

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

**RELACION DE LA TOXOCINETICA DE CARBARIL Y EL
EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE
ACETILCOLINESTERASA EN EL CARACOL**

Pomacea patula

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

P R E S E N T A :

M. en C. BEATRIZ RAMIREZ MORA

NOVIEMBRE, 2000.

“EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, PERTENECE AL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y ADEMÁS, CUENTA CON EL APOYO DEL MISMO CONSEJO CON EL CONVENIO PFP-20-93”

AGRADECIMIENTOS:

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA.**

**A LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

EL MAESTRO NO SABE

El **“indagador”** se acercó respetuosamente al **“discípulo”** y le preguntó «¿Cuál es el sentido de la vida humana?»

El **“discípulo”** consultó las palabras escritas de su **“maestro”** y, lleno de confianza, respondió con las palabras del propio **“maestro”**. «La vida humana no es, sino la expresión de la exuberancia de Dios».

Cuando el **“indagador”** se encontró con el **“maestro”** en persona, le hizo la misma pregunta; y el **“maestro”** le dijo:
«No lo sé».

El **“indagador”** dice: «No lo sé». Lo cual exige honradez.

El **“maestro”** dice: «No lo sé». Lo cual requiere tener una mente mística, capaz de saberlo todo a través del no-saber.

El **“discípulo”** dice: «Yo lo sé». Lo cual requiere ignorancia, disfrazada de conocimiento prestado.

I. RESUMEN

El carbaril inhibe la acetilcolinesterasa (ACHasa) en tejidos del sistema nervioso central (SNC) y periférico de vertebrados, dando como resultado un exceso de acetilcolina en los receptores neurales. La inhibición de la enzima causa una serie de efectos tóxicos de tipo agudo, mediados por interacciones del transmisor con receptores muscarínicos, nicotínicos y del SNC.

Debido a la escasa estabilidad de los carbamatos en cuerpos acuáticos, se dificulta establecer una relación entre la contaminación y el impacto bioquímico en los organismos.

Un modelo toxocinético-toxodinámico puede ser de utilidad predictiva al relacionar uno de los principales efectos tóxicos del carbaril (inhibición de ACHasa) y el curso temporal de su concentración tisular.

Bajo estas consideraciones, se desarrolló un modelo cuantitativo basado en la toxocinética del carbaril y el efecto sobre la actividad de las ACHasas, empleando al caracol *Pomacea patula*.

Se utilizó un sistema de contaminación semiestático con una concentración subletal de carbaril (1.46 $\mu\text{g/mL}$) correspondiente a 1/10 de la CL_{50} a 96h.

La detección del carbamato en tejido se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y derivatización postcolumna.

Se evaluó el proceso de bioconcentración y eliminación del plaguicida en muestras del gasterópodo. Paralelamente bajo las mismas condiciones, se determinó la actividad de las ACHasas.

Un modelo monocompartimental sirvió para describir cuantitativamente estos fenómenos. La bioconcentración de carbaril fue trifásica alcanzando el estado estacionario (4.2 $\mu\text{g/g}$ de tejido) y una inhibición promedio de ACHasas de 86%, dentro de las primeras 7 h de intoxicación. El factor de bioconcentración (FBC) fue calculado al estado estacionario, resultando un valor de 2.97 sobre base de peso húmedo. La transferencia de los caracoles a un medio libre de carbaril después de 72 h de exposición, fue seguida por una eliminación monofásica del contaminante con una vida media de 1.0 h.

Una correlación significativa ($r = 0.87$) fue encontrada entre los niveles tisulares de carbaril (proceso de bioconcentración) y la inhibición de ACHasa, no siendo así durante la fase de eliminación, donde una inhibición significativa de la enzima fué apreciada durante las 72 h de monitoreo, a pesar de que los niveles del plaguicida en la glándula digestiva fueron despreciables desde las 7 h.

Este estudio aporta una herramienta cuantitativamente potencial para la extrapolación de efectos toxicológicos producidos por carbaril, de un organismo a otro y puede emplearse además, para el monitoreo de la biodisponibilidad del

xenobiótico en muestras ambientales, así como para el diseño de medidas protectoras en envenenamiento por inhibidores de esterasas.

II. ABSTRACT

Water concentrations of contaminants sometimes are unreliable indicators of potentially harmful effects, because the fate of the chemicals may be affected by certain characteristics of the aquatic environment. Several authors have suggested that body concentration is a better indicator of toxic effects than water or sediment concentrations (Landrum et al., 1992). The persistence of carbaryl in the water medium is short, for the most part, due to a rapid degradation (Fisher and Lohner, 1986).

However, it is a potent inhibitor of AChase, even at sublethal concentration (Murty and Ramani, 1992).

For xenobiotics and their metabolites which form readily reversible interactions with target sites for toxicity (eg. Enzymes), the level of xenobiotic present in the target site should be directly related to the biochemical response over a concentration range. The goal of this study was to develop a kinetic model to evaluate the bioconcentration of carbaryl and inhibition of AChase in fresh water amphibious snail *Pomacea patula*.

While AChase inhibition is not a toxic effect *per se*, it is an index of the probability that acute carbamate toxicity will occur (Taylor, 1980).

Organisms were exposed to 1.46 $\mu\text{g/mL}$ (carbaryl) (1/10 of LC_{50} – 96 h) during 72 h using a semi-static contamination system; bioconcentration and elimination experiments were performed evaluating simultaneously ACHase activity. The inhibition of the digestive gland ACHase reached 86% when the carbaryl concentration (C_{EE}) in tissue was 4.2 $\mu\text{g/g}$. The increased enzyme inhibition was observed concomitantly with the bioconcentration of carbaryl until 7 h. ACHase inhibition was linearly dependent on the uptake and bioconcentration of carbaryl ($r = 0.87$).

The transfer of snails to carbaryl-free water after 72 h of exposure was followed by rapid monophasic elimination with a half-life of 1.0 h. However, ACHase activity levels never returned to control values. These results showed that the bioconcentration might be playing a critical role in contributing to the toxicity of carbaryl.

III. I N D I C E

	Pág.
RELACIÓN DE LA TOXOCINÉTICA DE CARBARIL Y EL EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA EN EL CARACOL <i>Pomacea patula</i>	i
Agradecimientos	iv
I. RESUMEN	vi
II. ABSTRACT	ix
III. INDICE	xi
IV. LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
V. LISTA DE FIGURAS	xv
VI. LISTA DE TABLAS	xvii
VII. LISTA DE CROMATOGRAMAS	xix
VIII. INTRODUCCION	1
1. FUENTES DE PLAGUICIDAS EN AGUA	2
1.1. <i>Aplicaciones intencionales</i>	2
1.2. <i>Aplicaciones no intencionales</i>	3
2. CARBAMATOS	3
2.1. <i>Características fisicoquímicas del carbaril</i>	4
2.1.1. <i>Transformaciones abióticas</i>	4
2.1.2. <i>Transformaciones bióticas</i>	5
2.2. <i>Toxicología de carbamatos</i>	7
2.3. <i>Mecanismo de acción de carbamatos</i>	8
2.4. <i>Metabolismo de carbamatos</i>	13
3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE COLINESTERASAS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS	16
4. ORGANISMOS DE PRUEBA	18
5. PROCESOS ECOTÓXICOS	20
6. BIOCONCENTRACION	21
6.1. <i>Potencial de bioconcentración y toxicidad de sustancias químicas</i>	23
6.2. <i>Bioconcentración de carbamatos</i>	24
6.3. <i>Uso de modelos compartimentales en ecosistemas acuáticos</i>	25
6.3.1. <i>Etapa en la construcción de modelos</i>	26
6.3.2. <i>Teoría de modelos de bioconcentración</i>	27
7. RELACION TOXOCINETICA-TOXODINAMICA	31
IX. HIPÓTESIS	33
X. OBJETIVOS	34
1. <i>Objetivo General</i>	34
1.1. <i>Objetivos particulares</i>	35

XI. MATERIAL Y METODOS	35
1. <i>Cuantificación del carbaril en muestras de agua</i>	36
2. <i>Determinación de la velocidad de degradación del carbaril en agua</i>	38
3. <i>Determinación del valor de CL₅₀ a 96 h del carbaril</i>	38
4. <i>Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL₅₀ del carbaril</i>	39
5. <i>Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas</i>	40
6. <i>Cinética de la bioconcentración-eliminación del carbaril y su efecto sobre la actividad de las acetilcolinesterasas de Pomacea patula</i>	40
6.1. <i>Curso temporal de la bioconcentración del carbaril en tejido (Bioconcentración-eliminación)</i>	40
6.2. <i>Preparación de las muestras para el ensayo enzimático de las acetilcolinesterasas</i>	42
6.2.1. <i>Determinación de la actividad de las acetilcolinesterasas (Método de Hestrin)</i>	42
6.3. <i>Determinación de proteína (Método de Bradford)</i>	43
6.3.1. <i>Determinación de proteína en las muestras tisulares de Pomacea patula</i>	43
6.4. <i>Determinación de lípidos (Método de fosfovainillina)</i>	44
6.4.1. <i>Determinación de lípidos en las muestras tisulares de Pomacea patula</i>	45
XII. RESULTADOS	46
1. <i>Determinación de la velocidad de degradación del carbaril en agua</i>	46
2. <i>Determinación del valor de CL₅₀ a 96 h del carbaril</i>	47
3. <i>Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL₅₀ del carbaril</i>	47
4. <i>Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas</i>	49
5. <i>Curso temporal de las concentraciones del carbaril en tejido (Bioconcentración-eliminación) y su efecto sobre la actividad de las acetilcolinesterasas en Pomacea patula</i>	49
XIII. DISCUSIÓN	55
1. <i>Velocidad de degradación del carbaril en agua sintética</i>	55
2. <i>Influencia del método experimental usado para determinar la toxicidad del carbaril</i>	56
3. <i>Toxicidad del carbaril en Pomacea patula</i>	57
4. <i>Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL₅₀ del carbaril</i>	57
5. <i>Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas</i>	58
6. <i>Factores de bioconcentración del carbaril y correlaciones con el coeficiente de partición, empleando datos de base bibliográfica</i>	59
7. <i>Relación de la cinética de bioconcentración-eliminación del carbaril y su efecto sobre las acetilcolinesterasas de Pomacea patula</i>	59
XIV. CONCLUSIONES	70

XV. APENDICES	73
<i>CL. Método de Probits (CL₅₀ a 96 h de carbaril)</i>	73
<i>P. Método de Bradford</i>	74
<i>L. Método de fosfovainillina</i>	75
<i>A1. Desarrollo de un método analítico para la determinación del carbaril en agua y tejido</i>	78
<i>A1-1. Introducción</i>	78
<i>A1-2. Objetivos</i>	79
<i>A1-3. Métodos</i>	79
<i>A1-3.1. Técnicas de extracción empleadas</i>	79
<i>A1-3.2. Elección de solventes para acondicionar los cartuchos de limpieza</i> ---	82
<i>A1-3.3. Eliminación del color de muestras de tejido</i>	
<i>A1-3.4. Procedimiento final para la cuantificación del carbaril, aplicado a diversos tejidos</i>	82
<i>A1-3.5. Cuantificación del carbaril en muestras de glándula digestiva</i>	83
<i>A1-3.6. Condiciones cromatográficas</i>	85
<i>A1-4. Resultados</i>	86
<i>A1-5. Discusión</i>	104
<i>A1-6. Conclusiones</i>	106
<i>A2. Validación del método analítico para determinar carbaril en muestras de agua y tejido</i>	107
<i>A2-1. Introducción</i>	107
<i>A2-1.1. Parámetros que determinan la validación de un método analítico</i>	107
<i>A2-2. Objetivos</i>	109
<i>A2-3. Métodos</i>	110
<i>A2-4. Resultados</i>	111
<i>A2-4.1. Linealidad del sistema</i>	111
<i>A2-4.2. Linealidad del método</i>	114
<i>A2-4.3. Exactitud y repetibilidad del método</i>	118
<i>A2-4.4. Límites de detección y cuantificación</i>	119
<i>A2-4.5. Precisión del método</i>	119
<i>A2-4.6. Criterios de aceptación para la linealidad</i>	121
<i>A2-4.6.1. Otros criterios para la linealidad del método</i>	122
<i>A2-4.7. Criterios de aceptación para la precisión del método</i>	122
<i>A2-4.8. Criterios para la exactitud y repetibilidad del método</i>	123
<i>A2-5. Discusión</i>	123
<i>A2-6. Conclusiones</i>	127
XVI. BIBLIOGRAFÍA	128
XVII. COPIA DE LA PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS	

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	Acetilcolina
ACHasa	Acetilcolinesterasa
ANDEVA	Análisis de varianza
C _{EE}	Concentración al estado estacionario
CL ₅₀	Concentración letal cincuenta
CV	Coefficiente de variación
DFP	di-isopropil-fluorofosfato
EI	Estándar interno
EFS	Extracción en fase sólida
FBC	Factor de bioconcentración
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Intervalo de confianza
K _e	Constante de eliminación
K _{oa}	Coefficiente de partición octanol/agua
LM	Linealidad del método
LS	Linealidad del sistema
MHD	Materiales húmicos disueltos
MOPSO	Acido sulfónico-3M-morfolino-2-hidroxipropano
OF	Organofosforados
2-PAM	Pralidoxima
PBC	Bifenilos policlorados
SNC	Sistema nervioso central
t _{1/2}	Tiempo de vida media

V. LISTA DE FIGURAS

Fig. No.	Título	Pág
1	Interacción de acetilcolina y la enzima acetilcolinesterasa.	10
2	Mecanismo de acción de carbamatos	12
3	Rutas principales del metabolismo del carbaril	14
4	Representación del modelo de un compartimiento para la bioconcentración de carbaril en el caracol <i>Pomacea patula</i>	28
5	Destino y reacciones de los plaguicidas en los organismos vivos	32
6	Tipo de jaula empleada para la contaminación del caracol <i>Pomacea patula</i>	36
7	Esquema de preparación de muestras de agua para la cuantificación del carbaril	37
8	Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL ₅₀ de carbaril en el caracol <i>Pomacea patula</i>	48
9	Cinética de bioconcentración y eliminación de carbaril en el caracol <i>Pomacea patula</i> .	50
10	Gráfica semilogarítmica de las concentraciones tisulares de carbaril en la glándula digestiva del caracol <i>Pomacea patula</i> versus tiempo	51
11	Cinética de bioconcentración-eliminación de carbaril y el efecto de inhibición de las acetilcolinesterasas en <i>Pomacea patula</i>	53
12	Relación lineal entre la actividad de acetilcolinesterasa y la concentración de carbaril en la glándula digestiva del caracol <i>Pomacea patula</i> , durante la fase de bioconcentración.	54
P-1	Curva estándar de proteína total.	74
L-1	Curva estándar de lípidos totales	76

CONTINUACION DE LISTA DE FIGURAS...

Fig. No.	Título	Pág
13	Esquema de preparación preliminar de muestras tisulares para cuantificar carbaril	81
14	Esquema de preparación final de muestras tisulares para cuantificar carbaril	84
15	Reacciones químicas del método EPA531, para determinar carbaril	86
V-1	Linealidad del sistema obtenida con 48 µg/mL de E.I.	111
V-2	Linealidad del método obtenida con 5 µg/mL de E.I.	115

VI. LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Título	Pág
1	Degradación de carbaril en agua sintética.	46
CL	Método de Probits (CL ₅₀ de carbaril a 96 h)	73
P-1	Cantidad de proteína en muestras de glándula digestiva de <i>Pomacea patula</i> durante el proceso bioconcentración-eliminación.	75
L-1	Cantidad de lípidos totales en muestras de glándula digestiva de <i>Pomacea patula</i> .	77
V-1	Alturas relativas de picos de carbaril/EI (5 µg/mL) determinadas para cada concentración de carbaril empleada (LS).	112
V-2	Resultados estadísticos de ANDEVA para constatar la (LS), 5 µg/mL de EI.	113
V-3	Alturas relativas de picos de carbaril/EI (48 µg/mL) determinadas para cada concentración de carbaril empleada (LS)	113
V-4	Resultados estadísticos de ANDEVA para constatar la (LS), 48 µg/mL de EI.	114
V-5	Datos de la cantidad de carbaril adicionada al tejido y la cantidad recuperada (LM), (5 µg/mL) de EI.	116
V-6	Manejo estadístico para sustentar la (LS), ANDEVA (5 µg/mL) de EI.	116
V-7	Alturas de picos de carbaril/EI (48 µg/mL) determinadas para cada concentración de carbaril empleada (LM).	117

CONTINUACIÓN DE LISTA DE TABLAS.....

Tabla No.	Título	Pág
V-8	Manejo estadístico para sustentar la (LM), ANDEVA (48 µg/mL) de EI.	117
V-9	Datos de recuperación para el análisis de carbaril en glándula digestiva.	118
V-10	Resultados de reproducibilidad para el estudio del efecto analista/día	120
V-11	Manejo estadístico para sustentar la reproducibilidad del método, ANDEVA.	121
V-12	Resumen de parámetros de validación del método analítico para determinar carbaril.	125

VII. LISTA DE CROMATOGRAMAS

Fig. No.	Título	Pág.
D-1	Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con cloroformo.	89
D-2	Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con cloruro de metileno.	90
D-3	Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con acetona en soxhlet.	91
D-4	Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con CHCl_2 en sonicador.	92
D-5	Cromatograma de carbaril sometido a sonicación por 15 min, con acetato de etilo.	93
D-6	Cromatograma de α -naftol sometido a sonicación por 15 min, con acetato de etilo.	94
D-7	Cromatograma de pie (blanco) tratado con acetato de etilo.	95
D-8	Cromatograma de intestino (blanco) tratado con acetato de etilo.	96
D-9	Cromatograma de glándula de albúmina (blanco) tratada con acetato de etilo.	97
D-10	Cromatograma de glándula digestiva (blanco) tratada con acetato de etilo.	98
D-11	Cromatograma de branquias (blanco) tratada con acetato de etilo.	99
D-12	Cromatograma de glándula digestiva de caracoles intoxicados durante 24 h con $0.09 \mu\text{g/mL}$ de carbaril	100
D-13	Cromatograma de tejido de branquias de caracoles intoxicados durante 24 h con $0.09 \mu\text{g/mL}$ de carbaril	101
D-14	Cromatograma de intestino de caracoles intoxicados durante 24 h con $0.09 \mu\text{g/mL}$ de carbaril.	102
D-15	Cromatograma de carbaril captado por la glándula digestiva de caracoles intoxicados con $1.49 \mu\text{g/mL}$ durante 24 h.	103

VIII. INTRODUCCION

Por miles de años el hombre ha considerado a los insectos como una plaga que había que destruir. La descripción de la plaga de la langosta en el libro del Exodo, del antiguo testamento, por ejemplo, atestigua la hostilidad histórica del hombre para con estas especies. Y efectivamente, desde que la agricultura empezó, invasiones de artrópodos han destruido en reiteradas ocasiones las cosechas del hombre.

Entre las plagas que inhiben el crecimiento de cosechas, las de insectos y de hongos, así como las de malas hierbas, son las más importantes y la idea de combatirlas con productos químicos no es del todo nueva.

No se puede negar que los plaguicidas han mejorado nuestras vidas, por la fácil asequibilidad y desde hace algún tiempo también, por su menor costo.

Las cosechas han sufrido menos pérdidas y en particular los estragos debidos a las enfermedades transmitidas por vectores, se han mitigado con las aplicaciones de agroquímicos, también ha habido, como resulta evidente, consecuencias desafortunadas en ocasiones para el medio ambiente, tales como la contaminación de los ríos y el surgimiento de especies resistentes. Además, el hecho de que algunos plaguicidas se acumulan en plantas y animales acuáticos, hace que sus efectos nocivos no sólo permanezcan, sino que sean de alta peligrosidad por su

carácter aditivo, que es posible detectar a lo largo de cadenas alimenticias (Turk, 1984).

En la actualidad en México, ya se encaminan esfuerzos tendientes a determinar la distribución y magnitud de la contaminación de origen agrícola, los mecanismos a través de los cuales actúan los plaguicidas sobre la fisiología de los organismos y de los daños potenciales que pueden producir al incorporarse a los ecosistemas (SEMARNAP, 1996).

1. FUENTES DE PLAGUICIDAS EN AGUA

Aún cuando la importancia relativa de las diferentes fuentes de plaguicidas en agua pueda diferir de la de suelos, las rutas de entrada son las mismas, involucrando tanto aplicaciones intencionales como no intencionales.

1.1. Aplicaciones intencionales

Los plaguicidas son usados para el control de malas hierbas y el crecimiento exagerado de algas en estanques y arroyos; para el control de insectos, mosquitos, larvas, depredadores de peces de utilidad económica; para remover desechos de peces o peces enfermos, antes de la restauración de estanques. Cada uno de esos procedimientos puede resultar en la contaminación de las aguas superficiales y el grado y duración son funciones de las condiciones del medio ambiente acuático y de la naturaleza del plaguicida involucrado.

1.2. Aplicaciones no intencionales

Las aguas son contaminadas en la misma forma como los suelos a través de la aspersión de plaguicidas durante la aplicación o la caída de la lluvia y polvo. Adicionalmente, el agua puede contaminarse a través de la erosión del suelo, efluentes industriales, aguas negras y ocasionalmente por derrames. Con la excepción de la acción atmosférica, muchas de esas contaminaciones son locales.

2. CARBAMATOS

Los carbamatos son compuestos orgánicos de síntesis. Una de sus características fisicoquímicas principales es la descomposición en la naturaleza, en una escala de tiempo que se mide en días o semanas, en lugar de años como los organoclorados. La desaparición rápida ofrece grandes ventajas, porque estos materiales presentan una menor tendencia a propagarse y moverse a lo largo de las cadenas alimenticias.

El carbaril es uno de los plaguicidas más utilizados en nuestro país, principalmente en los distritos de riego. Este compuesto es un insecticida de contacto con pocas propiedades sistémicas y de amplio espectro de actividad, efectivo contra muchos insectos plaga de frutales, hortalizas y algodón; sirve para el control de lombrices de tierra e insectos en céspedes.

2.1. Características fisicoquímicas del carbaril

SINONIMOS: Acido carbámico, metil, 1-Naftil ester, ácido metil carbámico-1-naftil ester, 1-naftil metil carbamato; Sevin.

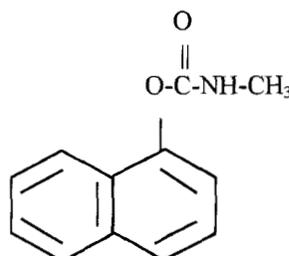
FORMULA QUIMICA: $C_{12}H_{11}NO_2$

PESO MOLECULAR: **201.14**

DESCRIPCION FISICA: **Polvo cristalino sólido, inodoro.**

PUNTO DE FUSION: **142°C**

SOLUBILIDAD: **Agua 40 mg/L a 30°C, soluble en muchos solventes orgánicos.**



2.1.1. Transformaciones abióticas

La persistencia de un compuesto depende de su estructura química, solubilidad en agua y biodegradabilidad.

La literatura contiene una gran cantidad de información sobre la solubilidad en agua, velocidad de hidrólisis y otras propiedades químicas de los plaguicidas. Para carbaril por ejemplo, se menciona que tiene una $t_{1/2}$ de 5 días en agua, pero pruebas en laboratorio utilizando agua destilada, indicaron que, aunque el químico se degradó rápidamente a pH's arriba de 8, éste fue más estable a pH 6.3 con $t_{1/2}$ de varios meses (Kuhr y Dorough, 1976).

Se conoce que el contenido de sal de aguas naturales (fuerza iónica) puede afectar la velocidad de hidrólisis de los carbamatos. Demostrándose que el carbaril es más estable a la hidrólisis en aguas con alto contenido de sal, que en aguas dulces (WHO, 1994).

Hay suficiente evidencia que sugiere, que la fotodescomposición puede provocar alguna pérdida de carbaril en aguas con superficies claras, que son expuestas a la luz solar por períodos prolongados. En aguas turbias la penetración es altamente restringida y la fotólisis desempeña un papel menor en la descomposición de este xenobiótico (WHO, 1994).

2.1.2. Transformaciones bióticas

Un gran número de plantas y animales intervienen en la degradación de plaguicidas a través de una variedad de rutas. De todos los grupos implicados en degradaciones directas, los microorganismos son de los más importantes. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis del carbaril en condiciones de pH neutras y ligeramente básicas fue mucho más rápida que la determinada en agua esterilizada. Por lo que se ha considerado que la degradación de carbaril por los microorganismos en agua natural tiene un papel secundario si se compara con la hidrólisis química. (París y Lewis, 1973).

Se ha determinado la velocidad de degradación del carbaril a pH 6.8, tanto con bacterias obtenidas del sedimento de un lago, como sin ellas. Sin microorganismos, la $t_{1/2}$ de carbaril obtenida bajo condiciones aeróbicas fue de 8.3 días y en anaeróbicas de 15.3 días. Con la adición de bacterias la $t_{1/2}$ fue de 6.8 y 5.8 días respectivamente. Después de introducir al medio glucosa y peptona, la $t_{1/2}$ fue reducida aún más a 3.8 y 4.2, lo que indica que la degradación bacteriana es más importante para la estabilidad del carbaril en situaciones de anaerobiosis. (Liu y col, 1981).

Los materiales húmicos disueltos (MHD) son componentes ubicuos del sistema acuático que pueden afectar la disponibilidad y la toxicidad en el medio. Estos materiales constituyen del 60 al 80% del total de compuestos orgánicos en aguas superficiales, sedimentos y suelos. Pueden formar complejos con contaminantes orgánicos e inorgánicos, afectando las características fisicoquímicas de lo mismos. Los mecanismos implicados no son claros y varían dependiendo de la naturaleza del xenobiótico y la composición general del medio acuático. En algunos casos, el enlazamiento de los tóxicos orgánicos a los MHD, puede aumentar su solubilidad en agua. En un estudio realizado por Benson y Long (1991) se demostró que la interacción (carbaril-MHD), aumentó la toxicidad del plaguicida. Sin embargo, la toxicidad fue afectada por el tiempo de interacción y la concentración de MHD.

2.2. Toxicología de carbamatos

La acetilcolina (ACH) es un importante neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como en el periférico de vertebrados. Un gran número de fibras periféricas del sistema nervioso autónomo la sintetizan y liberan; estas se denominan fibras colinérgicas, es decir, actúan mediante la liberación de dicha sustancia. Entre ellas se encuentran todas las fibras eferentes preganglionares y las fibras motoras somáticas (no autonómicas) que inervan el músculo esquelético. Así pues, casi todas las fibras eferentes que salen del sistema nervioso central son colinérgicas. Además, todas las fibras parasimpáticas posganglionares y algunas fibras simpáticas posganglionares también son colinérgicas.

Las terminales de las neuronas colinérgicas contienen gran número de pequeñas vesículas envueltas por membranas que se concentran cerca de la porción sináptica de la membrana celular. Estas vesículas contienen acetilcolina en alta concentración así como otras moléculas (por ejemplo péptidos) que posiblemente pueden actuar como cotransmisores del impulso nervioso.

La mayor parte de la ACH es sintetizada en el citoplasma a partir de la colina y la acetilcoenzima A (acetilCoA) mediante la acción catalítica de la enzima colina acetiltransferasa. La AcetilCoA es sintetizada en las mitocondrias, las cuales se encuentran en gran número en las terminaciones nerviosas. La colina es transportada mediante un mecanismo de membrana desde el líquido

extracelular hasta la terminal de la neurona. El almacenamiento de la ACH en vesículas se logra mediante el empaquetamiento de "quanta" de moléculas de ACH, por lo general 1,000 a 50,000 moléculas por "quantum".

La liberación del transmisor ocurre cuando un potencial de acción llega a la terminal y desencadena la entrada de suficientes iones Ca^{+2} . Se cree que el aumento en la concentración de Ca^{+2} desestabiliza las vesículas de almacenamiento. Luego ocurre la fusión de las membranas vesiculares con la membrana terminal, dando lugar a la expulsión exocítica de varios centenares de quanta de moléculas de ACH y de cotransmisor hacia la hendidura sináptica.

Se desconoce el papel fisiológico del cotransmisor. Después de ser liberadas por la terminal presináptica, las moléculas de ACH pueden unirse a un receptor colinérgico (colinoceptor) y ser activado. Generalmente con mucha rapidez, toda la ACH liberada se difunde hasta llegar al alcance de una molécula de acetilcolinesterasa (ACHasa), la cual degrada de manera eficaz a la ACH produciendo colina y acetato, y con ello termina la acción del transmisor (Katzung, 1991).

2.3. Mecanismo de acción de carbamatos

El carbaril pertenece a los compuestos con acción anticolinesterásica, estructuralmente análogo a los carbamatos terapéuticos: fisostigmina y neostigmina. Debido a su estructura relativamente simple, es un compuesto modelo para estudios

toxicológicos y metabólicos representativos del grupo carbamato. Su modo de acción es similar a los organofosforados.

Por otra parte, el mecanismo de toxicidad mas aceptado para los insecticidas carbámicos implica la inhibición de enzimas esterasas de tipo B, que son las que hidrolizan esterres con radicales alquílicos y se inhiben con los organofosforados.

La enzima colinesterasa posee en su estructura proteica, una parte responsable de la actividad catalítica, denominada sitio activo que consta de dos subsitios. Cada uno juega un papel importante para explicar la afinidad por sustratos catiónicos y por sus inhibidores, sobre todo para compuestos que poseen un átomo de nitrógeno cargado positivamente unido a grupos metilo y etilo. Se ha postulado la combinación de estos sustratos a la enzima en los dos subsitios distintos en el centro activo. El primero de ellos, el lugar aniónico, es una región de la superficie de la molécula cargada negativamente, que se combina con la carga positiva del átomo de nitrógeno cuaternario del sustrato mediante una interacción principalmente hidrofóbica. El segundo sitio esteárico parece combinarse con el grupo carboxílico del enlace éster y es el responsable de la afinidad y la hidrólisis del sustrato, Figura No. 1.

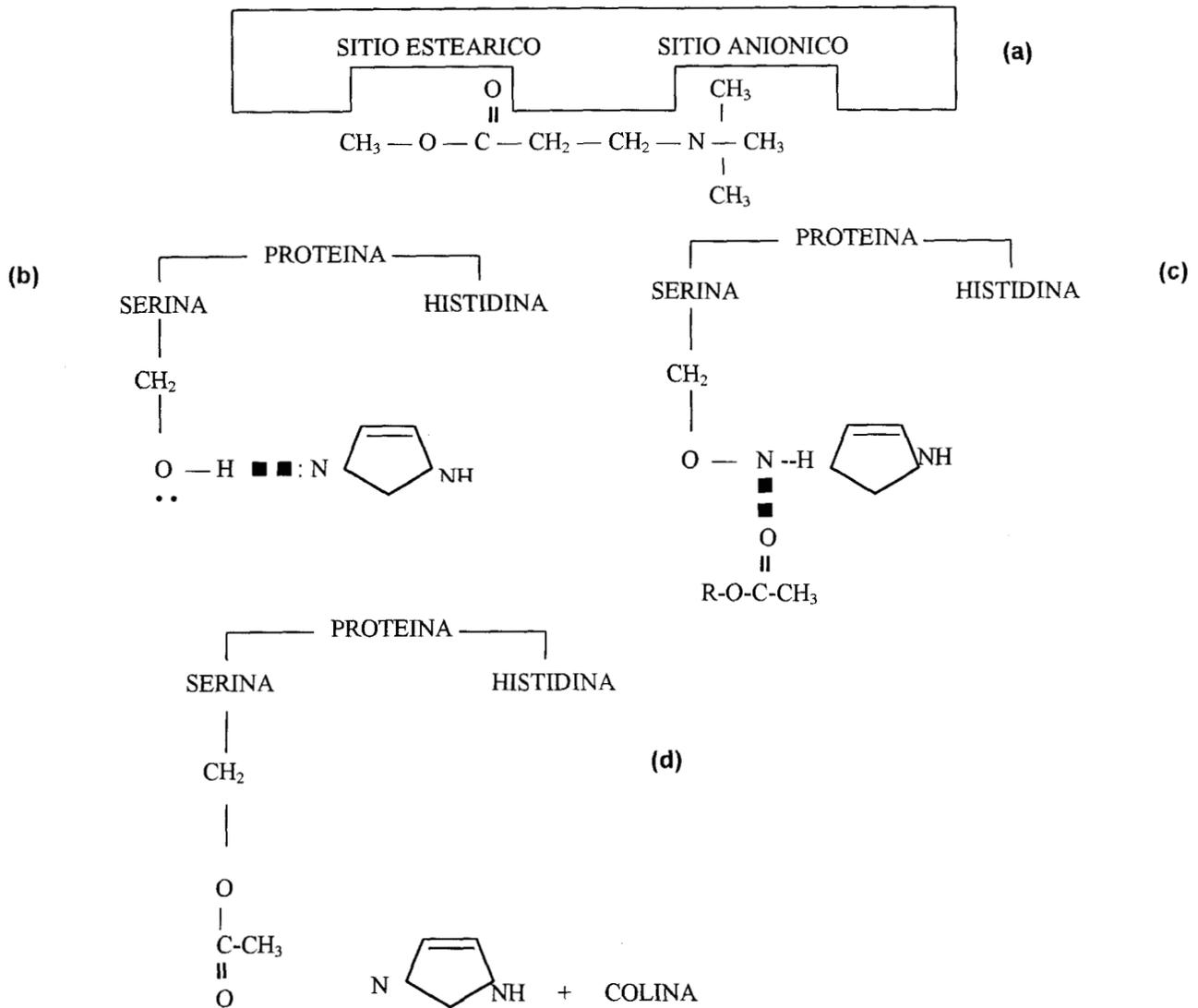


Figura No. 1. Interacción de acetilcolina y la enzima acetilcolinesterasa

Acetilcolinesterasa: Una representación de la estructura de la enzima con: a). Interacción en el sitio aniónico y esteárico de la acetilcolina, b). Centro esteárico con la presencia de dos restos de aminoácidos (histidina y serina), c). Ataque nucleofílico del sustrato sobre la enzima, d). Acetilación de la acetilcolinesterasa, con hidrólisis del sustrato.

