

Tesis de Posgrado

Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos

Della Penna, Angela Beatriz

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

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Della Penna, Angela Beatriz. (). Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3764_DellaPenna.pdf

Cita tipo Chicago:

Della Penna, Angela Beatriz. "Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3764_DellaPenna.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Maestría en Ciencias Ambientales
Orientación Recursos Naturales
Departamento de Ciencias de
la Atmósfera y los Océanos

*Tesis para optar al título de Magíster de la Universidad
de Buenos Aires, en Ciencias Ambientales*

"IMPACTO DEL HERBICIDA PARAQUAT
SOBRE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS"

Ing. Agr. ANGELA BEATRIZ DELLA PENNA

Directora: Dra. Noemí R. Verrengia Guerrero

Codirectora: Dra. Adriana C. Cochón

Departamento de Química Biológica

r 3764

2004

AGRADECIMIENTOS

- A mi Directora, Dra. Noemí R. Verrengia Guerrero y a mi Codirectora, Dra. Adriana C. Cochón por guiarme con sus conocimientos y experiencias con generosidad y paciencia.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a Ubacyt por los subsidios otorgados.
- A los Ingenieros Agrónomos Daniel Courreges y Paula Mirabelli, de Syngenta S. A por proporcionar el herbicida *paraquat* para la realización de este trabajo.
- A la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindarme el espacio físico y el material necesario para la cría y mantenimiento de los organismos y para la realización de las determinaciones analíticas.
- Al Dr. Vicente Barros y a la Dra. Inés Camilioni, por la atención y dedicación brindada a los alumnos de la Maestría.
- A la Secretaria de la Maestría, Susana Di Stefano, por la disposición y eficiencia en la realización de las tareas a su cargo.
- A las Dras. María Eugenia Dieguez y María Josefina Tommio por alentarme y brindarme su afecto.

- A todos mis compañeros, por su camaradería y solidaridad y, principalmente, a Viviana Muiños de Britos y Oscar Montaña, por su apoyo incondicional, por compartir las horas de estudio y por todo el cariño que me han brindado.
- Y muy especialmente a mi mamá , Profesora Angela Bruno de Della Penna, por alentarme, acompañarme, aportar su sabiduría, y haberme dado la fuerza, el tesón y los valores necesarios para alcanzar esta meta.

DEDICATORIA.

- *A mi mamá que comparte todo conmigo.*

A mi papá que desde el cielo me ilumina.

- *A mi hermana y mis sobrinos que siempre me alientan.*

INDICE

<u>CONTENIDOS</u>	<u>PÁGINA</u>
- RESUMEN	8
- ABREVIATURAS	9
1.- INTRODUCCIÓN	10
1.1.- SISTEMAS ACUÁTICOS Y CONTAMINACIÓN	11
1.2.- PLAGUICIDAS COMO AGENTES CONTAMINANTES DE LOS SISTEMAS ACUÁTICOS	13
1.3.- PARAQUAT	17
1.3.1.- Identificación	17
1.3.2.- Estructura química	17
1.3.3.- Propiedades fisico- químicas del producto formulado	18
1.3.4.- Mecanismo de acción en el vegetal	18
1.3.5.- Usos	19
1.3.6.- Destinos en el ambiente	20
1.3.7.- Residuos en alimentos	21
1.3.8.- Efectos tóxicos en el hombre	22
1.4.- POLIAMINAS	25
1.4.1.- Estructura de las principales poliaminas	25
1.4.2.- Antecedentes	25
1.4.3.- Distribución	26
1.4.4.- Biosíntesis e interconversión	26

<u>CONTENIDOS</u>	<u>PÁGINA</u>
1.5.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	28
1.6.- ORGANISMOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO	31
1.6.1.- <i>Lumbriculus variegatus</i> (Jamieson)	31
1.6.1.1.- Ubicación taxonómica	31
1.6.1.2.- Habitat y distribución geográfica	31
1.6.1.3.- Algunas características biológicas	31
1.6.1.4.- Imágenes	33
1.6.2.- <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say)	34
1.6.2.1.- Ubicación taxonómica	34
1.6.2.2.- Habitat y distribución geográfica	34
1.6.2.3.- Algunas características biológicas	34
1.6.2.4.- Imágenes	36
1.7. OBJETIVOS	37
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1.- MATERIALES	39
2.1.1.- Reactivos	39
2.1.2.- Equipos	39
2.1.3.- Organismos seleccionados	39
2.2.- MÉTODOS	40
2.2.1.- Estudios de letalidad	40
2.2.2.- Bioensayos para evaluar efectos subletales	41
2.2.3.- Niveles de poliaminas	42
2.2.4.- Peroxidación lipídica	42
2.2.5. Análisis Estadístico	43

<u>CONTENIDOS</u>	<u>PÁGINA</u>
3.- RESULTADOS	44
3.1.- ESTUDIOS DE LETALIDAD	45
3.1.1.- Estudios en <i>Lumbriculus variegatus</i>	45
3.1.2.- Estudios en <i>Biomphalaria glabrata</i>	46
3.2.- NIVELES DE POLIAMINAS	47
3.2.1.- Estudios en <i>Lumbriculus variegatus</i>	47
3.2.2.- Estudios en <i>Biomphalaria glabrata</i>	49
3.3.- ESTUDIOS DE PEROXIDACION DE LIPIDOS	50
3.3.1.- Estudios en <i>Lumbriculus variegatus</i>	50
3.3.2.- Estudios en <i>Biomphalaria glabrata</i>	51
4.- DISCUSION	53
5.- CONCLUSIONES	59
6.- REFERENCIAS	62

RESUMEN

El paraquat es un herbicida, ampliamente usado en ambientes terrestres y acuáticos. El objetivo del presente trabajo fue investigar algunos efectos tóxicos del paraquat en dos especies no blanco de invertebrados acuáticos. Específicamente se emplearon ejemplares adultos del oligoqueto *Lumbriculus variegatus* J. y moluscos gastrópodos pigmentados y no pigmentados de *Biomphalaria glabrata* S. En primer término se determinaron los valores de CL₅₀, exponiendo ambos organismos en condiciones agudas. El paraquat presente en un producto formulado comercial resultó ser más tóxico para la especie *L. variegatus* que la solución conteniendo el compuesto puro. Para organismos de *L. variegatus* la toxicidad del paraquat formulado comercial aumenta con el aumento de temperatura y disminuye por efecto de material particulado presente en el medio del bioensayo. Los valores de CL₅₀ (96 horas y 25 ±1 °C) resultaron similares para *L. variegatus* y ejemplares pigmentados de *B. glabrata*. En cambio, los organismos no-pigmentados de *B. glabrata* resultaron ser considerablemente más sensibles. En segundo lugar, se efectuaron bioensayos subletales a fin de investigar diversas respuestas bioquímicas. En este trabajo se reportan, por primera vez según nuestro conocimiento, valores de los niveles de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, en organismos controles de las dos especies de agua dulce en estudio. Por tratamiento a un nivel de 0,5 mg/L se observó que los niveles de poliaminas resultaron ser modificados por acción del paraquat producto comercial en *L. variegatus*. En cambio no se observaron diferencias significativas, con respecto a los controles, en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata*. Los organismos de *L. variegatus*, al igual que ejemplares pigmentados de *B. glabrata*, no evidenciaron cambios en los procesos de peroxidación lipídica por acción del paraquat formulado comercial a un nivel de exposición de 0,5 mg paraquat/L. En cambio, tras 48 horas de exposición los organismos no-pigmentados de *B. glabrata* presentaron un aumento significativo en la peroxidación de lípidos. Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo permiten proponer tanto el análisis de niveles de poliaminas como la investigación de procesos de lipoperoxidación como posibles parámetros biomarcadores de contaminación por paraquat.

Palabras claves: bioensayos - paraquat - *Biomphalaria glabrata* - *Lumbriculus variegatus* - CL₅₀ - poliaminas - lipoperoxidación.

ABREVIATURAS

CL₅₀ = Concentración Letal 50

DL₅₀ = Dosis Letal 50

IDA = Ingesta Diaria Admisible

HPLC = Cromatógrafo líquido de alta presión

KCl = Cloruro de Potasio

Kow = Coeficiente de partición octanol/agua.

LH = Lípido

LOOH = Hidroperoxidos

MAD = malonaldehido

ODC = Ornitina decarboxilasa

pK_a = Constante de acidez

RFD = Dosis de Referencia para la Exposición Oral Crónica

ROS = Radicales libres derivados del oxígeno

SAMDC = Adenosil decarboxilasa

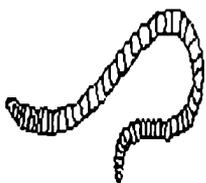
SSAT = Espermidina/ espermina. N¹- acetiltransferasa

TBA = Ácido tiobarbitúrico

TBARS = Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

TLV = Valor umbral límite, fracción respirable

INTRODUCCIÓN



1.1. SISTEMAS ACUATICOS Y CONTAMINACION

Los *Sistemas Acuáticos*, que constituyen las dos terceras partes del planeta, han sido seriamente afectados por distintos agentes de contaminación. Estos sistemas pueden clasificarse como marinos, de agua dulce, salobres o estuariales.

Los subcompartimientos que forman el medio acuático son:

- ◆ Aguas superficiales.
- ◆ Sedimentos.
- ◆ Sólidos en suspensión.
- ◆ Biota.

Los *contaminantes* son aquellas sustancias introducidas en el ambiente como resultado, por lo menos en forma parcial, de la actividad humana y que produce efectos adversos no deseados sobre los organismos individuales y sobre el ecosistema.

Las principales **causas** de la **contaminación acuática** se pueden dividir en:

a) *Directas:*

- Liberación de descargas o efluentes de industrias diversas con alto contenido de sustancias químicas.
- Liberación de descargas urbanas y cloacales.
- Actividades portuarias.
- Explotación excesiva de recursos.
- Derrames "*in situ*" de petróleo u otra sustancia tóxica.
- Descargas con alto contenido de material particulado que modifican las características físicas del sistema y constituyen un medio de transporte de numerosos contaminantes.

b) *Indirectas:*

- Por procesos de volatilización o arrastre derivados de la aplicación de plaguicidas que se efectúan en zonas adyacentes.
- Mediante el escurrimiento de suelo, por acción de las lluvias o aguas residuales que desaguan en ellos.

INTRODUCCIÓN

- ❑ A través de un percolado vertical de sustancias que inicialmente escurren hacia las napas subterráneas y luego se transfieren lateralmente hacia las cuencas.
- ❑ Por las deposiciones secas o húmedas de contaminantes inicialmente emitidos a la atmósfera (por ejemplo lluvia ácida).

La **contaminación acuática** puede producir graves **consecuencias** como:

- ❑ *Acidificación de las aguas.*
- ❑ *Erosión de las costas.*
- ❑ *Alteraciones en las poblaciones y en la diversidad de especies de las comunidades biológicas del ecosistema:* degradación de los arrecifes de corales; aparición de tumores en diversas especies de organismos acuáticos - por ejemplo, peces -; crecimiento desmesurado de algas, bacterias y fitoplancton.
- ❑ *Efectos en la salud pública:* cuando los cursos de aguas se destinan al suministro de agua de bebida para la población, transmisión de enfermedades por la presencia de agentes patógenos, intoxicaciones ocasionadas por la ingesta de organismo acuáticos.

La introducción de un xenobiótico en un ambiente acuático puede ser:
deliberada (por efluentes)
accidental (por derrames)

El sitio de liberación puede ser:
puntual, por descarga de efluentes o aplicaciones sobre el espejo de agua.
no puntual, por escorrentías, lixiviación o derivas.

El tipo de liberación puede ser:
accidental
continua
intermitente

La tasa de liberación puede ser:
constante
fluctuante

1.2. PLAGUICIDAS COMO AGENTES CONTAMINANTES DE LOS SISTEMAS ACUATICOS

Los "*plaguicidas o pesticidas*" son sustancias, de origen natural o sintético que permiten eliminar, controlar y manejar organismos vivos considerados "plagas" - , de origen natural o sintético que permiten eliminar, controlar y manejar organismos vivos considerados "plagas" - animales, enfermedades o malezas - que causan efectos no deseados sobre la producción agropecuaria, en áreas industriales, áreas no agrícolas y en salud pública.

Estos productos son altamente tóxicos para los organismos blanco, para asegurar su eficacia y la razón de su empleo, pero esa toxicidad puede extenderse a otras especies no blanco, causando un impacto sobre estos organismos y los distintos compartimientos ambientales. Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna.

Se considera que más de 1000 plaguicidas, corrientemente usados en la mayoría de los países del mundo, inadvertidamente alcanzan los ecosistemas acuáticos. Si bien la agricultura es sólo una de las fuentes no puntuales de polución, generalmente se la considera como la principal actividad que contribuye a la liberación de contaminantes en los sistemas acuáticos (Edwin, 1996). De este modo, el medio acuático es el que finalmente recibe, directa o indirectamente, deliberada o accidentalmente, la mezcla de sustancias químicas aplicadas en los otros medios. En el caso de los plaguicidas, el sistema acuático puede ser receptor no sólo del remanente de las moléculas no alteradas de los principios activos, sino también de una serie de otros productos derivados de la interacción de las mismas con los organismos y con los componentes abióticos del sistema particular considerado (Salibian, 2000).

El origen de la contaminación de los ecosistemas acuáticos por plaguicidas puede ser:

- Su aplicación directa para el control de malezas acuáticas, de larvas de mosquitos, moluscos, etc.
- El escurrimiento superficial de agua proveniente de agua tratada.

- ❑ Partículas de suelo contaminadas que son arrastradas por la erosión.
- ❑ Lixiviación.
- ❑ Lavado de equipos de aplicación directamente en el agua.
- ❑ Descarga de efluentes industriales o de actividades agrícolas.
- ❑ Deriva.
- ❑ Transporte por el agua de lluvia.

