



Agroquímicos en Argentina. Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales.

Marcelo L. Larramendy, Gabriela Molinari, Norma V. González, Juan P. Pilili, Josefina Vera Candiotti, Miguel A. Reigosa y Sonia Soloneski

*Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina*

Calle 64 No. 3, (1900), La Plata, Argentina. Fax: (+54) 221 425 8252

marcelo.larramendy@gmail.com

ABSTRACT

One of the major goals of our research laboratory is to evaluate comparatively the genotoxic and cytotoxic effects exerted by several pure agrochemicals and their technical formulations commonly used in Argentina on vertebrate cells *in vitro* and *in vivo*. Among them are listed the herbicides 2,4-D and 2,4-D DMA®, dicamba and Banvel®, the fungicide zineb and Azzurro®, the insecticides carbofuran and Furadan®, pirimicarb and Aficida®, and the endectocide ivermectin and Ivomec®. The SCE, comet assay, micronuclei, chromosomal aberrations, cell-cycle progression, spindle disturbances, MTT and neutral red assays were used as end-points for geno and cytotoxicity. Overall, the results clearly demonstrated that the damage induced by the commercial formulations is in general greater than that produced by the pure pesticides, suggesting the presence of deleterious components in the excipients with a toxic additive effect over the pure agrochemicals. Accordingly, the results highlight that: 1) A complete knowledge of the toxic effect/s of the active ingredient is not enough in biomonitoring studies; 2) Pesticide/s toxic effect/s should be evaluated according to the commercial formulation available in market; 3) The deleterious effect/s of the excipient/s present within the commercial formulation should not be either discarded nor underestimated, and 4) A single bioassay is not enough to characterize the toxicity of a agrochemical under study.

Key words: Agrochemicals, Cytotoxicity, Genotoxicity, Bioassays, Commercial formulations, Active ingredients

RESUMEN

Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es evaluar comparativamente los efectos geno-citotóxicos ejercidos *in vitro* e *in vivo* sobre células de vertebrados por principios activos de agroquímicos y sus formulaciones comerciales de uso masivo en Argentina. Entre los mismos caben mencionarse, los herbicidas 2,4-D y 2,4-D DMA®, dicamba y Banvel®, el fungicida zineb y Azzurro®, los insecticidas carbofurán y Furadan®, pirimicarb y Aficida®, como también el endectocida ivermectina e Ivomec®. Entre los bioensayos empleados para la cuantificación de efectos geno-citotóxicos, caben mencionarse a la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, ensayo cometa, micronúcleos, aberraciones cromosómicas, progresión del ciclo celular, alteraciones del huso mitótico, ensayos de MTT y Rojo Neutro, entre otros. En general, los resultados ponen en evidencia que el daño inducido por las formulaciones comerciales es, en la mayoría de los casos, superior al ejercido por sus principios activos. Esto sugiere la presencia de componentes nocivos en los excipientes con un efecto geno y/o citotóxico aditivo. En consecuencia, los resultados destacan que: 1) El conocimiento completo del/os efecto/s tóxico/s de un principio activo de un agroquímico no es suficiente en estudios de biomonitorio; 2) Los efectos geno y/o citotóxicos de un agroquímico deben ser evaluados de acuerdo a la formulación comercial disponible en el mercado; 3) El efecto nocivo/s del excipiente/s presente/s en la formulación comercial no debe ser descartada ni subestimada y 4) Un único bioensayo no es indicador suficiente para caracterizar la toxicidad de un agroquímico en estudio.