La hidrólisis de la ACH en el centro esteárico se produce por la intervención de dos restos de aminoácidos la histidina y serina. En reposo el OH de la serina establece un enlace con el N imidazólico de la histidina, con desplazamiento del protón de Ser a His y se postula la participación de un residuo de aspartato, constituyendo una triada catalítica. Así es posible la formación de un puente de hidrógeno desde el N de la His al O insaturado de la ACH. Lentamente el O alcohólico de la Serina realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace acilo oxígeno de la ACH, originando la hidrólisis y esterificación de la serina (acetilación). Posteriormente la hidrólisis del nuevo éster regeneraría la enzima (desacetilación). De manera similar para la actividad anticolinesterásica, parece que los carbamatos requieren de un grado de semejanza estructural con la ACH, por lo que estos compuestos compiten fuertemente con ella por los sitios reactivos en la ACHasa. La estabilidad del complejo enzima-inhibidor, depende de la complementariedad del plaguicida con el sitio blanco (Kolbezen y col, 1954). Los carbamatos que tienen menor complementariedad con el sitio activo, pueden removerse más fácilmente, dando lugar a la reactivación de las ACHasas. Si estos complejos no se disocian desde el sitio activo, un ataque nucleofílico del grupo éster (localizado en el sitio esterático en la enzima) o en el grupo carbonilo de la molécula de carbamato puede ocurrir, obteniéndose una enzima carbamilada estable y un grupo saliente (Kallander y col., 1997), ver Figura No. 2

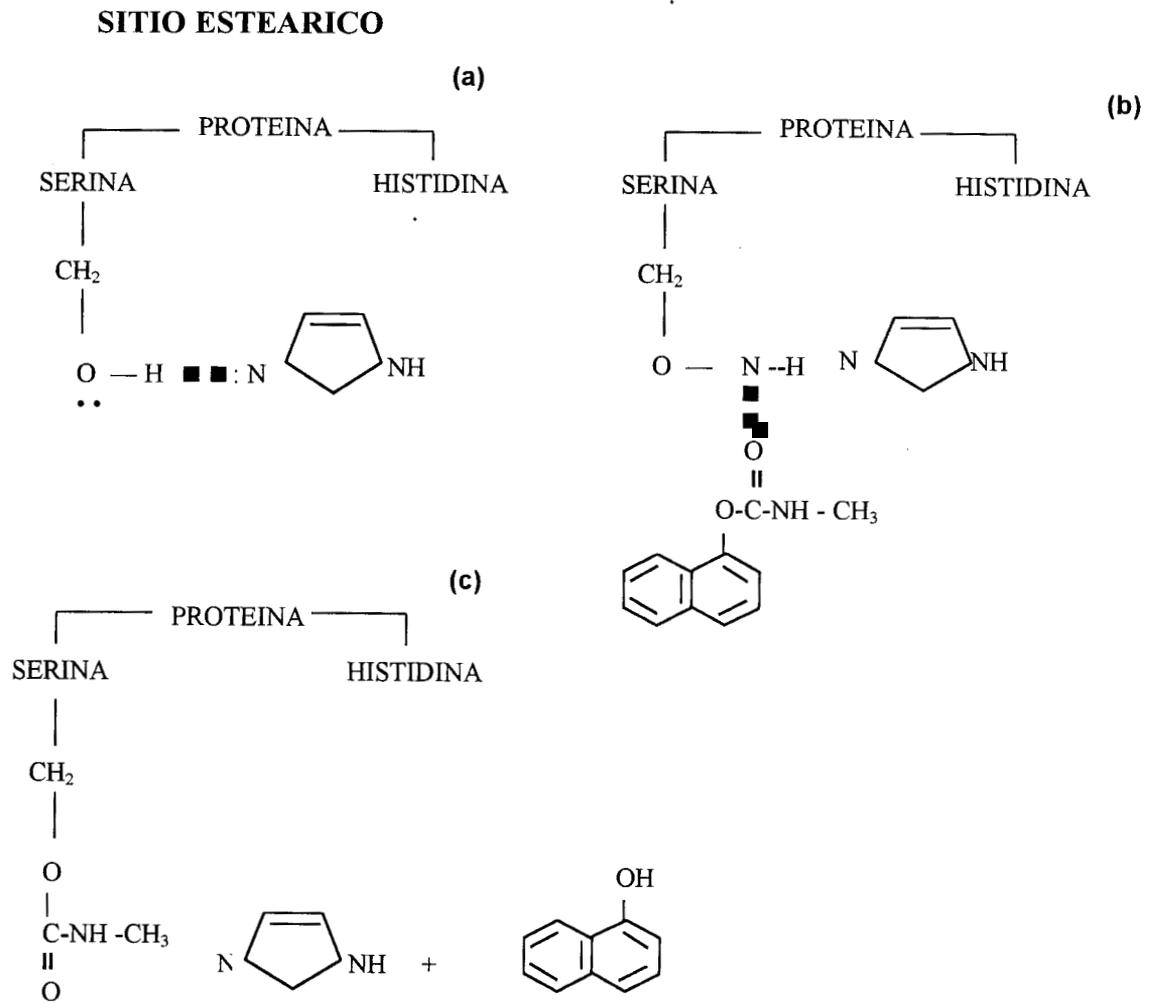


Figura No. 2.
Mecanismo de acción de carbamatos

Acetilcolinesterasa: Una representación de la enzima para ilustrar: a). El sitio esteárico libre, b). Formación de un puente de hidrógeno entre el N de histidina y el O del carbaril c). Carbamilación del grupo serina e hidrólisis de la molécula.

Generalmente, la velocidad de descomposición hidrolítica de la enzima carbamilada está en situación intermedia entre la enzima acetilada y la fosforilada.

Los signos y síntomas de intoxicación por el carbaril, son típicamente colinérgicos, con lagrimación, salivación, miosis, convulsiones y muerte.

Para carbaril y otros carbamatos, se recomienda el sulfato de atropina como antídoto para el envenenamiento. La administración de pralidoxima (2-PAM) que se usa generalmente en el tratamiento de intoxicación por organofosforados, no se recomienda en el tratamiento de envenenamiento por carbamatos, incluso hay reportes de que el 2-PAM aumenta la toxicidad de carbaril (Larrel y col. 1989).

2.4. Metabolismo de carbamatos

Los carbamatos se metabolizan por medio de dos mecanismos básicos; (ambos implican una descomposición del enlace éter carbamato), un ataque esterasa directo (vía a), o por la oxidación inicial por oxidasas de función mixta (MFO) seguida de un rompimiento hidrolítico de un intermediario inestable (vía b). Ver Figura No. 3.

La hidrólisis de carbaril a α -naftol es la principal ruta. El insecticida es metabolizado por las enzimas localizadas en el retículo endoplásmico liso, para formar 4 hidroxicarbaril, 5 hidroxicarbaril, 5,6 dihidro-5,6,-dehidroxicarbaril y 1-naftil-N-hidrometil carbamato.

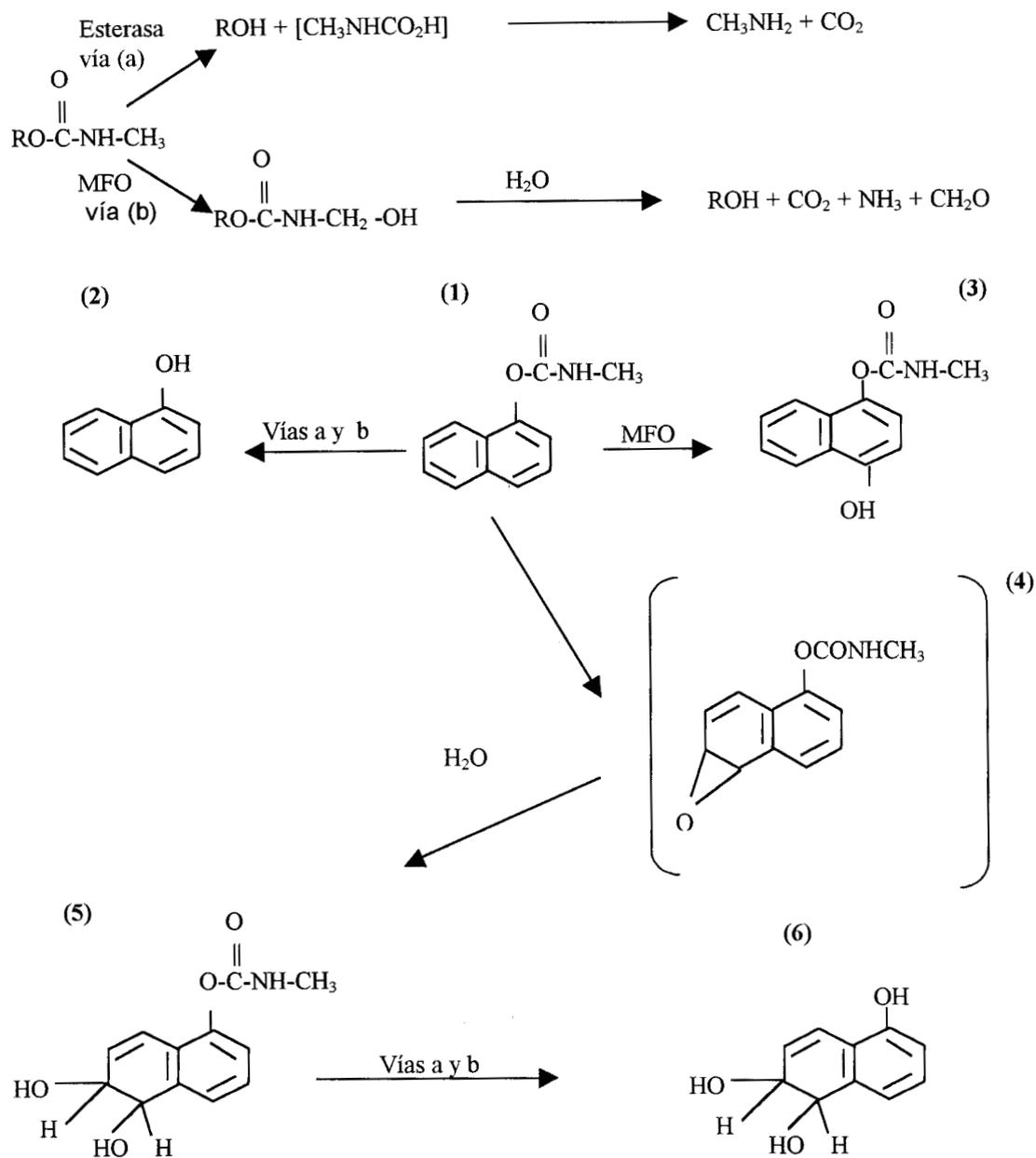


Figura No. 3. Rutas principales del metabolismo del carbaril

Vía (a) ataque de esterasas directo, vía (b) ataque por oxidación de función mixta, MFO. El carbaril (1) a través de vía a y b, es metabolizado a α naftol (2) y el compuesto hidroxilado (3). Se postula la formación de un grupo epoxi (4), la apertura del anillo da lugar al diol (5), subsecuente metabolismo por vía a y b genera el diol fenólico (6).

Muchos animales excretan entre 65 y 75% de la radioactividad derivada de carbaril (1-naftil¹⁴ C) en la orina después de 24 h. La principal diferencia entre varias especies estudiadas es el grado de rompimiento de carbaril a α -naftol (Knaak y col., 1968). Los tejidos hepáticos han demostrado hidrolizar y conjugar carbaril.

Los N-hidroxil- metil derivados de N-metilcarbamatos como carbaril y propoxur son suficientemente estables y pueden aislarse de mezclas de microsomas incubados; sin embargo, estos derivados son una vía menor en el metabolismo. La hidrólisis de los carbamatos resulta invariablemente en la pérdida de su actividad anticolinesterásica, pero los productos de oxidación que son formados por enzimas microsomales pueden presentar alguna actividad anticolinesterásica y no necesariamente son menos tóxicos que el compuesto original (Oonnithan y Casida, 1968).

Las reacciones hidrolíticas con carbamatos son catalizadas por carboxilesterasas. Los productos carecen de actividad anticolinesterásica. Las reacciones oxidativas se llevan a cabo por el citocromo P₄₅₀, familia de enzimas localizados en el retículo endoplásmico del hígado y tejidos extrahepáticos. La etapa inicial en el proceso oxidativo consiste en el enlazamiento del sustrato a la forma oxidada del citocromo P₄₅₀, que da lugar a un cambio espectral de tipo I o tipo II. Los sustratos tipo I exhiben una absorbancia espectral con un máximo a 385-390 nm y un mínimo aproximadamente 420nm.

Aquellos sustratos que se enlazan a mitocondrias hepáticas y exhiben un máximo a 420 – 435nm y a través de 390-410 nm se denominan sustratos tipo II. Cuando el carbaril se agrega a microsomas hepáticos de ratas no tratadas, se obtiene un débil espectro tipo I. Los metabolitos procedentes de la hidrólisis y oxidación de carbamatos son excretados como glucurónidos y sulfatos. El grado relativo de formación de glucuronidos y sulfatos con los carbamatos, depende del sustrato, especie y dosificación. Ambas vías conjugativas son saturables (Knight y col., 1986).

3. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE COLINESTERASAS EN ORGANISMOS ACUATICOS

Habig y DiGiulio (1991), presentan un resumen de tópicos a este respecto: La ACH tiene un papel esencial pero diferente en vertebrados e invertebrados. Las colinesterasas representan el sitio de acción tanto para organofosforados como para carbamatos, debido a su papel de remoción de exceso de ACH por hidrólisis.

En invertebrados, el papel de la ACH como neurotransmisor está menos claro. Patrones de inervación y funciones han sido estudiados principalmente en artrópodos y moluscos. En contraste con los vertebrados, los crustáceos tienen tanto motoneuronas excitatorias como inhibitorias (neuronas periféricas) que utilizan otros transmisores. La ACH parece funcionar principalmente como un transmisor para fibras sensoriales aferentes.

Dentro de los crustáceos, el tejido neural de cangrejos (ganglios) tiene principalmente ACHasa verdadera, en otras especies como las langostas se ha localizado a esta enzima y a la butirilcolinesterasa. Las ACHasas son enzimas enlazadas principalmente a las membranas. Las fracciones subcelulares de tejidos neurales de cangrejos indican que mucha de la actividad de la ACHasa se asocia con las fracciones sinaptosomales y microsomales, mientras que en las fracciones citosólicas, la actividad es muy baja.

En caracoles terrestres se ha informado de una alta actividad de colinesterasas en hemolinfa. En cefalópodos y bivalvos, se ha detectado la presencia de estas enzimas con actividad moderada.

Adicionalmente, estudios recientes con el cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*), revelaron diferencias en propiedades bioquímicas de sus respectivas ACHasas. Estas propiedades incluyen especificidad de sustratos, perfiles de actividad-pH, solubilización de enzimas enlazadas a la membrana, Kms y la sensibilidad *in vitro* hacia inhibidores. Las enzimas neuronales del cangrejo presentaron mayor capacidad para hidrolizar sustratos alternativos que las del pez. La afinidad de las ACHasas del cangrejo fueron mayores para el sustrato acetiltiocolina, comparativamente con las del pez. Las enzimas de este crustáceo fueron también más sensibles a varios inhibidores. La diferencia en el tiempo de reactivación de la enzima entre carbamatos y organofosforados (OF), tiene implicaciones en el uso de la actividad de las ACHasas como monitor biológico,

porque la enzima inhibida por carbamatos, sufre una reacción más rápida, permitiendo así diferenciar entre estos tóxicos. En el caso de los OF el tiempo de recuperación muy grande de la enzima sugiere que, este parámetro depende principalmente de la síntesis de nuevas enzimas. (Edwards y Fisher, 1991).

Es de interés observar como la vida media ($t_{1/2}$) de diversos compuestos, varía con el tipo de órgano blanco e inhibidores de la ACHasa *in vivo*, tal es el caso del organofosforado di-isopropil-fluorofosfato (DFP) que presenta una $t_{1/2}$ alta muy similar en el cerebro y músculo de pez, pero en el hígado el valor de este parámetro disminuye en forma significativa. En los cangrejos la $t_{1/2}$ obtenida de ganglios es comparable a la del tejido neural y muscular del pez. Sin embargo, en los crustáceos no hay diferencia entre el tejido ganglionar con la del hepatopáncreas, que es un órgano con funciones similares al hígado de peces. Este hecho puede relacionarse con el metabolismo más lento de compuestos organofosforados en el hepatopáncreas. De esta manera, aunque la $t_{1/2}$ de un xenobiótico puede ser considerablemente diferente entre peces y cangrejos, debido a un metabolismo mayor en hígado y riñón de los primeros, la $t_{1/2}$ en tejidos blanco como el neural es similar en ambas especies. (Edwards y Fisher, 1991).

4. ORGANISMOS DE PRUEBA

Los gasterópodos son la clase más amplia entre los moluscos. Se han descrito varios miles de especies vivientes, aceptando que éstos animales están ampliamente

distribuidos en ecosistemas de agua dulce, donde a menudo representan la comunidad más productiva.

En la vertiente del Golfo de México, formando parte de la fauna silvestre de ríos, embalses y lagunas, se encuentra distribuido el caracol dulceacuícola denominado "teogolo" del género *Pomacea*, y cuyas características morfológicas y organolépticas le hacen una especie de alta demanda en la región, destinándose para autoconsumo en algunos lugares de los estados de Veracruz y Tabasco y específicamente en Catemaco, donde es una fuente de ingresos económicos, ya que constituye un recurso explotable a nivel comercial (Carreón, 1998).

Además de estas características, otras de tipo fisiológico y bioquímico en primera instancia como las que se mencionan a continuación, parecen sugerir el uso de este tipo de moluscos como candidatos potenciales en estudios toxicológicos. Kerkut y Cottrell (1963), reportaron la presencia y el papel de ACH e hidroxitriptamina en el cerebro del caracol *Helix spp.* Singh y Agarwal (1981), informaron que el mexacarbato (carbamato) tiene alta actividad anticolinesterásica en el caracol *Pila globosa* (Swainson). Fisher y Lohner (1984), mencionan que *Helisoma spp* metaboliza el carbaril en una proporción más baja que otros organismos, entre ellos la larva *Chironomus riparius*, el pez *Gambusia affinis* y el alga *Oedogonium cardiacum*, concluyéndolo que el caracol es una especie susceptible para el monitoreo ambiental de la contaminación por carbamatos. Otro estudio demostró

el efecto de ésteres de colina, pilocarpina y serotonina sobre el corazón del gasterópodo *Pomacea lineata* (Spix) (Sampaio y col, 1988). Algunas técnicas han evidenciado la organización del sistema nervioso en el gasterópodo Prosobranquia *Concholepas concholepas* (Bruguiere) y puesto de manifiesto la actividad de las ACHasas, así como las propiedades de las enzimas, tales como: especificidad, coeficiente de sedimentación y solubilidad (González y col., 1990). Se ha demostrado que la glándula digestiva del molusco *Mytilus galloprovincialis*, es una fuente de actividad esterásica, condición que permite emplearlo para evaluar la exposición ambiental a organofosforados y carbamatos (Ozretic y Krajnovic-Ozretic, 1992).

5. PROCESOS ECOTOXICOS

En el marco de la ecología, la ecotoxicología es el estudio de ciertas sustancias o sus productos de degradación sobre el funcionamiento de los ecosistemas.

Una vez que los contaminantes alcanzan el ambiente acuático, ya sea a través de las emisiones atmosféricas, terrestres o bien mediante la descarga directa de efluentes, pueden estar sujetos a una serie de procesos de distribución y transporte, los cuales condicionan el destino de las sustancias en el sistema (Connell, 1987).

La valoración del efecto de un contaminante según Repetto (1995), debe tener en cuenta en términos cuantitativos, una serie de factores como son:

- a) Lugar, naturaleza y proporciones relativas (concentraciones) de la emisión contaminante.
- b) Transporte geográfico y alteraciones consecuentes a los mecanismos físicos implicados (adsorciones, absorciones, retenciones, diluciones, concentraciones, etc.).
- c) Transformaciones químicas de naturaleza abiótica (hidrólisis por la humedad, oxidaciones por el aire y la luz ultravioleta, condensaciones fotoquímicas, etc.).
- d) Biotransformaciones a su paso por los diferentes organismos del ecosistema (biodegradación) y bioacumulación a lo largo de las cadenas tróficas.
- e) Incidencia de la exposición sobre los organismos, poblaciones o comunidades críticas.
- f) Respuesta de los organismos a lo largo del tiempo.

6. BIOCONCENTRACION

La distribución de los contaminantes en el medio ambiente acuático, puede dar lugar a su acumulación en los sustratos bénticos, en la columna de agua y en los organismos. La captación corporal de xenobióticos por la fauna acuática se realiza a través de contacto directo, respiración (de aire o agua) e ingestión de alimento.

Varios términos definen esos procesos: la bioconcentración se refiere a la acumulación neta de un compuesto directamente desde agua por el organismo

acuático, considerando simultáneamente la captación (ejemplo, branquias o tejido epitelial) y eliminación; bioacumulación se utiliza para describir el aumento de concentración del xenobiótico en un organismo, a través de todas las rutas posibles incluyendo el alimento y la biomagnificación, se relaciona con un enriquecimiento del compuesto a lo largo de una cadena trófica, desde un nivel menor a uno más alto.

El fenómeno de bioconcentración se cuantifica empleando el factor de bioconcentración (FBC). El FBC de un xenobiótico puede definirse como el coeficiente de partición al equilibrio del contaminante entre el organismo, o en un tejido en concreto y el medio ambiente. Varios intentos se han hecho para correlacionar el FBC con propiedades fisicoquímicas intrínsecas en sistemas acuáticos. Algunos relacionados con la solubilidad del agua (Chiou 1985; Geyer y col., 1982) y otros, con el coeficiente de partición 1-octanol/agua (K_{oa}) para diferentes organismos. Diversos autores encontraron expresiones muy similares de correlaciones lineales entre el log del FBC y el log de K_{oa} . (Neely y col., 1974; Hawker y Connel, 1986). En general, los compuestos que presentan correlación entre estos parámetros poseen un log K_{oa} de 2 a 6.5.

Cuando el FBC es del orden de uno, o menos, se evidencia que la sustancia en cuestión no experimentó bioconcentración, los FBC menores a 10 se consideran de bajo nivel de concentración, los de 10-100 son de carácter intermedio y los FBC mayor de 100 se califican de alto potencial de bioconcentración.

El conocimiento de los FBC, puede ser útil en la evaluación de los riesgos en la salud de los organismos, expuestos a contaminantes ambientales por largo plazo.

6.1. Potencial de bioconcentración y toxicidad de sustancias químicas

La dinámica de bioconcentración es una clave importante en la distribución ambiental y ruta de tóxicos de baja reactividad, caracterizados por su alta lipofilicidad (ejemplo, plaguicidas organoclorados).

Por absorción directa del medio o a través de las cadenas tróficas, las sustancias químicas siguen un proceso toxocinético en los seres vivos que en muchas ocasiones, conducen a una captación en los órganos corporales. Este proceso está en función de las características fisicoquímicas de la sustancia, sobre todo, de la liposolubilidad, ya que favorece la absorción y fijación en varios tipos de tejidos, especialmente los grasos, a la par que disminuye su hidrosolubilidad y posibilidad de excreción por vía urinaria, (Gaggi y col., 1992).

Además, el grado de bioconcentración potencial depende de muchos factores del individuo, tales como: la temperatura, el estado fisiológico que varía con el sexo y la estación, así como la biomagnificación potencial que aumenta con el nivel trófico, por ejemplo, organismos pequeños que tienen una gran área superficial/volumen, puede esperarse que absorban contaminantes más rápido que los de mayor tamaño (Newman y McIntosh, 1983).

Existen varios tipos de relación entre la concentración final alcanzada por el organismo y la existente en el medio ambiente, que no dependen del proceso de absorción, sino de su habilidad para excretar contaminantes:

La velocidad de excreción del tóxico por el organismo es proporcional a la carga corporal, a medida que se incrementa la captación y los niveles corporales, sucede lo mismo con la excreción. (Schulz-Baldes, 1974).

El organismo almacena el tóxico en mayor proporción comparativamente con la velocidad de excreción (Bryan y Hummerstone, 1978).

El organismo excreta el tóxico en mayor proporción como respuesta a cualquier entrada adicional del mismo, desde el medio ambiente (Bryan, 1979).

6.2. Bioconcentración de carbamatos

Debido a que la toxicidad crónica de los carbamatos es baja y raramente se alcanzan concentraciones altas en el medio ambiente acuático, el daño de estos compuestos es menospreciado. Sin embargo, es necesario considerar que son xenobióticos inhibidores de la colinesterasa a concentraciones subletales y aún cuando los compuestos originales han desaparecido, sus productos de degradación o metabólicos continúan inhibiendo la enzima.

6.3. Uso de modelos compartimentales en ecosistemas acuáticos

Un enfoque de modelos en ecosistemas acuáticos, se basa en el principio de sobreposición lineal, el cual se aplica a sistemas que cambian proporcionalmente con la concentración del contaminante. Muchos procesos que controlan el destino de los xenobióticos son lineales y se gobiernan por la ley de Fick, lo que permite establecer el modelo en base a los flujos e intercambio de material en los compartimientos (Swartzman y Kaluzny, 1987). El compartimiento se define como un medio ambiental u organismo en el cual el tóxico se distribuye uniformemente.

Existen varios ejemplos de la aplicación de modelos en el área acuática, Soon y Erstfeld en 1997, desarrollaron un modelo para simular la biocumulación de tóxicos en diferentes condiciones de exposición de organismos bénticos, para los cuales el sedimento juega un papel muy importante en la biodisponibilidad. Este concepto se empleó para predecir la distribución de compuestos en las cadena tróficas, así como la captación y la eliminación desde cuerpos acuáticos (Cohen y col., 1990).

Existe la necesidad de conocer el comportamiento de un plaguicida introducido al ecosistema y conjuntar los resultados cuantitativos obtenidos para el compuesto dentro de un sistema predictivo. Los componentes pueden ser manejados con ecuaciones causa-efecto, empleando un diagrama de sistemas que permite el rearreglo en distintas relaciones y con la ayuda de la computadora se puede

obtener el mejor ajuste del modelo, introduciendo las funciones de entrada seleccionadas. (Simon y col., 1998).

Conjuntamente con el uso de modelos se emplean métodos analíticos que ayudan a la identificación, estimación de parámetros, análisis de sensibilidad y validación. A su vez, se puede lograr la estandarización, lo cual facilita la selección de modelos más adecuados para diagnosticar el comportamiento del compuesto en situaciones medioambientales específicas.

6.3.1. Etapas en la construcción de modelos

Generalmente, el conocimiento de axiomas hace posible proponer varios modelos concebidos físicamente que tipifican el sistema bajo estudio. Ya que el propósito del modelo es permitir la elección de una sola opción, con una descripción de la misma, esto da lugar a un procedimiento interactivo que comprende las siguientes cinco etapas sucesivas:

9. Identificar el propósito del modelo.
10. Proponer modelos para representar el sistema.
11. Con la calibración y técnicas de estimación de parámetros, además de datos experimentales sobre el sistema, se encuentran los estimados para los parámetros desconocidos en todos los modelos propuestos.

12. Comparar los modelos identificados con un conjunto de datos adicionales, pero de forma independiente. Aplicando técnicas estadísticas (ejemplo: bondad de ajuste de los métodos, análisis residual y pruebas de hipótesis), uno puede decidir cual de los modelos propuestos es tolerable, si no, se continúa con el proceso.
13. Tratar de indicar imperfecciones particulares en el modelo seleccionado y postular uno nuevo con mejor ajuste, lo que hace necesario regresar a la segunda etapa y continuar.

Es claro de acuerdo al esquema anterior, que la tarea de encontrar un modelo confiable se basa en el sistema analítico y técnicas estadísticas, también como en la existencia de un amplio conjunto de datos experimentales y de campo (De Greef, 1993)

6.3.2. Teoría de modelos de bioconcentración

La técnica más simple para modelar la dinámica de los xenobióticos es tratar a los organismos como un solo compartimiento. La captación del tóxico desde el agua es la única entrada y se asume que este proceso es proporcional a la concentración del mismo en el medio de exposición. El compuesto en estudio se distribuye de manera instantánea y homogénea, conformando un compartimiento que tiene la misma disponibilidad para la depuración. La velocidad de depuración, independientemente del mecanismo, se considera que es de primer orden. Para este modelo, el volumen

permanece como un parámetro constante. (Spacie y Hamelink, 1985). Ver Figura No. 4.

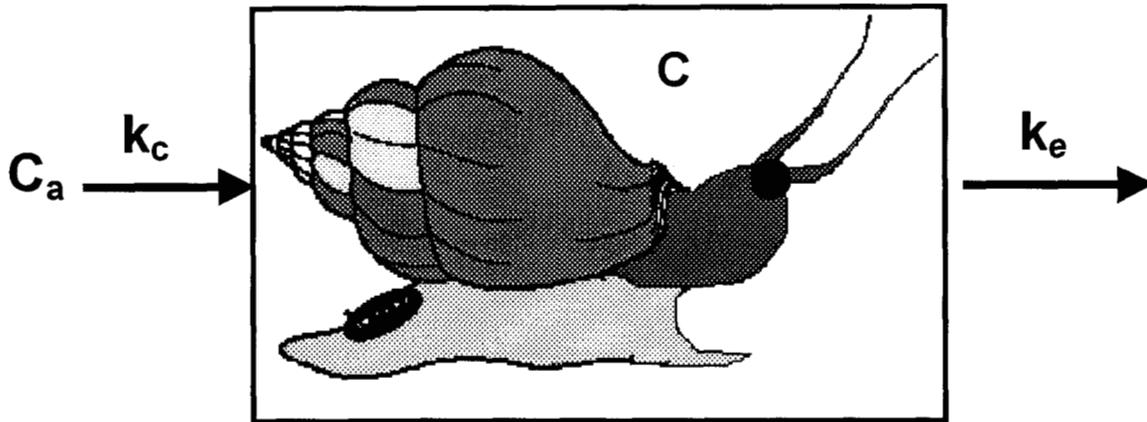


Figura No. 4. Representación del modelo de un compartimiento para la bioconcentración de carbaril en el caracol *Pomacea patula*, expuesto a una concentración constante del tóxico en el medio (C_a)

Empleando este modelo, el curso temporal de los residuos en el organismo está dado por:

$$dC/dt = \text{captación} - \text{pérdida} = k_c C_a - k_e C \quad (1)$$

donde:

C_a = concentración del tóxico en agua ($\mu\text{g/mL}$)

C = concentración del químico en el animal ($\mu\text{g/g}$)

t = tiempo (h)

k_c = constante de velocidad de captación (mL/g.h suponiendo que la densidad del tejido es de 1 g/mL.h⁻¹).

k_e = constante de velocidad de primer orden para la depuración (h⁻¹)

En el estado estacionario se tiene:

$$dC/dt = 0 = k_c C_a - k_e C_{EE} \quad (2)$$

Por lo tanto, después de una exposición de duración suficiente:

$$C_{EE} = \frac{k_c}{k_e} C_a \quad (3)$$

Donde C_{EE} es la concentración del xenobiótico en el organismo al estado estacionario.