Una vez en la fase acuosa, los compuestos pueden llegar al material particulado, ya sea en suspensión o al depositado en los sedimentos del lecho, o ser absorbidos por los organismos, pudiendo entonces ser detoxificados o acumulados. Pueden ser transportados a través del sistema acuático por difusión en las corrientes de agua, o en los cuerpos de los organismos acuáticos. Algunos de estos xenobióticos y sus metabolitos pueden regresar a la atmósfera por volatilización (Tomita y Beyruth, 2002).

Hay una interacción continua de los plaguicidas entre sedimento y agua, influenciada por el movimiento del agua, la turbulencia y la temperatura (Nimmo, 1985). Esta interacción puede resultar en un mayor tiempo de exposición de los organismos, especialmente los del bentos, a los compuestos tóxicos.

La *degradación* que experimentan los plaguicidas en los sistemas acuáticos puede ser:

- Abiótica: por reacciones químicas o fotólisis.
- Biótica: por acción de microorganismos.

El *impacto de los plaguicidas sobre los peces y macroinvertebrados* está determinado por:

- ❑ *Las propiedades físico - químicas del plaguicida*: grupo funcional al que pertenece, estructura química, estabilidad del producto, propiedades fotoquímicas, coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), constante de acidez (pK_a), potencial de ionización, densidad del producto, presión de vapor, pureza química, solubilidad en agua, formación de complejos con otras sustancias, mezclas con tensioactivos, concentración, entre los factores más relevantes.

□ *Características ambientales:*

a) Parámetros abióticos:

Propiedades físico químicas del sistema: densidad, salinidad, dureza, contenido de materia orgánica, pH del medio, tensión superficial, el tamaño y la forma de las partículas sobre las que se adsorbe, velocidad, profundidad, turbulencia, tipo de sedimentos y dinámica de la interfase agua-sedimento, concentración de oxígeno disuelta en agua, interacción con otros agroquímicos coexistentes, temperatura, luz, velocidad del flujo del agua.

b) Parámetros bióticos:

Estado nutricional, edad, tamaño, sensibilidad de los organismos, microorganismos acompañantes (fitoplancton, zooplancton, bacterias), permeabilidad de los epitelios, otros organismos tróficamente relacionados.

Las comunidades biológicas de los sistemas acuáticos se consideran especialmente sensibles a la presencia de sustancias contaminantes. Esto se debe, en gran parte, a que las especies predominantes tienen, en su mayoría, ciclos de vida relativamente cortos y ciclos reproductivos muy frecuentes, que fácilmente pueden ser afectados por perturbaciones al medio. La sensibilidad de los distintos grupos taxonómicos es dispar, y está determinada, también, por los sistemas fisiológicos y bioquímicos. Asimismo, dentro de un mismo taxón la sensibilidad varía a lo largo del ciclo de vida. Las especies pueden tener distintos mecanismos de biotransformación, detoxificación, degradación, que a su vez son los que determinan la bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación.

El hábitat de las especies puede determinar importantes diferencias, por ejemplo los organismos del bentos están más expuestos a las sustancias retenidas por los sedimentos.

Los productos presentes en los cuerpos de agua pueden ingresar a los organismos acuáticos por distintas vías de entrada y su grado de acumulación depende del nicho ecológico en que se encuentre en la cadena alimentaria, de la disponibilidad y de la persistencia del contaminante en el agua, sus propiedades físico-químicas y de las características hidrológicas, siempre fluctuantes, que promueven una constante movilización de los contaminantes (Ford 1989, Pratt, 1990).

Los organismos acuáticos pueden acumular a los plaguicidas en concentraciones muy superiores a las encontradas en la columna de agua circundante, ya sea a través de la

fase acuosa o por medio de la ingestión del material particulado en suspensión (Nimmo, 1998).

La época reproductiva coincidente con las aplicaciones de agroquímicos desestabiliza a la población y puede tener consecuencias en la cadena trófica. Algunos efectos adversos a largo plazo incluyen la modificación a la tolerancia térmica, alteraciones metabólicas y conductales. Estas respuestas pueden ser utilizadas como biomarcadores sensibles y tempranos de toxicidad.

Dentro de los plaguicidas, los herbicidas son menos tóxicos para los peces y macroinvertebrados que los insecticidas, sin embargo pueden tener un efecto indirecto, cuando se aplican para controlar hierbas acuáticas. En este caso, incrementan significativamente la cantidad de materia vegetal muerta en el cuerpo de agua, cuya putrefacción consume grandes cantidades de oxígeno disuelto, produciendo ambientes hipóxicos que afectan a las poblaciones de estos organismos. Algunas sustancias inducen hipoxia, ya sea por la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en el agua, disminuyendo la velocidad de transferencia del oxígeno, o bien afectan el metabolismo de este elemento.

Los plaguicidas pueden afectar a los organismos de muy distintas formas. No obstante, en primer lugar, los efectos tóxicos se verifican a nivel subcelular, por ejemplo, por modificaciones en actividades enzimáticas, permeabilidad de membranas, ataque a los ácidos nucleicos, o alteraciones en las organelas (Huggett et al., 1992). Estos cambios pueden afectar la integridad celular, la eficiencia energética de la célula o la velocidad de excreción de un metabolito, etc. Si los cambios son lo suficientemente severos, pueden provocar la muerte de un número considerable de células en un órgano determinado produciendo necrosis. La lesión en un órgano puede afectar la homeostasis del organismo completo, y cuando los mecanismos de defensa resultan insuficientes para hacer frente al estrés, se puede verificar su muerte (Depledge, 1989). La muerte de los organismos afecta su población, y a partir de aquí los efectos nocivos pueden propagarse a la comunidad biológica, y llegar a comprometer la composición y funcionalidad del ecosistema (Moriarty, 1990).

1.3. PARAQUAT

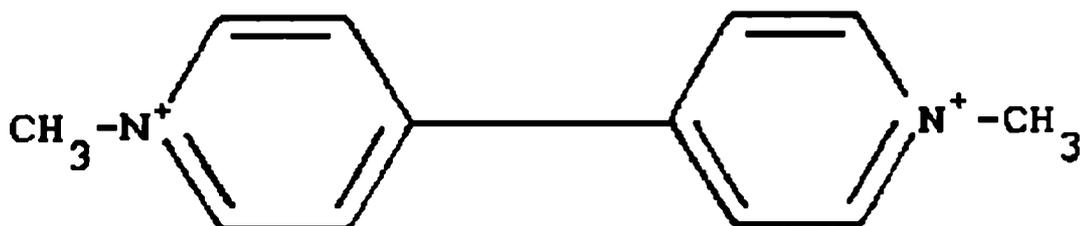
Es un herbicida de origen sintético ampliamente usado en el mundo. Fue sintetizado por primera vez en 1882 pero sus propiedades herbicidas fueron reconocidas en 1955 por Zeneca y se produjo comercialmente en 1961 (PAN UK, 1996).

Es un producto nitrogenado cuaternario, no selectivo, que actúa únicamente por contacto, de rápida acción sobre los tejidos verdes de las plantas (EXTOXNET, 1996) destruyendo las membranas celulares (Timbrell, 2000).

1.3.1. Identificación

- ☐ Nombre técnico registrado: Paraquat.
- ☐ Nombres comerciales: Gramoxone; Dextrone X; Esgram; Fitoquat.
- ☐ Nombre químico: 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo [catión].
- ☐ Fórmula empírica: $C_{12}H_{14}N_2^{2+}$
- ☐ Familia química: dipiridilos.
- ☐ Estado físico: sólido higroscópico. La sal pura es blanca, cristalina, inodora.
- ☐ Formulación comercial: Concentrado soluble.
- ☐ Composición del producto formulado:
 - Paraquat dicloruro (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4' bipiridilo)*.....27,6 g.
 - Inertes y coadyuvantes..... c.s.p..... 100 mL.
- *equivalente a 20 g de 1,1'-dimetil-4,4' bipiridilo
- ☐ Clase toxicológica II, Moderadamente peligroso (US EPA 1987)

1.3.2. Estructura química



1.3.3. Propiedades físico químicas del producto formulado

- ☐ *Densidad*: 1,135 g/mL a 20°C.
- ☐ *Punto de ebullición*: 175-180°C.
- ☐ *Presión de vapor*: muy baja, no volátil.
- ☐ *Estado físico*: líquido azulado.
- ☐ *Olor*: generalmente inodoro.
- ☐ No es *explosivo*.
- ☐ No es *inflamable* en formulaciones acuosas.
- ☐ Es *corrosivo* para los metales (aluminio, zinc, hierro).
- ☐ Es *incompatible* con los humectantes alquiaril sulfonatos.
- ☐ Es *estable* en soluciones ácidas o neutras, pero se hidroliza rápidamente por álcalis.
- ☐ Es *fotodegradable* con la luz ultravioleta.

1.3.4. Mecanismo de acción del herbicida

El paraquat actúa por contacto sobre las partes verdes del vegetal y es activado por la luz solar para formar compuestos oxigenados como el peróxido de hidrógeno.

Actúa como disruptor de las membranas celulares, desintegrando el plasmalema por polimerización de los componentes lipídicos insaturados, lo que resulta en una rápida necrosis tisular (Vidal Ribas, 1997; FÜRST et al, 1990).

El movimiento del herbicida a través de la parte aérea del vegetal ocurre rápidamente, distribuyéndose predominantemente por el xilema, ya que el daño celular y la rápida transpiración impiden que este producto tenga una amplia distribución por el floema.

El paraquat es reducido a radical catión estable en los cloroplastos, por un proceso de transferencia de un electrón que es revertido por el oxígeno molecular generando peróxido de hidrógeno. Este producto y su radical catión comprenden un sistema redox (Suntres, 2002).

La energía para la reacción química de reducción proviene de la fotólisis del agua, o de la respiración en la oscuridad. Una vez formados los radicales inician un conjunto de reacciones, que en presencia de oxígeno, promueven la destrucción de compuestos celulares esenciales.

Este herbicida tiene un potencial de reducción similar al de las reacciones de transferencia de electrones asociadas al Fotosistema I.

La reducción del herbicida también puede ocurrir en el Fotosistema II, pero con menor extensión que en el fotosistema I (Schmidt, 1997).

1.3.5. Usos

- ☐ En postemergencia de los cultivos, para el control de malezas anuales, en sus primeros estados de crecimiento, mediante aplicaciones aéreas o terrestres.
- ☐ En Siembra Directa o Labranza Cero, para la realización de barbecho químico - se aplica el producto sobre el rastrojo para favorecer su desecación, descomposición, y controlar las malezas existentes en él, una vez seco el material se procede a la siembra sin laboreo.
- ☐ En *labranza química* de parrales y viñedos, en forestales, frutales de carozo, pepita y cítricos, en olivo, té y yerba mate para eliminar las labores mecánicas de roturación y control de malezas.
- ☐ Como desecante en precosecha en cereales (trigo, maíz, sorgo, arroz, alpiste), y cultivos industriales (girasol, soja), en alfalfa y otras leguminosas forrajeras, en papa y legumbres (arveja, lenteja y poroto)
- ☐ Como defoliante en algodón.
- ☐ En almácigos o siembras de "asiento", para controlar malezas que nacen previo a la emergencia de especies de lenta germinación como tomate, pimiento, puerro, cebolla, hinojo y perejil.
- ☐ En *cursos de agua para controlar malezas acuáticas*
- ☐ En áreas no cultivadas o sitios industriales para limpieza de vías férreas y caminos.
- ☐ En acequias de riego o perimetrales, para eliminar malezas de bordes y taludes; en playas, alambrados, bases de cercas y paredes.

1.3.6. Destino en el ambiente

☐ Suelo

Este herbicida es fuertemente adsorbido por los constituyentes del suelo, coloides y materia orgánica de las partículas, lo que reduce su biodisponibilidad para las plantas, lombrices de tierra, y microorganismos. Por estar inmóvil en los suelos resulta muy persistente (valores de persistencia o tiempo de vida media residual mayores a 1000 días). Los residuos pueden persistir indefinidamente y pueden ser transportados por escorrentía junto con el sedimento. Bajo condiciones de campo, el residuo es lentamente redistribuido, registrándose valores de degradación de 5 -10% por año (WHO, 1996).

No produce efectos adversos sobre la microflora y otros organismos edáficos, o sobre el crecimiento de los cultivos a niveles normales y altos de aplicación. Los microorganismos pueden degradar rápidamente al paraquat libre, pero la descomposición química del producto adsorbido es relativamente lenta y poco importante.

La fotodescomposición se produce en las plantas tratadas al ser expuestas a la luz solar y continúa aún después que la planta muere. Los productos formados son menos tóxicos que el compuesto original. También es degradado por la luz ultravioleta en la superficie del suelo, aunque este proceso es poco importante. El paraquat no presenta un alto riesgo de contaminación de aguas subterráneas. Sólo puede llegar al agua por la erosión, en un proceso de flujo de masa. El producto penetra adsorbido en las partículas sólidas del suelo, quedando temporariamente en suspensión y luego se deposita en los sedimentos del lecho de los sistemas acuáticos.

☐ Agua

En el ambiente acuático el paraquat es adsorbido por los sedimentos o material en suspensión y por la vegetación acuática. En este último caso, al descomponerse los tejidos es liberado y fijado al sedimento. Su persistencia en este medio puede ser mayor que en el suelo, por la limitada disponibilidad de oxígeno.

En aplicaciones de paraquat para controlar malezas acuáticas, a dosis normales - 1mg/L -, la concentración puede bajar a la mitad del nivel inicial en 36 horas y por debajo de 0,01 mg/L en menos de 2 semanas.

A las dosis recomendadas para el control de malezas acuáticas, puede causar un daño indirecto al aumentar la cantidad de materia vegetal muerta en el cuerpo de agua, cuya putrefacción consume gran cantidad de oxígeno disuelto, produciendo ambientes hipóxicos (Peña et al., 2001).

☐ Aire

Este herbicida no es volátil. La cantidad del producto en el aire es insignificante bajo condiciones normales de uso, se registran de 0,0004 a 0,001 mg/m³ en las partículas del aire (WHO, 1996).

☐ Biota

Por su carácter herbicida es tóxico para vegetación terrestre y acuática. Las malezas acuáticas pueden bioacumular al compuesto.