Palabras clave: Agroquímicos, Citotoxicidad, Genotoxicidad, Bioensayos, Formulaciones comerciales, Principios activos

MARCO DE ESTUDIO

Mundialmente, la mayor parte de la biota se encuentra inevitablemente expuesta a agroquímicos, hecho que representa una preocupación severa tanto a nivel ecológico como sanitario dada la toxicidad de los mismos. Además, los agroquímicos son compuestos ubicuos en el planeta que son incorporados en grandes cantidades al medio ambiente por diversas actividades antrópicas (www.epa.gov). En la actualidad, tanto en estudios epidemiológicos como de genotoxicidad-citotoxicidad experimental, es manifiesto el interés creciente en la determinación de biomarcadores que permitan la medición y estimación de una exposición activa y/o pasiva a contaminantes ambientales con capacidad tóxica. A pesar de los beneficios aportados por los agroquímicos tanto en agricultura como en usos domésticos, muchos de ellos pueden representar peligros potenciales debido a la contaminación de alimentos, agua y aire; hecho que puede ocasionar graves problemas de salud no sólo para los seres humanos sino también para los ecosistemas y sus comunidades (WHO, 2006). Estudios realizados en países desarrollados han demostrado que las tasas de incidencia anual de intoxicación por exposición a plaguicidas puede llegar a valores que superan los 182 casos por millón en trabajadores agrícolas (Calvert *et al*, 2004) y los 7,4 casos por millón en la población en edad escolar (Alarcon *et al*, 2005). Sin embargo, también es cierto que los casos de intoxicación por agroquímicos podrían resultar de causas variadas dependiendo de las diferentes regiones del mundo.

El uso de plaguicidas prohibidos en los países industrializados, en particular aquellos clasificados como altamente tóxicos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2006), la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte América (EPA) (www.epa.gov), y la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) (www.iarc.fr), sumado a la existencia obsoleta de los mismos y a técnicas de almacenamiento inadecuadas, pueden proporcionar riesgos únicos en países emergentes (WHO-FAO, 2004), donde se consume el 25% de la producción mundial de plaguicidas (WHO, 2006). En ellos, por lo general, existen legislaciones insuficientes, falta de sistemas de vigilancia, menor cumplimiento normativo, falta de capacitación de la mayor parte de los usuarios y

operarios, acceso inadecuado o reducido a los sistemas de información, mantenimiento deficiente o no existente de un equipo de protección personal, entre otros. Asimismo, cabe mencionarse que en estos países es donde se concentra una población mayor vinculada directa o indirectamente con la agricultura; hecho que, sumado a lo mencionado anteriormente, hace que la incidencia de intoxicaciones sea por consiguiente, más elevada (IFCS, 2003).

El empleo masivo y no regulado de agroquímicos en la región, potencia la incidencia de intoxicaciones por plaguicidas, que ya ha sido catalogado como un problema grave de salud pública en toda América Latina por la Organización Mundial de la Salud (www.who.org). Debido a las condiciones socio-económicas y culturales en las que los mismos se utilizan, los plaguicidas representan una fuente de intoxicación tanto aguda como crónica para cientos de miles de personas anualmente. En la mayoría de los países latinoamericanos los registros de intoxicación son tan insuficientes que impiden llevar un registro detallado de las intoxicaciones agudas. Asimismo, los registros relativos a los efectos crónicos ocasionados por la exposición a plaguicidas, como la incidencia de diferentes neoplasias o malformaciones congénitas, en la mayoría de los casos no están disponibles. Dichas omisiones sirven para ocultar la proporción epidémica de la enfermedad relacionada con el uso de plaguicidas por parte de las distintas administraciones de los países en desarrollo. En Argentina, por ejemplo, datos oficiales revelan que el 79% de las intoxicaciones por plaguicidas están relacionadas con el uso de herbicidas, seguidas por insecticidas y fungicidas (www.msal.gov.ar). Estos registros se correlacionan con la evolución del mercado fitosanitario argentino, donde los herbicidas representan la mayor parte de los consumibles (69%), seguidos por insecticidas (13%), y fungicidas (11%) (www.casafe.org).