El FBC al estado estacionario puede definirse como:

$$FBC = \frac{C_{EE}}{C_a} = \frac{k_c}{k_e} \quad (4)$$

Para integrar esta ecuación se asume que k_c , k_e y C_a permanecen constantes.

La forma integrada de la ecuación (1) es:

$$C = \frac{k_c}{k_e} C_a [1 - e^{-k_e t}] \quad (5)$$

Las formas equivalentes son:

$$C = C_{EE} [1 - e^{-k_e t}] \quad (6)$$

$$C = FBC [1 - e^{-k_e t}] \quad (7)$$

El tiempo de experimentación es un factor importante para obtener un valor más exacto del FBC y se ha relacionado con la constante de depuración del xenobiótico en el organismo de prueba. Hawker y Connel (1986), derivan teóricamente una relación que se aplica a peces y otros organismos acuáticos:

$$\log \text{FBC} = \log [k_c/k_e] = a \log k_{oa} + b \quad (8)$$

donde:

a y b son constante empíricas.

Koa = coeficiente de partición octanol/agua

A su vez existe una relación lineal entre la constante de eliminación ($1/k_e$) y el koa

$$\log 1/k_e = x \log k_{oa} + y \quad (9)$$

donde x , y son constantes.

Para los plaguicidas, los procesos de captación y subsecuente eliminación por organismos acuáticos en cuerpos de agua tratados o contaminados, han sido caracterizados sobre las bases de una cinética de primer orden por el modelo matemático de Eberhardt y col., (1971). Un resumen del tipo de datos requerido para determinar el potencial de bioconcentración de un plaguicida ha sido proporcionado por Kenaga (1972).

Sin embargo, muy pocos modelos matemáticos han examinado las perturbaciones que producen los plaguicidas sobre los ecosistemas (Roberts, 1996).

La validación de los modelos en ecología ha sido enfatizado por diversos investigadores. Se ha sugerido que en los estudios multiespecies, se incluyan el microcosmos y mesocosmos (MacKay y Paterson, 1982). Esta metodología ya ha sido aplicada, para examinar el destino de endosulfan en medios acuáticos usando microcosmos (Peterson y Batley, 1993).

7. RELACION TOXOCINETICA-TOXODINAMICA

Para la evaluación de la toxicidad de un contaminante se deben considerar tres aspectos: la fase química, la toxocinética y la toxodinámica.

La fase química describe las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico bajo estudio, al cual el organismo es expuesto. Esto incluye la estabilidad del contaminante, su solubilidad en agua, el tamaño de partícula, etc.

La fase toxocinética estudia la relación entre la dosis total del xenobiótico administrado y las concentraciones resultantes (forma inalterada y/o metabolitos) que son alcanzadas en los tejidos y fluidos corporales del organismo expuesto, así como la intensidad y la velocidad de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción.

La fase toxodinámica describe la interacción del xenobiótico y/o metabolitos con los componentes celulares o extracelulares (receptores, sitios de acción) que al ser

modificados en sus funciones se expresan en términos de toxicidad, para el caso de los plaguicidas. Ver Figura No. 5.

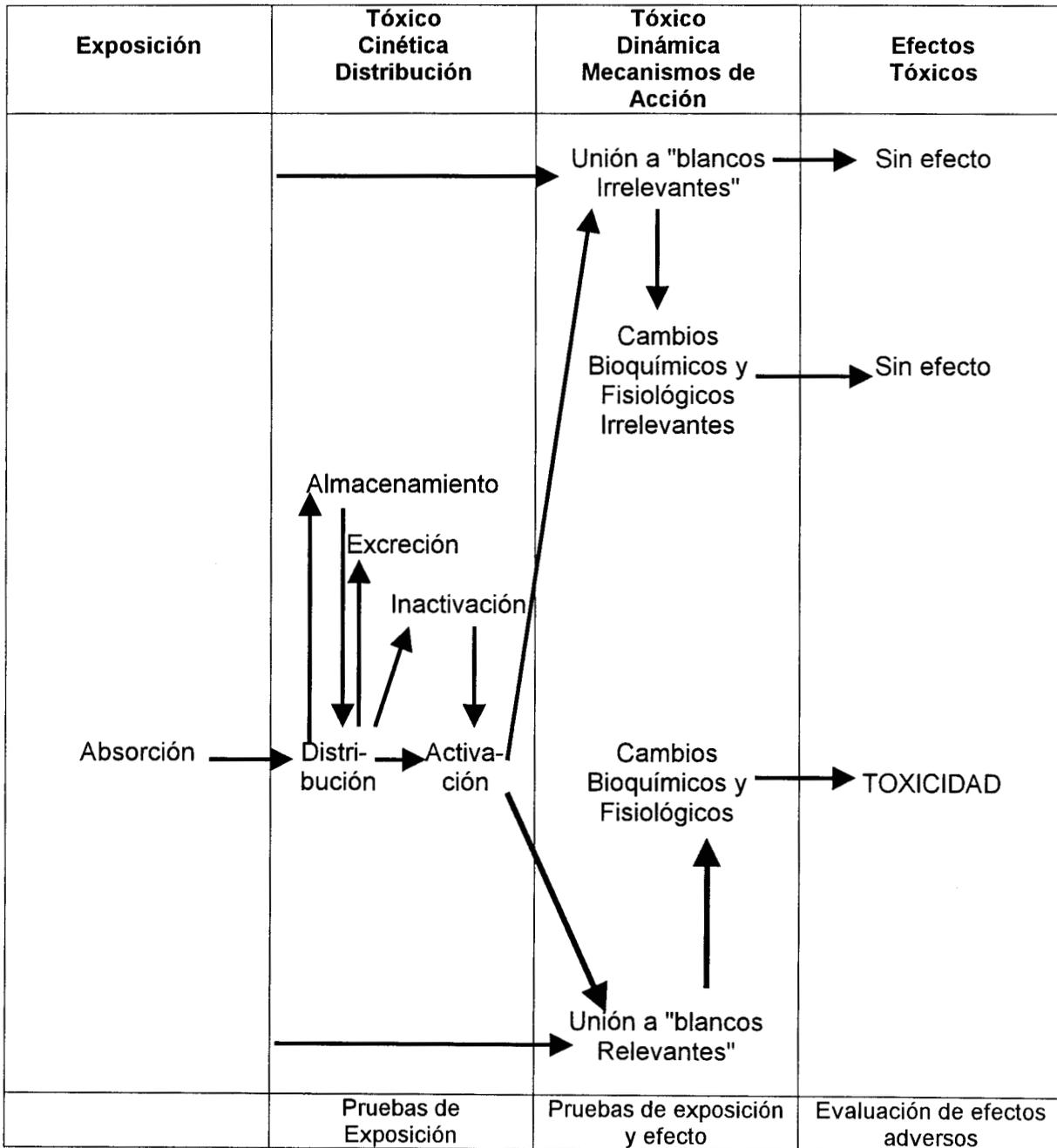


Figura No. 5. Destino y reacciones de los plaguicidas en los organismos vivos (tomado de serie plaguicidas No. 2, SEMARNAP, 1996).

La importancia del manejo simultáneo de datos farmacocinéticos y farmacodinámicos (FC-FD) ha permitido la predicción del curso temporal de la intensidad del efecto farmacológico *in vivo* (Schwinghammer y Kroboth, 1988). Aún en el área farmacocinética, a la fecha no ha sido posible establecer este tipo de relaciones para algunos fármacos de interés terapéutico, debido a la escases de métodos para evaluar adecuadamente su efecto y por consiguiente su intensidad (Granados y col., 1991).

Un modelo toxocinético-toxodinámico (TC-TD) ha sido estudiado ampliamente con la morfina y su efecto analgésico (Dahlström y col., 1978). Para algunos plaguicidas como el DFP se han desarrollado modelos TC-TD basados fisiológicamente en la inhibición de la acetilcolinesterasa (Gearhart y col., 1990). Sin embargo, no se tiene conocimiento del estudio de la relación entre la cinética de bioconcentración del carbaril y su efecto sobre las ACHasas.

IX. HIPOTESIS

Si los modelos toxocinéticos describen el curso temporal de la concentración de los xenobióticos en diversos tejidos y fluidos, entonces los niveles de los compuestos pueden relacionarse con los efectos observados, lo cual permitiría expresar la toxicidad en términos cuantitativos.

Si el carbaril interacciona con la enzima acetilcolinesterasa formando un complejo reversible, que representa un índice del efecto tóxico y además éste proceso es dependiente de la dosis, entonces es probable establecer una relación entre la cinética de bioconcentración del carbaril y la inhibición de la acetilcolinesterasa.

X. OBJETIVOS

1. *Objetivo general*

El objetivo del presente trabajo, es describir un modelo toxocinético-toxicodinámico para el carbaril en el caracol *Pomacea patula*.

1.1. *Objetivos particulares*

Determinación de la velocidad de degradación de carbaril en agua sintética.

- ◆ Determinación del valor de CL_{50} a 96 h del carbaril en el caracol *Pomacea patula*.
- ◆ Evaluación del efecto de oxígeno sobre la CL_{50} del carbaril en el caracol *Pomacea patula*.
- ◆ Efecto del almacenamiento sobre las ACHasas en muestras de organismos intoxicados con carbaril.
- ◆ Desarrollar y validar un método analítico para determinar carbaril en muestras de agua y tejido.

- ◆ Determinación de la cinética de captación, eliminación y factor de bioconcentración del carbaril en la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula* expuesto a una concentración subletal del tóxico.
- ◆ Evaluación de la actividad de la acetilcolinesterasa, durante los procesos de captación y eliminación del carbaril en la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula* expuesto a una concentración subletal del tóxico.
- ◆ Estimación de la relación entre los procesos cinéticos captación-eliminación y la actividad de acetilcolinesterasa de carbaril en la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula*.

XI. MATERIAL Y METODOS

Los caracoles *Pomacea patula* fueron colectados de la laguna de Catemaco, localizada en Veracruz, México. Los organismos se mantuvieron durante un mes bajo condiciones de laboratorio para su aclimatación. Las características fisicoquímicas del agua fueron las siguientes: temperatura $20^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, con aireación continua, pH 6.5, dureza total 48 mg/L como CaCO_3 .

El agua sintética fue preparada de acuerdo a Peltier y Weber (1985), usando agua destilada con la adición de las siguientes sales inorgánicas: 2 mg/L KCl, 30 mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 mg/L de MgSO_4 y 48 mg/L NaHCO_3 .

Los moluscos fueron alimentados *ad libitum* con alimento para pez (tetramin), la mortalidad de los organismos durante el período de aclimatación fue menor del 1%. Durante los bioensayos los animales no fueron alimentados. Se diseñaron cámaras de acrílico especialmente, para mantener sumergidos a los caracoles en el carbaril durante todo el lapso de experimentación y además, para que no tuvieran contacto con las heces, ya que el piso tenía agujeros, lo que hacia que el material se depositará en el fondo del recipiente e impedir con esto una posible coprofagia y con ello, datos de bioconcentración sobreevaluados (Scheerboom y Geldof, 1978). Ver Figura No. 6.

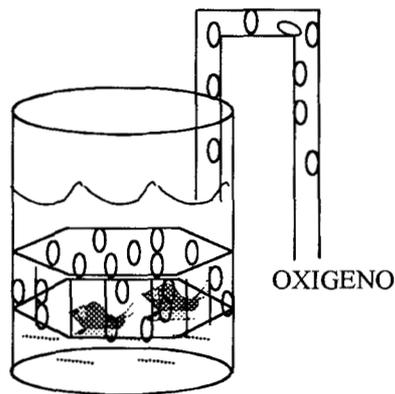


Figura No. 6. tipo de jaula empleada para la contaminación del caracol *P. patula*

1. Cuantificación de carbaril en muestras de agua

Se tomaron alicuotas de 20 mL, se agregó 1.0 mL de 4-Bromo-3,5-dimetilfenil-N metilcarbamato (BMCD) como estándar interno (EI), a una concentración de 48

$\mu\text{g/mL}$) y se agitaron las mezclas en vortex con 80 mL de CHCl_3 tres veces consecutivamente, por 3 min cada ocasión, centrifugando a 7000 rpm por 2 min. Después de cada centrifugación las fases se separaron juntando las clorofórmicas y concentrándolas en el rotavapor hasta un volumen aproximado de 2 mL, posteriormente se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno suave y el residuo se disolvió en 100 μL de metanol, se filtró a través de una membrana de 0.45 μm , inyectándose una alícuota de 25 μL , ver Figura No. 7.

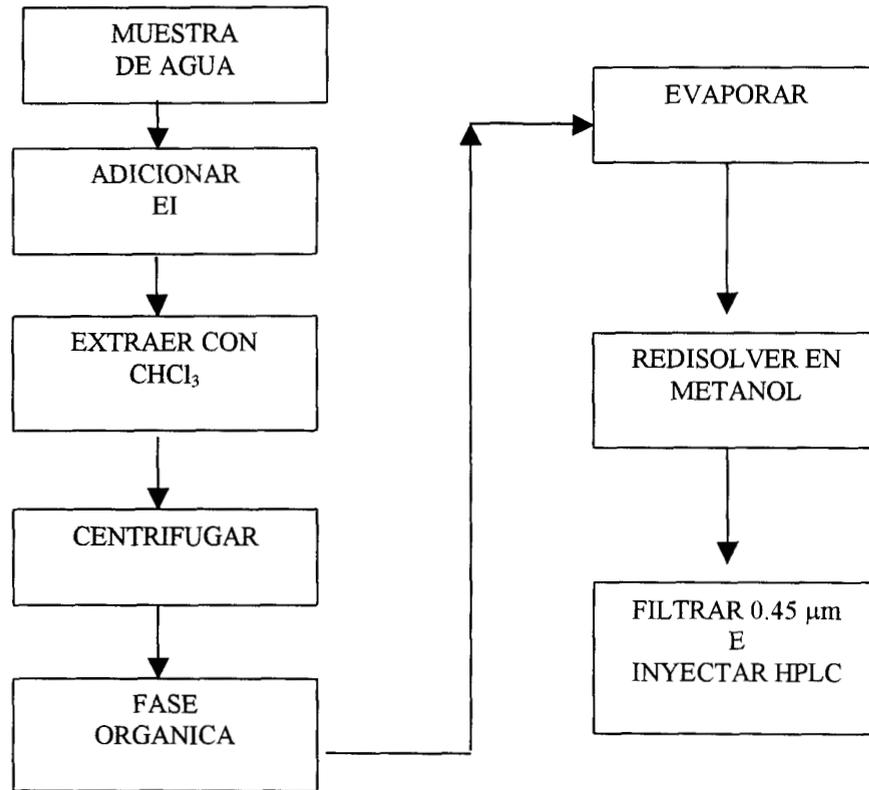


Figura No. 7. Esquema de preparación de muestras de agua para la cuantificación de carbaril

2. Determinación de la velocidad de degradación del carbaril en agua

El estudio cinético de la degradación de carbaril fue realizado en agua sintética, donde la concentración final del tóxico fue de 25 µg/mL, anteriormente una cantidad mínima de etanol (4mL/L) se empleó para disolverlo.

Este medio se mantuvo con aireación constante, a una temperatura de 20°C y se amortiguó con ácido sulfónico-3N-morfolino-2 hidroxipropano (MOPSO). Este buffer bioquímico tiene dos características importantes: no ser tóxico y mantener constante el pH a 6.5, el cual es un factor fisicoquímico relevante en la estabilidad y como consecuencia en la toxicidad del carbaril. Para monitorear los cambios temporales en la concentración del carbaril, se tomaron alícuotas de 20 mL de agua diariamente durante una semana y se analizaron por HPLC.

3. Determinación del valor de CL_{50} a 96 h del carbaril

El estudio de toxicidad aguda permitió la selección de una concentración subletal de carbaril (1/10 de la CL_{50}) para llevar a cabo los estudios cinéticos posteriores. Un ensayo semiestático (varios cambios del medio) durante 96 h fue realizado con carbaril (Sevin 99%), para ello se prepararon diluciones del tóxico con la mínima cantidad de etanol (4mL/L), la elección de este solvente fue hecha en base a la literatura que recomienda el empleo de un solvente orgánico que no sea tóxico, ni

se degrade en medio acuoso, ya que puede tener efecto sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (Vander Wel y Welling, 1989).

Después de varias pruebas preliminares, las concentraciones seleccionadas para determinar la toxicidad aguda fueron: 8.5, 10.8, 13.5, 17.0 y 21.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbaril en agua dulce sintética. Se formaron siete grupos de 6 caracoles cada uno y fueron colocados en cámaras de acrílico sumergidas en 800 mL de cada una de las concentraciones del xenobiótico. El medio oxigenado a saturación, se mantuvo a un pH de 6.5 con MOPSO. Se corrieron pruebas paralelas empleando un lote testigo solo con agua y un lote control con etanol a la concentración de 4 mL/L. Una vez iniciada la prueba de toxicidad se procedió a monitorear visualmente el cierre del caparazón de los caracoles y confirmar su muerte por estímulo al calor. Se contó el número de muertos y la CL_{50} se calculó mediante el método de Probits (Finney, 1971). Las determinaciones fueron realizadas por quintuplicado.

4. Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL_{50} del carbaril

Los efectos de la concentración de oxígeno sobre la toxicidad del carbaril fueron estudiados empleando el mismo modelo experimental para obtener la CL_{50} , las condiciones fueron básicamente las mismas, pero se manejaron tres modalidades de exposición:

Método estático con medio de prueba recién preparado, sin oxigenación previa.

Método estático con medio aireado previamente durante 24 h.

Método semiestático, con medio aireado hasta saturación y cambio de 2 veces al día.

Durante el lapso total de los bioensayos (96 h) se mantuvo una corriente ligera de oxígeno.

5. Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas

Para investigar la posibilidad de este efecto sobre la reactivación de las colinesterasas, muestras de homogenados de glándula digestiva de caracoles tratados con la concentración subletal de carbaril (1.46 µg/mL) equivalente a (1/10 de la CL₅₀) durante 72 h fueron almacenados a -20°C durante 3 días, posteriormente se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa tanto en homogenados testigo como tratados.

6. Cinética de la bioconcentración-eliminación del carbaril en tejido y su efecto sobre la actividad de las ACHasas en *Pomacea patula*

6.1. Curso temporal de la concentración del carbaril en tejido (bioconcentración-eliminación)

Para el experimento de bioconcentración, se expusieron 60 caracoles a la concentración subletal de carbaril (1.46 µg/mL). Con el fin de permitir el

vaciamiento del estómago, los caracoles permanecieron en ayunas 24 horas antes de iniciar el experimento. Los organismos se dividieron en 10 grupos, seis por lote y se colocaron en recipientes que contenían 800 mL de medio de intoxicación para su exposición, bajo condiciones de aireación y pH constante. Se sacrificaron los animales de acuerdo al siguiente intervalo de tiempo: 0.3, 0.6, 1, 2, 3, 7, 12, 24, 48 y 72 h. Posteriormente los caracoles fueron enjuagados con agua destilada, separando el tejido corporal total del caparazón y pesando la biomasa. La glándula digestiva de tres caracoles se disecó y pesó para formar un "pool". Los otros tres caracoles fueron empleados para medir la actividad de las ACHasas. El experimento se realizó por triplicado. Se eligió la glándula digestiva debido a que, experimentos preliminares realizados en el laboratorio de Toxicología Acuática, indicaron que en ella se concentró la mayor parte del carbaril (90%). Datos basales fueron obtenidos de un grupo de animales control y uno testigo.

La escala de tiempo elegida para monitorear el proceso de eliminación, se basó en estudios piloto. Los resultados indicaron que esta fase cinética se completó casi en su totalidad en un período de 7 h, mientras que se considero la conveniencia de continuar observando la inhibición enzimática hasta las 72 h. Para este experimento, 48 caracoles intoxicados con 1.46 µg/mL de carbaril durante 72 h bajo las condiciones de pH y oxígeno mencionadas anteriormente, se dividieron en grupos de 6 organismos y fueron transferidos a recipientes con medio libre de tóxico para posteriormente sacrificar a los gasterópodos, considerando el

siguiente intervalo de tiempo: 0, 0.33, 0.66, 1, 3 y 7 h, muestras de glándula digestiva de tres caracoles se utilizaron para el análisis químico del carbaril y paralelamente se determinó en otros tres, la actividad de ACHasa. Además se formaron grupos control de individuos, que fueron expuestos a la misma concentración de etanol en la cual se disolvió el carbaril para realizar la intoxicación (4 mL/L) y grupos testigo, con caracoles que permanecieron en el medio libre de tóxico.

6.2. Preparación de las muestras para el ensayo enzimático de las acetilcolinesterasas

Las muestras de glándula digestiva de *Pomacea patula* (testigo, control e intoxicadas), fueron pesadas y homogeneizadas (3% p/v) en solución amortiguadora tris pH 7.0, posteriormente fueron centrifugadas a 6000 rpm por 30 min a una temperatura de 4°C. La actividad fue determinada por el método de Hestrin (1949), usando diferentes alícuotas de los sobrenadantes.

6.2.1. Determinación de la actividad de las acetilcolinesterasas (método de Hestrin)

A las alícuotas del sobrenadante se les agregaron 1 mL de buffer tris pH 7.0 y 1 mL de ACH estándar, a una concentración de 4 μ M/mL. Posteriormente esta mezcla fue incubada 30 min a 25°C. Transcurrido este tiempo se agregaron 1.0 mL de

hidroxilamina alcalina, 1.0 mL de HCl 4N y 1 mL de FeCl_3 0.37 M. Los tubos se centrifugaron nuevamente, a 14,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se leyeron a una absorbancia de 540 nm y éstas se interpolaron en una curva estándar de ACH preparada con homogeneizado inactivado de glándula digestiva.

La actividad específica de las ACHasas, se calculó dividiendo los nmoles de acetilcolina hidrolizada/mg de proteína total/min. El contenido total de proteína fue determinado por el método de Bradford, (1976).

6.3. Determinación de proteína (método de Bradford)

Se preparó una solución estándar de albúmina sérica bovina (1 mg/mL), y se tomó 3, 4, 5, 7 y 10 mL de esta solución, diluyendo a la marca de 10 mL en matraces aforados. A 100 μL de estas soluciones correspondientes a 30, 40, 50, 70 y 100 μg de proteína se le agregaron 5mL del reactivo de Bradford (100 mg de azul de coomassie, 50 mL de etanol (95%), 100 mL de H_3PO_4 , llevando a 1 L con agua destilada). El complejo colorido azul se leyó después de 5 min, en un espectrofotómetro VARIAN DMS a 595 nm. La concentración de proteína total fue lineal con respecto a la absorbancia, ver Gráfica P-1, Apéndice P.

6.3.1. Determinación de proteína en las muestras tisulares de *Pomacea patula*

100 μL de los homogenados (testigo, control e intoxicados) se diluyeron con 100 μL de buffer pH 7.0, agitando suavemente y adicionando 5.0 mL del reactivo de

Bradford. La absorbancia se midió a 595 nm y se interpolaron los valores obtenidos en la curva estándar de albúmina, para determinar por comparación la cantidad de proteína, dicho valor fue empleado para evaluar la actividad de las ACHasas durante la cinética de bioconcentración-eliminación del carbaril en *Pomacea patula*, ver Tabla No. P-1, Apéndice P.

6.4. Determinación de lípidos (método de fosfovainillina)

De una solución estándar de lípidos con la siguiente composición: 175 mg de trioleína y 75 mg de tripalmitina en 25 mL de cloroformo. Se tomaron alícuotas de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mL correspondientes a la cantidad de (0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg de lípidos) y fueron llevadas a un volumen de 10 mL con CHCl_3 . A 250 μL de cada dilución se le adicionaron 2.0 mL de H_2SO_4 concentrado, calentando la mezcla durante 10 min en baño de agua hirviendo, posteriormente se enfrió 5 min en agua fría y se tomaron 250 μL de estas nuevas diluciones adicionando con agitación continua 5.0 mL del reactivo de fosfovainillina (200 mL de una solución de vainillina 0.6% y 800 mL de H_3PO_4), incubando a 37°C durante 15 min y permitiendo que la reacción se enfriará a temperatura ambiente por 5 min para leer a 540 nm dentro de los 10 min siguientes. (Barnes y Blackstock, 1973). La cantidad de lípidos totales **versus** absorbancia fue lineal, ver Gráfica L-1, Apéndice L.

6.4.1. Determinación de lípidos en las muestras tisulares de *Pomacea patula*

A 700 mg de tejido (glándula digestiva) se le adicionaron 100 mL de una mezcla $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 2:1 para extraer los lípidos, agitando mecánicamente durante 20 min, decantando y evaporando la mezcla hasta un volumen aproximado de 20 mL. A una alícuota de 75 μL se le agregó 2 mL de H_2SO_4 para continuar con el método de fosfovainillina. La cantidad de lípidos se obtuvo interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva estándar y como el valor de FBC puede depender del contenido de estas biomoléculas, la concentración del carbaril en el estado estacionario, obtenida anteriormente en tejido húmedo, se calculó en base al promedio del contenido de grasa, ver Tabla L-1, Apéndice L.

XII. RESULTADOS

1. Determinación de la velocidad de degradación del carbaril en agua

La tabla No. 1 muestra la variación temporal de la concentración del carbaril en el medio de prueba con pH 6.5, oxigenación a saturación y temperatura ambiente.

Tabla No. 1. Degradación del carbaril en agua sintética

DIA	CONCENTRACION INICIAL $\mu\text{g/mL}$	PORCIENTO DE DEGRADACION
0	25	0
1	24.67	1.4
2	24.34	2.7
3	23.80	4.8
4	23.67	5.4
5	23.30	6.8

Ajustando los datos a una ecuación monoexponencial de primer orden se obtiene:

$$C=24.9e^{-0.014t} \text{ con } r^2 = 0.9928 \text{ y } t_{1/2} = 48.63 \text{ días.}$$

Bajo condiciones ideales, la concentración del tóxico en el medio que permite evaluar el FBC al equilibrio debe mantenerse constante, en éste caso, la pérdida de carbaril por adsorción, evaporación y degradación química, etc., en los recipientes de prueba como se muestra en la Tabla No. 1, fue menor al 8%, empleando este sistema. Se evidenció una pérdida del tóxico de 20% a las 3 h, una vez que se agregaron los organismos, siendo esta más marcada conforme transcurrió el tiempo, ya que a las 12 h había desaparecido aproximadamente un 80%. Después de dos cambios diarios de medio con carbaril recién preparado a las 3 y 12 h, el nivel del xenobiótico se mantuvo constante durante las 72 h.

2. Determinación del valor de la CL_{50} a 96 h del carbaril

Empleando el método de probits se obtuvo un valor de CL_{50} a 96 h de 14.6 $\mu\text{g/mL}$ y los límites de confianza al 95% fueron de 13.2 a 16.3 para el carbaril en el caracol *Pomacea patula*. La mortalidad del caracol se incrementó de una manera dependiente con la concentración del plaguicida ($Y = -12.03 + 14.58 x$), ver Figura No. 8, inciso (C) y Apéndice CL.

3. Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL_{50} del carbaril

La toxicidad de carbaril para *Pomacea patula* fue dependiente del contenido de oxígeno. Se observaron diferencias significativas en los valores de la CL_{50} a 96 h. A concentraciones bajas de O_2 el compuesto fue menos tóxico ($Cl_{50} = 47.5 \mu\text{g/mL}$), conforme se fue oxigenando el medio de prueba la CL_{50} disminuyó 2.6 veces (23

$\mu\text{g/mL}$), finalmente se obtuvo un valor mínimo y estable de 14.6 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 3.2 veces menor que el valor de la CL_{50} inicial, empleando el método semiestático con medio aireado a saturación. Figura No. 8.

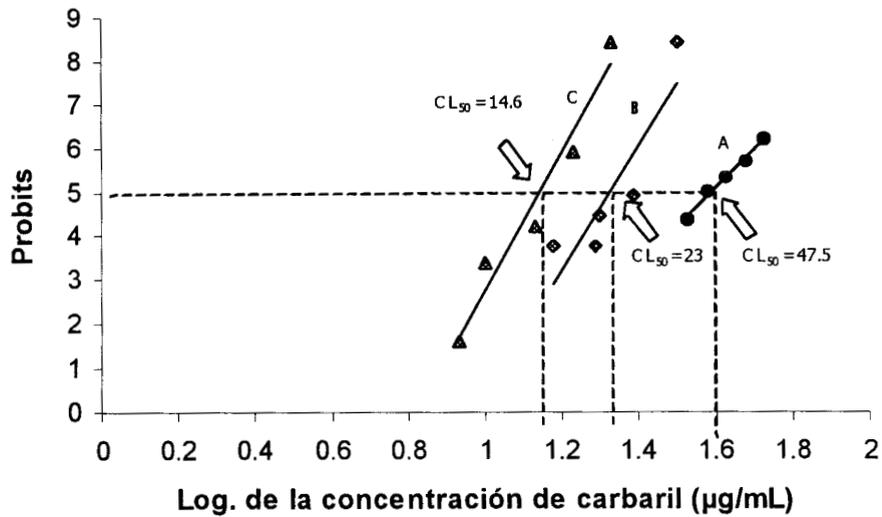


Fig. No. 8. Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL_{50} del carbaril en *Pomacea patula*

Condiciones para la obtención de la CL_{50} - 96 h: A) Método estático con medio de prueba recién preparado, sin oxigenación previa: B). Método estático con medio aireado previamente, 24 h. C). Método semiestático con medio aireado a saturación y recambio dos veces diariamente.

4. Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas

El porcentaje de la inhibición de las ACHasas de la glándula digestiva de caracoles intoxicados con 1.46 µg/mL de carbaril, que resultó de 74% ± 3, durante 72 h, no fue modificado significativamente en los 3 días de almacenamiento, a -20°C, empleando una prueba de ANDEVA.

5. Curso temporal de la concentración de carbaril en tejido (bioconcentración-eliminación) y su efecto sobre la actividad de las acetilcolinesterasas en *Pomacea patula*

La Figura No. 9 muestra la tendencia de los niveles de carbaril en (µg/g) de tejido húmedo vs tiempo durante la etapa de bioconcentración en los caracoles. Se observó: una fase inicial corta (0-2.5 h) con un importante aumento en la concentración de carbaril, correspondiente al proceso de captación y una fase intermedia (2.5 - 4 h) en la cual la concentración se elevó mas lentamente, alcanzando a las 12 h lo que puede considerarse un estado de equilibrio con una C_{EE} de 4.2 de carbaril en µg/g de tejido.

La concentración de carbaril en el medio de prueba osciló entre 1.34 y 1.46 µg/mL. Esta última concentración no provocó mortalidad durante las 96 h de exposición, ni cambios visibles de comportamiento en los organismos.