El paraquat es moderada a altamente tóxico para muchas especies de peces, incluyendo la trucha arcoiris, y bagre o siluro de canal (WSSA, 1994; US EPA, 1997).

Aún en dosis menores a las utilizadas en la práctica agrícola resulta tóxico para ácaros y fitófagos.

Es levemente tóxico para abejas y no produce efectos dañinos en aves bajo condiciones normales de uso (Walker y Keith, 1992).

No hay evidencias de acumulación de paraquat en lombrices de tierra (*Lumbriculus terrestris*) y en nematodos fitófagos (Göellner, 1989).

1.3.7. Residuos en alimentos

No se han encontrado residuos significativos del herbicida paraquat en alimentos, siempre y cuando sea usado dentro de las recomendaciones técnicas (Worthing y Walker, 1987).

En aplicaciones como desecante, pueden encontrarse residuos según la dosis aplicada y el período transcurrido entre la última aplicación y la cosecha.

1.3.8. Efectos tóxicos en el hombre

A- Parámetros toxicológicos (EXTOXNET, 1996, US- EPA, 1987)

- ☐ Clase Toxicológica II (Moderadamente Peligroso).
- ☐ Dosis Letal 50 (DL₅₀) por ingestión para el hombre: 35 mg/kg.
- ☐ DL₅₀ oral ratas: 600 - 700 mg/kg.
- ☐ IDA (Ingesta Diaria Admisible): 0,004 mg/kg/día
- ☐ RFD (Dosis de Referencia para la Exposición Oral Crónica): 0,0045 mg/kg/día
- ☐ TLV (Valor umbral límite): 0,1 mg/m³ (8 horas), fracción respirable.

B.- Sintomatología de intoxicación

- Aguda:

Su ingestión produce quemaduras en boca y garganta, seguido por trastornos gastrointestinales y daños hepáticos. Altas dosis pueden provocar excitabilidad, congestión pulmonar, convulsiones, incoordinación y muerte por falla respiratoria (Davies, 1987; Giulivi et al., 1995).

- Subcrónica

Daños renales: oliguria, sangre en orina, y finalmente puede ocurrir falla renal total (Bismuth et al., 1982, 1990, 1995). Depresión a nivel del sistema nervioso central: dolor de cabeza, vértigo, somnolencia, náuseas, vómito e incoordinación, coma y posible muerte debido a falla respiratoria (Morgan, 1995; Vale et al., 1987).

- Crónica:

Neumopatías: lesiones pulmonares, edema, colapso, fibrosis proliferativa y hemorragia (Smith, 1988). Neuropatía periférica (anormalidades sensitivas y motoras, espasmo muscular, debilidad y dolor en los brazos y piernas, entumecimiento y hormigueo de dedos de las manos y pies, y parálisis) (Olson, 1994).

No se evidencian efectos mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos ni tóxico-reproductivos (Pond, 1990).

C.- Toxicocinética

La absorción por *vía dérmica* es baja debido a la baja liposolubilidad del paraquat, pero la extensión de la absorción puede ser significativamente mayor en casos de piel severamente dañada. El daño dérmico local incluye dermatitis. El contacto prolongado produce eritema, aparición de ampollas, abrasión y ulceración, y puede afectar las uñas de las manos (Tungsanga et al., 1983).

La absorción por *inhalación* se produce por la mucosas nasal, traqueal o bronquial o vía alvéolos pulmonares. La gran superficie de absorción y la rica vascularización pulmonar hacen que esta vía de ingreso sea muy eficiente. Por su baja volatilidad y por el tamaño de las partículas de pulverización - 200 micrones - en condiciones normales de aplicación, la intoxicación por inhalación es difícil que ocurra.

La vía de absorción más completa se verifica por *vía oral*. La absorción ocurre a nivel de la mucosa gástrica y vía la mucosa del intestino delgado. Entre la sintomatología se encuentra hinchazón, edema y ulceración dolorosa de la boca, faringe, esófago, estómago e intestino. Con mayores concentraciones se producen otros síntomas de toxicidad que incluyen daño hepatocelular, el cual puede causar un aumento en los niveles de bilirrubina y la presencia de enzimas hepatocelulares en sangre. A nivel renal, las células tubulares secretan paraquat con rapidez, eliminándolo de forma eficiente de la sangre. Las altas concentraciones sanguíneas afectan al órgano excretor, pudiendo destruir las células. El hombre absorbe aproximadamente el 10% de la dosis de paraquat ingerida (Larini, 1999).

El paraquat absorbido es distribuido vía torrente sanguíneo a prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo, pero el almacenamiento no es prolongado en ningún tejido. No se metaboliza. La remoción del paraquat absorbido se produce por el riñón (Hughes, 1998).

D.- Toxicodinamia

Los pulmones son el primer blanco del herbicida y los efectos pulmonares representan la manifestación más letal y menos tratable de la toxicidad. El pulmón acumula selectivamente paraquat del plasma en los neumocitos tipo I y II. Dicha incorporación

INTRODUCCIÓN

ocurre por un proceso activo, a través de los transportadores de poliaminas, debido a que la distancia intermolecular entre los nitrógenos presentes en ambos compuestos (paraquat y poliaminas) es muy similar (Timbrell, 1996, 2000).

La toxicidad del herbicida se verifica a través de la formación de radicales libres que resultan de su reducción enzimática, con transferencia de un electrón, en presencia de NADPH. El radical paraquat así formado reacciona con una molécula de oxígeno dando origen al anión radical superóxido y regenerando el catión paraquat. A continuación el radical superóxido puede conducir a la formación de peróxido de hidrógeno y de radicales oxhidrilos, los cuales a su vez pueden desencadenar procesos de peroxidación de lípidos. Dado que en los pulmones hay alta concentración de oxígeno, las probabilidades del paraquat para desencadenar procesos de peroxidación de lípidos se encuentran preferencialmente aumentadas (Forman et al., 1982).

1.4. POLIAMINAS

Las poliaminas presentes en la naturaleza son un grupo de pequeñas moléculas alifáticas (no cíclicas) que se caracterizan por poseer dos o más grupos amino en su estructura. Son cationes orgánicos que se encuentran en todas las células vivas y resultan esenciales para el crecimiento, diferenciación, multiplicación y el buen funcionamiento celular (Tabor y Tabor, 1984; Pegg, 1986, Medina et al., 1999; Ochoa Rojas et al., 2002). Las más estudiadas son la *putrescina*, la *espermidina* y la *espermina* ya que presentan una estrecha relación en su biosíntesis e interconversión, además de que participan en múltiples procesos celulares.

1.4.1. Estructura de las principales poliaminas

PUTRESCINA	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{H}_2\text{N}$
ESPERMIDINA	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
ESPERMINA	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

1.4.2. Antecedentes

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se señaló hace más de 300 años. En 1678, Antoni van Leeuwenhoek descubrió la presencia de cristales en el semen humano. En 1791, Nicolás Vauquelin demostró la relativa insolubilidad en agua y etanol de esos cristales, concluyendo que eran sales de fosfato de un catión inorgánico, probablemente el calcio. En 1865 Boettcher supuso que los cristales estaban formados por una proteína a la que llamó *espermatina*. En 1878 Schreiner descubrió que los cristales eran sales de fosfato de un compuesto orgánico básico simple. En 1888, A. Landerburg y J. Abel, denominaron a esta base orgánica *espermina*, por encontrarse en cantidades relativamente altas en el semen humano. Otto, en 1926, determinó la estructura correcta de la *espermina* y sintetizó otra base identificada como fosfato de *espermidina*. Posteriormente la *espermidina* fue aislada de órganos animales, microorganismos y plantas, resultando ser una poliamina universal.

El descubrimiento de la putrescina y la cadaverina se le atribuye a Brieger en 1885, quien aisló estas bases como sales dobles de metales pesados de tejido animal.

1.4.3. Distribución

Las poliaminas están ampliamente distribuídas en todos los sistemas biológicos. Las concentraciones relativas de *putrescina*, *espermidina* y *espermina*, varían notablemente en diferentes tipos de células. Los procariontes tienen altas concentraciones de putrescina y espermidina. La espermina sólo se encuentra en las células eucariontes. Aunque los niveles de poliaminas han sido ampliamente estudiados en bacterias, levaduras, hongos, vegetales y animales superiores hay muy pocas referencias en bibliografía respecto a los niveles de estas poliaminas en invertebrados inferiores.

1.4.4. Biosíntesis e interconversión

Los niveles intracelulares de las poliaminas se encuentran regulados por varios mecanismos, lo que sugiere un rol importante para estas poliaminas en la función celular. La homeostasis de las poliaminas se controla a través de su biosíntesis, interconversión, catabolismo, secreción y captación. En la Figura 1.1 puede verse un esquema de la biosíntesis e interconversión de las poliaminas en células eucariotas. El primer paso en la biosíntesis consiste en la conversión de ornitina en putrescina, reacción catalizada por la enzima ornitina decarboxilasa (ODC). Las poliaminas superiores espermidina y espermina se forman a partir de putrescina por transferencia de uno o dos grupos aminopropilo a uno o ambos nitrógenos de la putrescina. La interconversión se produce por acción de dos enzimas (espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) y poliamina oxidasa) que remueven secuencialmente los grupos aminopropilo convirtiendo espermina nuevamente en espermidina y espermidina en putrescina. La biosíntesis está regulada por las actividades de ODC y S-adenosildecaboxilasa mientras que la interconversión está controlada por la actividad de SSAT.

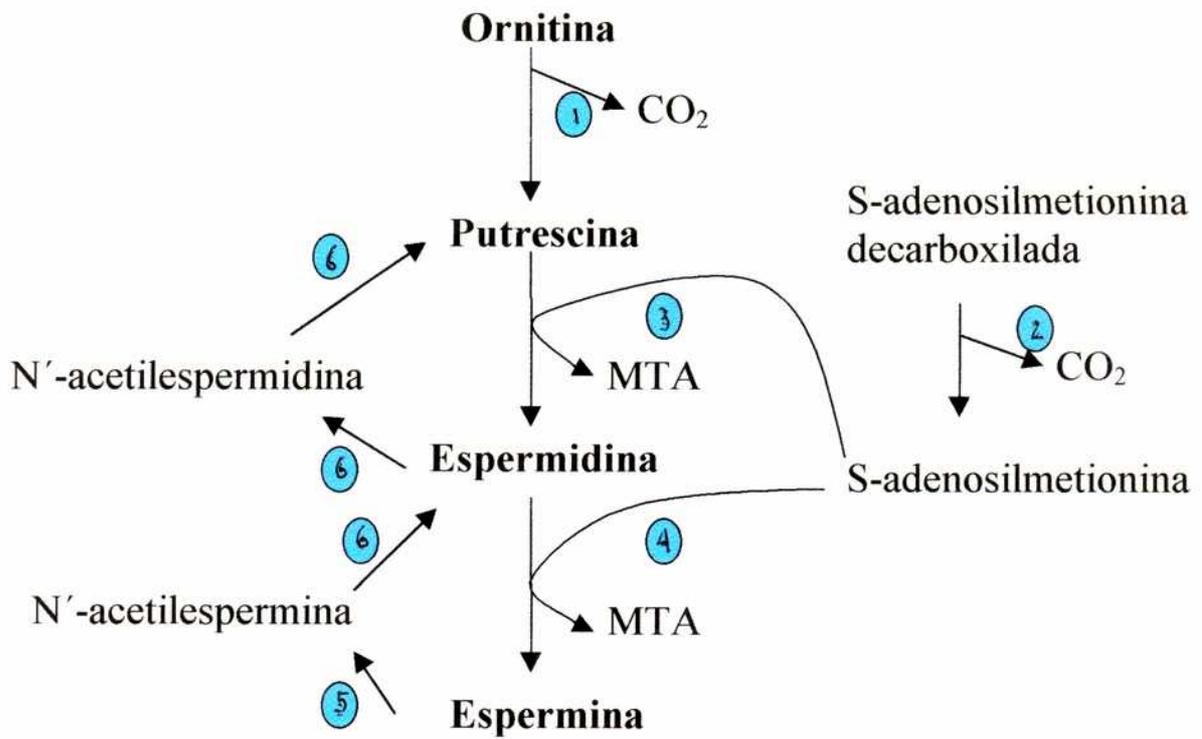


Figura 1.1: Metabolismo de poliaminas en animales superiores

1. Ornitina decarboxilasa (ODC)
 2. S-adenosilmetionina decarboxilasa (SAMDC)
 3. Espermidina sintasa
 4. Espermina sintasa
 5. Espermidina / espermina N'-acetiltransferasa (SSAT)
 6. Poliamina oxidasa
- MTA: 5'-metiltioadenosina.

1.5. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Diversos procesos intra o extra celulares pueden generar radicales libres, especialmente especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS). La exposición a diversos contaminantes orgánicos o metálicos, entre ellos el paraquat, constituye un factor clave para la ocurrencia de dichos procesos. Los radicales libres se inician mediante una etapa de activación metabólica, en la cual el xenobiótico es reducido por una reductasa dependiente de NAD(P)H (Huggett et al. 1992). La presencia de oxígeno y de iones metálicos en los organismos favorece este fenómeno. Además, muchos eventos patológicos pueden exacerbar la producción de radicales libres.

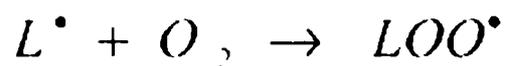
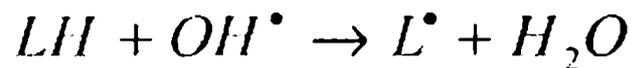
La formación de especies reactivas de oxígeno puede desencadenar diversos efectos tóxicos, mediante la peroxidación de lípidos de membrana, ataque a los ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Si bien las células poseen diversos sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, ya sean de carácter enzimático o no-enzimático, cuando se verifica un desbalance entre la producción de radicales y las barreras antioxidantes, surge el daño oxidativo.

