveles de hormonas esteroideas, desarrollo gonadal, diferenciación sexual, entre otros.

Los peces expuestos a **CPF 0,4 $\mu\text{g/L}$** no mostraron cambios significativos en la expresión de aromatasa gonadal, pero si una inhibición significativa de la expresión de aromatasa en cerebro. En peces, hay cada vez más evidencias que la aromatasa cerebral podría cumplir un papel importante en la diferenciación sexual. Además, está claramente demostrada la implicancia de esta enzima en el comportamiento sexual y agresivo estudiado en peces machos (Diotel et al., 2010). Machos de la especie *P. reticulata*

expuestos a fadrozole, un compuesto inhibidor de aromatasa mostraron comportamiento sexual disminuido asociado a una disminución de aromatasa en cerebro (Hallgren et al., 2006). En otro estudio donde machos y hembras de *P. reticulata* también fueron expuestos al inhibidor de aromatasa se observó disminución de la reproducción cuando estos peces fueron emparejados. Una de las causas de la menor fecundidad observada en este trabajo fue correlacionada a un menor número de eventos de desoves, dicho cambio en el comportamiento sexual de los machos fue atribuido a la inhibición de la aromatasa cerebral tanto en machos como en hembras (Ankley et al., 2002; Hallgren et al., 2006). Considerando al último trabajo citado, se podría pensar que en *J. multidentata* la inhibición de aromatasa cerebral alteraría su comportamiento sexual. Sin embargo esto debe ser comprobado ya que la función de la enzima aromatasa cerebral en el comportamiento de peces hembra todavía no está comprendido.

En los peces expuestos a **CIP+CPF** no se observaron efectos sobre la expresión de la aromatasa gonadal ni cerebral en ninguno de los dos órganos evaluados, al ser comparada con el control. Retomando los resultados anteriores, en este tratamiento se observó acumulación de cipermetrina en varios órganos, a diferencia de lo observado en los peces expuestos sólo a CIP 0,04 µg/L, donde la mayor parte del insecticida ya había sido biotransformado (Tabla 2.3). Esto lleva a suponer que la inhibición de aromatasa gonadal fue principalmente provocada por algún metabolito de cipermetrina. Un estudio que apoyaría esta hipótesis es que la aromatasa no resultó inhibida en gónadas expuestas a cipermetrina *in vitro* (Hinfray et al., 2006). Por otra parte, en este tratamiento se observó que el clorpirifós ya fue metabolizado a diferencia de los peces expuestos a CPF 0,4 µg/L que mostraron acumulación. Por lo tanto, se podría sugerir que la inhibición de aromatasa cerebral fue causada por el compuesto sin metabolizar. Estas hipótesis deberían ser confirmadas, siendo un posible ensayo la exposición a los metabolitos de los insecticidas.

Finalmente, en los peces expuestos a **PRODUCTO** se observó inhibida significativamente la expresión de aromatasa tanto en gónadas como en cerebro. Este tratamiento mostró una respuesta aditiva entre cipermetrina y clorpirifós, a diferencia de la mezcla técnica. Este efecto puede ser evidenciado por la comparación entre la inhibición mostrada en los tratamientos a los insecticidas de forma individual y la respuesta de similar magnitud observada en los peces expuestos a la mezcla comercial.

2.3.7 Evaluación integrada de biomarcadores de efecto y exposición

Análisis de conglomerados

Con el fin de evaluar de forma integral las respuestas obtenidas en *J. multidentata* se realizó un análisis exploratorio para observar las diferencias entre tratamientos considerando todos los biomarcadores de efecto medidos. Para el análisis se consideraron 45 parámetros (biomarcadores de efecto), sin tener en cuenta la acumulación de cipermetrina y clorpirifós, ya que éstos son biomarcadores de exposición. El dendrograma resultante del análisis se muestra en la Fig 2.20.

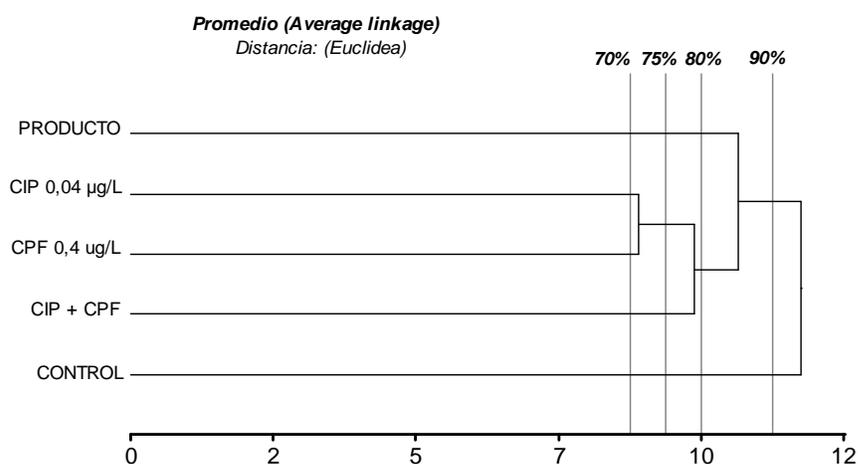


Figura 2.20. Dendrograma del Análisis de Conglomerados considerando los tratamientos (encadenamiento promedio, distancia Euclídea). Las distintas líneas indican el 70 %, 75 %, 80 % y 90 % de la distancia Euclídea total.

Como se observa en la Fig 2.20, al 90 % de la distancia total se forman dos conglomerados, el inferior incluye sólo a los peces control y el superior agrupa a los peces expuestos. Por lo tanto, se puede resaltar que en conjunto las respuestas de los biomarcadores de efecto observadas en los peces control son diferentes de las obtenidas en los peces expuestos. Por otra parte, si se considera el 80 % de la distancia total, se observan tres conglomerados, el primero agrupa a los peces control, el segundo incluye a los peces expuestos a CIP, CPF y a la mezcla técnica CIP + CPF y el tercero agrupa a los peces expuestos a PRODUCTO. Esta separación indica que los peces expuestos a la mezcla de producto comercial, además de diferenciarse de los peces control, presentaron respuestas diferentes del resto de los peces expuestos. Esto podría deberse a que los compuestos químicos coadyuvantes presentes en los productos

comerciales provocaron distintas respuestas que los principios activos de los plaguicidas. Si se contempla el 75 % de la distancia total, se separan cuatro grupos, el superior incluye únicamente a PRODUCTO, el siguiente agrupa a los tratamientos de los plaguicidas en forma individual: CIP 0,04 µg/L con CPF 0,4 µg/L, el tercero incluye únicamente a la mezcla técnica CIP+CPF y el grupo inferior incluye al control. A esta distancia se puede resaltar que las respuestas observadas en los peces expuestos a los insecticidas de forma individual fueron diferentes a las obtenidas en las mezclas de los mismos. Esta diferencia podría haber sido provocada por la interacción de los plaguicidas en las mezclas. Por último, si se considera el 70 % de la distancia total, los cinco tratamientos están diferenciados en grupos separados evidenciando que la exposición de *J. multidentata* a CIP, CPF, CIP+CPF y PRODUCTO producen diferentes respuestas de los biomarcadores de efecto medidos y que también se diferencian del control.