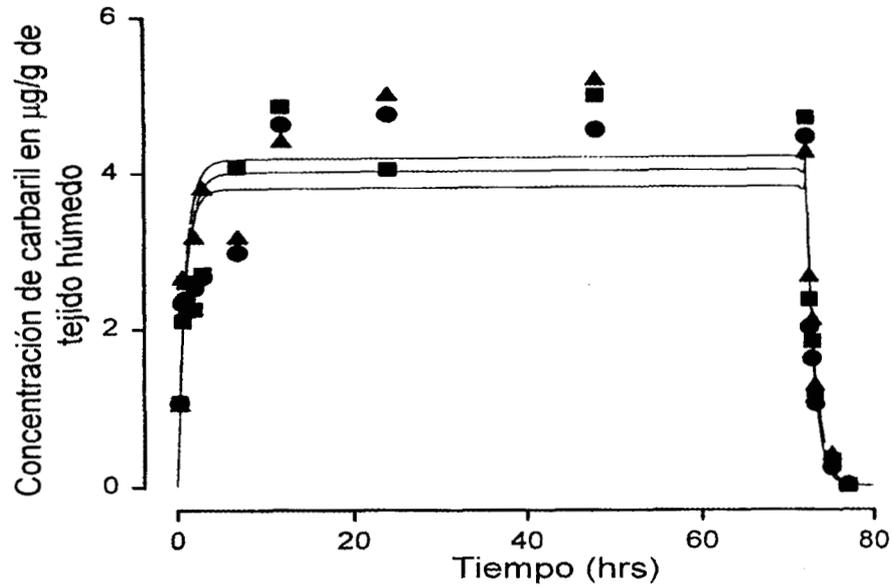


Figura No. 9. Cinética de bioconcentración y eliminación de carbaril en la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula* (cada símbolo representa un "pool" de tres glándulas), ajuste NONLIN.

El FBC calculado para el carbaril en el caracol *Pomacea patula* fue de 2.97 en base húmeda, expresado sobre base lipídica (C_{EE} de carbaril $\mu\text{g/g}$ de lípido) el valor correspondiente fue de 1.35. Empleando un programa de ajuste NONLIN, la toxicinética de bioconcentración del carbaril en *Pomacea patula* fue descrita adecuadamente por un modelo monocompartimental.

La misma Figura 9, muestra los datos del proceso de eliminación del carbaril, después de la exposición a 1.46 µg /mL durante 72 h, cuando los organismos fueron cambiados a un medio exento del xenobiótico. La depuración fue muy rápida y claramente monofásica con una concentración de 3.99 µg/g de carbaril en tejido húmedo al inicio de esta fase y de 0.035 después de 7 h (más del 90% eliminado). Empleando una transformación logarítmica se obtiene la siguiente ecuación: $C_{\text{tejido } \mu\text{g/g}} = 3.99e^{-0.675t}$ correspondiente al modelo de un compartimiento y mediante el ajuste con regresión lineal, el coeficiente de determinación fue de: $r^2 = 0.992$ y la $t_{1/2}$ de $1.0 \text{ h} \pm 0.22$. Ver Figura No. 10.

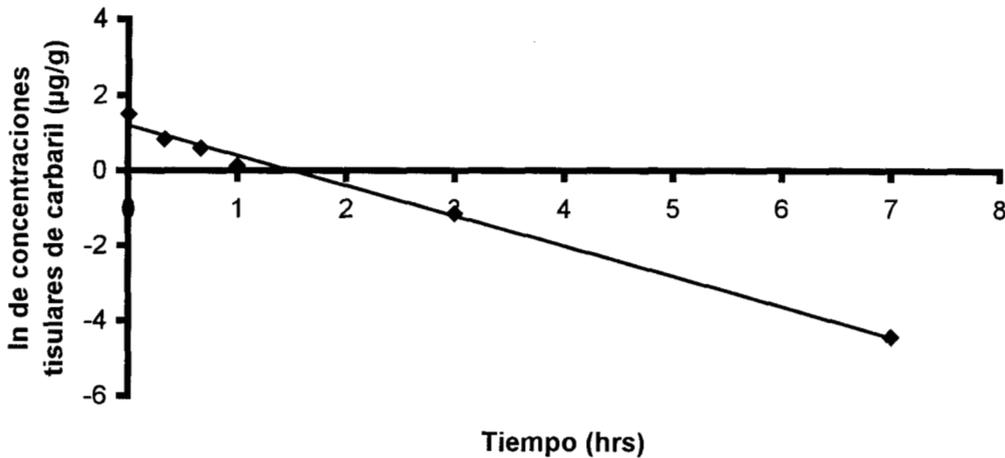


Figura No. 10. Gráfica semilogarítmica de las concentraciones tisulares de carbaril en la glándula digestiva de *Pomacea patula* durante la fase de eliminación

Resultados

Los resultados de la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa y los niveles de carbaril en la glándula digestiva de *Pomacea patula* después de la exposición a 1.46 µg/mL de carbaril, se presenta en la Figura No. 11, aquí puede observarse que la inhibición de las ACHasas varía significativamente en una forma dependiente del tiempo, alcanzando un máximo después de 7 h de iniciada la fase de bioconcentración, permaneciendo inhibida desde este momento y hasta concluir el proceso de eliminación. Durante la fase de depuración, cuando los animales fueron colocados en medio libre de tóxico, como ya se mencionó anteriormente, las enzimas presentaron una actividad específica promedio de 0.0153 ± 0.003 nmoles/min/mg de proteína, permaneciendo altamente inhibidas ($77.8\% \pm 5.1$) durante todo este proceso. Los valores control de la actividad de las ACHasas durante el estudio, correspondieron a 0.069 ± 0.009 nmoles de acetilcolina hidrolizados/min/mg de proteína.

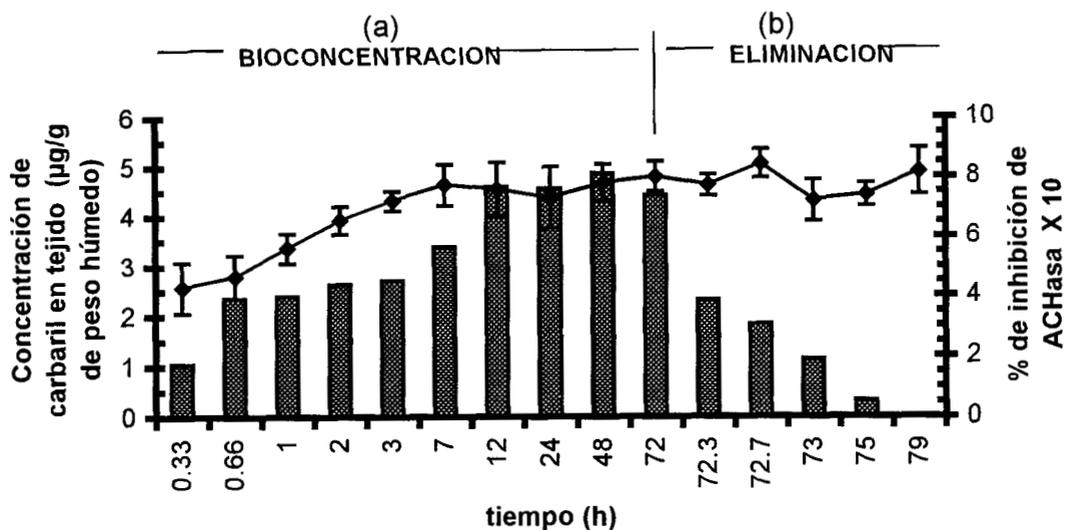


Figura No. 11. Cinética de bioconcentración - eliminación de carbaril y el efecto de inhibición de las ACHasas en la glándula digestiva de *Pomacea patula*

Dentro de las primeras 7 h correspondientes al proceso de bioconcentración, una correlación lineal entre la inhibición de las ACHasas y la concentración de tóxico en el tejido fue estimada ($r = 0.87$), ver figura No. 12. Se excluyeron los tiempos de 12 a 72 h para este cálculo, ya que pertenecen al estado estacionario. Durante la fase de depuración no se estableció ninguna relación entre las variables ($r = 0.14$) y la actividad de la enzima nunca retornó a sus niveles basales en las 72 h de observación, a pesar de que las concentraciones de carbaril en tejido fueron disminuyendo y se consideraron despreciables 7 h después de iniciado el proceso de eliminación.

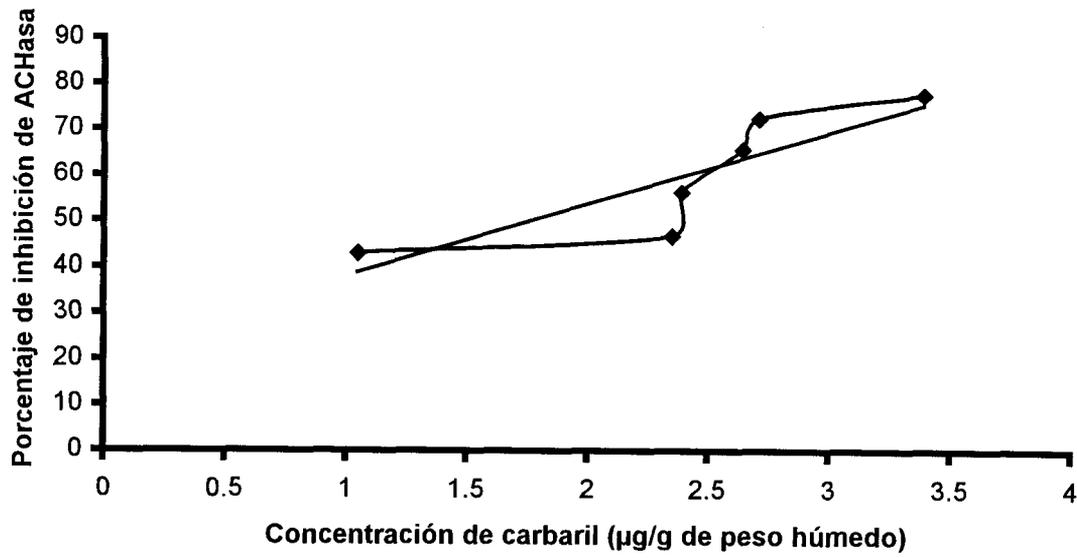


Figura No. 12. Relación lineal entre la inhibición de la actividad de las acetilcolinesterasas y la concentración de carbaril en la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula* durante la fase de bioconcentración.

XIII. DISCUSION

Es muy probable que la concentración de carbaril en agua y sedimento no sea un indicador confiable de la toxicidad, ya que su estabilidad es afectada por otras condiciones además del pH, como son: la temperatura, la fuerza iónica y el contenido de oxígeno (Aly y El-Dib, 1971).

Varios investigadores han sugerido que en estos casos, las concentraciones corporales del xenobiótico pueden ser mejores indicadores de los efectos (Borgmann y col., 1996). Considerando estos elementos se justifica fuertemente determinar la bioconcentración de este agroquímico en la biota y no en el agua o sedimento. Además, para que los datos de bioconcentración sean útiles en la predicción de los efectos y no necesariamente para el cálculo de biodisponibilidad, es recomendable determinar la relación toxicidad-acumulación en un estudio, bajo condiciones físicas controladas, en el cuál estos factores se determinen conjuntamente.

1. Velocidad de degradación del carbaril en agua

Uno de los factores fisicoquímicos que es determinante en la estabilidad del carbaril en agua es el pH. La $t_{1/2}$ obtenida para el sistema de contaminación de *Pomacea patula* fue de 48.63 días a pH 6.5, este valor se ubica en el intervalo encontrado por Fisher y Lohner (1986), quienes realizaron estudios de la ruta medioambiental del

xenobiótico en función del pH, determinando $t_{1/2}$ de 71.6 y 104 días a pH 6 y 4 respectivamente. Las posibles diferencias de $t_{1/2}$ observadas en ambos trabajos pueden estar relacionadas con el control de ajuste del pH del medio y el método analítico empleado, en el caso de Fisher y Lohner, llama la atención el uso de HCl y NaOH, ya que éstas sustancias no tienen capacidad amortiguadora. Así mismo, en diversos estudios realizados a este respecto es notoria la dispersión de la $t_{1/2}$ estimada a pH 7 que oscila entre 29, 71.6, 171 y 406 días encontrándose menos discrepancias en los valores reportados a pH 8: 10.5, 11.6, 12.5, 14, 15 y 16.5 días (WHO, 1994).

2. Influencia del método experimental usado para determinar la toxicidad del carbaril

Connell (1988), menciona que los compuestos biodegradables no muestran un FBC consistente, como sería el caso del carbaril, por lo tanto un sistema de exposición adecuado es crítico para disminuir la variabilidad, tanto en la cinética de bioconcentración como en la estimación del FBC. Con el método semiestático, reemplazando el medio de prueba diariamente con una solución de insecticida recién preparada a intervalos regulares (3 y 12 h), se mantuvo constante el nivel del tóxico entre 1.34 y 1.46 $\mu\text{g/mL}$ durante la experimentación, asegurando con ello un mejor cálculo del FBC, además bajo estas condiciones, es probable que la

bioconcentración sea el proceso que determine el mayor porcentaje de pérdida, ya que a las 3 h se observó una captación significativa por los caracoles.

En este estudio, el porcentaje de declinación de los niveles de carbaril con la adición de los organismos al medio de ensayo, fue aproximadamente de 20% a las 3 h, este resultado está acorde con el informado por Fisher y Lohner (1986), para el microcosmos alga-caracol-peiz de 11.8 y 17% en 1 y 7 días respectivamente; sin embargo, es notorio que el tiempo de este proceso es muy diferente en ambos sistemas, probablemente porque la captación del insecticida es dictada por el tamaño y número de los organismos empleados. Es claro que la biomasa de *Pomacea patula* es enorme, comparada con la del microcosmos de estos autores.

3. Toxicidad del carbaril en *Pomacea patula*

La toxicidad de carbaril (CL₅₀) a 96 h para *Pomacea patula* (14.6 µg/mL) es similar al valor reportado para los moluscos marinos: ostras, almejas y mejillones (1-10 µg/mL) y al caracol *Lymnaea stagnalis* (21 µg/mL). De acuerdo a la clasificación de Metelev (1983), el plaguicida puede considerarse moderadamente tóxico.

4. Efecto del contenido de oxígeno sobre la CL₅₀ del carbaril

El estudio preliminar de toxicidad aguda (exposición estática) de carbaril con *Pomacea patula*, se realizó en un medio de prueba con una concentración de

oxígeno baja y control de pH, obteniéndose un valor de CL_{50} a 96 h muy alto (47.5 $\mu\text{g/mL}$), ya que como era de esperarse, los caracoles experimentaron un cambio desfavorable en las condiciones del medio ambiente y cerraron su caparazón como respuesta. La CL_{50} para los especímenes colocados en un medio con mayor concentración de oxígeno y el pH amortiguado, resultó de 25 $\mu\text{g/mL}$. En el estudio final con un medio en condiciones de O_2 a saturación, control de pH y exposición semiestática (dos recambios diarios de medio), el valor de la CL_{50} fue de 14.6 $\mu\text{g/mL}$. Esta bien documentado que los organismos pueden protegerse de los xenobióticos mediante el cierre de valvas con los subsecuentes efectos de hipoxia y cambios metabólicos (Ham y Peterson, 1994). Este resultado sugiere, que en experimentos de corto tiempo con *Pomacea patula* se puede reducir la bioconcentración y la toxicidad del carbaril, si no se consideran las condiciones de oxígeno del medio de prueba. Además, en el caso de prosobranquios como la *Pomacea paludosa* (Say) de la misma familia de *Pomacea patula*, Freiburg y Hazelwood (1977), mencionan que los caracoles de menor tamaño consumen más oxígeno que los adultos, por lo tanto, es posible que puedan resultar más afectados por condiciones hipóxicas, en un estudio de toxicidad.

5. Efecto del almacenamiento sobre las acetilcolinesterasas

El grado de reactivación espontánea que sufren las esterasas durante el almacenamiento de los homogeneizados, depende del tipo de esterasa y el

compuesto en estudio. (Thompson y col. 1991). En la presente investigación no se observaron efectos significativos del almacenamiento en los controles de las ACHasas, ni tampoco en las muestras tratadas con carbaril. De manera similar, Ludke y col., (1975) informaron que en homogenizados de codorniz japonesa intoxicada con carbofuran y almacenados una semana a -22°C, no se presentó reactivación de las ACHasas. Por otro lado, Zinkl y col., (1987) demostraron que muestras de trucha arcoiris expuestas a 1 µg/mL de carbaril durante 24 h a -20°C, conservaron la actividad de las ACHasas hasta 55 días. Cuando se almacenaron los homogenizados a 4°C durante 5 días, la actividad no fue alterada significativamente.

6. Factores de bioconcentración de carbaril y correlaciones con el coeficiente de partición empleando datos de base bibliográfica

Una de las propiedades fisicoquímicas más ampliamente usadas para la predicción de la bioconcentración de tóxicos en diversas especies acuáticas, así como la sorción, la movilidad en suelos, sedimentos y la toxicidad, es el coeficiente de partición octanol/agua (koa), que representa una medida del carácter hidrofóbico del compuesto. (Gaggi y col. 1992).

El carbaril tiene un koa de 2.4 y un FBC de 2.97 que fue obtenido para *Pomacea patula*. Sin embargo, cuando se compara éste valor de FBC con el reportado por Serrano y col., (1995) para el organofosforado metidation en el molusco *Mytilus*

galloprovincialis que fue de 199.5, pero con un log de koa igual al del carbaril, resulta evidente que aunque estos compuestos tienen el mismo valor de coeficiente de partición, el FBC es completamente diferente. De este hecho es aparente que el FBC del carbaril no puede estimarse satisfactoriamente desde una relación con koa.

Otro elemento crítico para la estimación del FBC, es la variabilidad que puede introducirse si no se obtiene el estado estacionario del tóxico durante la prueba. Es claro que cuando no se alcanza el estado estacionario, la cantidad del xenobiótico captada es menor y el valor de FBC es bajo.

El tiempo para alcanzar el estado estacionario con carbaril en el caracol *Pomacea patula* fue de 7 h, con el compuesto 1,1,1 tricloroetano (log Koa = 2.49) similar al carbaril, Albernethy y col., (1988) también obtuvieron muy rápidamente el 99% del valor al equilibrio después de 72 h. Apoyando el hecho anterior, Ellgehausen y col., (1980), comprobaron que los plaguicidas menos lipofílicos llegan al equilibrio más rápidamente que los de carácter francamente lipofílico.

7. Relación de la cinética de bioconcentración-eliminación del carbaril y su efecto sobre las acetilcolinesterasas en *Pomacea patula*

Los modelos cinéticos compartimentales son herramientas útiles para evaluar la bioconcentración de tóxicos, la selección del modelo para este estudio se basó en el conocimiento anticipado de las características del carbaril como son: su peso

molecular, su moderada lipofilicidad y ausencia de grupos cargados, lo que posiblemente permite que la partición del tóxico entre fluidos y tejidos sea flujo limitado, con la posibilidad de obtener datos cerca o en el estado estacionario en un tiempo relativamente corto y la derivación de un FBC más confiable.

En moluscos el proceso de captación ocurre en órganos directamente expuestos al plaguicida, así como través de la circulación de agua. Usualmente en gasterópodos, el pie es la parte del cuerpo que está en contacto directo con el medio ambiente y es entonces una de las principales entradas de residuos al organismo. Después de un tiempo de intoxicación relativamente corto, la masa visceral es preferencialmente contaminada, además el paso de tóxicos a través del caparazón, es despreciable (Streit, 1979).

La captación del carbaril en *Pomacea patula* fue rápida, alcanzando una concentración de 4.2 $\mu\text{g/g}$ en el estado estacionario a las 7 h. Estos datos están de acuerdo con aquellos informados para el pez *Pseudorasbora parva* (Motsugo) expuesto a 1 $\mu\text{g/mL}$ de carbaril, presentando una velocidad de captación muy rápida y una concentración de 7.5 mg/kg después de un día de exposición (Kanasawa, 1975).

En cuanto a la bioconcentración rápida del carbaril por la glándula digestiva, pueden destacarse dos características anatómicas probablemente relacionadas con este

fenómeno: la alta circulación sanguínea del órgano y la gran biomasa (Takimoto y col., 1987).

Cuando un valor de FBC es bajo, como el del carbaril en *Pomacea patula*, debe pensarse en una posible contribución de factores que incluyen: el metabolismo, la velocidad de eliminación y la duración del período experimental. Con respecto a la biotransformación del carbaril, se ha mencionado que los caracoles presentan un índice muy bajo, comparado con algunas algas, peces e insectos, (Fisher y Lohner, 1986), por lo que en términos lógicos no es este el proceso responsable de un FBC tan pequeño. Probablemente, la velocidad de eliminación juegue el papel más importante en el grado de bioconcentración de este xenobiótico.

La dispersión en los valores de FBC obtenidos al "estado estacionario", por un lado puede deberse a las variaciones en la k_e y el k_{oa} , lo que dificulta la comparación cinética (Davies y Dobbs, 1984). Sin embargo, en este estudio la k_e de carbaril presentó poco error, ya que el estado estacionario se alcanzó muy rápido y un porcentaje alto del tóxico se eliminó dentro de 7 h. Por otro lado, considerando las características del Koa del plaguicida, no puede especularse la existencia de una eliminación bifásica, y por lo tanto la participación de un compartimiento de almacenamiento que pudiera contribuir a las variaciones del FBC.

Ambas consideraciones coinciden en la obtención de un valor de FBC confiable para el carbaril en *Pomacea patula*. La cinética de eliminación de este agroquímico en el

caracol fue ajustada a un proceso monofásico semejante al encontrado por Kanasawa (1975) en el pez Motosugo, pero con una gran diferencia en la $t_{1/2}$, siendo aproximadamente de 2.5 días en el pez y de 1 hora para el caracol.

La tendencia general observada conforme avanzó el proceso de bioconcentración del carbaril en el gasterópodo, fue la del incremento del efecto inhibitorio sobre las ACHasas. Estimándose de la primera parte de la curva correspondiente a la captación, una correlación positiva altamente significativa entre éstos dos parámetros ($r = 0.87$).

Este hecho permite suponer que la toxicidad del xenobiótico, está en función de la concentración del mismo en el sitio de acción (ACHasa de la glándula digestiva) y que los niveles tisulares son proporcionales a esta concentración en la biofase. En consecuencia se puede considerar que la adsorción del carbaril en la superficie del caracol fue despreciable, que no existió enlazamiento interno del tóxico, que se presentó una distribución homogénea favorecida por la forma química y la fuente de captación, pero sobre todo, es muy probable que la biomasa de la glándula digestiva y su característica de ser una estructura donde se alojan una gran cantidad de esterasas, le haya permitido ser el principal órgano blanco del carbaril y por consiguiente, obtener una respuesta lineal de la inhibición de las ACHasas relacionada con los niveles tisulares. A este respecto, se ha comunicado, que igual que con otras enzimas, las esterasas varían en su localización y que la

concentración de las mismas, en ciertos sitios específicamente afecta la magnitud de la respuesta.

Existe evidencia sustancial, que muestra diferentes grados de inhibición de la actividad de las enzimas ACHasas dependiendo del tipo de órgano y la especie, cuando el camarón ***Metapenaeus monoceros*** (Fabricius) fue expuesto a condiciones subletales de carbaril, se presentó el siguiente orden en cuanto al grado de inhibición: Tejido muscular nervioso > branquias > glándula estomacal. La acumulación de acetilcolina y el período de recuperación de los mismos, siguieron igual tendencia (Jayaprada y Rao, 1991).

Es también probable que los sitios blanco de algunas especies donde actúan los carbamatos, sea otro factor que desempeña un papel importante para lograr el establecimiento de una relación entre los niveles tisulares y la inhibición de las ACHasas. Estos plaguicidas presentan un modo de acción secundario, actuando ya sea sobre esterasas neurotóxicas o grupos sulfhidrilo, lo cual puede introducir mucha variabilidad cuando se determina la respuesta tóxica global. (Edwards y Fisher, 1991). La resistencia de la larva de mosco ***Aedes aegypti*** de Venezuela al propoxur (carbamato), ha demostrado que las enzimas esterasas no específicas y oxidasas, desempeñan un papel muy importante en este fenómeno (Mazzarri y Georghiou, 1995).

Resulta claro la importancia de seleccionar el material biológico para la predicción de la toxicidad de carbaril.

El análisis de la cinética de captación del carbaril por el caracol, debe contemplar la intensidad del proceso. Con el uso de un modelo semiestático y el pH controlado del medio, se logró que la concentración de carbaril permaneciera constante durante todo el período de experimentación. Este tipo de ensayo, puede promover el fenómeno de captación del plaguicida por los organismos, ya que favorece un gradiente de concentración y la biodisponibilidad del tóxico, reflejándose en un alto impacto sobre la inhibición de las ACHasas. En este estudio se demostró que durante la fase de bioconcentración, se alcanzó una inhibición máxima de la enzima de 84.4%. Un porcentaje de inhibición igualmente alto de 77% se observó en el caracol *Oziotelphusa senex senex* con el organofosforado fenitrothion (Edwards y Fisher, 1991), los autores mencionan que a pesar de esta condición bioquímica, los organismos no manifestaron ninguna respuesta conductual a la contaminación, observación similar fue hecha con el caracol de nuestro interés. La relación toxocinética-toxodinámica obtenida con carbaril en *Pomacea patula* durante la fase de bioconcentración es apoyada por varios autores que a pesar de no determinar la cinética de captación de los xenobióticos bajo estudio, encontraron una asociación puntual entre las concentraciones de plaguicida y el efecto tóxico. Así mismo, Bala Subramanain y Ramaswami (1991) determinaron una relación del efecto que depende de la concentración, empleando el corazón del pez *Oreochromis*

mossambicus (Peters) expuesto a 3 y 25 ppm de Sevin, resultando que la inhibición de las ACHasas fue de 64 y 88% respectivamente. El bentiocarb inhibió las ACHasas del pez **Sarotherodon mossambicus**, tanto *in vivo* como *in vitro* de una manera concentración-dependiente (Aravinda-Babu y col., 1989). El estudio de Reddy y col., (1990), señaló que la absorción de carbaril favorecida por emulsificantes, promueve el daño sobre las ACHasas de tejido nervioso y no nervioso utilizando camarones **Metapenaeus monoceros**. Las enzimas no recuperaron su actividad aún después de 10 días.

Bajo ciertas condiciones, la inhibición de las ACHasas puede ser afectada directamente por procesos dependientes del tiempo. Es de interés analizar el artículo de Cerón y col., (1996) acerca de los efectos del organofosforado diazinon sobre la actividad de colinesterasas determinadas a la 6, 24, 48, 72 y 95 h de exposición en el cerebro, plasma y ojo del pez **Anguilla anguilla**. En esta investigación se obtienen coeficientes de correlación positivos entre el porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa en los tejidos y el tiempo de exposición. Aún cuando no se determinó la cinética tisular del insecticida, estas observaciones concuerdan con la relación proporcional obtenida entre la inhibición las ACHasas y el tiempo de exposición con carbaril en **Pomacea patula** durante el proceso de bioconcentración.

Durante el proceso de eliminación, cuando los caracoles intoxicados con carbaril fueron colocados en agua limpia, fue evidente que la actividad de las ACHasas no llegó a niveles basales en las 72 h de duración del experimento, aún cuando las

concentraciones tisulares de carbaril desde las 7 h de iniciada esta fase, se podrían considerar despreciables. Si se examinan a continuación los siguientes informes obtenidos de la literatura comparativamente con el presente, se puede notar la discrepancia en el período de permanencia de inhibición de la enzima. Se ha mencionado que los carbamatos son inhibidores reversibles de las ACHasas y presentan una etapa de descarbamilación rápida, que permite la recuperación parcial de la misma en un tiempo de 30 a 40 min (Kuhr y Dorough, 1976). La trucha arcoiris expuesta a carbaril (1 mg/L) por 24 h mostró una recuperación de las ACHasas después de 48 h (Zinkl y col., 1987), así mismo la actividad de las enzimas de peces expuestos a carbofuran requirieron aproximadamente de un día para retornar a los valores basales (Dembélé y col., 1999).

Una de las hipótesis posibles para explicar la inhibición significativa y constante de las ACHasas en *Pomacea patula* durante la fase de eliminación, es la dependencia de la toxicidad con el tiempo y que el período de destoxificación (72 h) no fue suficiente para que las enzimas retornaran a su actividad inicial. Estas consideraciones fueron corroboradas en estudios experimentales con las ACHasas del caracol *Lymnaea acuminata* intoxicado con una dosis de 2.5 mg/L de Mexacarbato durante 48 h, la cual alcanzó sus valores basales de actividad en un período de 7 días (Mahendru y Agarwal, 1983). Por otro lado, Parsons y Surgeoner (1991) mostraron de forma similar, que el número de larvas de mosquito que se recuperaron después de la exposición a varias concentraciones de carbaril y

carbofuran, cuando se pusieron en agua limpia fue dependiente del tiempo. Estos autores atribuyen la recuperación de las larvas a la reactivación de las ACHasas inhibidas. Otros investigadores presentan la evidencia del efecto del carbaril sobre el camarón *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) que muestra algún grado de inhibición de la enzima, aún después de 10 días de detoxificación (Jayaprada y Rao, 1991). En este sentido es necesario realizar más trabajos de experimentación con el caracol *Pomacea patula*, extendiendo el tiempo de muestreo de la actividad de las ACHasas correspondiente a la fase de eliminación, para comprobar la hipótesis planteada.

En la relación toxicidad-bioconcentración son múltiples los factores que influyen, empezando por los que determinan la actividad de las ACHasas, entre ellos: el tipo de esterasa, la actividad metabólica oxidativa, los niveles de oxígeno disuelto, la temperatura, el peso corporal, la época del año, la presencia de sinergistas naturales y sintéticos, así como la interacción química con otros contaminantes, al cuál el organismo ha sido expuesto y además de otros parámetros como el K_{oa} y la variabilidad de la K_e . De los datos obtenidos en este estudio, es posible considerar con cierta reserva la actividad de las ACHasas del caracol *Pomacea patula*, como un bioindicador candidato para medir la toxicidad potencial de carbaril en muestras ambientales, ya que se desconoce la cinética de inactivación de la enzima: velocidad máxima (V_{MAX}) y la constante de Michaelis (K_m).

En general, las comparaciones entre diferentes especies empleando el efecto sobre las ACHasas aún con el mismo tóxico, son difíciles de interpretar por los múltiples factores que interaccionan, incluyendo los métodos analíticos y a pesar de que la diversidad en propiedades bioquímicas sea la que dicte la sensibilidad a los carbamatos, se hace necesario contar con metodología que permita establecer la relación entre la toxicidad y los niveles corporales del contaminante y evaluar el significado de la inhibición de las ACHasas en términos del impacto biológico en la biota acuática.

Por el rápido equilibrio del carbaril desde el medio de exposición y el organismo (3 días), el caracol *Pomacea patula* puede utilizarse para monitorear la biodisponibilidad del xenobiótico en cuerpos acuáticos y como un modelo para el diseño de medidas protectoras contra la exposición de inhibidores de las colinesterasas. Este estudio sugiere la posibilidad de emplear un modelo toxicocinético-toxicodinámico que puede contribuir probablemente al entendimiento de las diferencias observadas en la sensibilidad de especies hacia este tóxico, ya que se considera una herramienta esencial en la extrapolación de datos toxicológicos de un organismo a otro.

XIV. CONCLUSIONES

Es importante mantener el medio de prueba, bajo condiciones normóxicas y de regulación del pH , ya que estos factores afectan el valor de la CL_{50} , la estabilidad del carbaril y muy probablemente el proceso de bioconcentración .

El valor del la CL_{50} a 96 h de carbaril (14.6 $\mu\text{g/mL}$), mostró que el xenobiótico es moderadamente tóxico para el caracol *Pomacea patula*.

Teóricamente, considerando la base de datos bibliográfica, es necesario contar con mayor información que soporte el uso del koa para estimar el factor de bioconcentración del carbaril, así como la relación de este último con la solubilidad en agua, ya que es muy probable que no solo la fracción lipídica controle el FBC, sino también fracciones de otra naturaleza, como la proteica.

La importancia del conocimiento acerca de la partición química (koa), radica en que conjuntamente con los modelos que se basan en esta característica, determinan la velocidad de captación química, las concentraciones al estado estacionario en sangre y tejidos así como la cinética global de acumulación.

La bioconcentración de carbaril en el caracol *Pomacea patula* puede ser razonablemente bien explicada por el modelo monocompartimental de primer orden, presentándose una velocidad de captación y obtención del estado estacionario en un lapso de tiempo muy corto.