Aún cuando diversas estructuras biológicas pueden sufrir los procesos de estrés oxidativo, la oxidación de los ácidos grasos, especialmente de ácidos grasos poliinsaturados, es quizás el fenómeno mejor conocido. El proceso se reconoce como lipoperoxidación o peroxidación lipídica. Los productos iniciales de la peroxidación lipídica son hidroperóxidos diénicos conjugados (figura 1.2). Estas sustancias activas se descomponen en distintos aldehídos, o si el ácido graso original es el ácido araquidónico, se descomponen en isoprostanos (figura 1.3). Dentro de los aldehídos, se encuentra el malondialdehído (MDA), el cual perpetúa el daño al unirse a proteínas y provocando modificaciones que afectan su estructura y función.

Los distintos productos de degradación y descomposición pueden ser utilizados para evaluar el grado de estrés oxidativo, incluyendo los hidroperóxidos (LOOH), comúnmente expresados como dienos conjugados, los isoprostanos y el malondialdehído (Dotan et al., 2004). Sin embargo, el ensayo que emplea al ácido tiobarbitúrico (TBA) constituye una de las determinaciones más utilizadas para evaluar el daño oxidativo de los lípidos. El método se basa en la reacción del malondialdehído con el TBA formando aductos cromógenos y fluorescentes de **MDA-TBA** muy estables, los cuales se pueden

cuantificar ya sea por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría (Esterbauer, 1996).

Ecuación 1: Primera fase de la peroxidación lipídica



Ecuación 2: Fase de propagación / reacción en cadena. Esta fase es independiente de oxígeno.

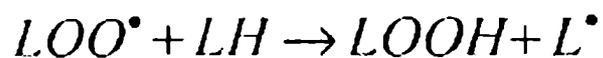


Figura 1.2: Las distintas fases de la peroxidación de lípidos inducida por radicales libres. LH: lípido, LOOH: hidroperóxido lipídico.

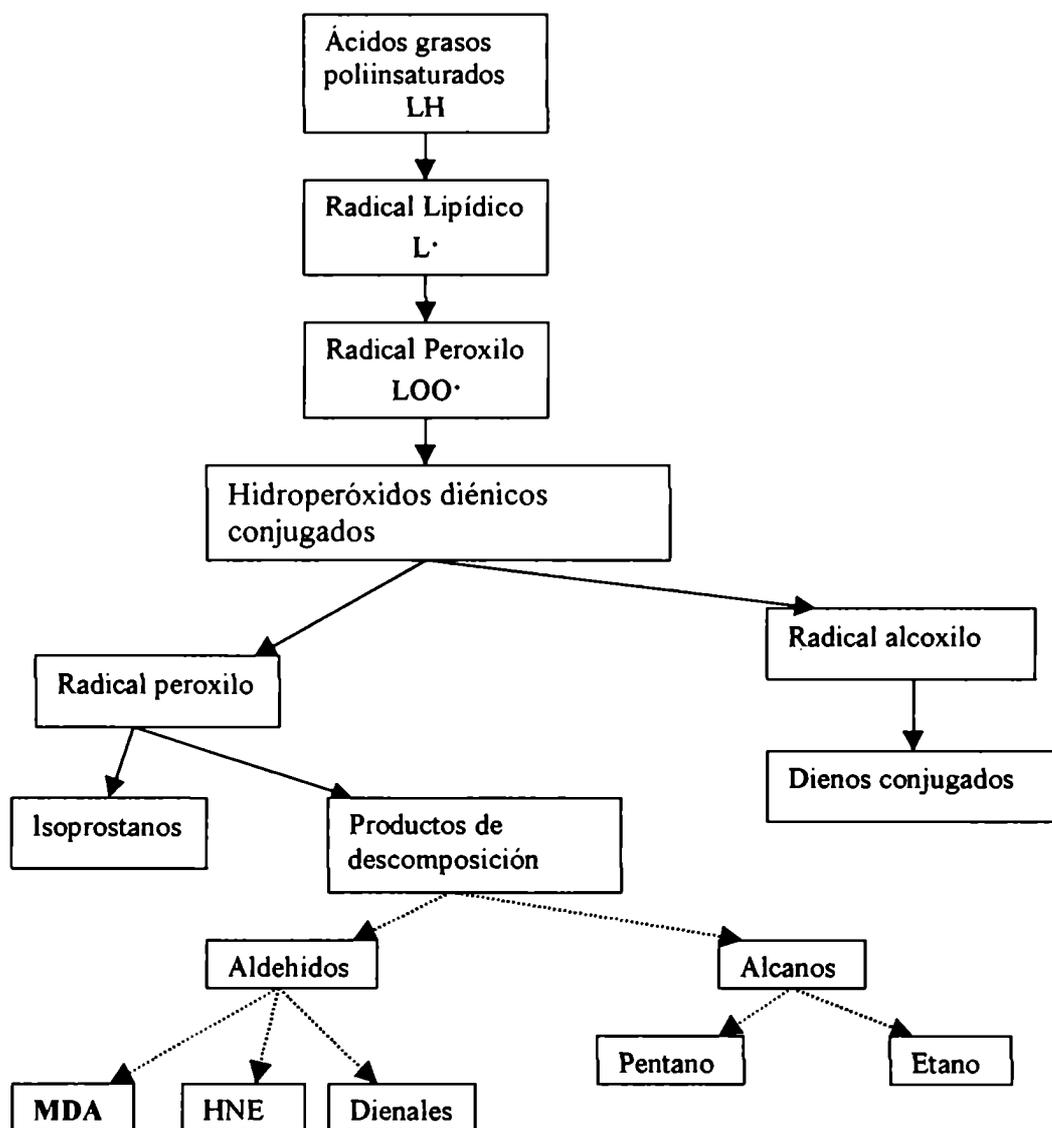


Figura 1.3: Productos de la peroxidación lipídica.

1.6. ORGANISMOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

1.6.1. *Lumbriculus variegatus*:

1.6.1.1. *Ubicación taxonómica*

Superreino: Eucariote.

Reino: Animal.

Subreino: Metazoo.

Phylum: Annelida.

Superclase: Clitellata.

Clase: Oligochaeta.

Orden: Lumbriculida.

Familia: Lumbriculidae.

Género y especie: *Lumbriculus variegatus*.

1.6.1.2. *Hábitat y distribución geográfica*

Lumbriculus variegatus es un oligoqueto de agua dulce que se distribuye naturalmente en Europa y Estados Unidos. Prefiere hábitats bajos, se encuentra en la orilla de ríos, estanques, lagos, charcas o pantanos donde se alimenta de la vegetación en descomposición y de microorganismos.

Sus micro- hábitats favoritos incluyen láminas de hojas o troncos sumergidos en descomposición, y vegetación emergente en la base de los sedimentos.

1.6.1.3. *Algunas características biológicas*

El cuerpo de *Lumbriculus variegatus* es de forma tubular, segmentado, conteniendo de 150 a 250 segmentos, pudiendo alcanzar hasta 10 cm de largo y 1.5 mm de diámetro. Las lombrices recolectadas en el ambiente natural suelen ser más largas que las cultivadas en laboratorio (8 – 10 cm versus 4 - 6 cm, respectivamente).

INTRODUCCIÓN

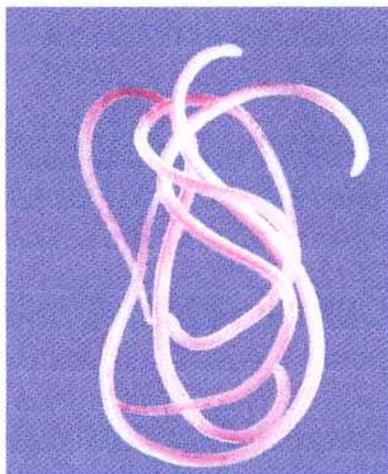
A pesar que estos anélidos aparecen como ejemplares hermafroditas, sexualmente maduros, la reproducción sexual es rara, siendo la reproducción por fragmentación o arquitomía la más común (Lesiuk y Drewes, 1999a).

La lombriz espontáneamente se divide en dos o más fragmentos. Cada fragmento que sobrevive regenera rápidamente los segmentos faltantes del cuerpo, hasta formar finalmente una nueva cabeza y cola. La capacidad de la lombriz de reproducirse por fragmentación se debe a su habilidad de autoamputarse en respuesta a un daño o a otro tipo de estimulación nociva. Esta respuesta refleja de protección se denomina "autotomía". Un estímulo que hace que la lombriz esté preparada para autotomizarse es la compresión de su cuerpo (Lesiuk y Drewes, 1999a). En condiciones óptimas la población se puede duplicar en unos 10 - 14 días a una temperatura de 20 ± 2 °C. En condiciones de laboratorio sólo se reproduce por fragmentación.

En la naturaleza esta especie usa su cabeza para enterrarse en los sedimentos y desechos para alimentarse, mientras la parte final de su cola, especializada para el intercambio de gases, generalmente se proyecta hacia arriba. Cuando le es posible, estira su cola perpendicularmente a la superficie del agua donde forma un ángulo recto, y rompe la tensión superficial del agua. Esta postura facilita el intercambio de gases entre el aire y el vaso sanguíneo dorsal pulsátil, ubicado justo debajo de la epidermis (Lesiuk y Drewes, 1999b).

Este anélido ha sido recomendado y ampliamente adoptado como organismo estándar para ensayos de toxicidad de aguas y/o sedimentos (Phipps et al., 1993; ASTM, 1994; Davies et al., 1999a- 1999b).

1.6.1.4. Lumbriculus variegatus (J.)



L. variegatus en laboratorio



1.6.2. *Biomphalaria glabrata*

1.6.2.1. *Ubicación taxonómica*

Superreino: Eucariote.

Reino: Animal.

Subreino: Metazoo.

Phylum: Mollusca.

Clase: Gastropoda.

Subclase: Pulmonata.

Orden: Basommatophora.

Familia: Planorbidae.

Género y especie: *Biomphalaria glabrata*.

Sinonimias: *Basommatophora planorbidae*; *Australorbis glabratus*.

1.6.2.2. *Hábitat y distribución geográfica*

Gastrópodo pulmonado que vive en aguas dulceacuícolas tropicales, principalmente en canales, valles de irrigación y en pequeños cursos de agua. Puede colonizar grandes ríos y lagunas, pero la escorrentía y las pequeñas ondas formadas por el viento dificultan su vida en estos lugares (Ruppert y Bannes, 1994). Se distribuye en Sudamérica y América Central. Actualmente está presente en extensas áreas de Brasil, en el sudeste de Bahía, norte de Spiritu Santo y centro- este de Minas Gerais. Aparece en menor número en zonas cálidas y húmedas de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Maranhão, Pará, Goriás, Rio de Janeiro, São Paulo y Paraná. También se encuentra en el Norte Argentino (Carvalho et al., 2001). Recientemente fue introducido en algunas regiones de los Estados Unidos.

1.6.2.3. *Algunas características biológicas*

Este caracol, dotado de un cuerpo viscoso envuelto por una concha univalva, tiene tres zonas corporales diferentes: una *céfalo-pedal*, que contiene los órganos sensoriales y los motores, una *masa visceral*, donde están alojados los órganos bien desarrollados de la digestión, excreción y reproducción; y un *manto-tejido*, por encima de la masa visceral. Son asimétricos, debido al fenómeno de torsión - giro de 180° del resto del cuerpo con respecto al céfalo-pedal -; la concha calcárea, en espiral en un plano, mide 3 a 4 cm de

diámetro y presenta una depresión central en cada fase. El caparazón crece con el cuerpo y sólo es visible fuera de éste la cabeza y el pie, su abertura es proporcional al tamaño de su cuerpo, su diámetro varía con las condiciones ambientales y es relativamente independiente de la edad. La formación de la concha comienza en el estado larval.

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

La cabeza está bien desarrollada, con un par de tentáculos simples conteniendo ojos primitivos cerca de sus bases. Estos apéndices son importantes como quimiorreceptores. La boca exhibe una lengua provista de dientes llamada "rádula", que puede proyectarse al exterior.

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

La actividad del animal está relacionada con el desarrollo de la cabeza y los órganos sensoriales cefálicos. El pie es un órgano ventral de desplazamiento, sus músculos le permiten moverse en todas las direcciones. Una importante función del pie es la secreción. Un rico suministro de glándulas mucosas provee baba para su lubricación.

Se trata de una especie hermafrodita, presentando con frecuencia reproducción cruzada. Los huevos son puestos en una especie de cápsula que puede contener en condiciones de laboratorio de 20 a 50 huevos por cápsula. El desarrollo embrionario se produce íntegramente dentro del huevo. Su reproducción es menor durante el invierno (Monteiro y Dias, 1989).

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

Biomphalaria es uno de los organismos más estudiados por ser huésped intermediario del verme parásito *Schistosoma mansoni* que produce en el ser humano la enfermedad denominada esquistosomiasis o bilharziasis (Neves, 1986).

Además, este gastrópodo ha sido utilizado como bioindicador en ensayos de toxicidad aguda y subaguda para la evaluación de riesgos ambientales por metales y por plaguicidas (Münzinger, 1987; Verrengia Guerrero et al, 1997, 2000).

1.6.2.4 *Biomphalaria glabrata*, Say.



B. glabrata en un acuario



Cuerpo juvenil visible a través del Caparazón translúcido (2 mm)



Huevos cubiertos por masa gelatinosa



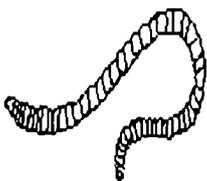
El opérculo.

1.7. OBJETIVOS

- * Evaluar letalidad - CL50 (96h) - y algunos efectos subletales - niveles de poliaminas y peroxidación lipídica - del herbicida *paraquat* en los macroinvertebrados de agua dulce *Lumbriculus variegatus*, anélido oligoqueto, y *Biomphalaria glabrata*, molusco gastrópodo, en condiciones de laboratorio, a fin de determinar el impacto de este herbicida sobre especies acuáticas no blanco.

- * Analizar los distintos factores que pueden incidir en la respuesta de los diferentes taxones, por exposición a este herbicida.

MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. MATERIALES

2.1.1.- Reactivos:

El producto comercial contenía 27,6 g/100 cm³ de paraquat dicloruro, equivalente a 20% de paraquat. El estándar analítico de paraquat fue donado por Syngenta, Jealott's Hill International Research Centre, Bracknell, Reino Unido.