Respuesta integrada de biomarcadores de efectos

El índice RIB es una herramienta sencilla para obtener una descripción general del “estado de salud” del organismo, combinando diferentes respuestas de biomarcadores de efecto. Este índice representa en un solo valor el nivel de efectos tóxicos inducidos en un organismo. Su utilidad se demostró previamente en estudios a campo, donde se calcularon valores de RIB en especies acuáticas pertenecientes a distintas áreas de estudio. Los resultados se relacionaron con los niveles de contaminación de cada sitio muestreado, observando que los mayores valores de RIB encontrados fueron en los sitios con mayores niveles de contaminación (Broeg y Lehtonen, 2006; Serafim et al., 2012). Se puede resaltar, además, la utilidad de este índice a pesar de la variabilidad en el conjunto de biomarcadores, los perfiles de contaminación y las especies consideradas.

Por otra parte, el índice RIB también resultó una herramienta útil en ensayos de laboratorio, pudiendo encontrarse diferentes valores de RIB en los peces expuestos a distintos tratamientos, a partir de los cuatro biomarcadores de efecto medidos (Qu et al., 2014).

En el presente estudio se aplicó para comparar el efecto tóxico causado por los diferentes tratamientos de exposición en *J. multidentata*. Previamente al cálculo del RIB, se efectuó un análisis discriminante (Wunderlin et al., 2001), con el objetivo de seleccionar los biomarcadores de efecto que mejor explican la variabilidad entre los

tratamientos e incluir sólo esos parámetros en dicho índice. Se realizó un análisis discriminante por órgano estudiado considerando todos los biomarcadores de efecto medidos. En otro análisis se evaluaron los parámetros de comportamiento natatorio del pez. Así, el análisis discriminante indicó para cada órgano o para el comportamiento natatorio aquellos biomarcadores que mejor explican la variabilidad entre tratamientos. Las respuestas que resultaron seleccionadas fueron las siguientes:

- En intestino: expresión génica de *CYP1A* y actividad de GSTm.
- En hígado: expresión génica de *CYP1A*.
- En branquias: actividad de GSTm.
- En cerebro: expresión génica de *P-gp* y actividad de BChE.
- En músculo: actividad de BChE.
- En gónadas: expresión génica de aromatasa.
- Para comportamiento; distancia recorrida por el individuo.

Considerando los biomarcadores seleccionados se efectuó el cálculo del RIB para cada tratamiento y los valores se muestran en la Fig 2.21.

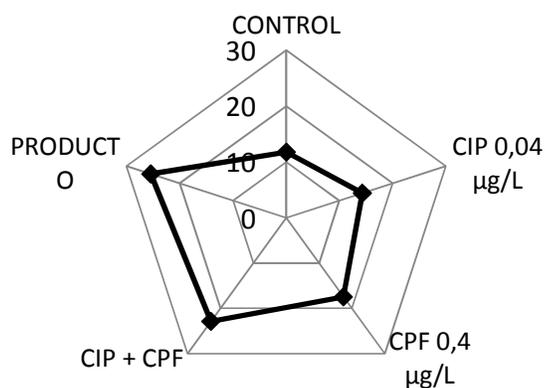


Figura 2.21: Respuesta integrada de biomarcadores (RIB) para cada tratamiento calculados a partir de los 9 biomarcadores medidos en *J. multidentata* y seleccionados por el análisis discriminante.

Según este índice los tratamientos podrían ser ordenados de forma creciente de acuerdo a un aumento en el efecto causado en *J. multidentata* de la siguiente manera: CONTROL (RIB= 12) < CIP 0,04 µg/L (RIB= 14) < CPF 0,4 µg/L (RIB= 18) < CIP + CPF (RIB= 23) < PRODUCTO (RIB= 26). Por lo tanto, a un mayor valor de RIB se considera que el

tratamiento es más tóxico para la especie expuesta. Los resultados evidenciaron que los peces tratados presentaron mayores respuestas de los biomarcadores de efecto que los peces control, indicando que la exposición de estos insecticidas, tanto de forma individual como en mezclas causó un impacto negativo sobre *J. multidentata*. Por otra parte, en los peces expuestos a CIP se obtuvo un RIB menor que en los peces expuestos a CPF, por consiguiente, podría ocurrir que para *J. multidentata* el insecticida clorpirifós sea más tóxico que cipermetrina. Esta comparación es válida, ya que los dos compuestos se ensayaron en concentraciones referidas a la misma unidad tóxica. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis deberían evaluarse los valores de CL_{50} para cipermetrina y clorpirifós en *J. multidentata*. Además, se observó que las mezclas CIP+CPF y PRODUCTO generaron mayores respuestas de biomarcadores de efecto que la exposición de los analitos en forma individual. Estos resultados, concuerdan con otros estudios en peces, que al ser expuestos a mezclas de plaguicidas mostraron mayores efectos tóxicos que frente a los mismos compuestos de forma individual (Denton et al., 2003; Wacksman et al., 2006; Iannacone et al., 2011). Por último, la mezcla de los insecticidas comerciales produjo mayores respuestas que la mezcla de los compuestos puros, evidenciado por un mayor RIB en PRODUCTO. Este hecho, podría deberse a los efectos generados por los compuestos coadyuvantes, que están presentes conjuntamente con los principios activos.

Análisis de correlación

Para establecer la posible asociación entre los efectos generados y la acumulación cuantificada en *J. multidentata* en los distintos tratamientos, se realizó un análisis de correlación de Spearman (prueba no paramétrica). Para realizar este análisis, se utilizaron como variables los valores de RIB calculados (integrando a los biomarcadores de efecto, Fig 2.21) y las concentraciones de cipermetrina y clorpirifós estimados en la totalidad del pez (biomarcadores de exposición, Fig 2.7). En los resultados se observó que el índice RIB y la sumatoria de las concentraciones de cipermetrina y clorpirifós acumulada, mostraron una correlación significativa positiva ($R= 1$, $p < 0,05$), hecho que indica que a mayor acumulación de los dos insecticidas en estudio mayores son los efectos encontrados en *J. multidentata*. Además, el índice RIB y la acumulación de cipermetrina y clorpirifós en los distintos tratamientos si bien no significativamente, mostraron un coeficiente de correlación positivo tanto para cipermetrina ($R= 0,82$, $p= 0,09$) como para clorpirifós ($R= 0,67$, $p= 0,2$). Por lo tanto, se podría sugerir que los efectos encontrados

estarían mayormente asociados a la acumulación de cipermetrina en los tejidos de *J. multidentata* que a la acumulación de clorpirifós.