Conclusiones

Bajo las condiciones de experimentación empleadas, el proceso de eliminación puede describirse cinéticamente como monofásico, con $t_{1/2}$ de 1 h.

El porcentaje de inhibición de las ACHasas en la glándula digestiva de los organismos intoxicados con carbaril, permaneció estable cuando se almacenó durante tres días a -20°C .

Existe la posibilidad de que el método de intoxicación semiestático y las características metabólicas del caracol *Pomacea patula* propicien que el proceso de bioconcentración dependa del mecanismo de partición al equilibrio.

Es probable que el grado de inhibición tan alto de las ACHasas en *Pomacea patula* por el carbaril sea dependiente del tiempo de exposición y la concentración del plaguicida, factores que contribuyeron para que la actividad de la enzima no llegara a sus niveles basales, aún después de 72 h de mantener los gasterópodos en medio limpio.

La conducta en el caracol *Pomacea patula* durante el proceso de bioconcentración aparentemente no se modificó, a pesar de los niveles de inhibición tan altos de las ACHasas.

Se estableció una relación significativa entre la cinética de carbaril durante el proceso de bioconcentración y la inhibición de las ACHasas.

Conclusiones

No hubo correlación entre la concentración tisular de carbaril y la respuesta durante la fase de eliminación.

Se sugiere emplear la glándula digestiva del caracol *Pomacea patula* para evaluar el efecto tóxico del carbaril durante el proceso de bioconcentración, ya que la respuesta de las ACHasas es aparentemente clara.

Debido a que la estimación de la concentración de carbaril en agua es compleja por muchos factores fisicoquímicos que afectan su estabilidad, una base racional para determinar la toxicidad es el empleo de la concentración corporal del tóxico, derivándose así relaciones toxicidad-bioconcentración con fines predictivos.

XV. APENDICES

CL Método de Probits (CL₅₀ a 96 h de carbaril)

Tabla CL. Parámetros para evaluar la CL₅₀ a 96 h de carbaril en *Pomacea patula*

DOSIS	Log₁₀ de la dosis	Mortalidad corregida	Probits
8.5	.92942	0.0	1.6
10.8	1.03342	0.056	3.4
13.0	1.13033	0.230	4.2
17.0	1.23045	0.840	6.0
21.5	1.33244	1.000	8.4

P. Método de Bradford.

P-1. Curva estándar de proteína total.

La respuesta es lineal en todo el intervalo de trabajo elegido. Ver Figura P-1.

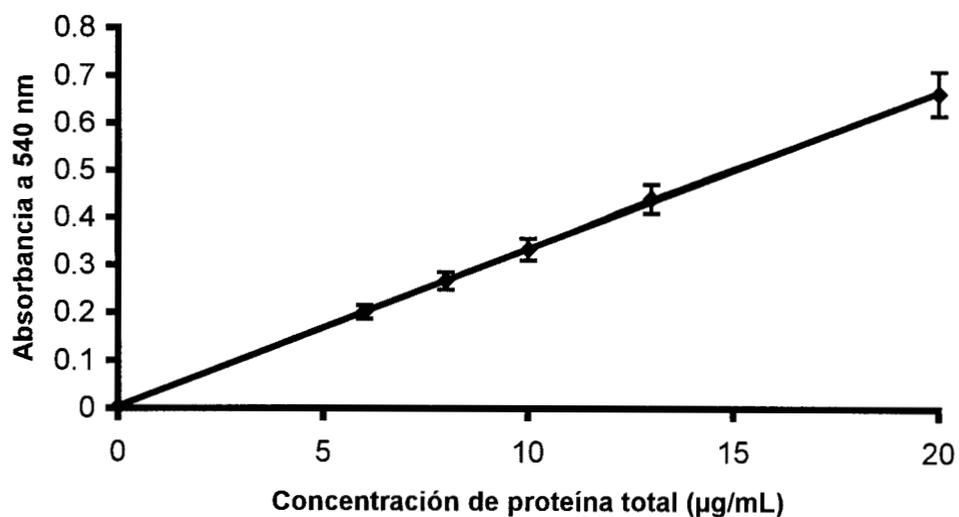


Figura P-1. Curva estándar de albúmina sérica bovina para determinar proteína total

A continuación se presenta la tabla de datos correspondiente a los valores de proteína total determinados en las muestras tisulares de *Pomacea patula* que fueron empleados para la evaluación de la actividad de las ACHasas.

TABLA P-1. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN EL SOBRENADANTE DESPUÉS DE CENTRIFUGAR EL HOMOGENIZADO DE MUESTRAS DE GLÁNDULA DIGESTIVA DE *Pomacea patula* (3% p/v)

FASE DE CAPTACION	FASE DE ELIMINACIÓN
1.21 ± 0.15	1.15 ± 0.18
1.20 ± 0.08	1.28 ± 0.11
1.50 ± 0.30	1.20 ± 0.14
1.42 ± 0.19	1.48 ± 0.26
0.94 ± 0.17	1.50 ± 0.15
0.87 ± 0.20	1.11 ± 0.04
1.63 ± 0.12	1.29 ± 0.13
1.7 ± 0.23*	2.12 ± 0.32*

* Testigos

L. Método de fosfovainillina.

L-1. curva estándar de lípidos totales.

La relación de la concentración de lípidos totales versus absorbancia, fue lineal en el intervalo de trabajo y presenta un coeficiente de correlación alto. Ver Figura L-1.

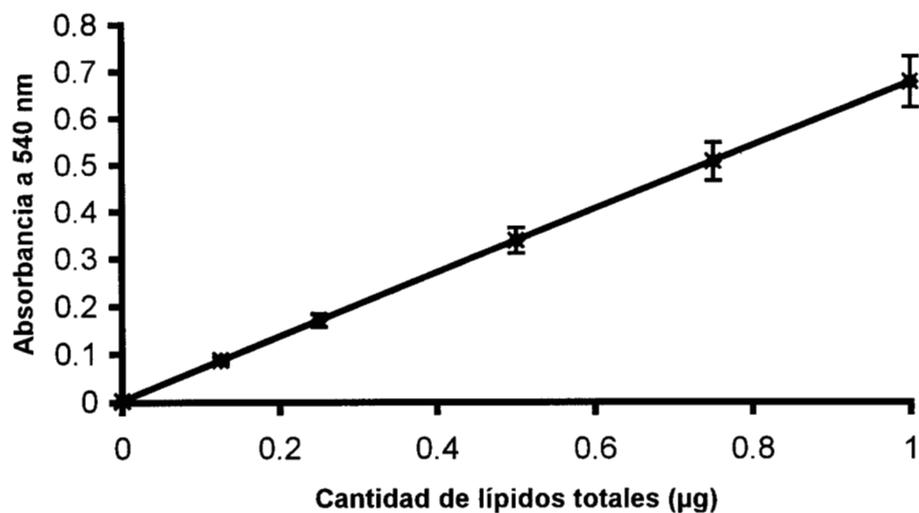


Figura L-1. Curva estándar de trioleína y tripalmitina para determinar lípidos totales

A continuación se presenta la tabla de datos correspondiente a los valores de la cantidad de lípidos determinados en las muestras tisulares de *Pomacea patula*, que fueron empleados para calcular el FBC del carbaril en base lípida.

TABLA L-1. CANTIDAD DE LÍPIDOS $\mu\text{g/g}$ DE GLÁNDULAS DIGESTIVAS DE *Pomacea patula*, EXPUESTAS A 1.46 $\mu\text{g/mL}$ DE CARBARIL DURANTE 72 h.

	GRUPO CONTROL*	GRUPO TRATADO*
CANTIDAD DE LÍPIDOS $\mu\text{g/g}$	3.2	2.8
	3.5	3.0
	2.8	2.5
MEDIA	3.16	2.72
DESVIACIÓN ESTANDAR	0.35	0.24

* Cada valor numérico representa un "pool" de tres glándulas digestivas, las medias de los grupos control y tratados no fueron significativamente diferentes, prueba "t" ($p < 0.05$).

A1. Desarrollo de un método analítico para determinar carbaril en agua y tejido

A1-1. Introducción.

Aunque la preparación de la muestra no es parte del procedimiento cromatográfico, merece toda la atención porque el éxito o fracaso de un análisis depende de esta etapa, más que de la separación cromatográfica en sí misma (Smith y Stewart, 1981).

El manejo de la muestra implica la extracción del tóxico de interés o de los metabolitos desde el material biológico, con el fin de obtener un extracto más simple después de la remoción de compuestos, que puedan interferir con el ensayo cromatográfico y además disminuir el tiempo de vida de la columna. Esta parte del ensayo se conoce como limpieza. Se sabe que a medida que la concentración del tóxico por analizar sea baja y se emplee un método de detección muy general, la etapa preparativa es mucho más compleja.

La extracción de un tóxico desde el material biológico se guía por sus propiedades fisicoquímicas y cada matriz biológica es diferente. No se debe descartar el hecho de que el xenobiótico se presente en forma libre o unido a otros compuestos, además de la presencia de posibles metabolitos. Todos esos compuestos pueden diferir en solubilidad. Una cierta medida de la efectividad de la extracción, es la

recuperación de los estándares adicionados al material biológico siendo de preferencia tóxicos marcados radioactivamente. En la actualidad, aparte de la purificación de los extractos mediante solventes orgánicos y ajuste del pH, se ha empleado la extracción llamada de fase sólida (EFS), en la cual, pequeñas columnas empacadas con sustancias adsorbentes enlazadas a fases reversas o normales, sirven tanto para la extracción como la prepurificación. La operación con esos cartuchos puede ser manual o automática.

A1-2. Objetivos

La experiencia demuestra que es necesario evitar inyecciones directas de extractos sucios dentro de la columna de HPLC, por lo que se diseñaron experimentos con variantes en el proceso de extracción, con el fin de desarrollar un método analítico adecuado para determinar carbaril en agua y tejido.

A1-3. Métodos

A1-3.1. Técnicas de extracción empleadas

1. Muestras de glándula digestiva (3.5 ± 1 g) fueron adicionadas con 1 mL de la mezcla carbaril/EI ($5/48 \mu\text{g/mL}$) preparada en acetato de etilo. Se permitió la evaporación completa del solvente a temperatura ambiente y posteriormente el tejido fue molido con 4 g de arena (purificada con ácido) y 40 g de sulfato de sodio anhidro, el polvo se transfirió cuantitativamente a cartuchos de

extracción elaborados con papel whatman y se realizó la extracción con 120 mL de diversas mezclas en proporción 2:1 con: (acetona, metanol, cloroformo, cloruro de metileno) y hexano durante 24 h, empleando equipo soxhlet tradicional.

2. Con los resultados de las muestras tisulares extraídas inicialmente con soxhlet, se descartó de inmediato el uso de las mezclas más polares, metanol y acetona en hexano, ya que la cantidad de proteínas precipitadas fue enorme. El tiempo del proceso se disminuyó a 3 h y con ello se minimizó este fenómeno. Se decidió continuar con las mezclas de cloroformo y cloruro de metileno/hexano, siguiendo el mismo procedimiento marcado anteriormente.
3. Se empleó otra técnica alternativa de extracción, sometiendo las muestras adicionadas de carbaril/EI a sonicación por 20 min. Los solventes que se emplearon fueron cloruro de metileno, cloroformo y acetato de etilo.
4. Se probó una extracción líquido/líquido empleando acetato de etilo.
5. Los residuos obtenidos después de la extracción líquido/líquido con acetato de etilo, fueron sometidos a una segunda etapa de limpieza con una mezcla de acetonitrilo/hexano, para eliminar lípidos y arrastrar selectivamente al carbaril en el solvente polar.

Debido al alto contenido de lípidos, proteínas y color, etc., obtenidas en todas las muestras, aún después de la primera extracción con los tres procedimientos, se hizo necesario una etapa extra de limpieza, que se realizó mediante cartuchos de fluorisil (Sep pack). Ver Figura No. 13.

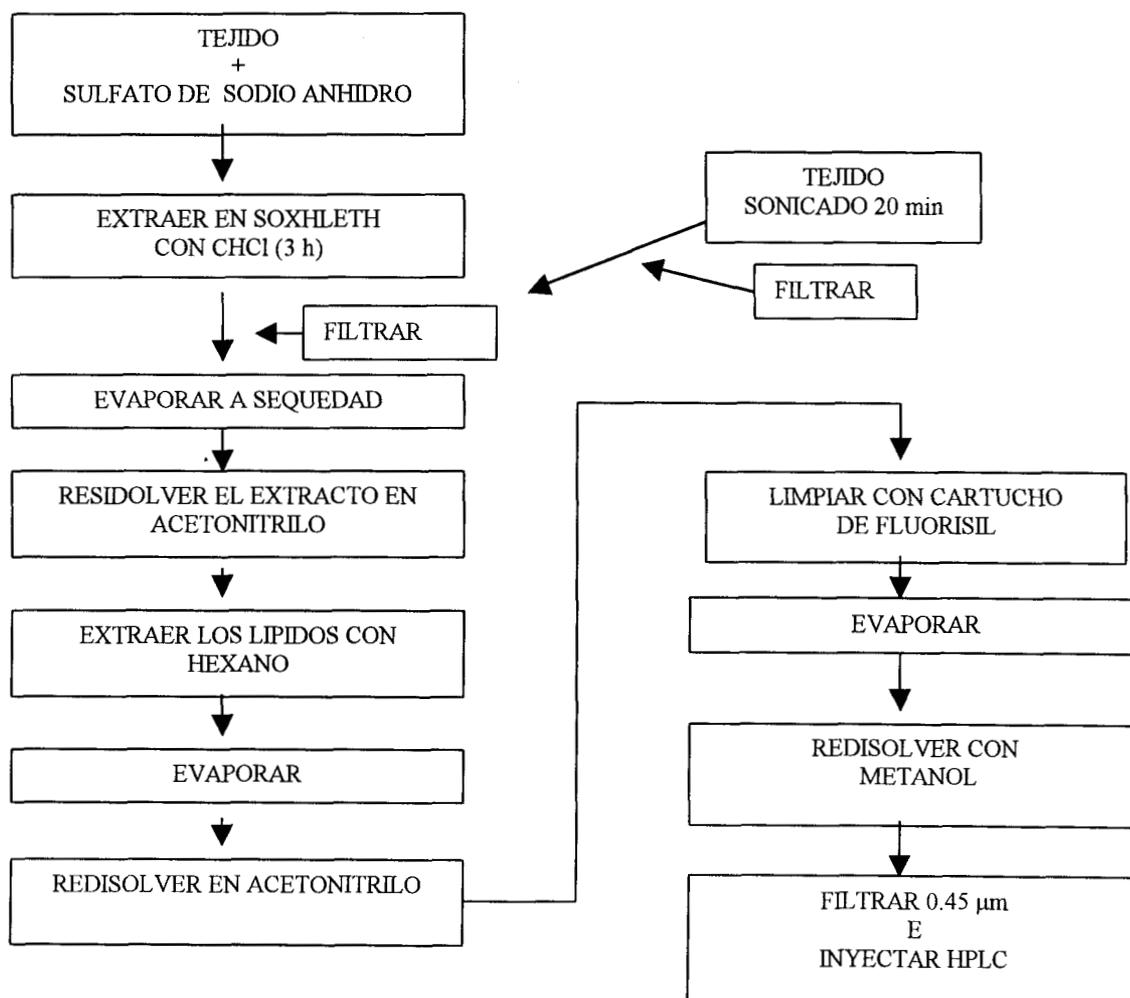


Figura No. 13. Esquema de preparación preliminar de muestras tisulares para la cuantificación de carbaril

A1-3.2. Elección de solventes para acondicionar los cartuchos de limpieza

El cartucho se lavó previamente con 20 mL de cada uno de los siguientes solventes: metanol, diclorometano, éter dietílico y hexano para remover interferencias, haciendo pasar finalmente 10 mL de acetonitrilo.

A1-3.3. Eliminación del color de muestras de tejido

Después de la extracción líquido/líquido se investigó la manera de remover el color anaranjado del eluato con naturaleza polar, ya que el de características lipídicas fue eliminado con hexano. La separación fue realizada eluyendo el residuo a través del cartucho con acetonitrilo, observándose que la solución resultante fue bastante clara, sin aumento de la pérdida del carbaril.

A1-3.4. Procedimiento final para la cuantificación de carbaril, aplicado a diversos tejidos

El procedimiento líquido/líquido en el pretratamiento de la muestra fue elegido por su rapidez y eficiencia. Para conocer el desempeño global del método, se analizaron las muestras de dos glándulas: la digestiva y la albúmina, así como las branquias de caracoles intoxicados con 0.09 y 1.46 $\mu\text{g/mL}$ que corresponden al límite permisible y a la (1/10 de la CL_{50}) respectivamente.

El procedimiento más detallado del análisis de carbaril seleccionado en tejido se muestra a continuación.

A1-3.5. Cuantificación del carbaril en muestras de glándula digestiva

La glándula digestiva (3.5 ± 1 g) adicionada con el xenobiótico o perteneciente al organismo expuesto, se homogenizó con 1 mL de acetona y el carbaril se extrajo con 80 mL de acetato de etilo, agregando a la suspensión 1.0 mL del EI (BMCD, 5 ó 48 $\mu\text{g/mL}$) y agitando vigorosamente en vortex, tres veces consecutivas, durante 3 min. Se permitió que la mezcla reposara 2 min, se decantó para juntar los extractos orgánicos y se disminuyó el volumen con ayuda del rotavapor. El residuo se redisolvió con 3 mL de acetonitrilo, se realizaron 2 extracciones de 80 mL de hexano, centrifugando 15 min a 10,000 rpm, para remover los lípidos, se desechó la capa de hexano y se evaporó la fase polar a un volumen aproximado de 3 mL. El remanente se eluyó con acetonitrilo a través de un cartucho "sep pak" de fluorisil previamente acondicionado con el mismo solvente. El eluato se evaporó a sequedad, redisolviendo posteriormente con 100 μL de metanol y filtrando a través de una membrana de 0.45 μm e inyectando 25 μL al cromatógrafo. En la Figura No. 14, se observa el procedimiento final de la preparación de muestras de glándula digestiva para cuantificar el carbaril.

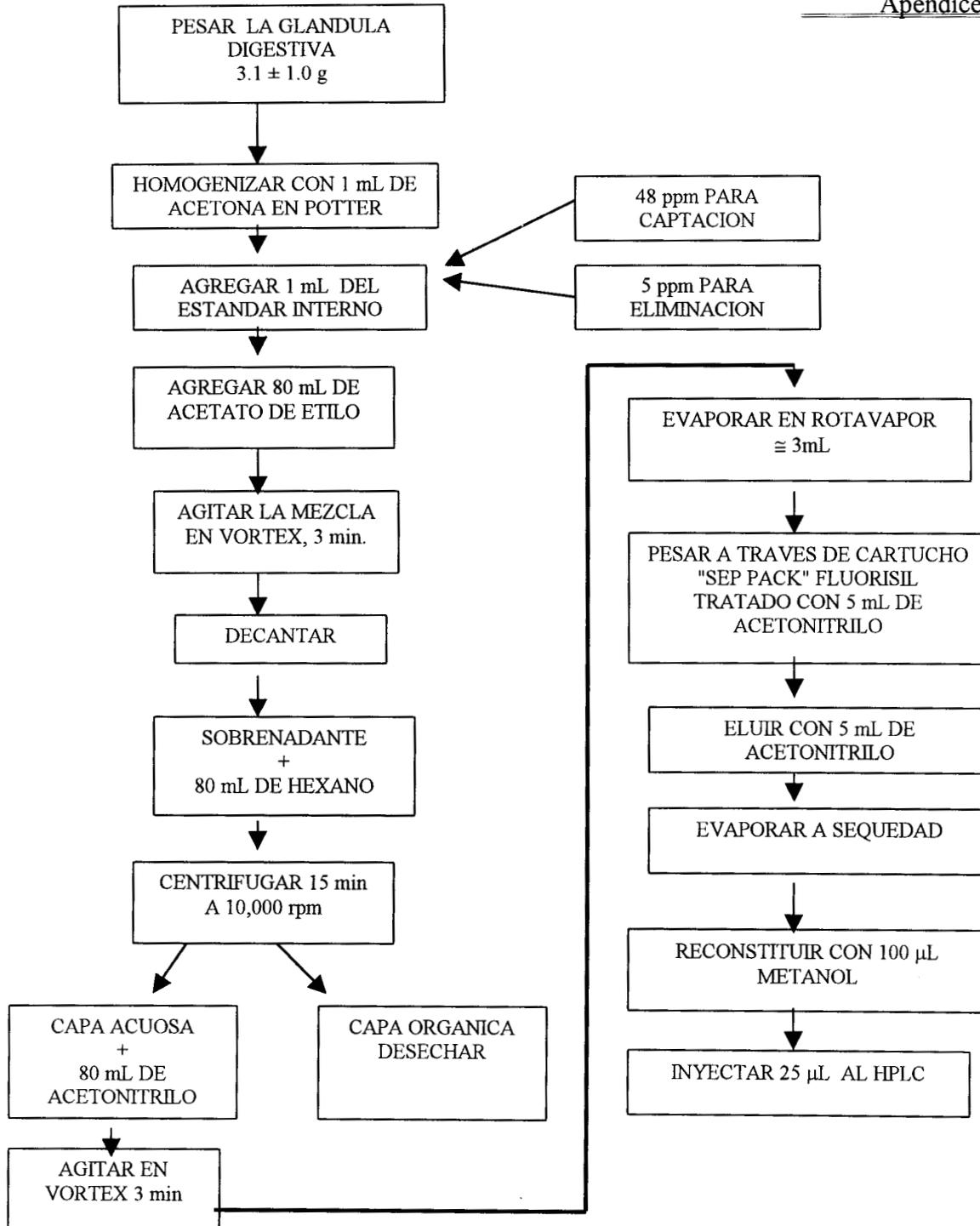


Figura No.14. Esquema de preparación final de muestras tisulares para cuantificar carbaril.

A1-3.6. Condiciones cromatográficas

Los residuos de carbaril fueron analizados con un cromatógrafo de líquidos Varian, equipado con una bomba de alta presión, modelo 9012, un detector de fluorescencia mod. 9070, un integrador Varian 4400, un inyector manual rheodyne y un instrumento de derivatización post-columna PCX. (Pickering)

La cromatografía fue realizada en una columna especial para determinar carbamatos (Pickering), de característica no polar C₁₈, 4.6 X 150 mm y tamaño de partícula de 5 µm. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.8mL/min. La mezcla de solventes de elución elegida fue: metanol-agua (49:51), la longitud de excitación se ajustó a 330 nm y la de emisión a 465 nm. El volumen de inyección fue de 25 µL. En las condiciones cromatográficas descritas, los tiempos de retención para carbaril y estándar interno fueron: 7.7 y 9.9 min, respectivamente.

El método EPA-531 que fue adoptado para este estudio, se basa brevemente en la elución de los componentes de la columna de HPLC, con posterior hidrólisis alcalina empleando NaOH en un reactor post-columna a 100°C. La metilamina formada reacciona con el O-ftalaldehído y 2 mercaptoetanol para formar un compuesto isoindol que fue detectado en un equipo de fluorescencia, ver reacción abajo, Figura No. 15:

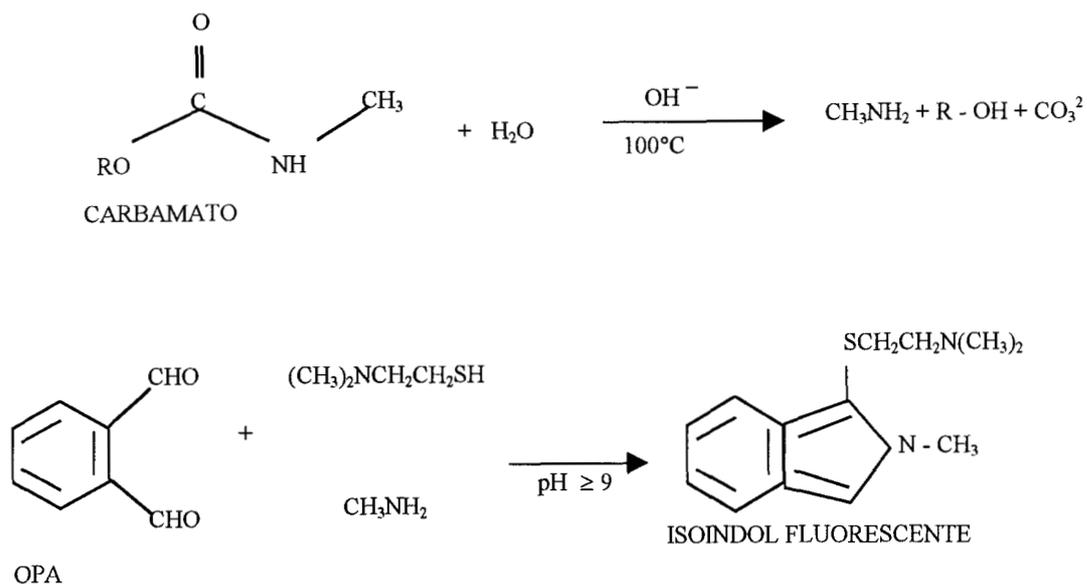


Figura No. 15. Reacciones químicas del método EPA-531, para determinar carbaril.

A1-4. Resultados

La separación de carbaril de las muestras de tejido total de caracol, es un problema difícil de resolver, especialmente por la cantidad de lípidos, proteínas y el color anaranjado que se genera. Con el manejo de los solventes hexano y acetona, se logró aislar dos tipos de colorante, ambos anaranjados, uno con características lípidicas y otro con polares.

Con el equipo soxhlet se extrajeron varias sustancias de interferencia del tejido que tenían tiempos de retención similares a los picos de interés, especialmente cuando se utilizó cloroformo y en menor grado con cloruro de metileno y acetona, ver Figuras D-1, D-2 y D-3.

Además, los varios tipos de papel whatman que fueron empleados para la elaboración de los cartuchos del soxhlet, presentaron sustancias de interferencia bajo las condiciones de trabajo establecidas.

Con sonicación y CH_2Cl_2 , se observaron también muchas impurezas en los cromatogramas de tejido, apareciendo estos en los tiempos de retención correspondientes a carbaril y el EI, ver Figura D-4, comprobándose una degradación total del carbaril en cloroformo y cloruro de metileno, pero no en acetato de etilo. Los picos de alfa naftol fueron detectados, señalando una buena estabilidad de este compuesto en acetato de etilo, ver Figura D-5 y D-6.

Debido a la complejidad de la matriz corporal total de tejido blando, se trabajaron varios órganos empleando una extracción líquido/líquido bajo las condiciones finales establecidas, procediendo posteriormente a la inyección en el cromatógrafo para estimar las interferencias y conocer la selectividad de esta etapa. Los cromatogramas del pretratamiento de limpieza de algunos órganos, son mostrados desde la Figura D-7 a la D-11.

Los principales picos de interferencia se presentaron en los primeros tiempos y no enmascararon los picos del carbaril y el estándar interno, cuyos tiempos de retención fueron 7.7 y 9.9 min respectivamente, ver Figura D-3. Empleando el método propuesto para detectar el plaguicida en muestras de diferentes órganos de animales intoxicados con 0.09 (límite permisible) y 1.46 $\mu\text{g/mL}$ (1/10 de la CL_{50}), se observó que la limpieza y separación del tóxico de la matriz biológica fue suficiente para permitir la cuantificación y que además, el agroquímico se bioconcentró principalmente en la glándula digestiva y no se presentaron productos del metabolismo, específicamente alfa naftol, ver Figuras desde D-12 hasta D-15.