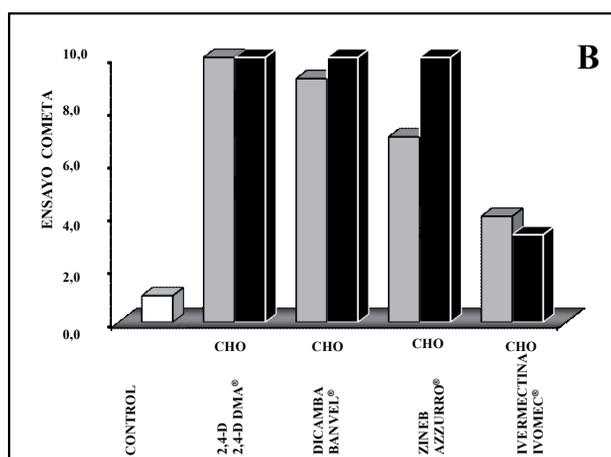
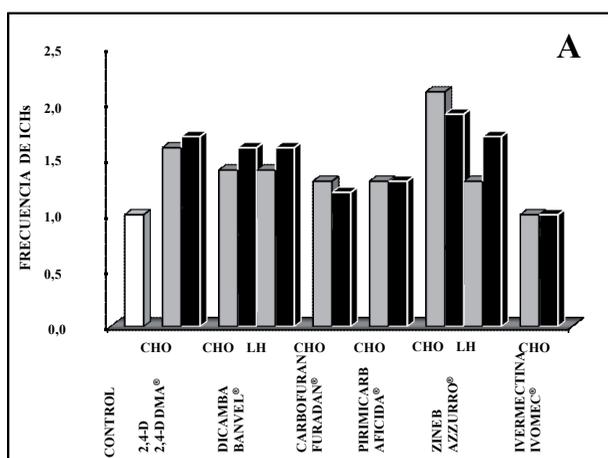
En agricultura, los plaguicidas no se utilizan como un ingrediente activo único, sino como parte de una formulación comercial compleja. Además del componente activo, los productos formulados contienen diferentes solventes y co-adyuvantes, para algunos de los cuales ha sido factible demostrar su capacidad de inducir daño genotóxico y citotóxico a nivel experimental en células de mamíferos, entre otras (Lin and Garry, 2000; González *et al*, 2007, 2009; Soloneski *et al*, 2008; Molinari *et al*, 2009).

Por lo tanto, una correcta evaluación del riesgo de exposición ante un agroquímico debe considerar otros posibles efectos tóxicos aditivos causados por el/los excipiente/s. Así, tanto los trabajadores, como los organismos no blanco, están expuestos a la acción simultánea del principio activo y a una variedad de otros productos químicos incluidos en su formulado comercial.

Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es evaluar comparativamente los efectos geno-citotóxicos ejercidos *in vitro* e *in vivo* sobre células de vertebrados por principios activos de agroquímicos (Pestanal®, Riedel-de Haën, Alemania) y de sus formulaciones comerciales de uso masivo en Argentina. Entre los mismos caben mencionarse, los herbicidas 2,4-D y 2,4-D DMA® (60,2% 2,4-D, Laboratorios Delente S.R.L., Buenos Aires, Argentina), dicamba y Banvel® (57,7% dicamba, Syngenta Agro S.A., Buenos Aires, Argentina), el fungicida zineb y Azzurro® (70,0% zineb, Chemiplant, Buenos Aires, Argentina), los insecticidas carbofurán y Furadan® (47,0% carbofurán, FMC Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina) y pirimicarb y Aficida® (50,0% pirimicarb, Syngenta Agro S.A., Buenos Aires, Argentina), así como el endectocida ivermectina e Ivomec® (1,0% ivermectina, Merial Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina).