Putrescina, espermidina, espermina, cloruro de dansilo y ácido tiobarbitúrico fueron adquiridos a Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). Acetonitrilo (grado HPLC) fue adquirido a Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina).

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

2.1.2. Equipos:

Los homogenatos de *L. variegatus* fueron realizados manualmente con un potter de vidrio, mientras que los correspondientes a *B. glabrata* se prepararon usando un Potter Elvehjen con émbolo de teflón.

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

Para la determinación de los niveles de poliaminas se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Spectra-Physics equipado con una bomba de gradiente SpectraSERIES P200 y un detector de fluorescencia Spectra SYSTEM FL2000.

2.1.3. Organismos seleccionados:

Se utilizó una especie de oligoqueto acuático, *Lumbriculus variegatus*, inicialmente obtenido de los cultivos del Prof. K. Simkiss, Universidad de Reading, Reino Unido. Una vez en el laboratorio, los organismos se cultivaron en peceras plásticas de 12 L, con

aireación, y conteniendo trozos de toallas de papel (formando un lecho de 3 - 6 cm) en unos 8 L de agua declorada. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C y con un fotoperíodo artificial de 16- 8 horas de luz/oscuridad. Los organismos se alimentaron con alimento para peces (TetraFin®, TetraWerke, Alemania) tres veces por semana. Para todos los bioensayos se utilizaron organismos adultos de $2,5 \pm 0,5$ cm de largo.

Los cultivos de los moluscos gastrópodos de *Biomphalaria glabrata* fueron obtenidos inicialmente del Laboratorio de Invertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los organismos fueron luego cultivados en nuestros laboratorios en peceras de vidrio aireadas (17-20 L), a una temperatura de 24 ± 2 °C y con un fotoperíodo artificial de 14- 10 horas de luz/oscuridad. Los animales se alimentaron con hojas de lechuga *ad libitum* (Fried et al., 1992). En todos los experimentos, fueron empleados organismos adultos de tamaño similar (18 ± 2 mm). El valor de peso total promedio fue de $0,755 \pm 0,100$ g.

Para los cultivos se utilizó agua de red, declorada por al menos 24 horas., con las siguientes propiedades fisico-químicas: dureza total = 67 ± 3 mg CaCO₃/L; alcalinidad = 29 ± 2 mg CaCO₃/L; pH = 7.0 ± 0.2 , y conductividad = 250 ± 17 µS. Para los bioensayos el agua declorada fue filtrada por una columna de carbón, a fin de eliminar la materia orgánica que pudiera estar disuelta.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Estudios de letalidad

Para los estudios con *L. variegatus* se colocaron aproximadamente 10 organismos en viales de 25 mL de capacidad, conteniendo 20,0 mL de soluciones de paraquat, sal pura o formulado comercial. Los viales se expusieron por diversos períodos (48, 72, 96 horas y 7 días) registrándose el número de organismos muertos. Los organismos fueron considerados muertos cuando presentaban nula movilidad y una intensa decoloración y/o

fragmentación. Algunos ensayos se realizaron a distintas temperaturas (20 ± 1 o 25 ± 1 °C) y otros en presencia o ausencia de 2g. de arena. Se utilizó arena marina comercial (Merck), previamente purificada con ácido, y calcinada a 900 °C. De esta manera se asegura que el material tenga un contenido de materia orgánica máximo de 0,05%. Los estudios se efectuaron por triplicado, en condiciones estáticas, sin aireación y sin suministrar alimento.

Para los estudios con *B. glabrata* cinco organismos pigmentados y no pigmentados se expusieron separadamente en peceras plásticas de 1,5 L de capacidad y conteniendo 600 mL de diversas soluciones de paraquat formulado comercial. Las peceras estuvieron provistas de aireación, a una temperatura de 25 ± 1 °C, en condiciones estáticas. Los animales no fueron alimentados durante las 96 horas de exposición. La retracción del animal en su valva, aunada con la falta de reacción frente a un estímulo sobre la región céfalo-pedal, fueron los criterios adoptados para determinar la mortalidad. Los estudios con gastrópodos se efectuaron por duplicado.

2.2.2- Bioensayos para evaluar efectos subletales

Todos los bioensayos efectuados para evaluar los efectos subletales - niveles de poliaminas y procesos de peroxidación lipídica - se realizaron a un nivel de exposición de 0,5 mg/L de paraquat producto comercial, en condiciones estáticas (sin renovación del medio). El nivel de exposición seleccionado constituye un valor de referencia recomendado para el control de plantas en sistemas acuáticos (Bacchetta et al., 2002) y resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la solución de paraquat empleada es estable por al menos 96 horas.

En ningún caso los organismos fueron alimentados. Los bioensayos tuvieron una duración de 4 y 48 horas. Los organismos controles se expusieron en agua declorada y filtrada por carbón, en forma análoga a los organismos tratados.

Las experiencias con *L. variegatus* se realizaron utilizando unos 20 organismos expuestos en viales de 25 mL de capacidad, sin aireación, y conteniendo un volumen de 20 mL de solución.

Para el tratamiento de los gastrópodos, 3 ejemplares pigmentados y 3 no pigmentados se expusieron simultáneamente en bandejas plásticas de 1,5 L, conteniendo 600 mL de solución, con aireación.

Los volúmenes de exposición utilizados con cada especie de organismos mantiene aproximadamente la misma relación peso/volumen del medio.

2.2.3. Niveles de poliaminas

Para determinar los niveles de poliaminas, el tejido a analizar se homogeneizó ácido perclórico (HClO₄) 0,2N en una relación 1:10 (peso de tejido/volumen). En todos los casos se trabajó con organismos enteros. Para *L. variegatus* se realizó un pool de 20 organismos, mientras que para *B. glabrata* se analizó el tejido blando total de cada organismo por separado.

El homogenato se incubó en hielo por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 3000 x g por 10 minutos para separar las proteínas desnaturalizadas. Una alícuota de 50 µl de dicho sobrenadante fue tratada con cloruro de dansilo en acetona a pH 8 por 16 horas para derivatizar las poliaminas. Las poliaminas dansiladas fueron extraídas con tolueno y separadas por HPLC como se describe en Cochón et al. (2002). Se utilizó una columna de 3,9 mm x 30 cm µBondapak C18 (Waters Corporation, Milford, MA). La columna se equilibró con acetonitrilo: agua (40:60) previo a la inyección de la muestra (50 µl). Las poliaminas se eluyeron con un gradiente lineal de 40 min. partiendo de un 40% de acetonitrilo en agua y finalizando con un 100% de acetonitrilo. El flujo fue de 1 ml/min y la detección se realizó fluorométricamente (λ excitación = 342nm, λ emisión = 512 nm).

2.2.4. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó por medio de la cuantificación de la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como se describe en Wills (1992) con algunas modificaciones.

Se preparó un homogenato del tejido blando total de los organismos analizados en solución de cloruro de potasio (KCl) 150 mM.

En el caso de *L. variegatus* se trabajó con el homogenato crudo, pero para analizar el contenido de TBARS en *B. glabrata* hubo que realizar una centrifugación a 3000 g x por 15 minutos para eliminar la interferencia de los pigmentos presentes.

A 1 ml del homogenato se le adicionaron 0,5 ml de ácido tricloroacético 20% y 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% (p/v), y se calentó a 100 °C en baño de agua por 10 minutos. Luego de enfriar, se separaron las proteínas precipitadas por centrifugación (1000 x g por 20 min.) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 nm. En todos los casos se realizó el blanco de reactivos y el correspondiente blanco de tejido (sin ácido tiobarbitúrico).

Para realizar los cálculos se utilizó un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresan como nmoles de malondialdehído formado por mg de proteínas.

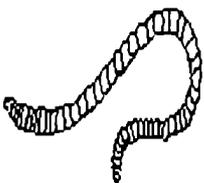
Para la determinación de proteínas se empleó el método de Lowry et al. (1951) usando albúmina bovina como estándar.

2.2.5. Análisis estadístico

Los valores de Concentración Letal 50 (CL_{50}) y el intervalo de confianza (95%) se determinaron empleando el Programa de Análisis Probit de la US - EPA.

Para efectuar el análisis estadístico se utilizaron métodos de análisis de varianza (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1995), a un nivel de significancia de 0,05. Los resultados se expresaron como valores promedios \pm DS (desviación estándar).

RESULTADOS



3.1. ESTUDIOS DE LETALIDAD

3.1.1. Estudios en *Lumbriculus variegatus*

En la Tabla 3.1 se presentan los valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀) obtenidos en *L. variegatus* tratados con soluciones de paraquat puro o de un formulado comercial conteniendo 20% de paraquat. Los estudios se efectuaron a distintas temperaturas, por diversos períodos y en presencia o ausencia de partículas de arena.

Tabla 3.1. Valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀) e intervalos de confianza (IC 95%) en *Lumbriculus variegatus* expuestos a distintas soluciones de Paraquat (mg paraquat/L).

Tiempo	Temperatura = 25 ± 1 °C		Temperatura = 20 ± 1 °C	
	<i>P. comercial</i> ^(a)	<i>P. comercial</i> ^(a) y arena	<i>P.comercial</i> ^(a)	Paraquat puro
48 h.	50,0 43,8-60,4	--	17,5 15,0-23,3	32,4 28,0-36,0
72 h.	29,7 22,7-38,1	48,5 43,4-52,5	--	--
96 h.	10,0 8,4-13,8	30,0 26,8-35,2	35,2 30,3-41,5	62,5 55,2-74,5
168 h. (7 días)	--	--	11,0 8,2-15,2	20,5 19,9-29,8

P. comercial^(a) : Producto formulado comercial

En primer lugar se destaca que a la temperatura de 20 ± 1 °C, los resultados de CL₅₀ para el paraquat droga pura fueron de 32,4; 62,5 y 20,5 mg/L,

RESULTADOS

a 48 y 96 h. y a 7 días respectivamente. Los valores correspondientes al producto comercial en cambio, resultaron ser aproximadamente la mitad, lo cual demuestra que la toxicidad del formulado comercial resultó mayor respecto a la sal pura. Por esta razón, los restantes estudios se limitaron a investigar la toxicidad del formulado comercial, el cual es por otra parte, el producto que efectivamente se emplea en la práctica como herbicida.

A las 96 h., se obtuvo un valor de $CL_{50} = 10,0$ cuando la temperatura era de 25 ± 1 °C, aproximadamente tres veces menor que a 20 ± 1 °C, poniendo en evidencia que el producto resulta más tóxico para estos organismos a más altas temperaturas.

Los estudios efectuados a 25 ± 1 °C demostraron además que en presencia de partículas de arena pura (libre de materia orgánica) los resultados de CL_{50} , tanto a 96 h. como a 7 días resultaron ser mayores que en sistemas conteniendo agua solamente.

3.1.2- Estudios en *Biomphalaria glabrata*

Los resultados de los valores de Concentración Letal 50 (CL_{50}) en organismos pigmentados y no- pigmentados de *B. glabrata* tratados con paraquat formulado comercial por 96 h. y a una temperatura de 25 ± 1 °C se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valores de Concentración Letal 50 (CL_{50}) e intervalos de confianza (IC 95%) en *Biomphalaria glabrata* expuestos a un producto comercial de Paraquat (mg paraquat/L).

Tiempo	Temperatura = 25 ± 1 °C	
	<i>Pigmentado</i>	<i>No-pigmentado</i>
96 h.	8,8	2,0
	5,4-12,8	1,7-2,4

RESULTADOS

Los resultados indican que en organismos no- pigmentados el valor de CL_{50} resultó ser significativamente más bajo que para organismos pigmentados ($p < 0,05$).

3.2. NIVELES DE POLIAMINAS

3.2.1- Estudios en *Lumbriculus variegatus*

En las Fig. 3.1 A, B y C se muestran los valores de las diversas poliaminas en estudio (putrescina, espermidina y espermina, respectivamente) encontrados en oligoquetos tratados con una solución de 0,5 mg/L de paraquat producto comercial, durante distintos tiempos de exposición.