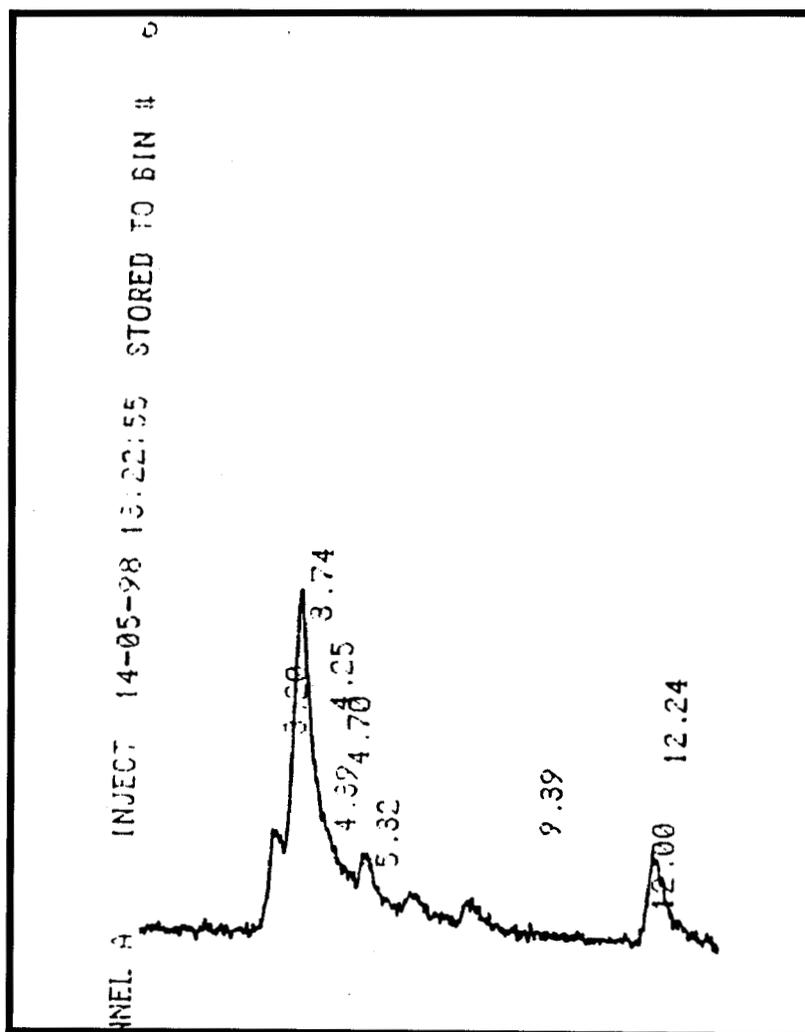


Fig. D-1. Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con cloroformo

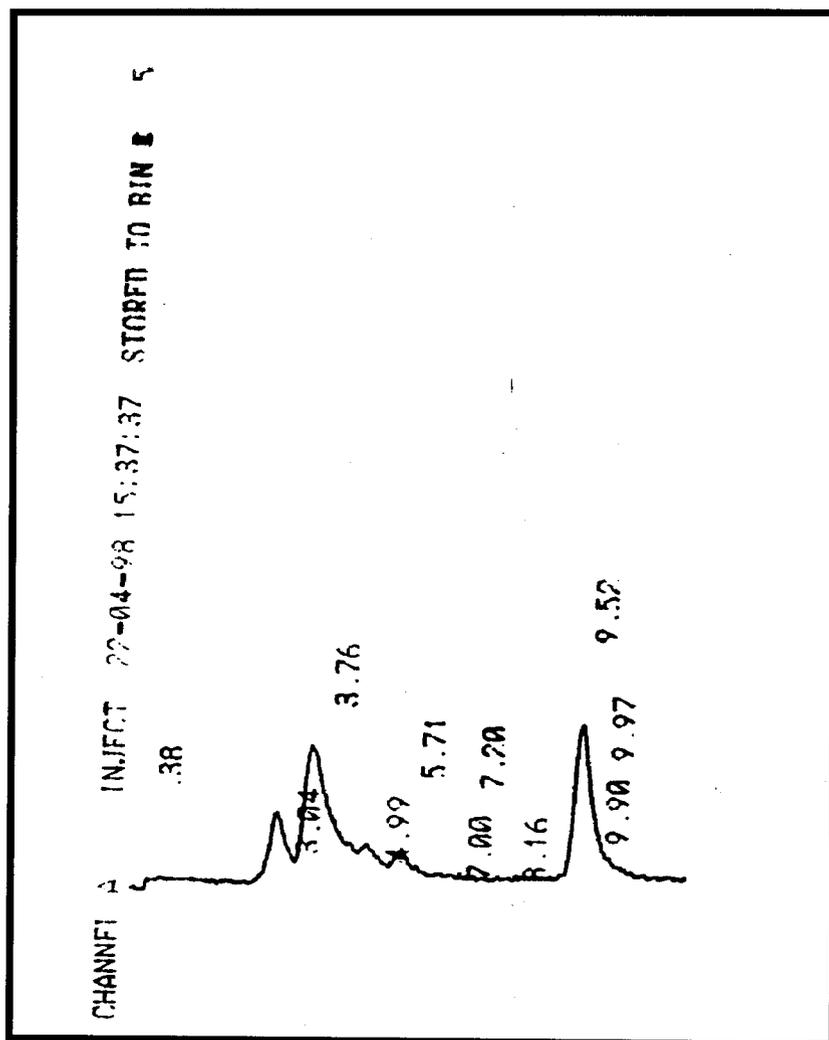


Fig. D-2. Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con cloruro de metileno

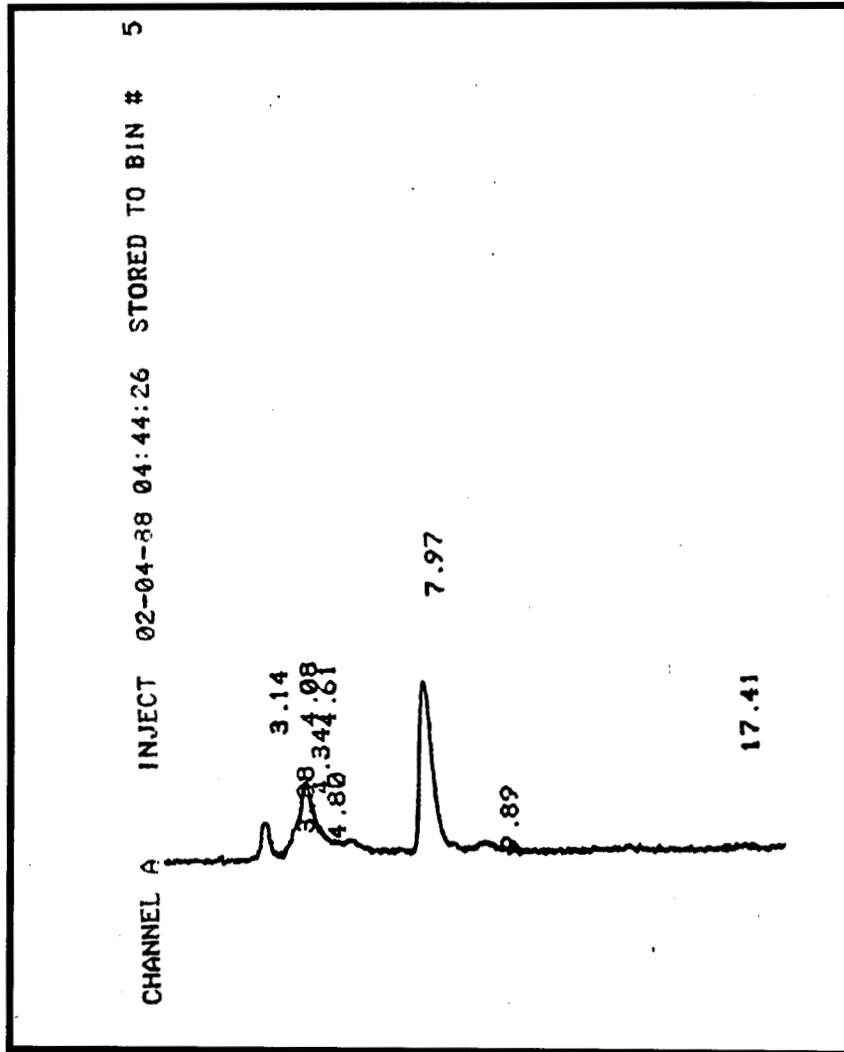


Fig. D-3. Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con acetona en soxhlet

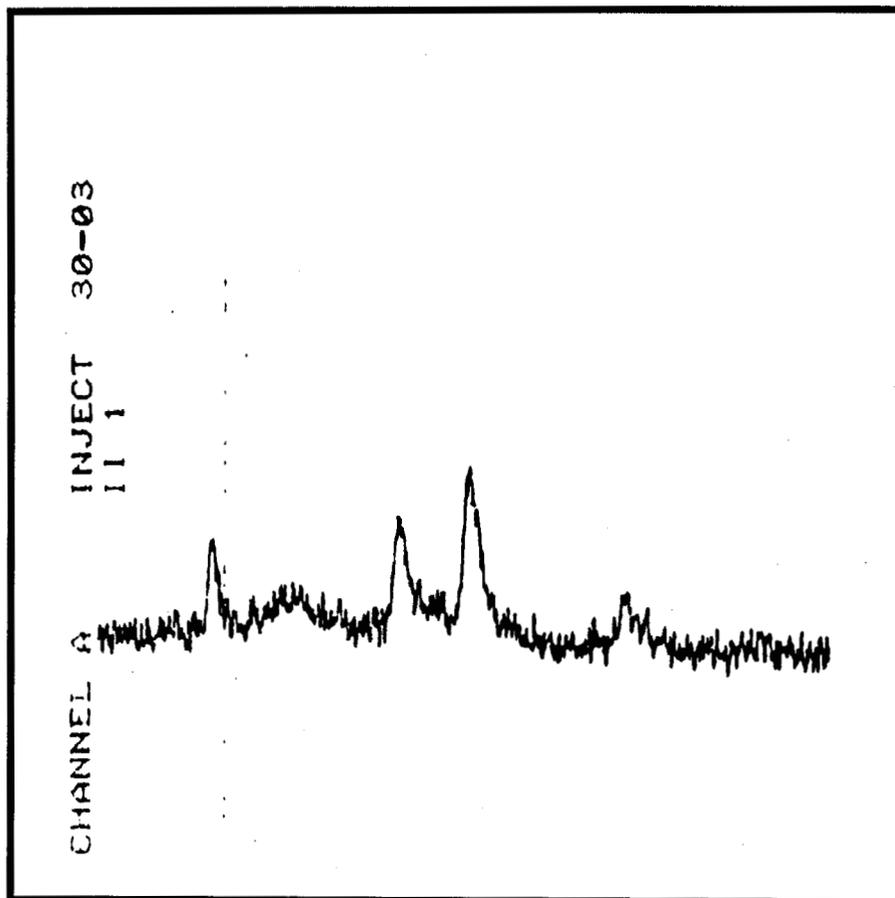


Fig. D-4. Cromatograma de tejido total de caracol (blanco) extraído con CHCl_2 en sonicador

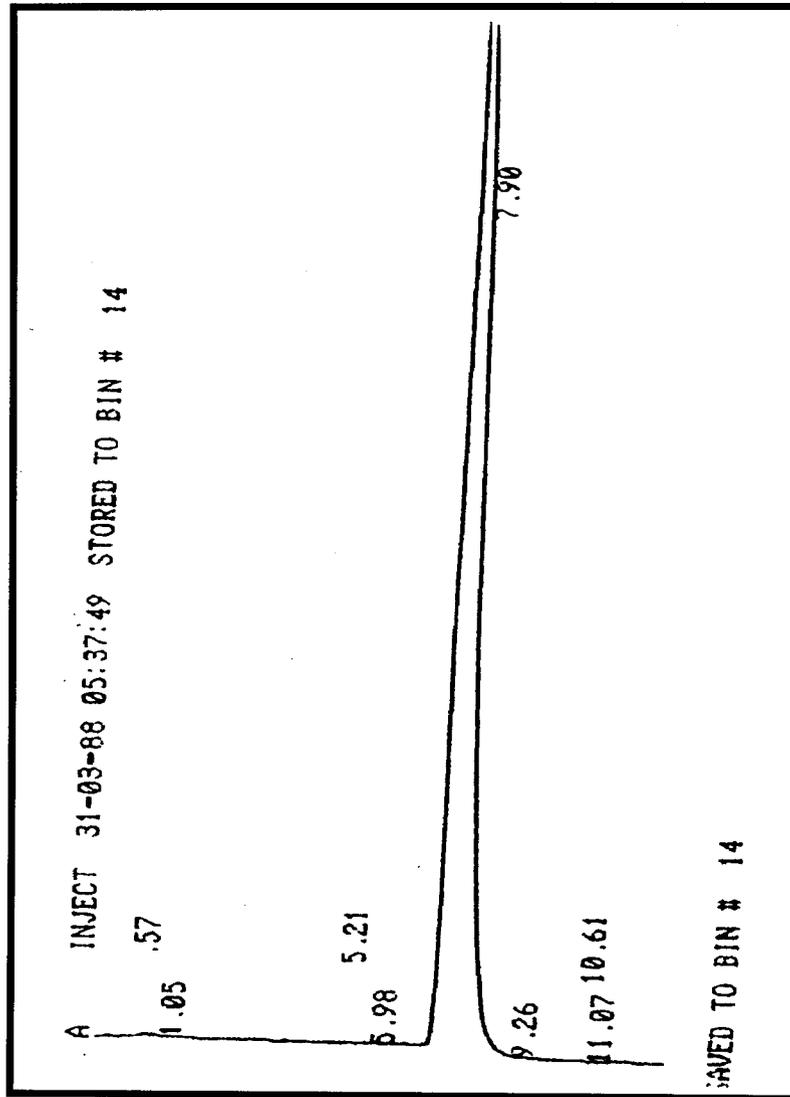


Fig. D-5. Cromatograma de carbaril sometido a sonicación por 15 min, con acetato de etilo.

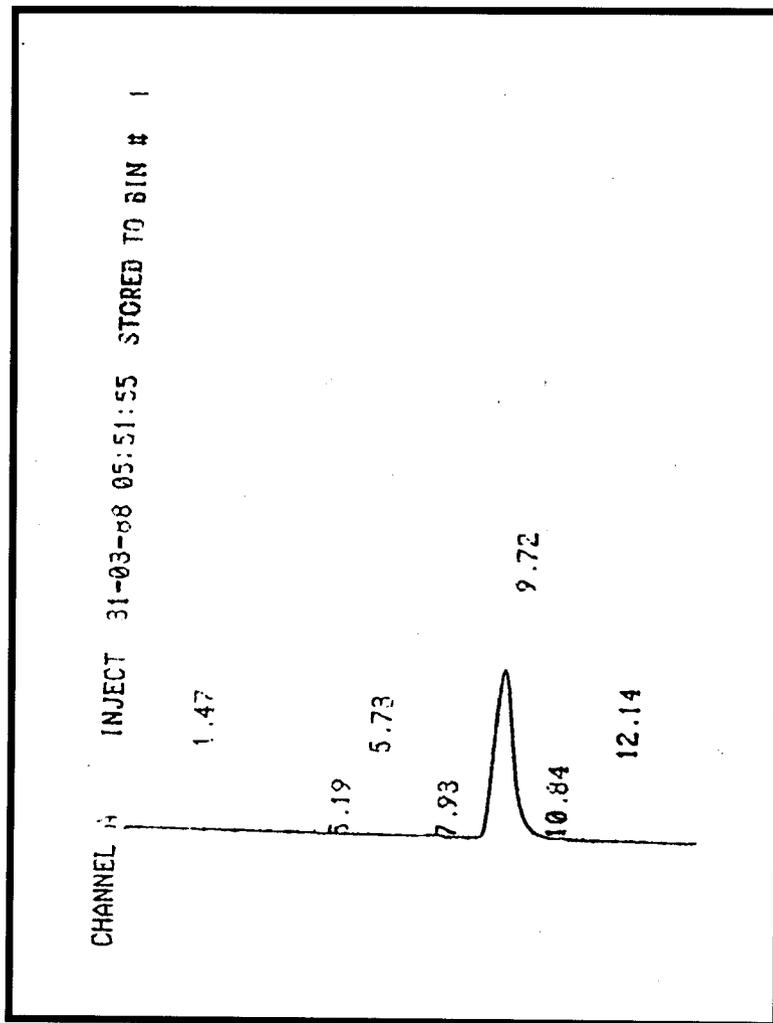


Fig. D-6. Cromatograma de α -naftol sometido a sonicación por 15 min, con acetato de etilo.

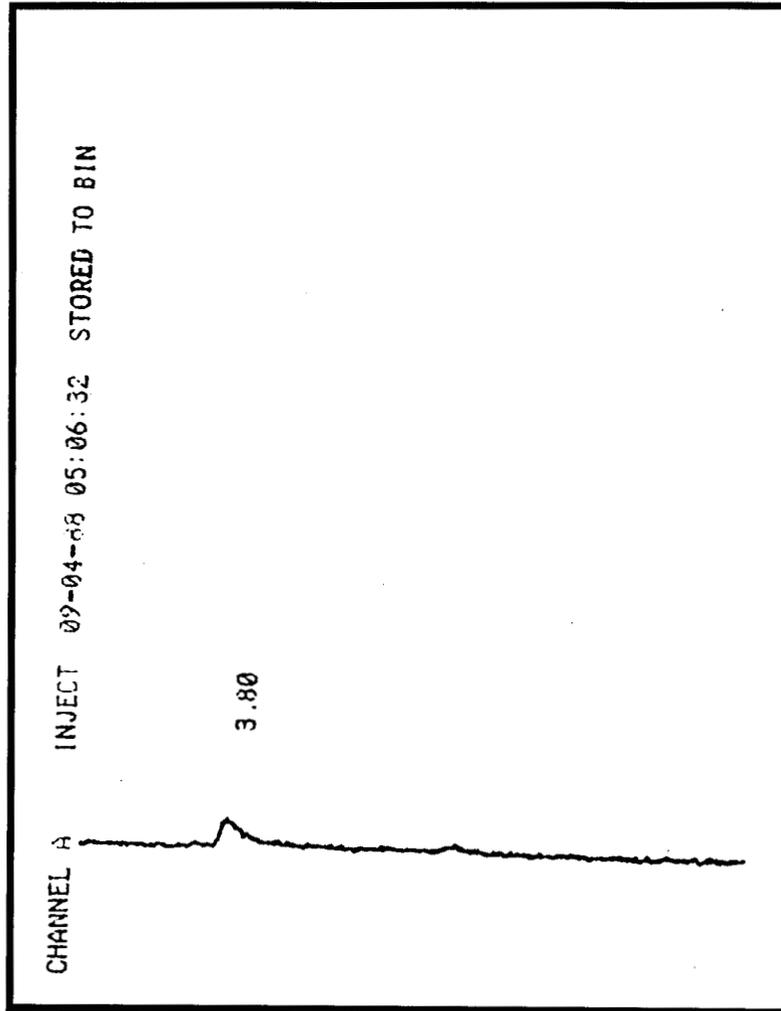


Fig. D-7. Cromatograma de pie (blanco) tratado con acetato de etilo.

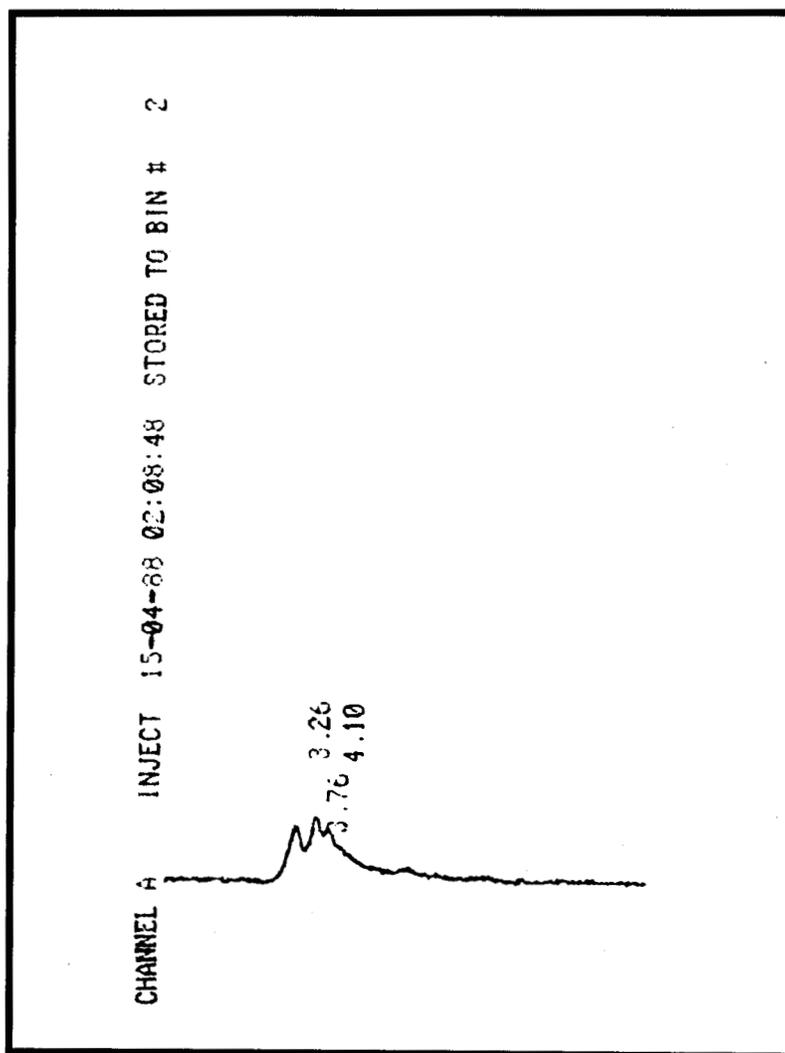


Fig. D-8. Cromatograma de intestino (blanco) tratado con acetato de etilo

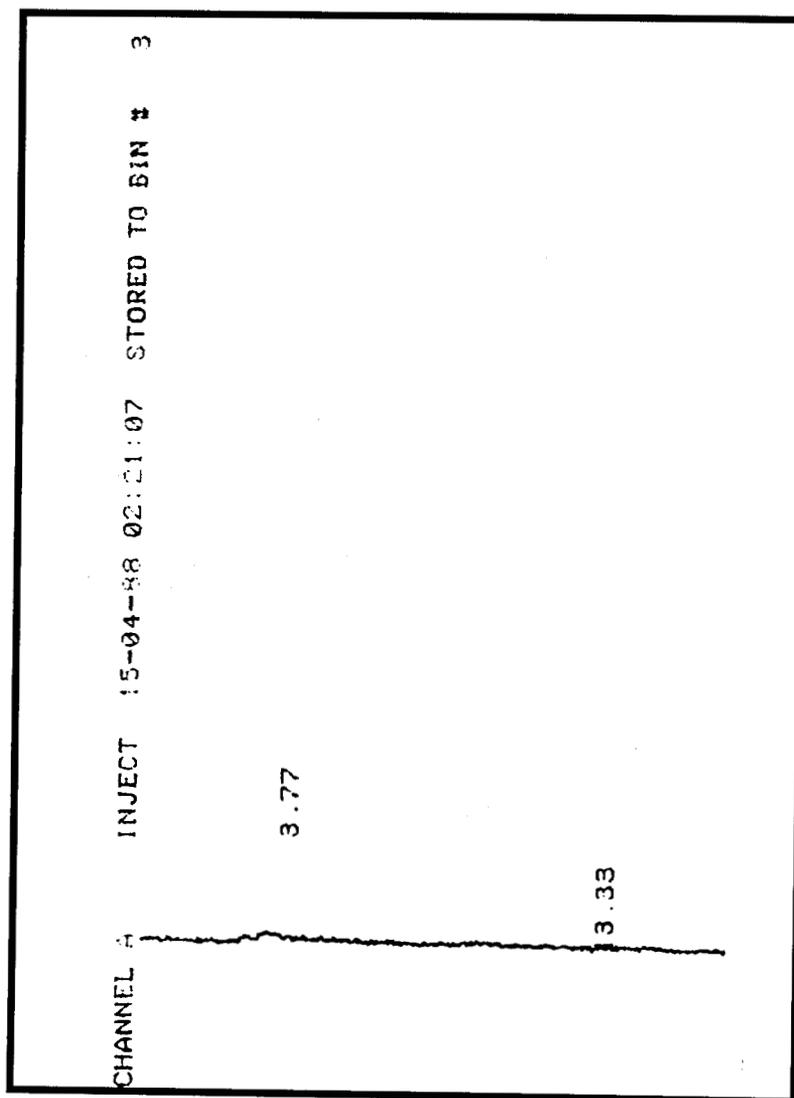


Fig. D-9. Cromatograma de glándula de albúmina (blanco) tratado con acetato de etilo.

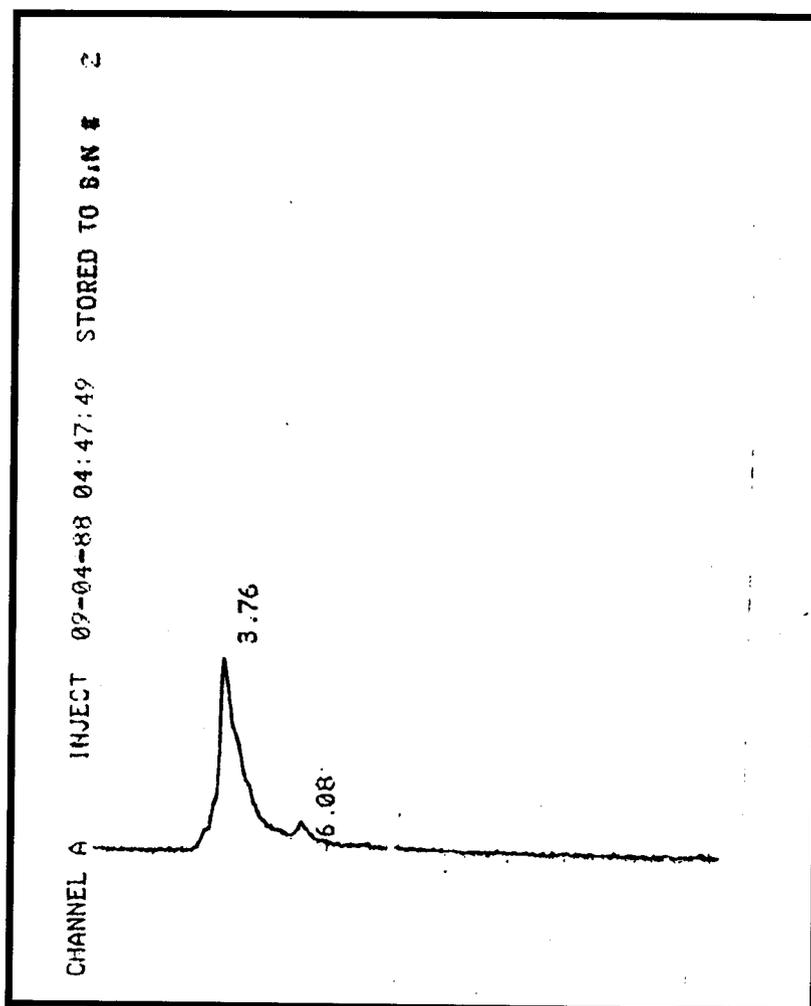


Fig. D-10. Cromatograma de glándula digestiva (blanco) tratada con acetato de etilo.

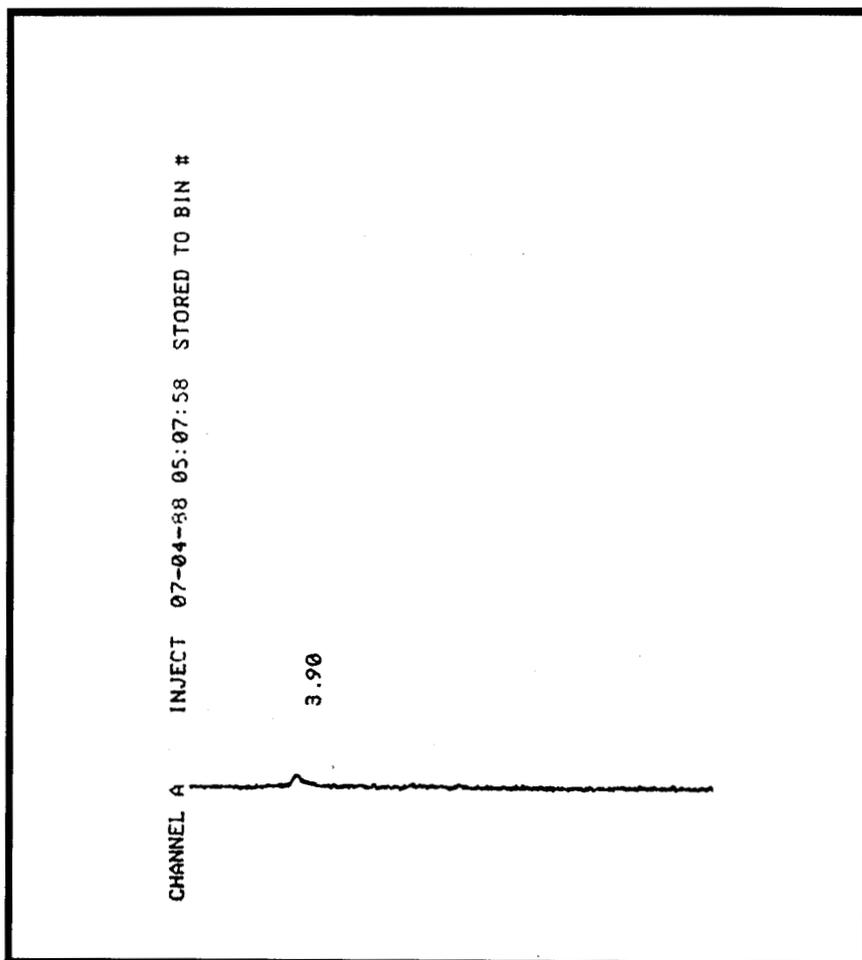


Fig. D-11. Cromatograma de branquias (blanco) tratado con acetato de etilo.

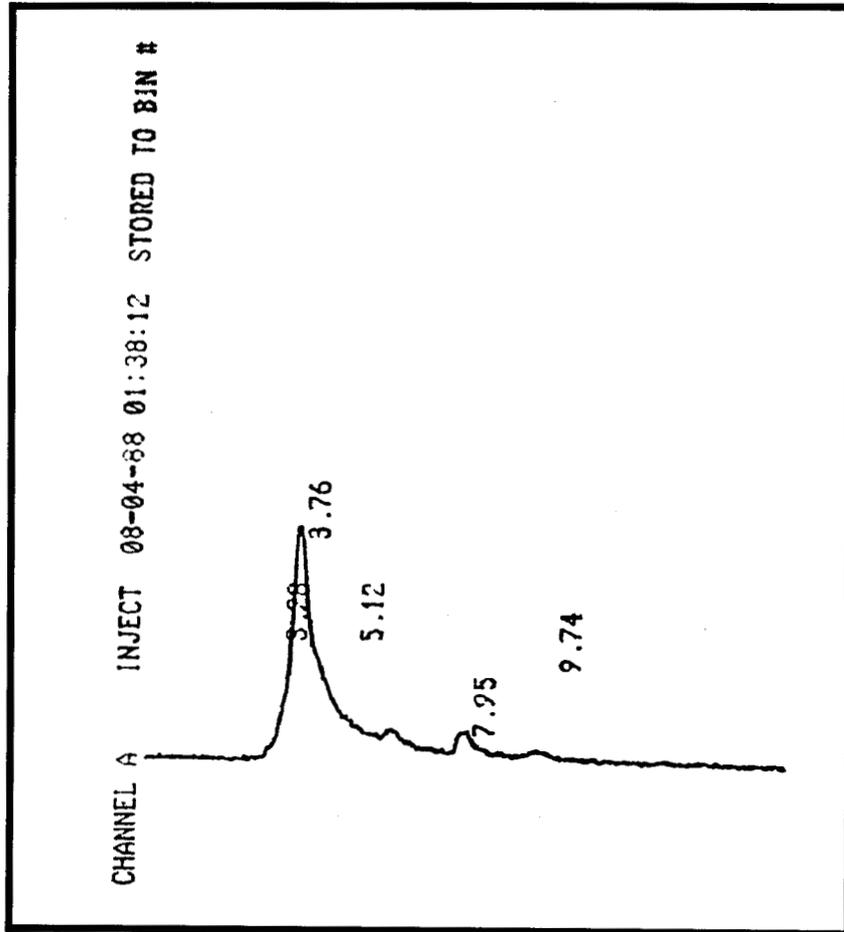


Fig. D-12. Cromatograma de glándula digestiva de caracoles intoxicados durante 24 horas con 0.09 µg/mL de carbaril.

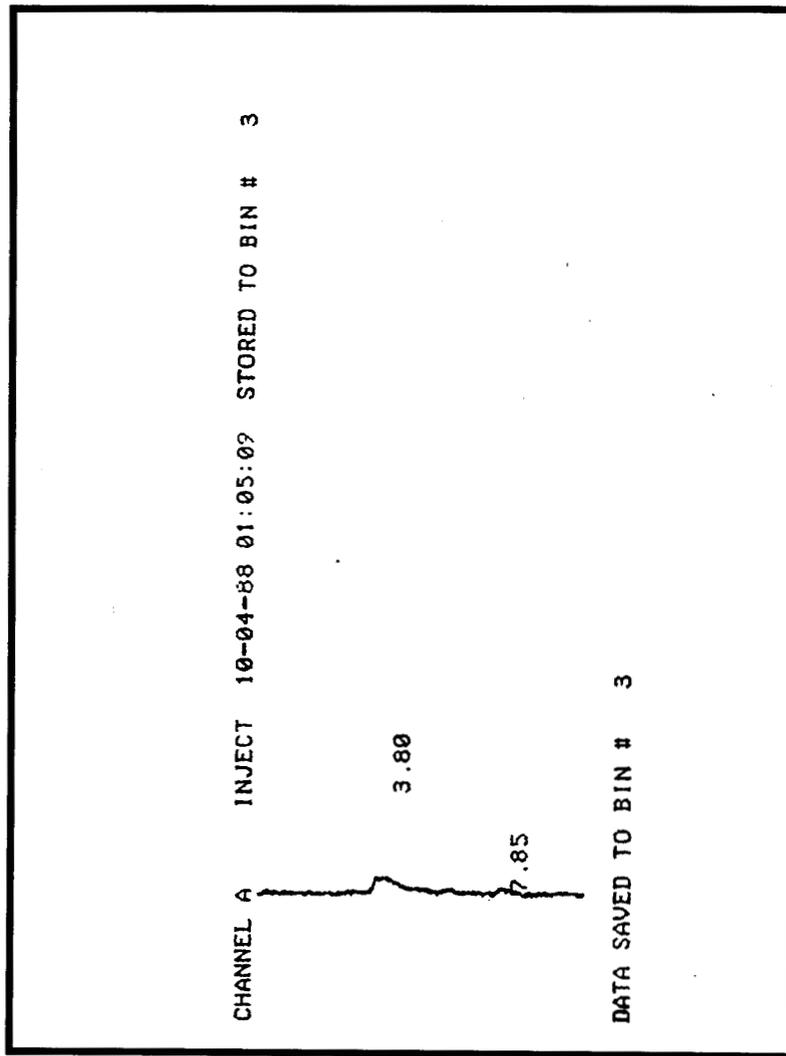


Fig. D-13. Cromatograma de tejido de branquias de caracoles intoxicados durante 24 h con 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbaril.