Entre los bioensayos empleados para la cuantificación de los efectos geno-citotóxicos caben mencionarse a la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, el ensayo cometa, la frecuencia de micronúcleos, la frecuencia de aberraciones cromosómicas, la progresión del ciclo celular, las alteraciones del huso mitótico, los ensayos de MTT y Rojo Neutro, entre otros. Los mismos son llevados a cabo incluyendo tratamientos *in vitro* en fibroblastos y linfocitos humanos, en líneas celulares de mamíferos y en eritrocitos circulantes de larvas de *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) expuestas *in vivo*. En general, los resultados demuestran claramente que el daño inducido por las formulaciones comerciales es en la mayoría de los casos supera al ejercido por sus principios activos, lo que sugiere la presencia de componentes nocivos en los excipientes con un efecto geno y/o citotóxico aditivo (Soloneski et al, 2001, 2002a,b, 2003a,b, 2007, 2008; González et al, 2005; González et al, 2006, 2007, 2008, 2009; Molinari et al, 2009; Soloneski and Larramendy, 2010; Vera Candioti et al, 2010) (Fig. 1).

En consecuencia, los resultados destacan que: 1) El conocimiento completo del/os efecto/s tóxico/s de un principio activo de un agroquímico no es suficiente en estudios de biomonitorio; 2) Los efectos geno y/o citotóxicos de un agroquímico deben ser evaluados de acuerdo a la formulación comercial disponible en el mercado; 3) El efecto nocivo/s del excipiente/s presente/s en la formulación comercial no debe ser descartada ni subestimada y 4) Un único bioensayo no es indicador suficiente para caracterizar la toxicidad de un agroquímico en estudio.