2.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Acumulación y biotransformación

- Los insecticidas cipermetrina y clorpirifós se acumularon en los distintos órganos de *J. multidentata*, observándose mayores concentraciones en hígado > intestino > branquias, siendo menores las cantidades acumuladas en músculo y < LD en cerebro y gónadas.
- Se detectó acumulación de estos insecticidas en todos los tratamientos, mostrando mayores concentraciones acumuladas y más distribución en los órganos de peces expuestos a mezcla técnica y producto comercial.
- El sistema de biotransformación mostró respuestas de Fase I y II en los peces expuestos a CIP 0,04 µg/L, Fase II y III en los peces expuestos a CPF 0,4 µg/L y Fase I, II y III en los peces expuestos a CIP+CPF y PRODUCTO.
- Estos mecanismos de biotransformación fueron insuficientes para evitar la acumulación de estos compuestos en los órganos de *J. multidentata*.

Colinesterasas

- Las enzimas ChE mostraron que al responder la enzima de protección (BChE) se evitó el efecto sobre AChE en *J. multidentata* expuesta a BAJA concentración de CIP 0,04 µg/L y CPF 0,4 µg/L en forma individual. Además, no se observó respuesta de la enzima de protección con la consecuente inhibición de la enzima AChE en *J. multidentata* expuesta a ALTA concentración de CIP 0,4 µg/L y CPF 4 µg/L en forma individual.
- Las enzimas ChE mostraron que la respuesta de BChE no fue suficiente para evitar el efecto sobre la AChE en *J. multidentata* expuesta a BAJA y ALTA concentración de CIP+CPF.
- Las enzimas ChE no mostraron cambios en la respuesta en *J. multidentata* expuestas a BAJA concentración de PRODUCTO. Además, no se observaron cambios en la respuesta de BChE que eviten la inhibición de la enzima AChE en *J. multidentata* expuesta a ALTA concentración de PRODUCTO.
- La actividad de AChE en músculo de *J. multidentata* es más sensible que en cerebro a la exposición a CIP, CPF y a sus mezclas.

Estrés oxidativo

- La activación de las enzimas antioxidantes, evidenciado por el aumento de GR en hígado fue suficiente para preservar a los órganos estudiados del daño oxidativo en *J. multidentata* expuesta a CIP 0,04 µg/L.
- La activación de las enzimas antioxidantes, evidenciado por el aumento de CAT en hígado y GSTm en branquias, no fue suficiente para evitar que se produzca el daño oxidativo demostrado por el aumento de los niveles de PCO en branquias de *J. multidentata* expuesta a CPF 0,4 µg/L.
- La activación de las enzimas antioxidantes, evidenciado por el aumento de GPx en cerebro y GR en hígado, no fue suficiente para evitar que se produzca el daño oxidativo mostrado por el aumento de los niveles de PCO en branquias y músculo, y LPO en hígado de *J. multidentata* expuestas a CIP+CPF.
- La activación de las enzimas antioxidantes, evidenciado por el aumento de GR en hígado y GPx en cerebro, no fue suficiente para evitar que se produzca el daño oxidativo observado por el aumento de PCO en músculo de *J. multidentata* expuestas a PRODUCTO.

Comportamiento natatorio

- El comportamiento natatorio de *J. multidentata* se modificó de forma similar a las 24 y 96 h de exposición, mostrando mayores diferencias a las 96 h.
- Se observó hiperactividad en *J. multidentata* expuestas a BAJA concentración de CIP+CPF y PRODUCTO.
- Se evidenció hipoactividad en *J. multidentata* expuestas a ALTA concentración de CPF 0,4 µg/L, CIP+CPF y PRODUCTO.
- Los cambios observados en el comportamiento natatorio estarían asociados a la inhibición en la actividad de AChE en músculo de *J. multidentata* expuestas a CPF 0,4 µg/L, CIP+CPF y PRODUCTO.

Disrupción endócrina

- La expresión de aromatasa gonadal se inhibió en *J. multidentata* expuestas a CIP 0,04 µg/L en relación a la expresión del control.
- La expresión de aromatasa cerebral se inhibió en *J. multidentata* expuestas a CPF 0,4 µg/L en relación a la expresión del control.

- La expresión de aromatasa gonadal y cerebral no mostraron cambios en *J. multidentata* expuestas a CIP+CPF.
- La expresión de aromatasa gonadal y cerebral se inhibió, mostrando un efecto aditivo de cipermetrina y clorpirifós en *J. multidentata* expuestas a PRODUCTO.

Respuesta integrada de biomarcadores

- El análisis de conglomerados permitió evidenciar diferencias entre todos los tratamientos al analizar en forma conjunta los biomarcadores de efecto medidos en *J. multidentata*.
- Con una selección de biomarcadores de efecto por órgano se construyó un índice RIB que permitió ordenar los tratamientos el siguiente orden creciente según el efecto causado en *J. multidentata*:
CONTROL < CIP < CPF < CIP+CPF < PRODUCTO.
- El índice RIB mostró una correlación positiva con el contenido total plaguicidas medido en los tejidos de *J. multidentata* expuestas a cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas.

CONCLUSIONES FINALES

El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar la presencia de plaguicidas de uso frecuente en distintos compartimientos del hábitat acuático en la cuenca del río Suquía (Córdoba), su efecto sobre organismos acuáticos y su acumulación.

En el monitoreo realizado en la cuenca de río Suquía, se registró la presencia de plaguicidas de uso frecuente en actividades agropecuarias y domésticas en agua, sedimento y MPS. Los compuestos cuantificados podrían ordenarse en forma decreciente en concentración de la siguiente manera: glifosato > AMPA > alfa-cipermetrina > atrazina > endosulfán sulfato > acetoclor > beta-endosulfán > alfa-endosulfán > clorpirifós. La amplia distribución de estos contaminantes fue evidenciada por la presencia de estos compuestos en las tres matrices analizadas, en los cinco sitios monitoreados y durante el período de un año. Los niveles hallados en sedimentos y MPS, fueron mayores en relación a los detectados en agua, evidenciando la alta afinidad de glifosato, AMPA y cipermetrina por las partículas de los compartimientos sólidos.