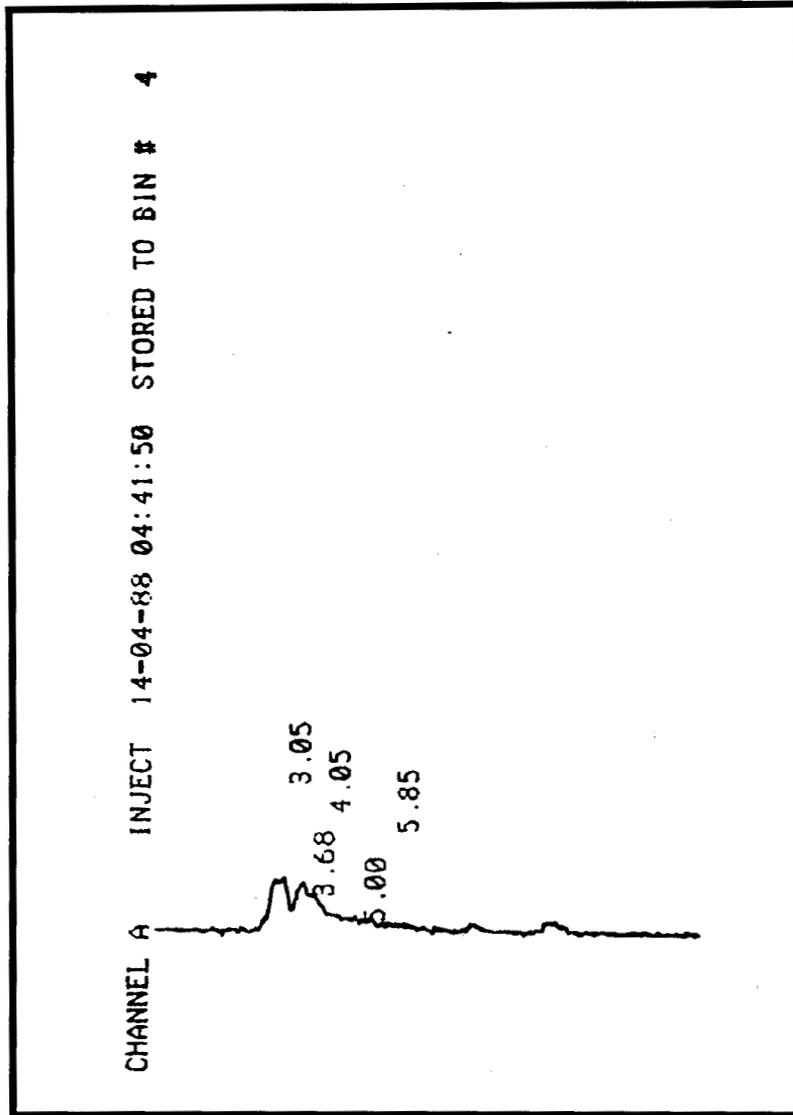


Fig. D-14. Cromatograma de intestino de caracoles intoxicados durante 24 h con 0.09 µg/mL de carbaril

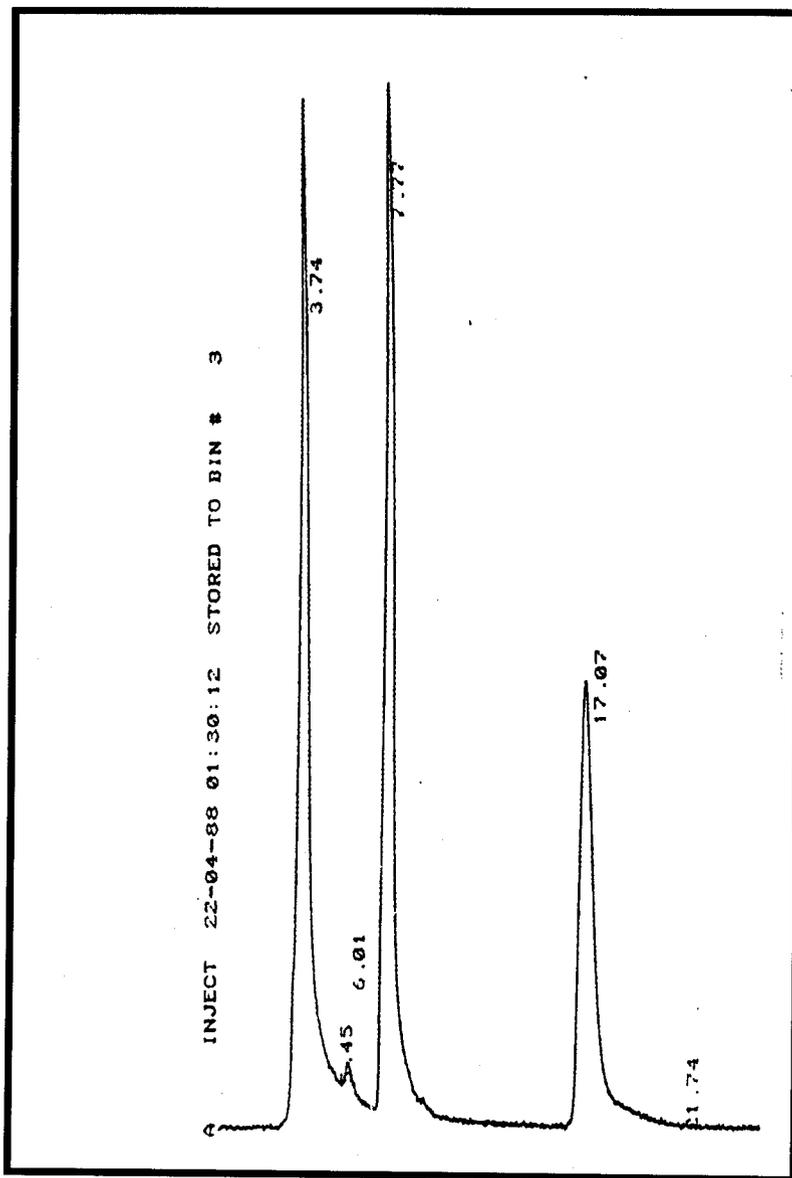


Fig. D-15. Cromatograma de carbaril captado por la glándula digestiva de caracoles intoxicados con 1.46 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. (se agregó más agua a la fase móvil, para observar la existencia de interferencias entre carbaril y estándar interno; t_R 7.7 y 17.07 min. respectivamente).

A1-5. Discusión

Varios métodos por HPLC se han descrito para la determinación de N-metil carbamatos, la mayoría con aplicación a muestras de agua, sedimento y follaje. (Pieper, 1979; Blaicher y col., 1980).

Dadas las características de biodegradación e inestabilidad química del carbaril, se le ha dado poca importancia al proceso de bioacumulación, y los métodos de cuantificación en tejidos de animales son escasos, por lo mismo muy pocos procedimientos describen la preparación de tales muestras.

La tendencia del análisis de plaguicidas en años recientes, ha sido el empleo de las extracciones líquido-líquido y EFS. Las razones son: una mayor eficiencia de extracción, fácil uso, menos gasto de solventes, potencial para automatización y aumento de la selectividad.

Las interferencias son impurezas que pueden generarse a partir de la matriz biológica, solventes y sistema analítico empleado.

Las etapas de extracción y limpieza con soxhlet y sonicación resultaron inadecuadas, debido a que las interferencias obtenidas usando tejido fueron muy altas. Estas impurezas fueron básicamente de tipo proteico, poniéndose de manifiesto su presencia con el método de Bradford (1976).

Se observó que el carbaril también podía identificarse con el mismo método, este hallazgo es de interés, ya que probablemente, tanto las proteínas como el xenobiótico presentan grupos químicos similares (péptidico y carbamilo) que propician la dificultad en la separación y una buena resolución analítica.

En este estudio la limpieza y separación de carbaril del tejido total fue realizada con extracción líquido/líquido empleando acetato de etilo, hexano/acetonitrilo y un cartucho de fluorisil. Para ello los cartuchos se activaron con acetonitrilo, ya que el metanol, cloroformo y cloruro de metileno no ofrecieron ninguna ventaja.

Se investigó como remover el color del eluato de naturaleza polar obtenido, después de la extracción líquido/líquido, ya que el de características lipídicas fue eliminado con hexano. La separación fue realizada eluyendo con acetonitrilo el residuo colocado en el cartucho activado, observándose que la solución que eluyó fue bastante clara, sin pérdida del carbaril.

El estudio de estabilidad con sonicación, demostró que el carbaril fue más estable en acetato de etilo que en cloroformo y cloruro de metileno. Este experimento concuerda con lo establecido por Blaicher y col., en 1980, quienes mencionaron que los carbamatos son más solubles en metanol, pero presentan más estabilidad en acetato de etilo.

Otro problema que requiere un comentario, es la remoción de interferencias generadas por el tejido, con metanol se favoreció la elución de impurezas, pero se

enmascaraban los picos de interés, eligiéndose finalmente el acetonitrilo. En este sentido, Barceló y col., (1994) obtuvieron resultados similares. Cabe señalar que trabajando con tejido total se tenían muchos compuestos que absorbían en fluorescencia e interferían con la determinación del plaguicida.

Cuando se trabajó con órganos aislados, se eligió la glándula digestiva, ya que ésta captaba más del 90% y además las interferencias coloridas derivadas de este tejido fueron mínimas.

Por otro lado, aunque se detectaron interferencias con el método final desarrollado para la cuantificación de carbaril, el lapso de tiempo entre los picos de interés y estas impurezas, fue suficiente permitiendo una buena separación.

Además se decidió utilizar dos cantidades diferentes de EI (48 y 5 $\mu\text{g/mL}$) para evaluar el xenobiótico durante la fase de bioconcentración y eliminación respectivamente, debido a que en este último proceso el decaimiento de las concentraciones de carbaril fue muy rápido y con una menor cantidad de EI se obtuvieron relaciones de alturas de picos más confiables.

A1-6. Conclusiones

El método analítico desarrollado, permitió la cuantificación de carbaril en muestras de agua y tejido.

El promedio de la recuperación del carbaril ($98.7\% \pm 3.0$) fue satisfactoria y comparable al del estándar interno ($96.5\% \pm 3.5$). Este resultado es importante, porque los estándares internos se usan para estimar la eficiencia de extracción.

A2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA DETERMINAR CARBARIL

A2-1. Introducción

El método analítico para la cuantificación de tóxicos y sus metabolitos en muestras biológicas, juega un papel importante en la evaluación e interpretación de los datos toxocinéticos (Hirtz, 1986). La validación incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que el método elegido para cuantificar la concentración de un tóxico (o serie de tóxicos) en una matriz biológica en particular es confiable.

Todas las variables del método deben ser consideradas, incluyendo muestreo, procedimiento, preparación de la muestra, separación cromatográfica, detección y evaluación de datos.

A2-1.1. Parámetros que determinan la validación de un método analítico.

La validación comprende una serie de pruebas sistemáticas que consisten en evaluar las siguientes propiedades estadísticas de ejecución, conforme a los criterios de aceptación:

- Linealidad del sistema

- Linealidad del método
- Precisión:
 - a) Repetibilidad
 - b) Reproducibilidad
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Especificidad

Linealidad de sistema: Es la relación que se establece mediante una recta entre la respuesta (variable Y) y la concentración (Variable X) dentro de un intervalo determinado.

Linealidad del método: Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado).

Precisión: Es una medida del error aleatorio definida como la concordancia entre resultados analíticos, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea. La precisión tiene dos derivaciones: la repetibilidad y la reproducibilidad.

- Repetibilidad, es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.
- Reproducibilidad es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo laboratorio empleando el mismo equipo.

Especificidad/selectividad. Es la habilidad de separar el tóxico desde los productos de degradación y metabolitos para obtener una respuesta debida únicamente al compuesto de interés.

La aceptación de un método analítico depende de la demostración de su calidad y validación. Aunque algunas agencias estan trabajando para el establecimiento de guías adecuadas, para la validación de métodos empleados en la determinación de plaguicidas, no se han establecido aún, métodos oficiales.

A2-2. Objetivos

Validar el método analítico desarrollado para cuantificar el carbaril en muestras de tejido y agua, con la finalidad de demostrar que el método reúne los requisitos para realizar un estudio de toxicocinética, bajo las condiciones experimentales establecidas.

A2-3. Métodos

◆ **Linealidad del sistema:** (LS) y **Linealidad del método** (LM).

Se adicionó al blanco (agua), concentraciones conocidas del tóxico disueltas en acetato de etilo (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$) para obtener LS y en el tejido de interés (glándula digestiva) para obtener LM. Se analizó cada solución y muestra, siguiendo el procedimiento mostrado en las Figuras 7 y 14 y los experimentos se realizaron por triplicado.

◆ **Exactitud y repetibilidad del método.**

Empleando 5 muestras de tejido adicionadas con carbaril de manera independiente, se determinó la cantidad recuperada del xenobiótico, la cual fue expresada en %. El análisis se llevó a cabo por el mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Precisión del método. (Reproducibilidad). Se obtuvo con 2 analistas en 2 días diferentes, analizando de manera independiente por quintuplicado cada muestra adicionada con carbaril a la concentración de 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

Selectividad. Los tiempos de retención de los picos de interés en los cromatogramas de los blancos de tejido se analizaron, comparándolos con los de los compuestos endógenos.

A2-4. Resultados.

A2-4.1. Linealidad del sistema:

La linealidad de la respuesta del detector de fluorescencia en el intervalo de concentración de 0.5 a 5 $\mu\text{g/mL}$ del carbaril en agua se ilustra en la Figura V-1. La respuesta es lineal en todo el intervalo de trabajo elegido.

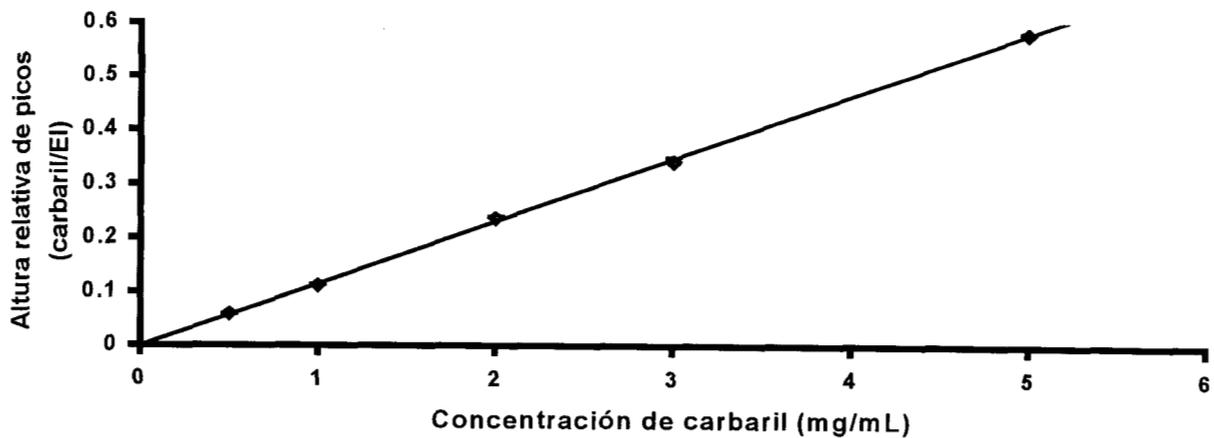


Figura V-1. Linealidad del sistema obtenida con 48 $\mu\text{g/mL}$ de EI

A continuación se presentan las tablas de los datos correspondientes a la linealidad del sistema.

TABLA V-1. ALTURAS RELATIVAS DE PICOS DE CARBARIL/EI (5 µg/mL) DETERMINADAS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE CARBARIL EMPLEADA (LS)

Concentración µg/mL	Altura relativa de picos C/EI					\bar{X}	t_{n-1}	CV%
0.5	0.4933	0.5031	0.4714	0.4824	0.4983	0.4897	0.012	2.6
1.0	0.9837	0.9875	0.9719	0.9933	0.9877	0.9848	7.9×10^{-3}	0.08
2.0	1.8361	1.9432	1.8500	1.9488	1.8455	1.8847	0.056	2.9
3.0	2.8918	2.9314	2.7318	2.8422	2.9103	2.8615	0.079	2.7
5.0	4.9464	4.8133	4.8245	4.8901	4.7911	4.8577	0.06	1.2
b = 0.009		m = 0.9671		$r^2 = 0.9987$				

TABLA No. V-2. RESULTADOS ESTADISTICOS DEL (ANDEVA) PARA CONSTATAR LA LS, 5µg/mL DE EI.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de Cuadrados	F experimental
Regresión	1	63.918398460	63.918398460	18015.875
Error de la regresión	23	0.081601540	0.003547893	
Error total	24	64.0		

TABLA V-3. ALTURAS RELATIVAS DE PICOS DE CARBARIL/EI (48 µg/mL) DETERMINADAS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE CARBARIL EMPLEADA (LS)

Concentración µg/mL	Altura relativa de picos C/EI					\bar{x}	t	CV %
0.5	0.0589	0.0603	0.0571	0.0587	0.0590	0.0587		
1.0	0.1133	0.1100	0.1104	0.1099	0.1142	0.1115	2.0×10^{-3}	1.8
2.0	0.2328	0.2410	0.2350	0.2302	0.2357	0.2349	4.0×10^{-3}	1.7
3.0	0.3452	0.3362	0.3271	0.3475	0.3450	0.3402	8.4×10^{-3}	2.4
5.0	0.5723	0.5815	0.5718	0.5791	0.5812	0.5771	4.7×10^{-3}	0.08
b = -5.3×10^{-4}		m = 0.1152		$r^2 = 0.9991$				

TABLA V-4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE (ANDEVA), PARA CONSTATAR LA LS, 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DE EI

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F experimental
Regresión	1	63.940507874	63.94050784	24719.77
Error de la regresión	23	0.059492126	0.002586614	
Error total	24	64.0		

A2-4.2. Linealidad del método

La linealidad del método es otro parámetro de ejecución en la validación. En muchas ocasiones este tipo de gráfico puede poner de manifiesto el efecto de la matriz biológica. El cociente de altura de picos carbaril/E.I. (5 ó 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el intervalo de concentración en ambos casos, resultó lineal con un coeficiente de correlación alto, se presenta la linealidad del método de 0 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ver Figura V-2.

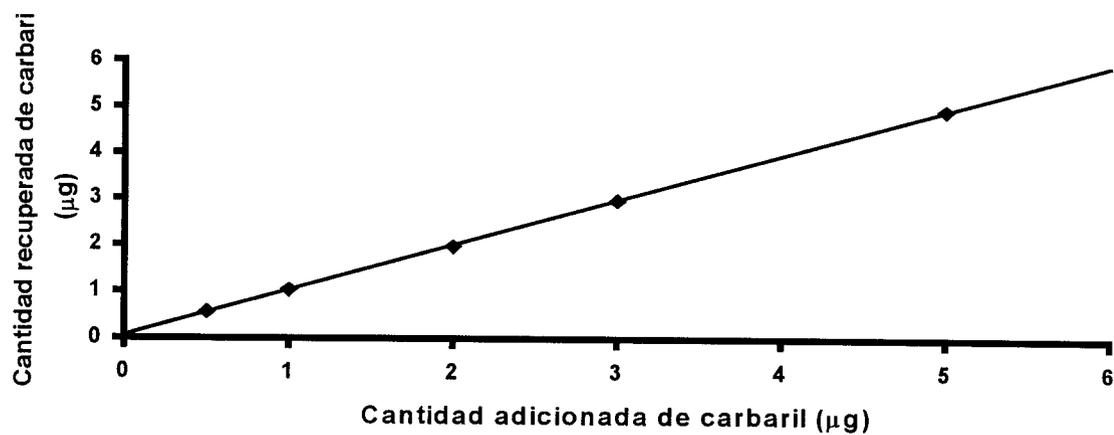


Figura V-2. Linealidad del método obtenida con 5 µg/mL de EI

A continuación se muestran las cantidades adicionadas del tóxico al tejido y las recuperadas después de la aplicación del método analítico desarrollado.

TABLA V-5. DATOS DE LA CANTIDAD DE CARBARIL ADICIONADA AL TEJIDO Y LA CANTIDAD RECUPERADA (LM), 5 µg/mL DE EI.

Cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)		
0.5	0.47	0.50	0.49
1.0	1.01	1.08	0.99
2.0	1.95	1.90	2.00
3.0	2.95	3.10	3.00
5.0	4.98	5.10	4.89

TABLA V-6. MANEJO ESTADÍSTICO PARA SUSTENTAR LA LM (ANDEVA) (5 µg/mL) DE EI.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F Experimental
Regresión	1	38.345452109	38.345452109	9138.591
Error de la regresión	13	0.004195992	0.004195992	
Error total	14	64.0		

TABLA V-7. ALTURAS DE PICOS DE CARBARIL/EI (48 µg/mL), DETERMINADAS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE CARBARIL EMPLEADA (LM)

Concentración µg/mL	Altura relativa de picos C/EI					\bar{X}	t_{n-1}	CV%
0.5	0.061	0.0605	0.0606	0.0675	0.0615	0.062	2.9×10^{-3}	4.8
1.0	0.1225	0.1251	0.1249	0.1154	0.1100	0.1195	6.6×10^{-3}	5.5
2.0	0.2375	0.2374	0.2398	0.2133	0.2239	0.2295	10×10^{-3}	4.7
3.0	0.3576	0.3749	0.3657	0.3425	0.3371	0.3552	15×10^{-3}	4.4
5.0	0.5807	0.5903	0.5818	0.5729	0.6252	0.5814	6.9×10^{-3}	1.1
$b = 3.08 \times 10^{-3}$		$m = 0.1158$		$r^2 = 0.9998$				

TABLA V-8. MANEJO ESTADÍSTICO PARA SUSTENTAR LA LM (48 µg/mL) DE EI.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F experimental
Regresión	1	63.738247608	63.738247608	5600.635
Error de la regresión	23	0.261752392	0.011380539	
Error total	24	64.0		

A2-4.3. Exactitud y repetibilidad del método

La exactitud del método fue demostrada por el ensayo de recuperación. En todas las determinaciones este parámetro fue satisfactorio y reproducible.

TABLA V-9. DATOS DE RECUPERACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE CARBARIL EN GLANDULA DIGESTIVA

No. de determinación	Cantidad adicionada a tejido (µg)	Cantidad recuperada en tejido (µg)	% recuperación
1	2.0	1.94	97.0
2	2.0	2.00	100.0
3	2.0	1.93	96.5
4	2.0	1.99	99.5
5	2.0	2.01	100.5
6	2.0	1.98	99.0

Coefficiente de variación (CV):

$$C.V. = S_{n-1}/\bar{X} (100) = \frac{1.63}{98.75} = 1.65\%$$

El promedio del porcentaje de recuperación fue de 98.75

La exactitud del método se confirma además, con las siguientes pruebas:

Prueba de "t" student

Hipótesis nula H_0 : $\bar{X} = 100.0\%$

Hipótesis alterna H_1 : $\bar{X} \neq 100.0\%$

$t_{\text{experimental}} = -1.89$

" t "_{tablas} ($\alpha = 0.050$) = 2.5706

Intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación:

$$97.03 < 100 < 100.46$$

A2-4.4. Límites de detección y cuantificación

La definición del límite de detección (LDD) que se utiliza comúnmente por varios organismos internacionales, puede enunciarse mediante las fórmulas simplificadas:

1a. $LDD = b + 3S_{y/x}$

Donde: $S_{y/x}$ = desviación estándar del grupo de blancos.

b = ordenada al origen

1b. $LDD = b \pm 1.95 (S_{y/x})$

2. $LDC = 2 (LDD)$

Donde LDC = límite de cuantificación.

A2-4.5. Precisión del método

Se describe una prueba estadística (ANDEVA) para evaluar el desempeño del método, con el estudio de las variables analista y día.

TABLA V-10. RESULTADOS DE (REPRODUCIBILIDAD), EFECTO ANALISTA/DÍA

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
D I A 1	97.2	92.2
	99.2	101.3
	91.6	94.8
	100.0	101.0
	102.3	90.5
D I A 2	97.0	96.2
	96.5	96.5
	100.0	100.6
	99.0	103.0
	101.0	100.0

TABLA V-11. MANEJO ESTADISTICO PARA SUSTENTAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO, (ANDEVA)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de cuadrados	F experimental
Analista	1	2.9650	2.9650	0.20994866 1.0616425
Día	2	28.2450	14.1225	
Error	16	212.84	13.3025	

Los resultados muestran que el método es reproducible y confiable para determinar carbaril en tejido.

La precisión del método se validó por un análisis de varianza que sustenta la no variación significativa introducida por el analista o día, en la determinación de carbaril

A2-4.6. Criterios de aceptación para la linealidad

- Construir una tabla de (ANDEVA) y tomar la decisión considerando las siguientes reglas:

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} \text{ (glr 0.01)}$$

Lo que establece una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida.

Cuando se tiene $F_{\text{regresión}} < F_{\text{crítica}}$ (glr 0.01), no existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la respuesta medida.

A2-4.6.1. Otros criterios para la linealidad del método:

(m) Pendiente $\cong 1$

- Prueba de hipótesis para la pendiente

Ho: $m = 1$

Hi: $m \neq 1$

Realizar una prueba "t" con $\alpha = 0.05$

- ◆ Calcular los límites de confianza al 95%, la pendiente (m) debe estar dentro de este intervalo.
- ◆ Calcular los límites de confianza al 95%, la ordenada (b) debe estar incluida en este intervalo.

*Nota: Estos cálculos se aplicaron sólo para el método con EI de 5 $\mu\text{g/ml}$

A2-4.7. Criterios de aceptación para la precisión del método

1. $CV \leq 10\%$
2. La reproducibilidad interanalista e interdía debe satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método.

$F_{\text{analistas}} < F_{(gla, gld 0.05)}$. El método es reproducible por los analistas.

$F_{\text{analistas}} > F_{(gla, gld 0.05)}$. El método no es reproducible por los analistas.

$F_{\text{días}} < F_{(gld, gle 0.05)}$. El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

$F_{\text{días}} > F_{(gld, gle 0.05)}$. El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

A2-4.8. Criterios para la exactitud y repetibilidad del método

1. La media aritmética del porcentaje de carbaril recuperado, debe ser estadísticamente igual a 100%.

2. Hacer una prueba de hipótesis para la media

Ho: $\bar{X} = \mu$, donde $\mu = 100\%$ recuperado del analito adicionado.

Hi: $\bar{X} \neq \mu$

Aplicar una prueba de $t_{\text{tablas}} (n-1, \alpha = 0.05)$

$$t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$$

3. El intervalo de confianza debe incluir el 100%

4. El CV $\leq 5.0\%$

A2-5. Discusión

La ejecución del método analítico global para cuantificar el carbaril en tejido, se presenta en la tabla V-12. la precisión del método es buena, con un CV $< 10\%$. Las desviaciones presentadas entre la cantidad adicionada (100%) y la determinada

fueron muy pequeñas ($\cong 3\%$). Para el límite de detección, el valor fue de $0.25 \mu\text{g/g}$ de carbaril por gramo de tejido, y el de cuantificación fue de $0.384 \mu\text{g/g}$, valores que permitieron la cuantificación de carbaril en el estudio toxicocinético, siendo estas cantidades bastante aceptables por el grado de dificultad que presenta la determinación de carbamatos.

TABLA No. V-12. RESUMEN DE PARAMETROS DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR CARBARIL

<p>Linealidad del sistema El 5 µg/mL</p> <p>ANDEVA:</p> <p>$F_{\text{regresión}} = 18015.875$</p> <p>$F_{\text{crítica}} = 7.88 \therefore F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}}$</p>	<p>Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la respuesta.</p>
<p>Linealidad del sistema El 48 µg/mL</p> <p>ANDEVA:</p> <p>$F_{\text{regresión}} = 24719.77$</p> <p>$F_{\text{crítica}} = 7.88 \therefore F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}}$</p>	<p>Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la respuesta.</p>
<p>Linealidad del método El 5 µg/mL</p> <p>REGRESION LINEAL:</p> <p>$r^2 = 0.9985$</p> <p>$r = 0.9992$</p> <p>$m = 0.9999$</p> <p>$b = -0.004$</p> <p>Pruebas de hipótesis para la pendiente (m)</p> <p>$H_0: m = 0$</p> <p>$H_i: m \neq 0$</p> <p>$t_{\text{experimental}} = 54.99$</p> <p>$t_{\text{tablas}} (n-2; 0.975) = 2.16$</p> <p>$\therefore t_{\text{experimental}} < t_{\text{tablas}} (n-2; 0.975)$</p> <p>Intervalo de confianza para la pendiente (m)</p> <p>$0.9891 < 0.9991 < 1.0090$</p>	<p>El coeficiente de correlación y determinación se aproxima al valor de 1.</p> <p>Se rechaza H_0 y se concluye que la pendiente de la recta de regresión verdadera, no es cero.</p> <p>El intervalo de confianza incluye el valor obtenido de la pendiente.</p>

<p>Precisión del método</p> <p>Coeficiente de variación < 10%</p> <p>Del análisis de varianza EI 5 µg/mL</p> <p>$F_{\text{analista}} = 0.2099$</p> <p>$F_{\text{crítica}} (\text{gla, gld, 0.05}) = 18.51$</p> <p>$\therefore F_{\text{analista}} < F_{\text{crítica}} (\text{gla, gld, 0.05})$</p> <p>$F_{\text{día}} = 1.06164$</p> <p>$F_{\text{crítica}} (\text{gla, gld, 0.05}) = 3.63$</p> <p>$\therefore F_{\text{día}} < F_{\text{crítica}} (\text{gla, gld, 0.05})$</p>	<p>El método es reproducible por los analistas.</p> <p>El método es reproducible en distintos días por un mismo analista.</p>
<p>Exactitud y repetibilidad del método</p> <p>Porcentaje de recuperación $\bar{X} = 98.75$</p> <p>$H_0: \bar{X} = 100\%$</p> <p>$H_i: \bar{X} \neq 100\%$</p> <p>$t_{\text{experimental}} = -1.89 \therefore t_{\text{experimental}} < t_{\text{tablas}}$</p> <p>$t_{\text{tabla}} (n-1)(0.05) = 2.5706$</p> <p>Intervalo de confianza para la media</p> <p>$97.03 < 100.0 < 100.46$</p>	<p>Se acepta H_0 y el método se considera exacto.</p> <p>El intervalo de confianza incluye el valor del 100% recuperado</p>
<p>Límite de detección y cuantificación</p> <p>LM 5 µg/mL de EI</p> <p>A) $LDD = b + 3S_{y/x}$</p> <p>$LDD = 0.19030; LDD = 0.194 \mu\text{g/g}^*$</p> <p>$LDC = 2 LDD$</p> <p>$LDC = 2(0.190)$</p> <p>$LDC = 0.3800; LDC = 0.384 \mu\text{g/g}^*$</p> <p>B) $LDD = b \pm (1.95) S_{y/x}$</p> <p>$LDD = 0.2420$</p> <p>$LDD = 0.25023 \mu\text{g/g}$</p>	

* Valor obtenido en $\mu\text{g/g}$; interpolando LDD y LDC (cociente de altura de picos) en la curva estándar ajustada con regresión.

A2-6. Conclusiones.

El método es aceptable para monitorear los niveles de carbaril en tejido durante el estudio toxicocinético, bajo las condiciones experimentales establecidas. Sin embargo, el método no sigue ningún lineamiento oficial, a pesar que la cuantificación por HPLC se realizó siguiendo el método EPA-531.

XVI. BIBLIOGRAFIA

Aly OM y El-Dib MA. (1971) Studies on the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment. I. Hydrolysis of Sevin, Baygon, Pyrolan and Dimetilan in waters. *Water Res.* 5:1191-1205

Albernethy SG, Mackay D y Mc Carty LS. (1988) "Volume Fraction" correlation for narcosis in aquatic organisms. The key role of partition. *Environ Toxicol Chem.* 7:469-481.

Aravinda-Babu PR, Ramesh-Reddy G, Veera-Babu GR y Chetty CS. (1989) Recovery of benthocarb-inhibited AchE in fish brain : An in vitro study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 17:317-332

Bala-Subramanian-S y Ramaswami-M. (1991) Effect of pesticide Sevin on acetylcholinesterase (ACHE) activity in different tissues of ***Oreochromis mossambicus***. *J Ecobiol.* 3:117-122.

Barceló D, Chiron S, Lacorte S, Martínez E y Salau JS (1994) Solid phase sample preparation and stability of pesticides in water using empore disks. *Trends in analytical chemistry.* 13:352-361.

Barnes H y Blackstock J. (1973) Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. *J Exp Mar Biol Ecol.* 12:103-118.

Benson WH y Long FS (1991) Evaluation of humic-pesticide interactions on the acute toxicity of select organophosphate and carbamate insecticides. *Ecotox Environ Saf.* 21:301-307.

Blaicher G, Pfannhauser W y Woidich H. (1980) Problems encountered with the routine applications of HPLC to the analysis of carbamate pesticides. *Chromatographia.* 13:438-446.

Borgmann V, Chau YK, Wong PTS, Brown M y Yaromich J. (1996) The relationship between tributyltin (TBT) accumulation and toxicity to *Hyalella azteca* for use in identifying TBT toxicity in the field. *J. Aquat Ecosyst Health.* 5:199-206.