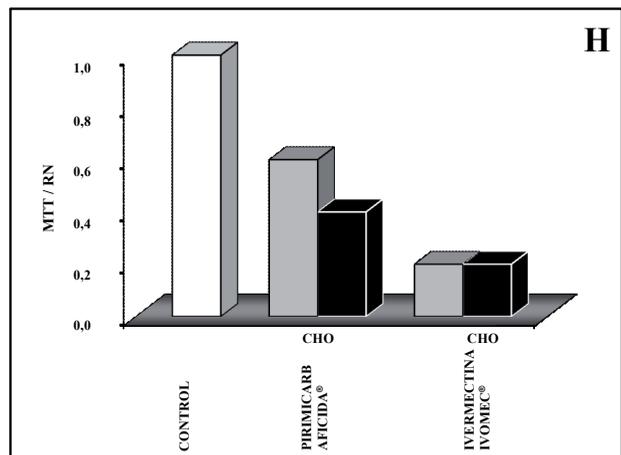
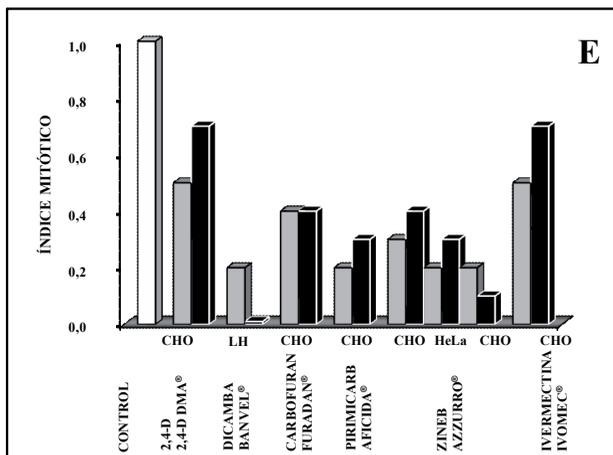
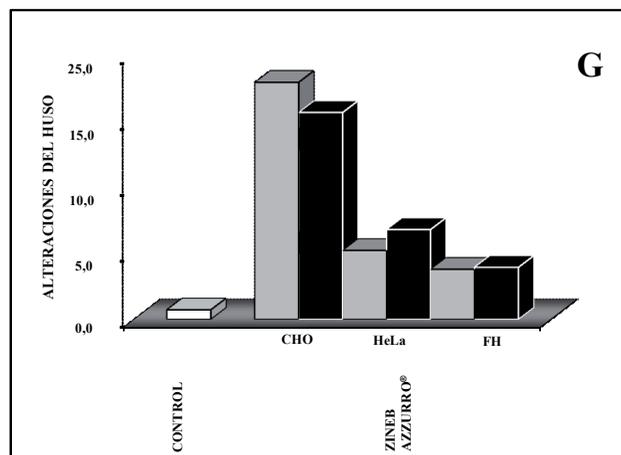
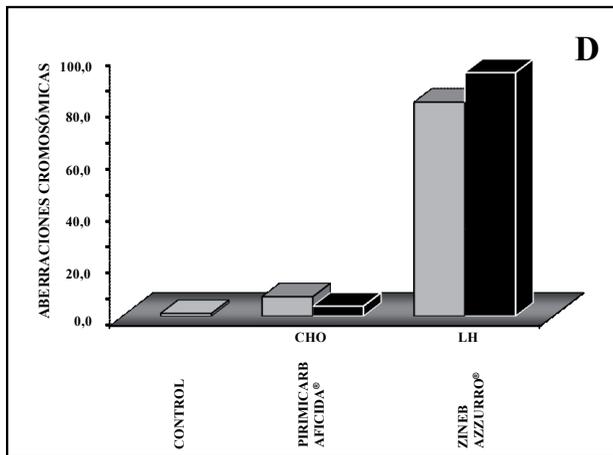
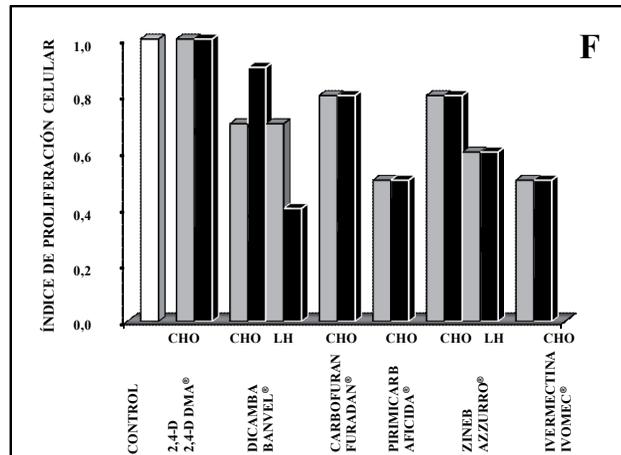
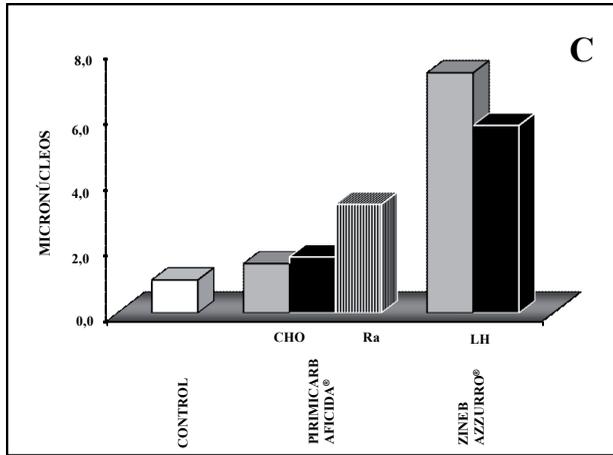