(Fig. en página siguiente)

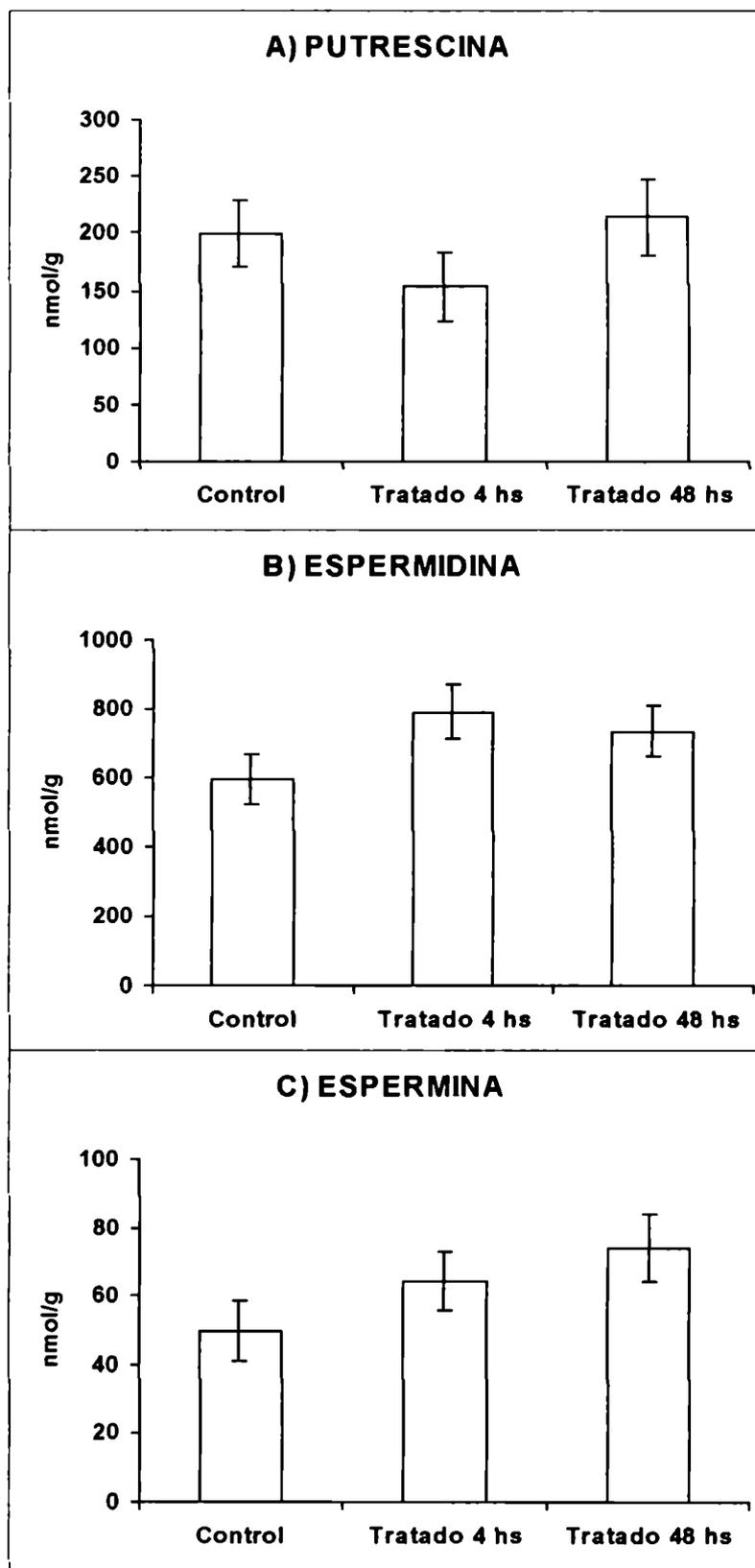
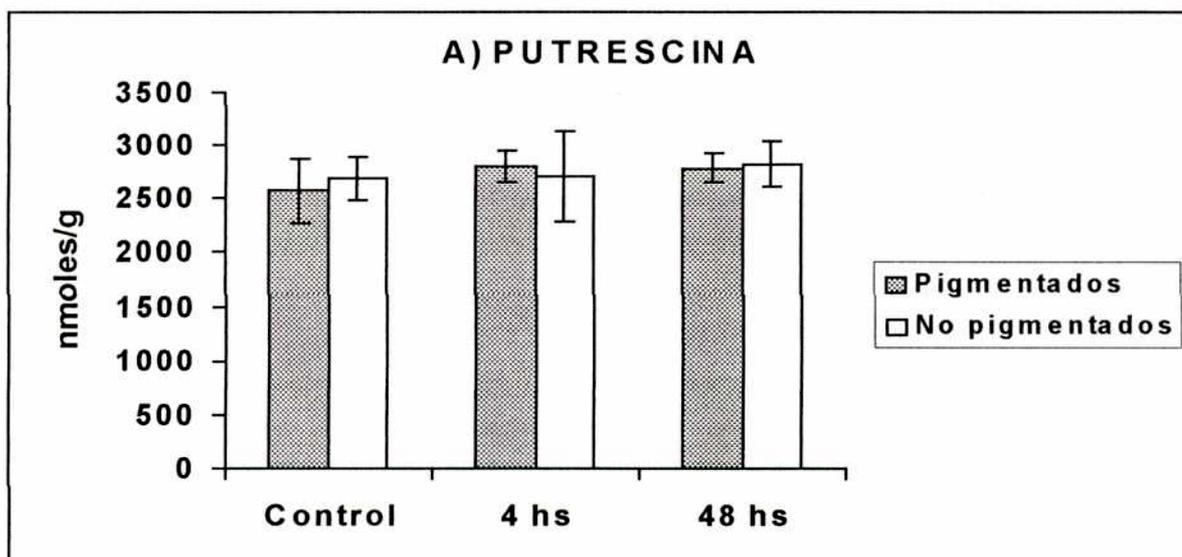


Figura 3.1: Niveles de poliaminas en *L. variegatus* expuestos a 0,5 mg/L de paraquat producto comercial



3.2.2. Estudios en *Biomphalaria glabrata*

En la Fig. 3.2 A y B se muestran los valores de las diversas poliaminas (putrescina y espermidina, respectivamente) encontrados en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata* tratados con una solución de 0,5 mg/L de paraquat producto comercial, durante diversos tiempos. Es interesante destacar que en estos organismos no se registraron valores detectables de la poliamina espermina.

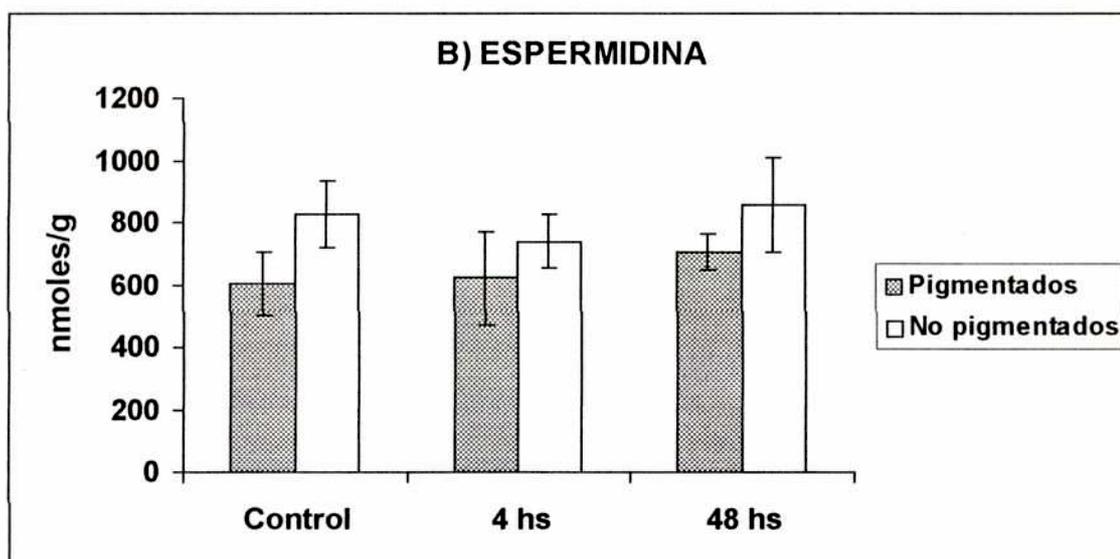


Figura 3.2: Niveles de poliaminas en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata* expuestos a 0,5 mg/L de paraquat producto comercial

Los resultados obtenidos indican que en organismos controles, los niveles de putrescina son considerablemente más altos que los de espermidina. En organismos tratados por 4 y 48 horas no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ambas poliaminas, respecto a los ejemplares controles ($p > 0,05$). Por otra parte, en ningún caso se observaron diferencias significativas entre organismos pigmentados y no-pigmentados ($p > 0,05$).

3.3. ESTUDIOS DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

3.3.1- Estudios en *Lumbriculus variegatus*

Los valores de peroxidación lipídica, determinados por reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico, en oligoquetos expuestos a un nivel de 0,5 mg/L de paraquat producto comercial, durante diversos tiempos se presentan en la Fig. 3.3.

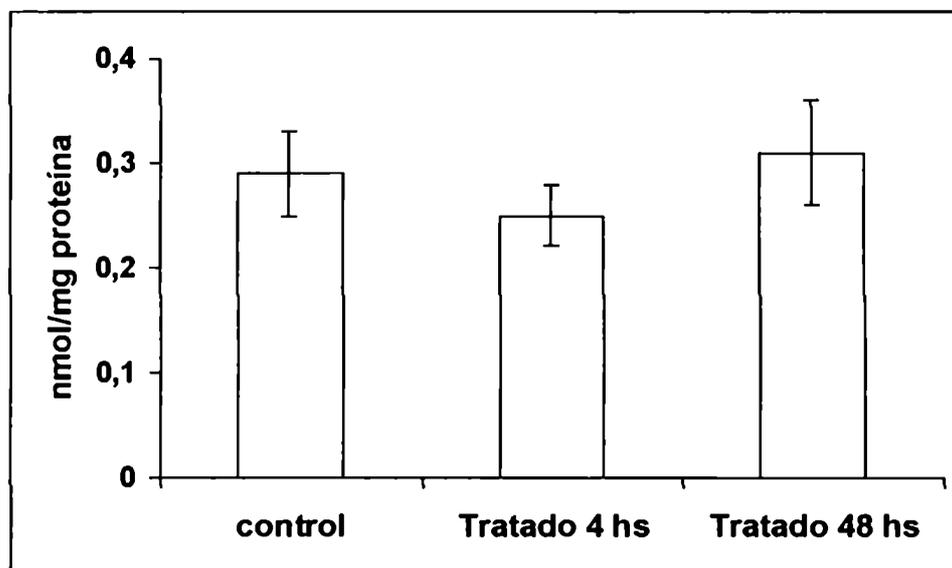


Figura 3.3: Niveles de peroxidación lipídica (expresados como nmoles de especies reactivas al TBA/mg de proteínas) en *L. variegatus* expuestos a 0,5 mg/L de paraquat producto comercial.

Los resultados obtenidos demuestran que no se observaron diferencias significativas en los niveles de peroxidación entre los organismos controles y los tratados ya sea por 4 y 48 horas de exposición.

3.3.2. Estudios en *Biomphalaria glabrata*

Los valores de peroxidación lipídica, determinados por reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico, en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata* expuestos a un nivel de 0,5 mg/L de paraquat producto comercial, durante diversos tiempos se presentan en la Fig. 3.4.

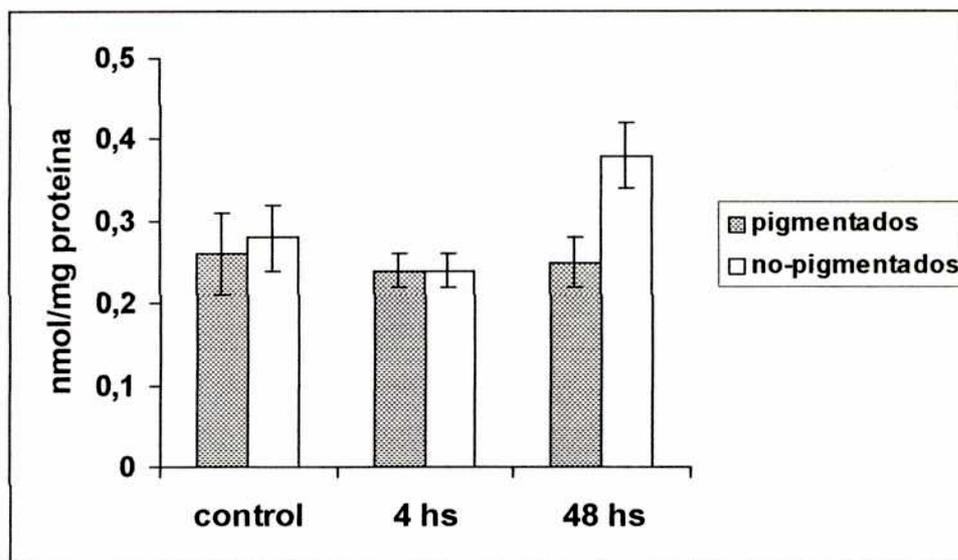
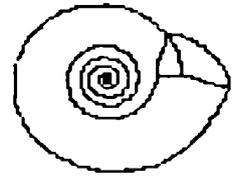
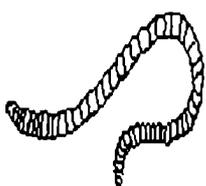


Figura 3.4: Niveles de peroxidación lipídica (expresados como nmoles de especies reactivas al TBA/mg de proteínas) en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata* expuestos a 0,5 mg/L de paraquat producto comercial.

Los resultados obtenidos para organismos pigmentados, no presentan diferencias significativas entre controles y tratados ($p > 0,05$). Los organismos no-pigmentados presentaron niveles de peroxidación similares entre ejemplares controles y en aquellos tratados por 4 horas, y también respecto a los valores de organismos pigmentados ($p > 0,05$). En cambio, tras 48 horas de tratamiento con el producto comercial se observó un significativo aumento en los organismos no-pigmentados, respecto a los controles ($p < 0,05$).



DISCUSIÓN



Los estudios de letalidad permitieron establecer valores de concentración letal 50 (CL₅₀) del paraquat puro y de un producto formulado comercial en dos especies de invertebrados de agua dulce, el oligoqueto *Lumbriculus variegatus*, y organismos pigmentados y no-pigmentados del molusco gastrópodo *Biomphalaria glabrata*. A la fecha, no se han reportado en la literatura otros valores de referencia para estas especies (base datos de US EPA).

Los estudios de letalidad efectuados en *L. variegatus* permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- Los valores de CL₅₀ (24 y 48 horas y 7 días) indicaron que el paraquat contenido en el producto formulado comercial resultó más tóxico que la sustancia pura.
- La toxicidad del producto comercial resultó mayor con el aumento de temperatura. Este hecho puede atribuirse a que estos organismos en su hábitat natural están más adaptados a temperaturas moderadas o incluso relativamente frías. Por consiguiente, el aumento de temperatura de por sí produce un efecto estresante en los organismos, por el cual resultan más sensibles a la acción de compuestos químicos, en este caso particular, el paraquat.
- La toxicidad del formulado comercial disminuyó notablemente cuando en el medio del bioensayo se encontraban partículas de arena. Hay que tener en cuenta que la arena seleccionada era un producto comercial de alta pureza y prácticamente libre de materia orgánica. Se considera que el catión paraquat es fuerte y rápidamente adsorbido por el material particulado, reduciendo su biodisponibilidad para los animales acuáticos. Eisler (1990) reportó que este herbicida tenía una vida residual media de 36 horas a dosis normales para el control de malezas (0.5-1.0 mg/L) y se detectó menos de 0.01 mg/L en dos semanas.