Se observaron variaciones espaciales a partir de la comparación de las concentraciones de los plaguicidas cuantificados en los distintos sitios de muestreo. La zona que demostró la mayor contaminación, fue CM, donde se deduce que los plaguicidas presentes en el río, podría provenir de dos fuentes principales: agrícola y urbano. Los sitios siguientes en contaminación fueron LP, RP y SR, en los cuales se evidencia un importante uso agrícola del suelo. Por último, el sitio menos contaminado fue LC acorde al escasa actividad agropecuaria desarrollada en el área. Por otro lado, no se observaron variaciones temporales en relación a las épocas de baja y alta aplicación probablemente debido al uso urbano de los plaguicidas monitoreados o a su persistencia.

Los niveles encontrados de cipermetrina, clorpirifós y endosulfán en agua del río Suquía sobrepasaron los límites máximos recomendados para protección de la biota acuática.

Esta evaluación es el primer registro de contaminación con plaguicidas realizado en la cuenca de río Suquía. Los resultados aportan información importante sobre el deterioro de éste y otros recursos hídricos con similares características, donde el uso de los suelos aledaños al río es de tipo agrícola y urbano. Los resultados de este trabajo, resaltaron el aporte significativo de fuentes domésticas a la contaminación con plaguicidas.

Por lo tanto, resulta necesario aplicar medidas más estrictas de control en el uso de plaguicidas, para evitar que estos contaminantes alcancen los ríos desde la aplicación en cultivos o zonas urbanas.

Sobre la base del monitoreo de plaguicidas en la cuenca de río Suquía, se definió un diseño experimental para evaluar la acumulación y efecto tóxico de cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas de compuestos puros y comerciales sobre un organismo autóctono de la cuenca del río Suquía, *J. multidentata*.

Cipermetrina y clorpirifós se acumularon en los distintos órganos de *J. multidentata* expuestas a los insecticidas de forma individual y en mezclas. La acumulación cuantificada en peces expuestos a las mezclas fue mayor que la observada en peces expuestos a los compuestos de forma individual. Además, la mezcla técnica mostró un patrón de acumulación diferente a la mezcla comercial, siendo mayores las concentraciones acumuladas en este último tratamiento.

Para evaluar los efectos tóxicos generados por cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas, se realizó un estudio integral que contempló distintos niveles en que los peces pueden ser afectados: molecular y de individuo. A nivel molecular, se evaluaron efectos sobre los sistemas de biotransformación de Fase I, II y III. Los peces expuestos a las mezclas mostraron mayores respuestas que los peces expuestos a los insecticidas de forma individual estando esta respuesta asociada a la acumulación medida.

Por otro lado, se observó que clorpirifós ejerció su mecanismo de acción específico sobre *J. multidentata* inhibiendo la actividad de AChE en músculo, pero no en cerebro. Una respuesta similar se observó para CIP. En los peces expuestos a CIP+CPF se observaron mayores cambios en esta respuesta que frente a los dos plaguicidas en forma individual.

Además, a nivel molecular, se contemplaron mecanismos de toxicidad inespecíficos como la producción de daño oxidativo y respuestas en el sistema de defensa de enzimas antioxidantes. Los peces expuestos a CIP no evidenciaron daño oxidativo debido la activación de las enzimas antioxidantes. Los peces expuestos a CPF, CIP+CPF y PRODUCTO mostraron daño oxidativo, a pesar de la activación de las enzimas antioxidantes.

Por otra parte, se detectaron indicios de disrupción endócrina, a partir de la medición de la actividad de aromatasas. Los peces expuestos a PRODUCTO mostraron un efecto aditivo en *J. multidentata*, provocando la inhibición de aromatasas gonadales y cerebrales, debido a la suma de los efectos producidos por la exposición a los insecticidas de forma individual. Estos resultados deberían complementarse con otros estudios para corroborar la acción de estos plaguicidas como disruptores endócrinos.

A nivel de individuo, se evaluaron respuestas en el comportamiento natatorio. Este biomarcador permite integrar los efectos ocurridos a niveles de organización inferiores. Los peces expuestos a baja concentración de CPF, CIP+CPF y PRODUCTO mostraron un aumento de la actividad natatoria, mientras que la alta concentración de estos tratamientos provocó disminución de la actividad natatoria.

A partir de la integración de las respuestas de los biomarcadores de efecto medidos en el índice RIB, se concluye que cipermetrina y clorpirifós en forma individual y en mezclas provocaron efectos tóxicos sobre la especie autóctona *J. multidentata*. Esto se evidencia en los mayores valores de RIB observados en peces tratados en relación a los peces control. Además, se identificó que las mezclas de los insecticidas causaron un mayor efecto tóxico que los compuestos de forma individual.

Por otra parte, al correlacionar la acumulación de cipermetrina y clorpirifós con los efectos de toxicidad encontrados en *J. multidentata* se pudo observar una correlación positiva. Esto muestra que cuanto mayor es la acumulación de los insecticidas en estudio mayores fueron los efectos tóxicos medidos en *J. multidentata*.

Los datos de acumulación y toxicidad de cipermetrina y clorpirifós generados a partir de esta tesis, son relevantes debido a que no existía información previa sobre el efecto de estos plaguicidas en especies autóctonas. Además, estos insecticidas son compuestos de uso actual tanto en los hogares como en actividades agropecuarias.

La acumulación medida en los distintos tejidos de *J. multidentata* indica a esta especie como posible organismo involucrado en el pasaje de cipermetrina y clorpirifós entre distintos niveles de la cadena trófica. De ocurrir este proceso de biomagnificación podría significar un riesgo para la salud humana asociado al consumo de peces que se alimentan de la especie en estudio.

Las concentraciones utilizadas en esta tesis son ambientalmente relevantes, por lo tanto, los efectos tóxicos observados indicarían un importante riesgo ecológico para la especie *J. multidentata*.

El mayor efecto tóxico de las mezclas de cipermetrina y clorpirifós en relación a los insecticidas evaluados de forma individual, demuestra la importancia de generar datos toxicológicos de compuestos en forma conjunta.

Éste y otros estudios similares deberían ser considerados en evaluaciones de riesgo de ambientes naturales donde una gran variedad de contaminantes están presentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, O.E., 2004. Pesticides and oxidativestress: A review. *Medical Science Monitoring* 10, 141-147.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A., 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179-1186.
- Amé, M.V., Galanti, L.N., Menone, M.L., Gerpe, M.S., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A., 2010. Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae* 9, 66-73.
- Amitai, G., Moorad, D., Adani, R., Doctor, B.P., 1998. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifosoxon. *Biochem. Pharmacol.* 56, 293-299.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1-12.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E. a., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67, 121-130.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnum, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 86, 300-308.
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458-79.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. *Methods of Analysis*, 16th ed.(March 1999 revision). AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- Aparicio, V.C., Gerónimo, E.D., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866-1873.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J., 2011a. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water. Air. Soil Pollut.* 216, 39-49.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J., Biancucci, G.F., 2011b. Biochemical stress responses in tissues of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 453-460.

- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009a. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 199–205.
- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Díaz, M.P., Bistoni, M.A., Wunderlin, D.A., 2009b. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 157, 1573–80.
- Ballesteros, M.L., Gonzalez, M., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Miglioranza, K.S.B., 2011. Uptake, tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 159, 1709–1714.
- Ballesteros, M.L., Miglioranza, K.S.B., Gonzalez, M., Fillmann, G., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2014. Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake. *Sci. Total Environ.* 490, 73–80.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Barr, D.B., 2008. Biomonitoring of exposure to pesticides. *J. Chem. Heal. Saf.* 15, 20–29.
- Barron, M.G., Plakas, S.M., Wilga, P.C., 1991. Chlorpyrifos pharmacokinetics and metabolism following intravascular and dietary administration in channel catfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108, 474–482.
- Barron, M.G., Plakas, S.M., Wilga, P.C., Ball, T., 1993. Absorption, Tissue Distribution and Metabolism of Chlorpyrifos in Channel Catfish Following Waterborne Exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1469–1476.
- Beutler, E., 1982. Catalase. En: *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods* (Ed.: Beutler, E.) Grune and Stratton Inc., New York. 105–106pp.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
- Bicker, W., Lämmerhofer, M., Genser, D., Kiss, H., Lindner, W., 2005. A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples. *Toxicol. Lett.* 159, 235–51.
- Bistoni, M.A., Hued, A.C., Videla, M., Sagretti, L., 1999. Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región cent al de Argentina. *Rev. Chil. Hist.Nat.* 72, 325–335.
- Boelsterli, U.A., 2007. *Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets* 2da Ed. CRC Press. Boca Raton, USA. 399pp.
- Boone, J.S., Chambers, E.J., 1996. Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulhydryl levels following exposure

- toorganophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fundam. Appl. Toxicol.* 29, 202-207.
- Botté, E.S., Jerry, D.R., Codi King, S., Smith-Keune, C., Negri, A.P., 2012. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 384-393.
- Bradbury, S.P., Carlson, R.W., Niemi, G.J., Henry, T.R., 1991. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 4. Central nervous system seizure agents. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 115-131.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brewer, S.K., Little, E.E., De Lonay, A.J., Beauvais, S.L., Jones, S.B., Ellersieck, M.R., 2001. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 70-76.
- Brodeur, J.C., Poliserpi, M.B., D'Andrea, M.F., Sánchez, M., 2014. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* 112, 70-6.
- Broeg, K., Lehtonen, K.K., 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 508-522.
- Butinof, M., Fernández, R., Lantieri, M.J., Stimolo, M.I., Blanco, M., Machado, A.L., Franchini, G., Gieco, M., Portilla, M., Eandi, M., Sastre, A., Diaz, M.P., 2014. Pesticides and Agricultural Work Environments in Argentina. *Intech, Pesticides-Toxic Aspects*, Chapter 5, 105-134 pp.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione-Reductase. *Method Enzymol.* 113, 484-490.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68, 613-621.
- Carriquiriborde, P., Marino, D.J., Giachero, G., Castro, E.A., Ronco, A.E., 2012. Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 46-54.
- Carriquiriborde, P., Bainy, A.C.D., 2012. Environmental toxicology and chemistry in Latin America. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 931-934.
- Carvalho, P.N., Rodrigues, P.N.R., Alves, F., Evangelista, R., Basto, M.C.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2008. An expeditious method for the determination of organochlorine pesticides residues in estuarine sediments using microwave assisted pre-extraction

- and automated headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 76, 1124-1129.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes), 2008, 2013. <http://www.casafe.org/biblioteca/estadisticas/> (CASAFE, 2008: consultado 29 Abril 2010 y CASAFE, 2013: consultado 30 junio 2014).
- Casarett y Doull's, 2008. *Toxicology the basic science of poisons*. Seventh Edition. McGraw-Hill, Press. 883-930 y 1159 pp.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1995b. Metabolism and synergism of pyrethrins. In "Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses" (J. E. Casida and G. B. Quistad, eds.), Oxford University Press, New York. 258-276 pp.
- Castro, G., 1985. Biotransformación de sustancias extrañas al organismo. Reacciones y enzimas involucradas. *Acta Bioquím. Clin. Lat.* 19, 201-213.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L.Á., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178-190.
- Cazenave, J., Bistoni, M.D.L.Á., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1-12.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 1999, 2012. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. http://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/index.html (consultado 14 enero 2015).
- Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31-62.
- Christensen, B.T., Lauridsen, T.L., Ravn, H.W., Bayley, M., 2005. A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquat. Toxicol.* 73, 210-20.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Fish as bioindicators. In: Markert, Breure & Zechmeister (Eds). *Bioindicator & Biomonitoring. Principles, concepts and applications*. Elsevier, Amsterdam. 639-676 pp.

- Chuiko, G.M., Podgornaya, V. a., Zhelnin, Y.Y., 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: Cross-species and cross-family differences. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 135, 55-61.
- Coats, J.R., Symonik, D.M., Bradbury, S.P., Dyer, S.D., Timson, L.K., Atchison, G.J., 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 671-679.
- Concha-Graña, E., Fernández-González, V., Grueiro-Noche, G., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D., 2010. Development of an environmental friendly method for the analysis of organochlorine pesticides in sediments. *Chemosphere* 79, 698-705.
- Contardo-Jara, V., Galanti, L.N., Amé, M. V., Monferrán, M. V., Wunderlin, D. a., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in watercourses of Córdoba, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1871-1880.
- Cortada, C., Vidal, L., Tejada, S., Romo, A., Canals, A., 2009. Determination of organochlorine pesticides in complex matrices by single-drop microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 638, 29-35.
- Crawford, M.J., Croucher, A., Hutson, D.H., Sag, K.M.E., 1981. The Metabolism of the Pyrethroid Insecticide Cypermethrin in Rats; Excreted Metabolites. *Pestic. Sci.* 12, 399-411.
- Cui, Y., Guo, J., Xu, B., Chen, Z., 2006. Potential of chlorpyrifos and cypermethrin forming DNA adducts. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 604, 36-41.
- Cursi O, 1993. *Toxicología*. Lopez Libreros editors, Buenos Aires, 180pp.
- D'Archivio, A.A., Fanelli, M., Mazzeo, P., Ruggieri, F., 2007. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* 71, 25-30.
- David, M., Marigoudar, S.R., Patil, V.K., Halappa, R., 2012. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 127-134.
- Davies, P.E., Cook, L.S.J., Geonarso, D., 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 13, 1341-1354.
- Denton D, Wheelock C, Murray S, Deanovic L, Hammock B, Hinton D., 2003 Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 336-341.