Figura 1. Comparación de los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por diversos principios activos de pesticidas Pestanal® (barras grises) y sus formulaciones comerciales (barras negras) de mayor empleo en Argentina sobre células de vertebrados *in vitro* (barras lisas) e *in vivo* (barras rayadas). Los resultados se expresan como número de veces de incremento sobre valores controles. La evaluación fue realizada empleando diferentes bioensayos de genotoxicidad [Frecuencia de Inter-cambios de Cromátidas Hermanas (ICHs) (A), Ensayo Cometa (B), Micronúcleos (C), Aberraciones Cromosómicas (D)] y de citotoxicidad [Índice Mitótico (E), Índice de Proliferación Celular (F), Alteraciones del Huso Mitótico (G), Ensayos de MTT y Rojo Neutro (NR) (H)]. CHO, células de ovario de hámster chino (CHO-K1, ATCC CCL-61); FH, fibroblastos humanos no transformados provenientes de cultivos primarios de prepucio (Instituto Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina); LH, linfocitos humanos de sangre periférica; HeLa, células HeLa (HeLa, ATCC CCL-2); Ra, eritrocitos circulantes de larvas de *Rhinella arenarum*.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por Universidad Nacional de La Plata (Subsidio N° 11/N564, 11/N619), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Subsidio BID PICT 2004 N° 26116), y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Subsidio PIP 11220090100106) de Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon, W.A., Calvert, G.M., Blondell, J.M., Mehler, L.N., Sievert, J., Propeck, M., Tibbetts, D.S., Becker, A., Lackovic, M., Soileau, S.B., Das, R., Beckman, J., Male, D.P., Thomsen, C.L., Stanbury, M. (2005) Acute illnesses associated with pesticide exposure at schools. *JAMA* 294: 455-65.
- Calvert, G.M., Plate, D.K., Das, R., Rosales, R., Shafey, O., Thomsen, C., Male, D., Beckman, J., Arvizu, E., Lackovic, M. (2004) Acute occupational pesticide-related illness in the US, 1998-1999: surveillance findings from the SENSOR-pesticides program. *Am. J. Ind. Med.* 45: 14-23.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2005) Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its derivative 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt (2,4-D DMA). I. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. In Vitro* 19: 289-97.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2006) Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 20: 1481-87.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2007) The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel® induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 634: 60-68.
- González, N.V., Molinari, G., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2008) Genotoxicity and cytotoxicity of pesticides. Evaluation of the active ingredients and Argentinean commercial formulations. *Theoria* 17: 27-45.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M. (2009) Dicamba-induced genotoxicity of Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *J. Hazard. Mater.* 163: 337-43.
- IFCS (2003) Acutely toxic pesticides: initial input on extent of problem and guidance for risk management. Fourth session of the Intergovernmental Forum on Chemical Safety. Doc number: IFCS/FORUM-IV/10w.
- Lin, N., Garry, V.F. (2000) *In vitro* studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *J. Toxicol. Environ. Health* 60: 423-39.
- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2009) *In vitro* genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *J. Hazard. Mater.* 165: 1074-82.
- Molinari, G., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2010) New ventures in the genotoxic and cytotoxic effect of macrocyclic lactones. Abamectin and Ivermectin. *Cytogenet. Genome Res.* 128: 37-45.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Apezteguía, M., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2001) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutagenesis* 16: 487-93.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2002a) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* 514: 201-12.

- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2002b) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. II. Clastogenesis on immunophenotyped human lymphocytes assessed by the micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 40: 57-62.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2003a) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. V. Abnormalities induced in the spindle apparatus of transformed and non-transformed mammalian cell lines. *Mutat. Res.* 536: 121-29.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2003b) Vitamin E prevents ethylene bis(dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 18: 505-10.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. (2007) Herbicide 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro. *Cell Biol. Int.* 31: 1316-22.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Molinari, G., González, N.V., Larramendy, M.L. (2008) Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutat. Res.* 656: 68-73.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2010) Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with insecticide pirimicarb. *J. Hazard. Mater.* 174: 410-15.
- Vera Candioti, J., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L. (2010) Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide aficida®. *Chemosphere* 78: 249-55.
- WHO-FAO (2004). Pesticides residues in food-2004. FAO Plant Production and Protection paper Rome, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. 178: 154-61.
- WHO (2006). Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to the classification Geneva, World Health Organization: 1-200.

- Received 7/05/2010
- Accepted 10/06/2010