Para investigar la toxicidad del formulado comercial en los moluscos gastrópodos, los experimentos se realizaron a una temperatura de 25±1 °C, ya que estos organismos, a diferencia de los oligoquetos, se distribuyen en la naturaleza en regiones tropicales y subtropicales. Una temperatura más baja, por ende, podría causar un efecto de estrés adicional en esta especie. El valor de CL₅₀ (96 horas) para los organismos pigmentados fue de 8,8 (IC 95%=5,4-12,8) mg/L, resultando no ser significativamente diferente del valor correspondiente a *L. variegatus* (CL₅₀ = 10,0; IC 95% = 8,4-13,8 mg/L). En cambio los

organismos no- pigmentados presentaron una mayor sensibilidad al formulado comercial, ya que el valor de CL₅₀ (96 horas) fue de 2,0 con un IC 95% = 1,7-2,4 mg/L.

En peces se reportaron valores de CL₅₀ (96h), para el producto formulado comercial, iguales a 25±7 mg/L para la trucha arcoiris, y a 13 mg/L para la trucha marrón (FAO, 2003). Para el invertebrado de agua dulce *Daphnia pulex* los valores de CL₅₀ (48h) fueron de 1,2 a 4,0 mg/L, (Alberdi et al, 1994; 1996). Estos valores se dan como referencia, ya que no es posible efectuar comparaciones en forma directa entre nuestros datos y los obtenidos por otros laboratorios debido a posibles diferencias en las condiciones experimentales.

En este trabajo se reportan también por primera vez, según nuestro conocimiento, los valores de poliaminas presentes en las dos especies acuáticas en estudio. Es por ello que los datos se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de poliaminas (valor medio ± DS) en organismos controles (nmol/g peso húmedo)

Poliamina	<i>L. variegatus</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	
		Pigmentados	No-pigmentados
Putrescina	199,3 ± 28,7	2571,5 ± 311,1	2687,0 ± 201,1
Espermidina	595,5 ± 70,9	600,8 ± 101,4	827,7 ± 108,1
Espermina	49,9 ± 8,8	No detectado	No detectado
Total	844,7	3172,3	3514,7

En primer lugar se destaca que mientras que en *L. variegatus* se detectaron las tres poliaminas en estudio, en los moluscos gastrópodos no se detectó espermina. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de putrescina y espermidina entre ejemplares pigmentados y no- pigmentados de *B. glabrata*.

Las proporciones relativas de las tres poliaminas en *L. variegatus* fue de 1: 2,99: 0,25, lo cual demuestra que la mayor proporción correspondió a espermidina, seguida por putrescina y luego espermina. Un perfil muy similar fue encontrado en una especie de anélido terrestre, *Pheretima communissima* (Hamana et. al., 1995). Las relaciones

correspondientes para los moluscos gastrópodos fueron de 1:0,23 0 para organismos pigmentados y de 1: 0,30: 0 para organismos no- pigmentados, reflejando que la mayor proporción consistió en putrescina.

En oligoquetos tratados con paraquat comercial, los niveles de poliaminas resultaron afectados por la exposición a un tiempo tan breve como 4 horas. Tras dicho período, los niveles de putrescina disminuyeron, mientras que los valores de espermidina y espermina presentaron sendos aumentos con respecto a los organismos controles. En los organismos expuestos por 48 horas, los niveles de putrescina tendieron a aumentar, acercándose a los valores de organismos controles. En cambio, persistieron los aumentos en las otras dos poliaminas, espermidina y espermina.

Según la literatura, los niveles de poliaminas fueron modificados por efecto del paraquat tanto en diversos tejidos vegetales como animales (Ye et al., 1997; Kurepa et al., 1998; Bayoumi et al., 2000; Rácz et al., 2000). Sin embargo, dichos cambios no siguen un patrón general, ya que en algunos casos se han encontrado aumentos o descensos en las concentraciones poliaminas, dependiendo de una cada poliamina en particular y del tejido analizado. Por cierto, tanto factores biológicos como experimentales pueden contribuir a estas discrepancias, como por ejemplo los niveles intrínsecos de cada poliamina, el nivel y el tiempo de exposición, y el compuesto específico usado (paraquat puro o formulado comercial), por citar los factores más relevantes.

Los moluscos gastrópodos presentaron un comportamiento muy diferente al de los oligoquetos, ya que no se observaron modificaciones en los niveles de poliaminas por la exposición a paraquat comercial, en ninguno de los tiempos estudiados.

Resulta difícil en base a estos experimentos poder explicar este comportamiento diferencial entre oligoquetos y gastrópodos. No obstante, está bien establecido en literatura que frente a un mismo agente químico los procesos toxicocinéticos transcurren en forma diferencial entre organismos de diversas especies, las cuales poseen diferentes hábitos nutricionales, respiratorios, y eventualmente diferentes mecanismos de defensa. Por otra parte, es posible también que al nivel de intoxicación seleccionado (0,5 mg/L) no se haya alcanzado el valor de concentración umbral en los gastrópodos como para observar efectos a nivel de las cantidades de poliaminas.

En base a estos resultados, se puede inferir que los análisis de los niveles de poliaminas en oligoquetos de *L. variegatus* podrían constituir sensibles parámetros biomarcadores de contaminación por efecto del paraquat.

Finalmente, durante el desarrollo de este trabajo se investigó también la posibilidad de ocurrencia de procesos de peroxidación de lípidos. Los datos encontrados en *L. variegatus* demostraron que durante los períodos de exposición analizados (4 y 48 horas) no se registraron diferencias significativas en procesos de peroxidación de lípidos con respecto a los organismos controles. Esta conclusión resultó igualmente válida cuando se analizaron organismos pigmentados de *B. glabrata*. Los ejemplares no-pigmentados, en cambio, presentaron un significativo aumento en la peroxidación cuando estaban expuestos por 48 horas al formulado comercial.

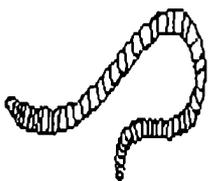
Algunos autores han reportado incrementos en los procesos de peroxidación lipídica por acción del paraquat en varios organismos (Ali et al., 2000, Ranjbar et al., 2002; Suntres, 2002), mientras que otros no observaron modificaciones, o incluso documentaron descensos, respecto a los valores controles (Nakagawa et al., 1998; Ali et al., 2000), dependiendo de la especie estudiada. Como fue señalado en la Introducción (Item 1.5.), los procesos de peroxidación de lípidos son iniciados por especies reactivas de oxígeno, las cuales se generan por la reducción del dicatión paraquat, mediante la citocromo P₄₅₀ reductasa. Si el sistema enzimático involucrado en dicha reducción tiene baja actividad, las posibilidades de formación de radicales libres son también muy bajas. Efectivamente, se ha sugerido que las actividades de las enzimas microsomales en la especie *L. variegatus* son considerablemente bajas (Verrengia Guerrero et al., 2002), apoyando esta hipótesis. Por otra parte, la ausencia de procesos de lipoperoxidación también puede ser atribuida al bajo nivel de exposición, al corto período de tratamiento, o como consecuencia de una rápida y eficiente repuesta de los mecanismos antioxidantes. Recientemente, se ha reportado el posible rol de las poliaminas, especialmente, espermidina y espermina, como defensas frente a los daños inducidos por radicales libres. Por consiguiente, en los oligoquetos de *L. variegatus*, los aumentos de dichas poliaminas podrían dar cuenta de la falta de inducción de procesos de peroxidación lipídica (Farriol et al., 2003).

Con respecto a los moluscos gastrópodos merece destacarse que, en base a los estudios de letalidad, los organismos no-pigmentados de *B. glabrata* habían resultado más sensibles a la acción del paraquat formulado comercial en comparación con los organismos pigmentados.

La posible relación entre los pigmentos melánicos y diversos factores ambientales ha sido reconocida previamente en la literatura. Como consecuencia de la revolución industrial del siglo XVIII se verificó un progresivo incremento en la población de individuos salvajes o altamente pigmentados en diversas especies animales. Este hecho fue correlacionado positivamente con el aumento de la contaminación atmosférica (Moriarty, 1990; Majerus., 1998). Actualmente se acepta que la melanina desempeña un rol muy significativo en la protección de la piel frente a agresiones inducidas por la luz UV (Pathak, 1995; Barker et al., 1995, Riley 1997). No obstante, la presencia de melanina en tejidos no expuestos (meninges, vísceras abdominales, etc.) plantea un singular interrogante por cuanto implicaría funciones adicionales, aún no esclarecidas (Prota, 1992). En este sentido algunos autores han señalado que estos pigmentos, o algunos de sus productos intermediarios, serían capaces de intervenir en procesos aún no bien establecidos de detoxificación o defensa (Bucket et al 1992). Al respecto, se ha propuesto que los pigmentos melánicos podrían actuar como atrapantes de radicales libres (Sarna et al., 1986). Por estudios con especies pigmentadas y albinas de sapos se estableció que desempeñan un rol protector frente a procesos de peroxidación de lípidos (Scalia et al 1990; Corsaro et al 1995).

Por consiguiente, la melanina y/o pigmentos relacionados que están presentes en los organismos pigmentados estarían desempeñando un rol de protección y defensa frente a la acción tóxica del radical paraquat. Los organismos albinos, que carecen de los pigmentos melánicos, resultan así más susceptibles a la acción del estrés oxidativo inducido por los radicales libres de paraquat. Este hecho podría a su vez contribuir a la mayor letalidad observada.

CONCLUSIONES



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

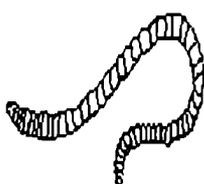
1. El paraquat presente en un producto formulado comercial resultó ser más tóxico para la especie *L. variegatus* que la solución conteniendo el compuesto puro.
2. Para organismos de *L. variegatus* la toxicidad del paraquat formulado comercial aumenta con el aumento de temperatura y disminuye por efecto de material particulado presente en el medio del bioensayo.
3. Los valores de CL₅₀ (96 horas y 25 ±1 °C) resultaron similares para *L. variegatus* y ejemplares pigmentados de *B. glabrata*. En cambio, los organismos no-pigmentados de *B. glabrata* resultaron considerablemente más sensibles.
4. En este trabajo se reportan, por primera vez según nuestro conocimiento, valores de los niveles de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, en organismos controles de las dos especies de agua dulce en estudio.
5. Los niveles de poliaminas resultaron ser modificados por acción del paraquat producto comercial en *L. variegatus* expuestos en forma aguda (4 y 48 horas) a un nivel de 0,5 mg paraquat/L. En cambio no se observaron diferencias significativas, con respecto a los controles, en organismos pigmentados y no-pigmentados de *B. glabrata*.
6. Los organismos de *L. variegatus*, al igual que ejemplares pigmentados de *B. glabrata*, no evidenciaron cambios en los procesos de peroxidación lipídica por acción del paraquat formulado comercial a un nivel de exposición de 0,5 mg paraquat/L. En cambio, tras 48 horas de exposición los organismos no-pigmentados de *B. glabrata* presentaron un aumento significativo en la peroxidación de lípidos.

CONCLUSIONES

7. Las modificaciones en los niveles de poliaminas podrían actuar como mecanismo de defensa frente a procesos de estrés oxidativo en los oligoquetos *L. variegatus*. Sin embargo, quedan por esclarecer los mecanismos por los cuales se afectan diferencialmente los niveles de poliaminas en los oligoquetos. No obstante, los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo permiten proponer su análisis como posibles parámetros biomarcadores de contaminación.

8. La presencia de melanina y pigmentos relacionados que caracteriza a los gastrópodos pigmentados podría dar cuenta de la mayor resistencia que se observó en estos organismos frente a las respuestas de letalidad y peroxidación de lípidos, en comparación con los ejemplares no-pigmentados. No obstante, esta hipótesis debería ser confirmada mediante la realización de estudios adicionales.

REFERENCIAS



- Alberdi J.L.; Di Marzio, W.D.; Sáenz, M.E.; Tortorelli, M.C.; 1994. Toxicidad aguda de un formulado de paraquat sobre *Daphnia spinulata* y *Daphnia magna*. *Acta Toxicológica Argentina*; 2: 1- 2, 13.
- Alberdi, J.L.; Sáenz, M.E.; Di Marzio, W.D.; Tortorelli, M.C.; 1996. Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *Daphnia spinulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 57: 229- 235.
- Ali, S.; Diwakar, G.; Pawas, S.; 2000. Paraquat induces different pulmonary biochemical responses in Wistar rats and Swiss mice. *Chem. Biol. Interact.*; 125: 79- 91.
- ASTM - American Society For Testing And Materials-; 1988. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity. Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E 729- 88^a, Philadelphia. PA, USA. 20 p.
- ASTM - American Society for Testing and Materials; 1994. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. PA, USA. V 11: 05.
- Bacchetta R.; Mantecca, P.; Vailati, G.; 2002. Oocyte degeneration and altered ovipository activity induced by paraquat in the freshwater snail *Physa fontinalis* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Mollus. Stud.*, 68: 181- 186.
- Barker, D.; Dixon, K.; Medrano, E.E.; Smalara, D.; Babcock, G.; Abdel - Malek, Z.A.; 1995. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. *Cáncer Res.*; 55: 4041- 4046.
- Bayoumi, A.E.; Pérez Pertejo, Y.; Ordóñez, C.; Reguera, R.M.; Cubria, J.C.; Balana Fouce, R.; Ordoñez, D.; 2000. Alterations in polyamine contents and glutathione metabolism induced by different concentrations of paraquat in CHO- KI cells. *Toxicol. in vitro.*; 14: 211- 217.
- Bismuth, C.; Garnier, R.; Dally, S.; Fournier, P.E.; Scherrmann, J.M.; 1982. Prognosis and treatment of paraquat poisoning. A review of 28 cases. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*; 19: 461 - 474.
- Bismuth, C.; Garnier, R.; Baud F.J.; Muszynsky, J.; Keyes, C.; 1990. Paraquat poisoning. An overview of the current status. *Drug. Saf.* 5: 243- 251.
- Bismuth, C.; Hall, A.H.; 1995. Paraquat poisoning. New York. Marcel Dekker Inc.; pp. 195- 210.
- Bucket, D.; Vethaak, A.D.; Lang, T.; 1992. Quantitative assessment of melano-macrophage center (MMCs) in dab, *Limanda limanda*, along a pollution transect in the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 193- 196.