- den Besten PJ, Munawar M, 2005. Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies. CRC Press Taylor & Francis. Boca Raton, FL; USA. 271pp.
- Diotel, N., Page, Y. Le, Mouriec, K., Tong, S.K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 172-192.
- Edwards, R., Millburn, P., 1987. The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis and trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Xenobiotica* 17, 1175-1193.
- Elhalwagy, M.E. a, Zaki, N.I., 2009. Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 219-24.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R., 1961. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- EXTONET (Extension Toxicology Network), 1993. Movement of pesticides in the environment. <http://extoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm> (consultado 12 enero 2015).
- EXTONET (Extension Toxicology Network), 1996. Pesticide Information Profiles Chlorpyrifos: <http://extoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm> Cypermethrim: <http://extoxnet.orst.edu/pips/cypermet.htm> (consultado 16 enero 2015)
- FAO/WHO (Food and Agricultural organization of the United Nations/World Health Organization), 2004a. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Sixty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, Italy, 4-12 February 2004.
- FAO/WHO (Food and Agricultural organization of the United Nations/World Health Organization), 2004b. Pesticide residues in food. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Rome, Italy, 20-29 September 2004.
- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.* 49, 243-250.
- Feo, M.L., Ginebreda, a., Eljarrat, E., Barceló, D., 2010. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J. Hydrol.* 393, 156-162.
- Fernandez-Alvarez, M., Llompart, M., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., 2008. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction - gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1188, 154-163.

- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10, 360-75.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37-45.
- Gallo, M.A., Lawryk, N.J., 1991. Organic phosphorus pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W.J., Jr. y Laws, E.R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY., 3-5 pp.
- García-Rodríguez, D., Carro-Díaz, A.M., Lorenzo-Ferreira, R.A., Cela-Torrijos, R., 2010. Determination of pesticides in seaweeds by pressurized liquid extraction and programmed temperature vaporization-based large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 2940-2949.
- Gfrerer, M., Lankmayr, E., 2005. Screening, optimization and validation of microwave assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. *Anal. Chim. Acta* 533, 203-211.
- Gómez, M.J., Herrera, S., Solé, D., García-Calvo, E., Fernández-Alba, A.R., 2012. Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. *Sci. Total Environ.* 420, 134-145.
- Gonzalez, M., Miglioranza, K.S.B., Shimabukuro, V.M., Londoño, O.M.Q., Martinez, D.E., Aizpún, J.E., Moreno, V.J., 2012. Surface and groundwater pollution by organochlorine compounds in a typical soybean system from the south Pampa, Argentina. *Environ. Earth Sci.* 65, 481-491.
- Grunewald K., Schmidt W., Unger C., Hanschmann G., 2001. Behavior of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (ampa) in soils and water of reservoir Radeburg II catchment (Saxony/Germany). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 65-70.
- Guia SATA, Guía para la protección y nutrición vegetal, 2009 <http://www.laguiasata.com>, (consultado 10 diciembre 2014).
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154-162
- Guyón, N.F., Bistoni, M. a., Wunderlin, D., Amé, M.V., 2012a. Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality. *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 7, 97-104.
- Guyón, N.F., Roggio, M.A., Amé, M.V., Hued, A.C., Valdés, M.E., Giojalas, L.C., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L.Á., 2012. Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17 β -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 935-940.

- Guyón N.F., 2013. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Expresión de aromatasa cerebral y gonadal y cambios histológicos gonadales como biomarcadores de exposición a contaminantes ambientales. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S- transferases. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hai, D.Q., Varga, S.I., Matkovics, B., 1997b. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 117, 83-88.
- Hallgren, S.L.E., Linderöth, M., Olsén, K.H., 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Ender guppy (*Poecilia reticulata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 323-328.
- Hayes, 2010. *Handbook of Pesticide Toxicology. Third Edition VOLUME 1.* Academic Press of Elsevier. 1505-1526, 1640-1641 pp.
- Hinfray, N., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 144, 252-262.
- Hirthe, G., Fisher, T.C., Crane, M. & Callaghan, A., 2001. Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. *Chemosphere.* 44, 583-589.
- Holcombe, G.W., G.L. Phipps and D.K. Tanner. 1982. The acute toxicity of Kelthane, dursban, Disulfoton, Pydrin, and Permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environ. Pollut. Ser. A.* 29, 167-178.
- Hued, A.C, Bistoni, M.A., 2002. Effects of water quality variations on fish communities in the Central Part of Argentina, South America. *Proc. Intern. Assoc. Theor. Appl. Limnol.* 28, 112-116.
- Hued, A.C., Bistoni M.A., 2005. Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiología* 543, 279-298.
- Hum, J.B., Allen, J.L., 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 1-27.
- Iannacone, J., Alvariño, L., Mamani, N., 2011. Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 6, 23-29.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 150, 177-192.

- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R., 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61, 817-826.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W. 1992. *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 3rd ed. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 642 pp.
- Kavitha, P., Venkateswara Rao, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87, 182-188.
- Kavitha, P., Venkateswara Rao, J.V., 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 192-198.
- Kelly, S.A., Havrillal, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative Stress. *Environmental Health*, 106, 375-384.
- Khalil, F., Joon, I., Undap, S., Tasmin, R., Qiu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2013. Chemosphere Alterations in social behavior of *Japanese medaka* (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemosphere* 92, 125-130.
- Klute A., 1986. *Methods of soil analysis I. Physical and mineralogical methods*. Madison: American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., González, S., Cortina, J.L., de Alda, M.L., Barceló, D., 2012. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 86, 8-16.
- Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Albanis, T. a., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ. Pollut.* 141, 555-570.
- Kumar, A., Rai, D.K., Sharma, B., Pandey, R.S., 2009. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* 93, 96-99.
- Kuranchie-Mensah, H., Atiemo, S.M., Palm, L.M.N.D., Blankson-Arthur, S., Tutu, A.O., Fosu, P., 2012. Determination of organochlorine pesticide residue in sediment and water from the Densu river basin, Ghana. *Chemosphere* 86, 286-292.
- Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2006. Coupling of headspace solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 573-574, 223-230.
- Lengyel, Z., Földényi, R., 2003. Acetochlor as a soil pollutant. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 10, 13-18.

- Lanning, C.L., Fine, R.L., Corcoran, J.J., Ayad, H.A., Rose, R.L., Abou-Donia, M.B., 1996. Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 155-162.
- Leonard, A.W., Hyne, R.V., Lim, R.P., Chapman, J.C., 1999. Effect of endosulfan runoff from cotton fields on macroinvertebrates in the Namoi river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 125-134.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464
- Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13-19.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Martinez, P.G., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 112, 265-276.
- Livingstone, D., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 427-430.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
- Maggioni, T., Hued, A.C., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N., Amé, M.V., 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the suquia river (Córdoba, Argentina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 337-353.
- Marigoudar, S.R., Ahmed, R.N., David, M., 2009. Impact of Cypermethrin on Behavioural Responses in the Freshwater Teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *World J. Zool.* 4, 19-23.
- Marino, D., Ronco, A., 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 820-826.
- Menone, M.L., Pesce, S.F., Díaz, M.P., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A., 2008. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69, 1150-1157.
- Merlo, C., Abril, C., Amé, M.V., Argüello, G.A., Carreras, H.A., Chiappero, M.S., Hued, A.C., Wannaz, E., Galanti, L.N., Monferrán, M.V., González, C.M., Solís, V.M., 2011. Integral assessment of pollution in the Suquia River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Sci. Total Environ.* 409, 5034-5045.
- Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., 1997. The trophodynamics of PCBs, including mono- and non-ortho congeners, in the food web of North-Central Lake Ontario. *Sci. Total Environ.* 201, 245-272.

- Miglioranza, K.S.B., Aizpún de Moreno, J.E., Moreno, V.J., 2003. Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 712-717.
- Mmualefe, L.C., Torto, N., Huntsman-Mapila, P., Mbongwe, B., 2009. Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry. *Microchem. J.* 91, 239-244.
- Molero, A.M., Pisanó, A., 1987. Estadios de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Rev. Bras. Biol.* 47, 115-125.
- Monferran, M.V., Wunderlin, D.A., Nimptsch, J., Pflugmacher, S., 2007. Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68, 2073-2079.
- Monferran, M.V., Pesce, S.F., Cazenave, J., Wunderlin, D.A., 2008. Detoxification and antioxidant responses in diverse organs of *Jenynsia multidentata* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Environ. Toxicol.* 23, 184-192.
- Monferrán, M. V, Cortina, P.R., Santiago, A.N., Wunderlin, D.A., 2009. Study of the distribution of dichlorobenzenes in sediment and water of Suquía River basin (Córdoba-Argentina) by an optimised SPME-GC-MS procedure. *Int. J. Environ. Heal.* 3, 363-378.
- Monferrán, M.V., Galanti, L.N., Bonansea, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2011. Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *J. Environ. Monit.* 13, 398-409.
- Monserrat, J.M., Garcia, M.L., Ventura-Lima, J., González, M., Ballesteros, M.L., Miglioranza, K.S.B., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2014. Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 108, 8-15.
- Moreno, I., Pichardo, S., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C.M., Cameán, A.M., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon* 45, 395-402.
- Mugni, H., Ronco, a, Bonetto, C., 2011. Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 350-4.
- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D., 2010. Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the Ebro River Basin. *J. Hydrol.* 383, 18-29.
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Second Edition. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Florida. 458 pp.

- Ortiz-Hernández ML., Sánchez-Salinas E., Olvera-Velona A., Folch-Mallol JL, 2011. Pesticides in the Environment: Impacts and its Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment. Rijeka: In Tech. <http://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate> (consultado 10 enero 2015).
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Exposure* 20, 112–117.
- Pasquini, A.I., Formica, S.M., Sacchi, G.A., 2012. Hydrochemistry and nutrients dynamic in the Suquía River urban catchment's, Córdoba, Argentina. *Environ. Earth Sci.* 65, 453–467.
- Pereira, P., de Pablo, H., Dulce Subida, M., Vale, C., Pacheco, M., 2009. Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Óbidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1471–1480.
- Pérez, D.J., Menone, M.L., Camadro, E.L., Moreno, V.J., 2008. Genotoxicity evaluation of the insecticide endosulfan in the wetland macrophyte *Bidens laevis* L. *Environ. Pollut.* 153, 695–698.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66.
- Pesce, S.F., Wunderlin, D. a, 2000. Use of Water Quality Indices To Verify the impact of Córdoba city (Argentina) on Suquía River. *Water Res.* 34, 2915 – 2926.
- Pesce, S.F., Cazenave, J., Monferrán, M. V., Frede, S., Wunderlin, D. a., 2008. Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ. Pollut.* 156, 775–783.
- Pessagno, R.C., Torres Sánchez, R.M., dos Santos Afonso, M., 2008. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environ. Pollut.* 153, 53–9.
- Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.* 70, 169–178.
- Polat, H., Erkoc, F.U., Viran, R., Koc, O., 2002. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 49, 39–44.
- Qiu, C., Cai, M., 2010. Ultra trace analysis of 17 organochlorine pesticides in water samples from the Arctic based on the combination of solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-electron-capture detector. *J. Chromatogr. A* 1217, 1191–1202.
- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z., Wang, L., 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following

- in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150, 9–16.
- Rao, J.V., Begum, G., Pallela, R., Usman, P.K., Rao, R.N., 2005. Environmental Research and Public Health Changes in Behavior and Brain Acetylcholinesterase Activity in Mosquito Fish, *Gambusia affinis* in Response to the Sub-Lethal Exposure to Chlorpyrifos. *Public Health* 2, 478–483.
- Raposo Júnior, J.L., Ré-Poppi, N., 2007. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta* 72, 1833–1841.
- Rathore H.S., Nollet L.M.L., 2012. PESTICIDES. Evaluation of Environmental Pollution www.agriagriculture.net. 1-627pp.
- Reddy, P.M., Philip, G.H., 1994. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 619–626.
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Créton, R., 2012. Neurotoxicology and Teratology Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 458–465.
- Rodríguez-Fuentes, G., Soto, M., Luna-Ramírez, K., 2013. Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96, 99–102.
- Sánchez-Avila, J., Fernández-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S., 2011. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 6799–6811.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2001. Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 172, 21–63.
- Sancho, J.V., Hernández, F., López, F.J., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E., van Zoonen, P., 1996. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 737, 75–83.
- Santhakumar, M., M. Balaji, K.R. Saravanan, D. Soumady and K. Ramudu, 2000. Effect of monocrotophos on the optomotor behaviour of an air breathing fish, *Anabas testudinius* (Bloch). *J. Environ. Biol.*, 21, 65–68.
- Sharma P, Firdous S, Singh R, 2014. Neurotoxic effect of cypermethrin and protective role of resveratrol in Wistar rats. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 4, 104–111.
- Schegg, K.M., Harrington, L.S., Nielsen, S., Zweig, R.M., Peacock, J.H., 1992. Soluble and Membrane-Bound Forms of Brain Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease. *Neurobiol. og Aging* 13, 697–704.