- Carvalho, O. dos S.; Michelin Nunes, I.; Lima Caldeira, R.; 1998. First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Research Note. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brasil . 93: 39- 40.
- Cochón, A.C.; González, N.; San Martín de Viale; L.C.; 2002. Effects of the porphyrinogenic compounds hexachlorobenzene and 3,5- diethoxycarbonyl- 1,4- dihydrocollidine on polyamine metabolism. *Toxicology*; 176: 209- 219.
- Corsaro, C; Scalia, M.; Blanco, A.R.; Aiello, I.; Sichel, G.; 1995. Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation. A study of albino and pigmented *Xenopus*. *Pigment Cell. Res.* 8: 279- 282.
- Davies, D.S.; 1987. Paraquat poisoning: The rationale for current treatment regimes. *Hum. Toxicol.* 6: 37- 40.
- Davies, N.A.; Edwards, P.A.; Lawrence, M.A.M.; Simkiss, K.; Taylor, M.G.; 1999^a. Biocide testing using particles with controlled surface properties (artificial sediments). *Environ. Toxicol.Chem.*18: 2337- 2342.
- Davies, N.A.; Edwards, P.A.; Lawrence, M.A.M.; Simkiss, K.; Taylor, M.G.; 1999^b. Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4 dichlorophenol and pentachlorophenol. *Environ. Scie. Technol.*, 33: 2465- 2468.
- Depledge, M.H.; 1989. The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *Ambio* 18, 301- 302.
- Dotan Y.; Lichlenberg, D.; Pinchuk, I.; 2004. Lipid peroxidation cannot be used as an universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.*; 4: 200- 227.
- Edwin, D.O.; 1996. Control of water pollution from agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper 55, 101p.
- Eisler, R.; 1990. Paraquat hazard to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Contaminants Hazard Reviews. U.S. Fish and Wildlife Service. *Biol. Rep.* 85, 28p.
- Esterbauer, H.; 1996. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol. Biol.* 44: 25- 28.
- EXTOXNET - Extension Toxicology Network -; 1996. Paraquat. Pesticide Information Profiles, Oregon State University, USA.
<http://ace.orst.edu/cgibin/mfs/01/pips/paraquat.htm>; 5p.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2003. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. Paraquat dichloride; 21p.

- Farriol, M.; Segovia- Silvestre, T; Venereo, Y.; Orta, X.; 2003. Antioxidant effect of polyamines and erythrocyte cell membrane lipoperoxidation after free-radical damage. *Phytother. Res.*, 17: 44- 47.
- Ford, J.; 1989. The effect of chemical stress on aquatic species composition and community structures. En: Levin, S.A.; Harwell, M.A.; Kelly, J.R. & Kimball, K.D. (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and approaches*. Springer- Verlag; pp.: 99- 144.
- Forman, H.J.; Aldrich, T.K; Posner, M.A.; Fisher, A.B.; 1982. Differential paraquat uptake and redox kinetics of rat granular pneumocytes and alveolar macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 428- 433.
- Fried, B.; Sundar, K.; Rao, K; Sherma, J.; 1992. Fatty acid composition of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) fed hen's egg yolk versus leaf lettuce. *Comp. Biochem Physiol.*; 101A: 351- 352.
- FÜRST, E.P.; Laughin, K.C.; 1990. Mechanism of paraquat resistance. *Weed Technol.*; 4: 150- 156.
- Giulivi, C.; Lavagno, C.; Lucesoli, F.; 1995. Lung damage in paraquat poisoning and hyperbaric oxygen exposure: superoxide-mediated inhibition of phospholipase. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 203- 213.
- Göellner, C.; 1989. *Ecotoxicologia e Toxicologia do herbicida Paraquat*. Grafica Ed. Universidade de Passo Fundo, Brasil. 93 p.
- Hanmana, K; Hamana, H.; Shinozawa, T.; 1995. Alterations in polyamine levels of nematode, earthworm, leech and planarian during regeneration temperature and osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol.*; 111: 91-97.
- Hughes, J.T. 1998: Brain damage due to paraquat poisoning: A fatal case with neuropathological examination of the brain. *Neurotoxicology*; 9: 243- 248.
- Huggett, R. ; Klmerte, R.; Mehrle, P.M.; Bergman, H.L.; 1992. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Antropogenic Stress*. Lewis Publishers; pp. 284- 286.
- Kurepa, J.; Smalle, J.; Van Montagu, M.; Inze, D.; 1998. Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*; 39: 987 - 992.
- Larini, L.; 1999. *Toxicologia dos praguicidas*. São Paulo, Manole Pub.; pp.: 171- 174.
- Lesiuk N.; Drewes, C.D.; 1999a. Autonomy reflex in a freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Hydrobiologia*. 406: 253- 261.

- Lesiuk N.; Drewes, C. D.; 1999b. Blackworms, blood vessel pulsation and drug effects. *Amer. Biol. Teach.*, 61: 48- 53
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.; 1951. Protein measurement with the folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 249: 265- 275.
- Majerus, M.E.N.; 1998. Melanism. Oxford Academic Press. 338p.
- Medina, M.A.; Quesada, A.R.; Nuñez de Castro, I.; Sánchez Jiménez, F.; 1999. Histamine, polyamine and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 57: 1341- 1344.
- Monteiro, W.; Dias, B.F.S. de; 1989. Estratégias Reprodutivas em *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). *Ciência e Cultura.* 41: 1051-1054.
- Morgan, D.P.; 1995. Diagnóstico y tratamiento de envenenamientos por plaguicidas, 4ª Ed. Health effect Division, EPA, Washington DC., Busa Publicaciones; 186p.
- Moriarty, F.; 1990. Ecotoxicology: The study of Pollutions in Ecosystems. 2nd Ed. Academic Press. 290 p.
- Münzinger, A.; 1987. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. *Environ. Technol. Lett.*; 8: 141- 148.
- Nakagawa, I.; Suzuki, M.; Imura, N.; Naganuma, A.; 1998. Involvement of oxidative stress in paraquat, induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. *Free Rad. Biol. Med.*; 24: 1390- 1395.
- Neves, D.P.; 1986. Parasitologia humana. 6ª ed., Livraria Ateneu, Rio de Janeiro, Brasil; 1028 p.
- Nimmo, D.R.; 1985. Pesticides. En: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R.. (Eds.) Fundamental of aquatic toxicology: Methods and application, New York, Hampshire; pp.: 335 - 373.
- Nimmo, D.R.; Mcewen, L.C.; 1998. Pesticides. En: Calow, P. Handbook of Ecotoxicology. Oxford, Blackwell Sciences; pp.: 619- 667.
- Ochoa Rojas, M.C.; Leal, L.I.; Guadarrama, J.; Méndez, D.; 2002. Papel de las poliaminas en la inmunosupresión. *Rev. Méd.*; IMSS 40: 77- 103.
- Olson, K.R.; 1994. Paraquat and diquat. En: Olson K.R. Poisoning and Drug Overdose, 2nd Ed. Norwalk CT: Appleton & Lange, pp.: 245- 246.
- PAN- UK (Pesticide Action Network UK); 1996. Paraquat. *Pesticide News* 32: 20- 21.
- Pathak, M.; 1995. Function of melanin and protection by melanin. En: Melanin: Its role on Human Photoprotection. Zeise, L; Chedekel, M. & Fitzpatrick, T. Eds., American Society for Photobiology. *Photobiology*; pp.: 125- 135.

- Pegg, A. E.; 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in euboryotes. *Biochem. J.*; 234: 249- 262.
- Peña, C.E.; Carter, D.E.; Ayala Fierro, F.; 2001. Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Southwest Hazardous Waste Program College of Pharmacy, Arizona, U.S.; 2:48- 101; 3: 102- 136.
- Phipps, G.L.; Ankley, G.T.; Mattson, V.R.; 1993. Use of aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants, *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 269- 279
- Phipps, G. L.; Mattson, V. R.; Ankley, G. T.; 1995. Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 28: 281- 286.
- Pond, S.M.; 1990. Manifestations and management of paraquat poisoning. *Med. J.Aust.*; 152: 256- 259.
- Pratt, J.R.; 1990. Aquatic community response to stress. Prediction and detection of adverse effects. En: Landes, W.G & Van der Schalie, W. H. (Eds.). Aquatic toxicology and risk assessment. American Society for Testing and Materials (ASTM), 13th Volume, pp.: 16- 26.
- Prota, G.; 1992. Melanins and Melanogenesis. Academic Press, London, 277 p.
- Prota, G.; 1992. The role of peroxidase in melanogenesis revisited. *Pigment. Cell. Res. Suppl.* 2: 25- 34.
- Rácz I.; Lásztity, D.; Darkó, É.; Hidvégi, E.; Szigeti, Z.; 2000. Paraquat resistance of horseweed (*Erigeron canadensis* L.) is not caused by polyamines. *Pest. Biochem. Physiol.* 68: 1-10.
- Ranjbar, A.; Pavalar, P.; Sedighi, a.; Abdollahi, M.; 2002. Induction of oxidative stress in paraquat formulation workers. *Toxicol. Lett.*; 131: 191- 194.
- Riley, P. A. 1997. Epidermal melanin: Sun screen or waste disposal ?. *Biologist*; 44: 408- 411.
- Ruppert, E.E.; Barnes, R.D.; 1994. Invertebrate Zoology; 6th edition. Hardcover Ed.; pp.: 379- 423; 554- 568.
- Salibian, A., 2000. Impacto de los agroquímicos sobre especies no blanco. Material Impreso, Seminario Taller: Evaluación de riesgos fitosanitarios. CASAFE- UADE. 5 p. -

- Sarna, T.; Pilas, B.; Land, E. J.; Truscott, T. G.; 1986. Interactions of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochem. Biophys. Acta* 883: 162- 167.
- Scalia, M.; Geremia, E.; Corsaro, C.; Santoro, C.; Baratta, D.; Sichel, G.; 1990. Lipid peroxidation in pigmented and non pigmented liver tissues: Protective role of melanin. *Pig. Cell. Res.* 3: 115- 119.
- Schmidt, R.R.; 1997. HRAC Classification of Herbicides according to Mode of Action. Brighton Crop Protection Conference – Weeds pp.: 1133-1140.
- Smith, L.L.; 1987. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum. Toxicol.*; 6: 31- 36.
- Smith, J.G.; 1988. Paraquat poisoning by skin absorption: A review, *Hum. Toxicol.*; 7: 15- 19.
- Sokal, R. R.; Rohlf, F. J.; 1995. Biometry. The Principles and Practice of Statistic in Biological Research. WH Freeman & Company, New York, USA, 887 p.
- Suntres, Z.; 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*; 180: 65- 77.
- Tabor, C.W.; Tabor, H.; 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749- 790.
- Timbrell, J.A.; 1996. Introduction to Toxicology. Taylor & Francis. Eds., London; pp.: 91- 101.
- Timbrell, J.A.; 2000. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor & Francis Eds. London; pp.: 285- 383
- Tomita, R.Y.; Beyruth, Z.; 2002. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, São Paulo; 64: 135- 142.
- Tungsanga, K.; Chusilp, S.; Israsena, S.; Sitprija, V.; 1983. Paraquat poisoning: Evidence of systemic toxicity after dermal exposure. *Postgrad. Med. J.*, 59: 338-339.
- US. EPA - United States Environmental Protection Agency-; 1997. Paraquat Dichloride. Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W), R.E.D. FACTS, EPA-738-F- 96-018.
- US- EPA - United States Environmental Protection Agency-; 1987. Health Advisory Draft Report: Paraquat. Office of Drinking Water, Washington, DC, 1987.10-112
- US- EPA - United States Environmental Protection Agency-; 1987. Pesticide Fact Sheet Number 131: Paraquat. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC. 10-113.
- Vale, J.A.; Meredith, T.J.; Buckley, B.M.; 1987. Paraquat poisoning: Clinical features and immediate general management. *Hum. Toxicol.*; 6: 41- 48.

- Verrengia Guerrero, N.R.; Mozzarelli, M.N.; Giancarlo, H.; Nahabedian, D.; Wider, E. A.; 1997. *Biomphalaria glabrata*: Relevance of albino organisms as a useful tool for environmental lead monitoring. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 59: 822- 827.
- Verrengia Guerrero, N.R.; Nahabedian, D.E.; Wider, E.; 2000. Analysis of some factors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by *Biomphalaria glabrata*. *Environ. Toxicol. Chem.*. 19: 2762- 2768.
- Verrengia Guerrero, N.R.; Taylor, M. G.; Davies, N. A.; Lawrence, M. A.; Edwards, P.A. A.; Simkiss, K.; E. A. Wider, K.; 2002. Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. *Environ. Poll.*; 117: 523- 530.
- Vidal Ribas, A.; 1997. Mecanismos de acción e resistencia de plantas. Faculdade de Agronomia da Universidade Federal Rio Grande do Sul (UFRGS) Ed ; pp.: 55- 61.
- Walker, M.; Keith, L.H.; 1992. US- EPA'S Pesticide Fact Sheet Database. Lewis Publishers MI. 5 p.
- WHO -World Health Organization -; 1994. Paraquat and diquat. Environmental Health Criteria 39. Geneva, Switzerland; 128p.
- WHO - World Health Organization -; 1996. Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. WHO/PCS/96.3, WHO, Geneva, Switzerland.
- Wills, E.D. 1992. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. En: Snell, K.; Mullock, B. Biochemical Toxicology. A Practical Approach. (Eds.) IRL Press, Oxford-Washington DC.; pp.: 127- 152.
- Worthing, C.R.; Walker, S.B.; 1987. The pesticide Manual. 8ª Ed. Lavenham, Lavenham Press Limited, British Crop Protection Council, London. 148 p.
- Ye, B. Muller, H.H.; Zhaney, J.; Gressel, J.; 1997 Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and weath. *Plant Physiol.*; 1154: 1443- 1451.
- WSSA - Weed Science Society of America; 1994. Herbicide Handbook. 7th Edition. Champaign, I.L.; pp.: 10- 59.