- Schleizinger, J.J., Stegeman, J.J., 2001. Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquatic Toxicology*, 52, 101-115.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M., 2008. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography-mass spectrometry: A realistic case in vineyard soils. *Talanta* 77, 298-303.
- Schreiber, R., Harguinteguy, C. a., Manetti, M.D., 2013. Dynamics of organochlorine contaminants in surface water and in *Myriophyllum aquaticum* plants of the river Xanaes in central Argentina during the annual dry season. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 466-473.
- Scollon, E.J., Starr, J.M., Godin, S.J., DeVito, M.J., Hughes, M.F., 2009. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab. Dispos.* 37, 221-228.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 1998. Límites máximos de residuos de plaguicidas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 2011. Proyecto norma de prohibición de endosulfán <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1412&io=16359> (Consultado 3 enero 2015).
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., Frana, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecol. Indic.* 19, 215-225.
- Sharbidre, A.A., Metkari, V., Patode, P., 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 132-141.
- Sijm, D.T., Opperhuizen, A., 1989. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.). *Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2E. Reactions and Processes. Springer, Berlin.
- SIIA (Sistema Integrado de Información Agropecuaria), 2013. Estimaciones Agrícolas. Datos de la Dirección de Información Agrícola y Forestal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. <http://www.siiia.gov.ar/series>. (Consultado 10 diciembre 2014).
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171, 3-59.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1999. *Introducción a la Bioestadística*. Traducido por Navarron, J. Reverté, Barcelona.

- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., van der Kraak, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 721–772.
- Spiro y Stigliani, 2003. *Chemistry of the Environmental*. Second Edition.
- SRHN (Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación), 2003. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. <http://www.hidricosargentina.gov.ar/NivelCalidad1.html>. (consultado 10 diciembre 2007).
- Sturm, A., Da Silva De Assis, H.C., Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: Enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.* 47, 389–398.
- Swati A., Singh D.K., 2002. Utilization of chlorpyrifos by *Aspergillus niger* and *A. flavus* as carbon and phosphorus source. 17th World Congress of Soil Science, 14–21 August 2001, Bangkok, Thailand.
- Tahboub, Y.R., Zaater, M.F., Al-Talla, Z. a., 2005. Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1098, 150–155.
- Taylor, P., 1996. Cholinesterase agents. In “Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics” (J. G. Hardman et al, eds.), 9th ed., pp. 161–176. McGraw-Hill, New York.
- 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.
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Hodgson, E., 2002. In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem. Biol. Interact.* 141, 229–241.
- Tarigopula, S.P., Philip, G.H., 2014. Studies of cypermethrin activity on steroidogenesis in female *Labeo Rohita*. *Anal. Pharm. Biomed. Sci.* 63–70.
- Thurman EM, Fallon JD., 1996. The deethylatrazine/atrazine ratio as an indicator of the onset of the spring flush of herbicides into surface water of the Midwestern United States. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 65, 203–214.
- Tilton, F.A., Bammler, T.K., Gallagher, E.P., 2011. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 153, 9–16.
- Tomkins, B.A., Barnard, A.R., 2008. Determination of organochlorine pesticides in ground water using solid-phase microextraction followed by dual-column gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* 964, 21–33.

- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool* 290, 475-483.
- Tu, H.T., Silvestre, F., Meulder, B. De, Thome, J.P., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere* 86, 83-91.
- Tutundjian, R., Cachot, J., Leboulenger, F., Minier, C., 2002. Genetic and immunological characterisation of a multixenobiotic resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132, 463-471.
- Tyler, C.R., Beresford, N., van der Woning, M., Sumpter, J.P., Thorpe, K.L., 2000. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 801-809.
- USDA (United States Department of Agriculture), 1987. Soil mechanics level 1. Module 3: Textural Soil Classification. 1-48 pp.
- USEPA (United State Environmental Protection Agency), 1989. Pesticide Fact Sheet Number 199, Cypermethrin. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2-9
- USEPA (United State Environmental Protection Agency), 1995. Method 3540, US Government Printing Office, Washington USA, 1995. (AOAC, 1990) AOAC methods 963.15, Association of Official Analytical Chemists.
- USEPA (United State Environmental Protection Agency), 2000. Dursban Announcement. In the News, Speeches and Testimony.
- Valdés, M.E., Amé, M.V., Bistoni, M.D.L.A., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472, 389-396.
- 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.
- van Gestel, C.A.M. and Van Brummelen, T.C., 1994. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- Vázquez J.B., Lopez-Robles A., Sosa D.F., Sáez M.P., 1979. Aguas. En: Vázquez J.B., Miatello R., Roque M., (editores). *Geografía Física de la Provincia de Córdoba*. Córdoba: Banco Provincia de Córdoba. pp 139-211.
- Vega, M., Pardo, R., Barrado, E., Debn, L., 1998. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research*, 32, 3581-3592.
- Villatte, F., Bachmann, T.T., 2002. How many genes encode cholinesterase in arthropods? *Pestic. Biochem. Physiol.* 73, 122-129.

- Wacksman, M.N., Maul, J.D., Lydy, M.J., 2006. Impact of atrazine on chlorpyrifos toxicity in four aquatic vertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 681-689.
- Walkley A, Black CA., 1965. Organic carbon. In Black CA, ed, *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison,WI., pp 1372-1375.
- Wang, W., Ballatori, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 50, 335-355.
- Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G., Augustijnbeckers P.W.M., 1992. The SCS ARS CES pesticide properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123, 1-155.
- Welling, W., de Vries, J.W., 1992. Bioconcentration kinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 64-75.
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A., Hammock, B.D., 2005. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 74, 172-192.
- WHO (World Health Organization), 1994. Glyphosate. World Health Organization: Geneva. <http://www.who.int/en/>
- Wiberg K., Harner, T., Wideman, J. Bidleman T.F., 2001. Chiral analyses of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Chemosphere.* 45, 843-844.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Wunderlin, D.A., Díaz, M.P., Amé, M.V., Pesce, S.F., Hued, A.C., Bistoni, M.A., 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquía River basin (Córdoba-Argentina). *Water Res.* 35, 2881-2894.
- Xing, H., Wang, X., Sun, G., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 233-244.
- Xing, H., Zhang, Z., Yao, H., Liu, T., Wang, L., Xu, S., Li, S., 2014. Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. *Chemosphere* 104, 244-250.
- Yang, Y., Niu, L., Li, S., 2013. Purification and studies on characteristics of cholinesterases from *Daphnia magna*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14, 325-335.
- Yilmaz, M., Gül, A., Erbaşı, K., 2004. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere* 56, 381-385.

- Zhao, X., Metcalfe, C.D., 2008. Characterizing and Compensating for Matrix Effects Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry: Analysis of Neutral Pharmaceuticals in Municipal Wastewater. *Anal. Chem.* 80, 2010–2017.
- Zhou, S., Duan, C., Michelle, W.H.G., Yang, F., Wang, X., 2011. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *J. Environ. Sci.* 23, 676–680.