Bouquengneau JM, Gerday C y Disteché A. (1975) Fish mercury-binding thionein related to adaptation mechanisms. *FEBS Lett.* 55:173-177.

Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

Bryan GW y Hummerstone LG. (1978) Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from contaminated and uncontaminated estuaries. *J Mar Biol Ass UK.* 58:401-419.

Bryan GW. (1979) Bioaccumulation of marine pollutants. *Phil Trans R Soc Lond B.* 286:483-505.

- Carreón L. Desarrollo del aparato reproductor de caracol (tegogolo) *Pomacea patula* catemacencis (Baker, 1922). Proyecto de investigación. Tesis E.N.C.B., I.P.N. (1998) México, D.F. pp 3-15.
- Cerón JJ, Ferryo MD, Sancho, Gutiérrez-Panizo C y Andreu-Moliner E. (1996) Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European Eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotox Environ Saf.* 35:222-225
- Cohen Y, Tsai W, Chetty SL y Mayer GJ (1990). Dynamic partition of organic chemicals in regional environments: A multimedia screening-level modeling approach. *Environ Sci Technol.* 24:1549-1558.
- Connell DW. (1987) Ecotoxicology – A framework for investigations of hazardous chemical in the environment. *Ambio* 16: 47-50.
- Connell DW y Hawker DW. (1988) Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemical by fish. *Ecotoxicol Environ Saf.* 16:242-257
- Chiou CT. (1985) Partition coefficients of organic compounds in lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. *Environ Sci Technol.* 19:57-62
- Dahlström, BE, Paalzow LK, Segre G y Agren AJ. (1978) Relation between morphine pharmacokinetics and analgesia. *J Pharmacokin Biopharm.* 6:41-53.

Davies RP y Dobbs AJ. (1984) The prediction of bioconcentration in fish. *Water Research*. 18:1253-1262.

De Greef J. (1993) Linear compartmental models In Chemical exposure predictions. Ed D Calamari, Lewis Publisher Boca Raton Florida. pp 197-203.

Dembélé K, Haubruge E and Gaspar CH. (1999) Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio L*) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bull Environ Contam Toxicol*. 62:731-742.

Eberhardt LL, Meeks RL y Peterle TJ. (1971) Food chain model for DDT kinetics in a freshwater marsh. *Nature*. 230:60-62

Edwards CA y Fisher SW. (1991) The use of cholinesterase measurements In: assessing the impacts of the pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates In cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment. Ed. P. Mineau. Elsevier. Amsterdam. pp. 255-275.

Ellgehausen H, Guth JA y Esser HO. (1980) Factors determining the bioaccumulation potencial of pesticides in the individual compartments aquatic food chains. *Ecotoxicol Environ Saf*. 4:137-157.

Finney DJ. (1971) "Probits analysis". 3a. Ed. Cambridge Univ Press. London, England. p. 333.

- Fisher SW y Lohner TW. (1986) Studies on the environmental fate of carbaryl a function of pH. *Arch Environ Contam Toxicol.* 15:661-667.
- Freiburg MN y Hazelwood DH. (1977) Oxygen consumption of two amphibious snails: ***Pomacea paludosa*** and ***Marisa cornuarietis*** (Prosobranchia: ampullariidae). *Malacologia.* 16:541-548.
- Gaggy C, Calamari D y Bassi E. (1992) Bioconcentration of nonpolar xenobiotics in terrestrial plant biomass in : Chemical exposure predictions. Ed. D Calamari., Lewis Publishers. Boca Ratón Florida. pp 147-148.
- Gearhart J.M, Jepson GW, Clwell H.J, Andersen ME y Conolly BR. (1990) Physiologically based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic model for the inhibition of acetylcholinesterase by diisopropyl fluorophosphate. *Toxicol App Pharmacol.* 106:295-310.
- Geyer H, Sheehan P, Kotzias D, Freitag D, y Korte F (1982) Prediction of ecotoxicological behavior of chemicals : Relationships between physico- chemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel ***Mytilus edulis***. *Chemosphere.* 11:1121-1134.
- González M, Perelman A y Fuentes ME. (1990) Neurotransmitter-related enzyme acetylcholinesterase in juveniles of ***Concholepas concholepas*** (Mollusca; gastropoda; Muricidae). *J Exp Zool.* 225:1-8.

- Granados-Soto V, Flores-Murrieta J, López-Muñoz JF, Salazar LA, Villarreal JE y Castañeda Hernández G. (1992) Relationship between paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 44:741-744.
- Habig C y DiGiulio T. (1991) Biochemical Characteristics of Cholinesterases in aquatic organisms In: Cholinesterase inhibiting Insecticides. Their impact on Wildlife and the environment. Ed. P Mineau. Elsevier. Amsterdam. pp 20-32.
- Ham KD y Peterson MJ. (1994) Effect of fluctuating low-level chlorine concentrations on valve-movement behavior of the Asiatic clam (***Corbicula fluminea***). *Environ Toxicol Chem* 13, 493-498.
- Hawker DW y Connel DW. (1986) Bioconcentration of lipophilic compounds by some aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 11:184-197.
- Heinonen J, Kukkonen J, Penttinen O-P y Holopainen IJ. (1997) Effects of hipoxia on valve closure time and bioaccumulation of 2,4,5-Trichlorophenol the freshwater clam ***Sphaerium corneum*** (L.). *Ecotox Environ Saf.* 36:49-56.
- Hestrin S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivates with hydroxilamine, and its analytical application. *J Biol Chem.* 180:249-261.
- Hirtz J. (1986) Importance of analytical methods in pharmacokinetic and drug metabolism studies. *Biopharm y Drug Disp.* 7:315-326.

- Jayaprada P y Rao KVR. (1991) Carbaryl toxicity on tissue acetylcholinesterase in penaeid prawn, ***Metapenaeus monoceros*** (Fabricius) -A monitoring study. *Indian J Comp Anim Physiol.* 9:38-43.
- Kallyer DB, Fisher SW y Lydy MJ. (1997) Recovery following pulsed exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the midge, ***Chironomus riparius***. *Arch Environ Contam Toxicol.* 33:39-33.
- Kanazawa J. (1975) Uptake and excretion of organophosphorus and carbamate insecticides by fresh water fish, Mutsugo, ***Pseudorasbora parva***. *Bull Environ Contam Toxicol.* 14:346-352.
- Katzung B G. (1991) Introducción a la farmacología del sistema nervioso autónomo. En farmacología básica y clínica 4ª. Edición Katzung. México. Ed. Manual moderno. México. pp 63-73.
- Kenaga EE. (1972) Guidelines for environmental study of pesticides: Determination of bioconcentration potencial. *Residue Rev.* 44:73-113.
- Kerkut GA y Cottrell GA. (1963) Acetylcholine and 5-hidroxytryptamine in the snail brain. *Comp Biochem Physiol.* 8:53-63.
- Knaak JB, Tallant MJ, Kozbelt SJ y Bartley WJ. (1968) The metabolism of carbaryl in man, monkey, pig and sheep. *J Agr Food Chem.* 16:465-470.

Knight EV, Chin BH, Ueng TH y Alvarez AP. (1986) Differences in the in vivo and in vitro effects of the carbamate insecticide, carbaryl on rat hepatic microsomes. *Drug Chem Toxicol.* 9:253-273.

Kolbezen MJ, Metcalf RL y Fukuto TR. (1954) Insecticidal activity of carbamate cholinesterase inhibitors. *Agric Food Chem.* 2:864-870.

Kuhr RJ y Dorrough HW. (1976) Carbamate insecticides: Chemistry, biochemistry, and toxicology. *CRC Press, Cleveland. OH. pp.* 143-194.

Larrel W H , Brian GT , Lennox WJ y Yerson DR. (1989) The relationship between oxime-induced reactivation of carbamylated acetylcholinesterase and antidotal efficacy against carbamate intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol.* 98:128-133.

Liu D, Thompson K y Stracham WM. (1981) Biodegradation of carbaryl in simulated aquatic environment. *Bull Environ Contam. Toxicol.* 27: 412-417.

Ludke JL, Hill EF y Dicker MP. (1975) ChE response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol.* 3:1-21.

Mackay D y Paterson S. (1982) Fugacity revisited. *Environ Sci Technol.* 16:645A-660A.

- Mahendru. VK and Agarwal. (1983) Phorate and mexacarbamate induce changes in enzymes of the snail *Limnaea acuminata*. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:77-82.
- Mazzarri MB y Georghiou GP. (1995) Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 11:315-322.
- Meteliev VV. (1983) Classification of sewer waters and their components. In *Water Toxicology*, Ed. VS Kothekar.. Oxoman Press. Ltd. England. pp. 6-9.
- Moore KM, Jones SR y James C. (1995) Multi-residue analytical method for uron and carbamate pesticides in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Water Res.* 29:1225-1230.
- Murty AS y Ramani AV. (1992) Toxicity of anticholinesterases to aquatic organisms In: *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Ed. B. Ballantyne, T. C. Marrs. Ed. Butterworth-Heinemann. Ltd. pp 305-317.
- Neely WB, Branson DR y Blau GE. (1974) The use of the partition coeficient to measure bioconcentration potential of organic chemical in fish. *Environ Sci Technol.* 8:1113-1274.

- Newman MC y McIntosh AW. (1983) Lead elimination and size effects on accumulation by two freshwater gastropods. *Arch Environ Contam Toxicol.* 12:25-29.
- Oonnithan ES y Casida J E. (1968) Oxidation of methyl and methylcarbamate insecticide chemicals by microsomal enzymes and anticholinesterase activity of metabolites. *J Agr Food Chem.* 16:28-44.
- Ozretic B y Krajnovic-Ozretic M. (1992) Esterase heterogeneity in mussel ***Mytilus galloprovincialis***: Effects of organophosphate and carbamate pesticides **in vitro**. *Comp. Biochem. Physiol.* 1030:221-225.
- Paris DF y Lewis DL. (1973) Chemical and microbiological degradation of ten select pesticides in aquatic system. *Residue Rev.* 45:95-124.
- Parsons JT y Surgeoner GA. (1991) Effect of exposure time on the acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae. *Environ Toxicol Chem.* 10:1219-1227.
- Peltier W y Weber Cl. (1985) Methods for measuring the acute toxicity of effluents to fresh water and marine organisms. 3rd. Ed Environmental and Support laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, *EPA/600/4-85/013*. pp. 216.

- Peterson SM y Batley GE. (1993) The fate and transport of endosulfan in aquatic ecosystems. *Environ Pollut.* 83:143-152.
- Pieper, R G. (1979) Residue analysis of carbaryl on forest foliage and in stream water using HPLC. *Bull Environ Contam Toxicol.* 22:167-171.
- Repetto M y Sanz P. (1995) Fundamentos de ecotoxicología. En: *Toxicología avanzada*. Ed. Díaz de Santos. Madrid. pp 147-204.
- Reddy MS, Jayaprada-P y Rao KVR. (1990) Recovery of carbaryl inhibited ACHE in penaeid prawn, ***Metapenaeus monoceros***. *Biochem Int.* 22: 189-198.
- Roberts TR. (1996) Assessing the environmental fate of agrochemicals. *Contam Agric Wastes.* 31:325-335.
- Sampaio F, Campos MLA y Mendes GE. (1988) The action of choline esters, pilocarpine and serotonin on the heart of an amphibious snails, ***Pomacea lineata*** (Spix, 1827) (Mollusca, gastropoda, prosobranchia). *Bol Fisiol Anim S Paulo.* 12:57-69
- Scheerboom JEM y Geldof AA. (1978) A quantitative study of the assimilation of different diets in the pond snail ***Lymnaea stagnalis*** (L), Introducing a method to prevent (coprophagy). *Proc Kon Ned A Kad Wet. Series C*81:173-183.

- Schulz-Baldes, M. (1974) Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol.* 25:177-193.
- Schwinghammer TL, Kroboth PD. (1988) Basic concepts in pharmacodynamic modeling. *J Clin Pharmacol.* 28:388-394.
- SEMARNAP (1996) ¿Por qué, para qué y cómo se evalúan los riesgos para la salud y el ambiente de los plaguicidas? Serie plaguicidas No. 2, Proyecto FAO TCP / MEX / 445. México, D.F.
- Serrano R, Fernández F, Peña JB, Dosda V y Canales J. (1995) Toxicity and bioconcentration of selected organophosphorus pesticides in *Mytilus galloprovincialis* and *Venus gallina*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 29:284-290.
- Simon D, Helliwell S y Robards K. (1998) Pesticide toxicity endpoints in aquatic ecosystems. *J Aquat Ecosys Stress Rec.* 6:159-177.
- Singh O y Agarwal RA. (1981) Toxicity of certain pesticides to two economical species of snails in Northern India. *J Econ Entomol.* 74:586-571.
- Smith RV y Stewart JT. (1981) The separation step In: textbook of biopharmaceutic analysis. Ed. R.V. Smith. Ed Lea and Febiger, Philadelphia pp. 22-70.

- Soon PS y Erstfeld MK. (1997) A numerical kinetic model for bioaccumulation of organic chemicals in sediment-water systems *Chemosphere*. 34: 419-427.
- Spacie A y Hamelink JL. (1985) Bioaccumulation In: Fundamentals of aquatic Toxicology methods and applications Ed. G.M Ry, SM Petrocelli, Hemisphere publishing corporation. New York. pp 495-525.
- Stanley JG y Trial JG. (1980) Disappearance constants of carbaryl from streams contaminated by forest spraying. *Bull Environ Contam Toxicol*. 25:771-776.
- Streit B. (1979) Uptake, accumulation, and release of organic pesticides by benthic invertebrates. 2. Reversible accumulation of lindane, paraquat and 2,4 D from aqueous solution by invertebrates and detritus. *Arch Hydrobiol Suppl*. 55, 349-372.
- Swartzman GL y Kaluzny (1987) Ecological simulation Primer. MacMillan, New York. p. 370.
- Takimoto Y, Oshima M y Migamoto J. (1987) Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms. II. Metabolism in the freshwater snails, ***Cipangopalludina japonica*** and ***Physa acuta***. *Ecotoxicol Environ Saf*. 13:118-125.
- Thompson HM, Walker CH y Hardy AR. (1991) Inhibition of avian esterases by organophosphorus insecticides: problems of reactivation and storage. *Arch Environ Contam Toxicol*. 20:509-513.

Turk A. (1984) Pesticidas En: Ecología-contaminación-medio ambiente. Eds. A Turk, J Turk y JT Wittes. Ed. Interamericana. México. pp 43-56.

USEPA (1989) Measurement of N methyl carbamoyloximes and N-Methyl carbamates in drinking water by Direct aqueous injection LC with post-column derivatization. EPA Method 531 by D.L. Foerst, EPA/600/4-851054 (1986); Method 531.1 revised by R.L Graves, EPA. Environmental Monitoring and Support Laboratory. Cincinnati.

Van der Wel H y Welling W. (1989) Inhibition of acetylcholinesterase in Guppies (*Poecilia reticulata*) by clorpyrifos at sublethal concentrations: Methodological aspects. *Ecotoxicol Environ Saf.* 17:205-215.

WHO. (1994) Carbaryl revised by F. Kaloganova and PP, Simeonova. Environmental Health Criteria 153, Geneva.

Zinkl JE, Patrick JS, Nakamoto RJ y Callman J. (1987) a). Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bull Environ Contam Toxicol.* 38:29-35

Zinkl JE, Shea PJ, Nakamoto RJ y Callman J. (1987) b). Technical and biological considerations for the analysis of brain cholinesterase of rainbow trout. *Trans Am Fisheries Soc.* 116:570-573.

Relationship between Toxicokinetics of Carbaryl and Effect on Acetylcholinesterase Activity in *Pomacea patula* Snail

Beatriz Ramírez Mora,^{*1} Laura Martínez-Tabche,[†] Eugenia Sánchez-Hidalgo,[†] Gilberto Castañeda Hernández,[‡] Ma Concepción Gutiérrez Ruiz,^{*} and Francisco Flores Murrieta[‡]

^{*} Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, [†] Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN,

[‡] Centro de Investigación y Estudios Avanzados-Terapéutica Experimental, México, D.F., Mexico

Received September 27, 1999

The 96-h LC₅₀ value of carbaryl was 14.6 µg/mL for the snail *Pomacea patula*. Organisms were exposed for 72 h to a low sublethal concentration (0.1 of LC₅₀) using a semistatic contamination system; bioconcentration and elimination experiments were performed evaluating simultaneously acetylcholinesterase (ACHase) activity. The inhibition of the digestive gland ACHase reached 76% when the carbaryl concentration in tissue was 3.2 µg/g. The increased enzyme inhibition was observed concomitantly with the bioconcentration of carbaryl until 7 h. ACHase inhibition was linearly dependent on the uptake and bioconcentration of carbaryl ($r^2 = 0.87$). The transfer of snails to carbaryl-free water after 72 h of exposure was followed by rapid monophasic elimination with a half-life of 1.0 h. However, ACHase activity levels never returned to control values. These results revealed that the bioconcentration might play a critical role in contributing to the toxicity of carbaryl. © 2000 Academic Press

Key Words: snails; carbaryl; toxicokinetics; uptake; elimination; acetylcholinesterase activity.

INTRODUCTION

Water concentrations of contaminants sometimes are unreliable indicators of potentially harmful effects, because the fate of the chemicals may be affected by certain characteristics of the aquatic environment. Several authors have suggested that body concentration is a better indicator of toxic effects than water or sediment concentrations (Landrum *et al.*, 1992). pH, for instance, can alter the rate at which carbamates are decomposed by hydrolysis. Thus, the persistence of carbaryl in the water medium is short, for the most part, due to a rapid degradation (Fisher and Lohner, 1986); consequently, accumulation in organisms is low. However, it is a potent inhibitor of acetylcholinesterase

(ACHase), even at sublethal concentrations (Murty and Ramani, 1992).

There are reports of the successful use of ACHase inhibition to identify exposure of fish to cholinergic insecticides. In the same way, there is evidence that snails are more sensitive to anticholinesterases than vertebrates (Singh and Agarwal, 1981; Edwards and Fisher, 1991). Besides that, some snails metabolized less carbaryl than other aquatic species (Fisher and Lohner, 1986); all these arguments suggest that ACHase inhibition in snails could be a trigger for remedial action in an ecotoxicological risk.

If toxicokinetic investigations entail the knowledge of the fate of a substance in the body and of the time courses of the substance levels in the various tissues, then it could be coupled with a comparison of the observed effects. This enables one to express the action of the substance in quantitative terms (Filov *et al.*, 1979). On this basis it was decided that the relationship between ACHase inhibition and toxicokinetics (bioconcentration-elimination) of carbaryl in freshwater amphibious snail *Pomacea patula* (Gastropoda, Ampullariidae) be studied. This snail, an important component of aquatic food chains widely distributed in local freshwater ecosystems, is traditionally collected and commercialized in Mexico for human consumption.

MATERIAL AND METHODS

P. patula, commonly known as “teogolo snails,” were collected from Catemaco lagoon (Veracruz, Mexico). The snails were acclimated at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, and a natural light/dark cycle (13L/11D), in the laboratory aquarium for at least 1 month prior to exposure (mortality < 1%). During this period water was renewed every day and snails were fed fish food (Tetramin) *ad libitum*.

Bioassays were carried out in 1-L glass jars containing 800 mL of artificial freshwater, each one housing six snails randomly selected. At each experiment, all concentrations

¹ Current address: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, CP 11340, México D.F., México. E-mail: ltabche@vmredipn.ipn.mx.

tested and controls were in triplicate. To forestall coprophagy, each jar was adapted with a false floor of acrylic plastic with holes (Scheerboom and Geldof, 1978). The artificial medium was prepared using distillate water, according to Peltier and Weber (1985): 30 mg/L $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 mg/L MgSO_4 , 48 mg/L NaHCO_3 , and 2 mg/L KCl. The total hardness was 48 mg/L as CaCO_3 . To avoid shell closure of organisms, an adequate stream of oxygen was applied continuously; to prevent sorption of the test chemical by food, snails were not fed 24 h prior and throughout the experiments.

To avoid carbaryl degradation during all exposure bioassays, test water was renewed twice every 24 h (semistatic exposure conditions), and samples were taken to measure carbaryl concentration. pH was maintained at 6.5 by buffering the artificial freshwater with Mopso (3-[*N*-morpholino]-2 hydroxypropane sulfonic acid). Temperature, pH, and dissolved oxygen were monitored twice daily.

Carbaryl (99%, Sigma) and ethanol as solvent were added to distilled water to prepare stock solutions for bioassays. The ethanol concentration used (4 mL/L) was run as the solvent control in each experiment; artificial freshwater control was also carried out throughout all tests.

Acute Toxicity Test (96-h LC₅₀)

After a pilot test, the nominal concentrations to determine the 96-h LC₅₀ of carbaryl were 8.5, 10.8, 13.5, 17.0, and 21.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in progressive logarithmic scale. The number of dead individuals was counted daily, using an unresponsive behavior into hot water as death criteria. 96-h LC₅₀ value and 95% confidence limits were estimated by probit analysis (Pharm/PCS, 1986).

Bioconcentration-ACHase Kinetics

Ten groups of snails, each one with six individuals, were exposed to 1/10 of 96-h LC₅₀ (1.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Each group was sacrificed at one time interval: 0.3, 0.6, 1, 2, 3, 7, 12, 24, 48, and 72 h. A preliminary study carried out in this laboratory indicated that carbaryl concentration is greater in digestive gland than intestine, foot, kidney, or gonads. Thus, after snails were washed thoroughly with distilled water, the whole body tissue was separated and weighed. Immediately, the digestive glands were excised and weighed. Two pools of three organs were done: the first one was used to evaluate the carbaryl bioconcentration by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the other to estimate the ACHase activity by the method of Hestrin (1949).

Elimination-ACHase Kinetics

Thirty-six *P. patula* divided randomly into six groups were exposed for 72 h to a carbaryl concentration of

1.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After exposure, snails were transferred to glass jars containing 800 mL of uncontaminated artificial freshwater (pH 6.5). One group at a time was taken and pooled after 0, 0.33, 0.66, 1, 3, and 7 h, following the same procedure to evaluate carbaryl concentrations and ACHase activity, as described above. The pilot studies indicated that the appropriate time scale for elimination kinetics is 7 h rather than 72 h. However, ACHase activity was examined for 72 h.

HPLC Chromatographic Analysis

Evaluation of carbaryl was carried out according to USEPA (1989) methods 5 and 531.1. They were designed to use gradient liquid chromatography with fluorescence detection, accomplished by postcolumn hydrolysis and derivatization of the elute carbamates. The HPLC system consisted of a Varian 9012, equipped with a 25- μL manual rheodyne loop injector, a Varian (9070) fluorescence detector, a Varian 4400 integrator, and a Pickering Laboratories PCX 5100 postcolumn derivatization instrument.

For determination of carbaryl, a Pickering Laboratories column (C18), 4.6 mm i.d. \times 150 mm, with 5- μm particle size was used. The mobile phase was water:methanol (49:51) which was pumped at a constant flow of 1 mL/min. The column was kept at 42°C. The fluorescence detector was set at excitation 330 and emission 465 nm.

The carbaryl concentration in the water was determined by the following procedure: A measured volume (20 mL) of test water was mixed with 80 mL of chloroform; each sample was extracted three times. 4-Bromo-3,5-dimethyl phenyl-*N*-methylcarbamate (BMCD) was added as an internal standard. After drying with anhydrous sodium sulfate the solvent was concentrated to dryness on a rotary vacuum evaporator and a gentle nitrogen stream. The residue was dissolved in 100 μL of methanol and filtered on a Millipore HA filter (0.45 μm). Samples were injected into a liquid chromatograph; recoveries were in the range of 95–100% ($n = 5$).

For isolation of carbaryl from animal tissues, 3.5 \pm 1 g of a pool of digestive glands was homogenized with an aliquot of ethyl acetate; tissues (added with BMCD) were extracted three times with 80 mL of ethyl acetate, in different funnels. The organic layers were mixed and reduced on a rotary vacuum evaporator. The residue was redissolved in acetonitrile, and then lipids were extracted two times with hexane and discarded. The acetonitrile extracts were evaporated to 1–1.5 mL and next applied to a "Sep Pak" cartridge (Florisil) previously rinsed with acetonitrile. The eluate obtained was evaporated to dryness at 45°C, and immediately it was redissolved in 100 μL of methanol. The sample was filtered and then injected into a liquid chromatograph; the mean recovery rate of carbaryl was 95%.

Enzymatic Assay

Pools of digestive glands were homogenized in 2 mL of Tris buffer (pH 7), as soon as they were excised. All the enzyme preparations were carried out at 0–4°C. AChase assays were performed by a spectrophotometric method using acetylcholine chloride (Sigma) as substrate (Hestrin, 1949). The protein content was determined by the technique described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

Data Treatment

Data were analyzed with a one-compartment model; equations were adjusted using NONLIN program (Metzler *et al.*, 1974). The bioconcentration factor at the steady state (BCF_{ss}) was obtained as $BCF_{ss} = C_B/C_W$, where C_B is the biotic concentration, and C_W is the aqueous concentration of carbaryl. The BCF_{ss} was expressed on a wet weight basis. The bioconcentration of chemicals is dependent on the lipid content; therefore, the BCF_{ss} on a lipid weight basis was calculated as $BCF_L = BCF_{ss}/\text{average fat content}$.

The lipid weight of the digestive gland was determined by the method of Barnes and Blackstock (1973).

RESULTS

Acute Toxicity Test

The acute toxicity of carbaryl to *P. patula* (96-h LC₅₀) was 14.6 µg/mL (95% confidence limits = 13.2–16.3). There is a positive linear relationship for probit of mortality and log carbaryl concentration, $Y = -12.03 + 14.58X$ ($r^2 = 0.988$), seen in Fig. 1.

Bioconcentration

Figure 2 presents the trend of carbaryl levels in digestive gland (µg/g) versus time: a short initial phase (0–2.5 h) with an increase in insecticide uptake, then, an intermediate phase (2.5–4 h) during which the concentration rose more slowly, and a third phase during which carbaryl concentrations remain more or less constant (3.99 ± 0.19 µg/g). This last phase can be compared to a steady phase, reached at 12 h. The carbaryl BCF_{ss} was 2.97; the corresponding value of BCF_L was 1.35.

The loss of carbaryl in the jars during the experiment was less than 8% (1.46 to 1.34 µg/mL) as shown by the analysis of the water before and after recharge of medium twice daily. In the present investigation 1-naphthol, the major degradation product of carbaryl, was detected neither in water nor in tissues.

The carbaryl concentration of 1.46 µg/mL did not induce mortality during 72 h of exposure, and the toxic agent did not noticeably modify the behavior of organisms. Shell closure was not observed.

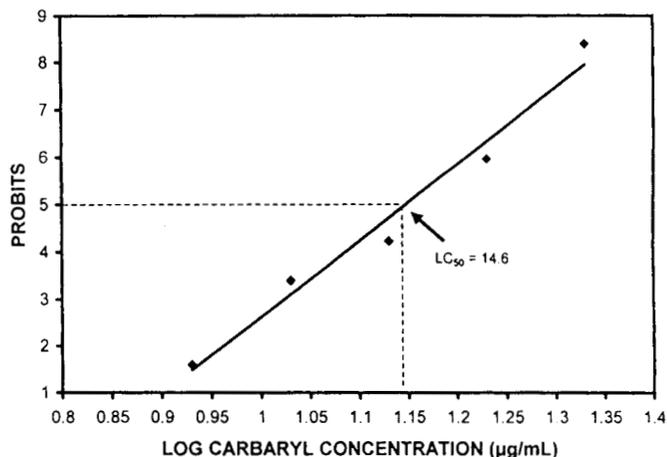


FIG. 1. Mortality of *Pomacea patula* snail exposed to different carbaryl concentrations for 96 h. Mortality expressed as probit units. Each point represents the mean of three replicate (six snails/group).

Elimination

Figure 2 also presents the elimination data of the snails when they were transferred into clean water after 72 h of exposure to carbaryl. A mean concentration of 3.99 µg/g was observed at the beginning of the experiment and 0.035 µg/g, 7 h later. The one-compartment model gave a good description of carbaryl elimination from the digestive gland. The elimination constant (k_{el}) was obtained by linear regression analysis ($k_{el} = -0.675$; $r^2 = 0.999$) and the half-life was $1.0 \text{ h} \pm 0.022$ (Fig. 3).

Bioconcentration—Elimination and AChase Inhibition

The results of AChase activity inhibition in digestive gland during bioconcentration are presented in Fig. 4. As

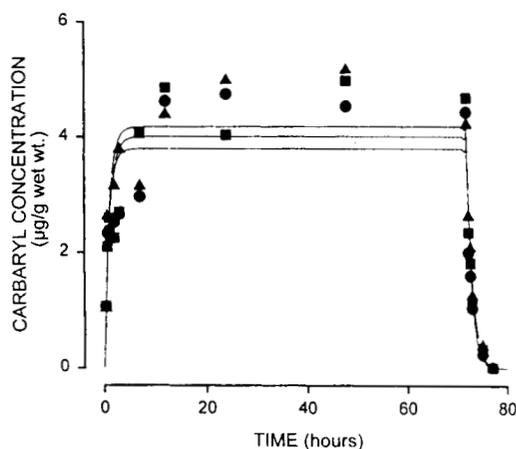


FIG. 2. The concentration time course of carbaryl in digestive gland of *P. patula* snail. Each point ($n = 3$) represents the concentration of carbaryl bioconcentrated and eliminated (pooled tissues). The lines indicate the fitted model.

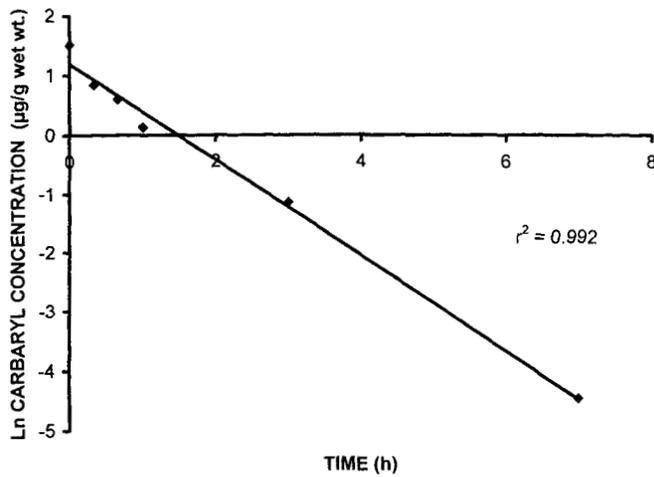


FIG. 3. Elimination rate constant (k_{el}) of carbaryl by *P. patula*.

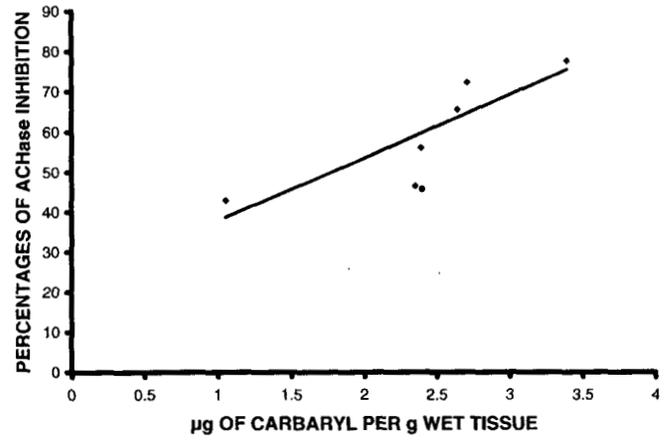


FIG. 5. Linearity of AChase inhibition percentage as a function of tissue carbaryl concentrations during uptake (0.33–7 h); $r^2 = 0.87$.

can be seen in this figure, the AChase depression varied significantly in a typical time-response fashion (there was an activity reduction with enhancement in carbaryl uptake), reaching a maximum at 7 h. This inhibition persisted throughout the experiment although carbaryl concentrations decreased during the elimination period until they were negligible.

A linear correlation during uptake was found ($r^2 = 0.87$) between tissue concentrations and the degree of inhibition within 7 h of exposure as can be seen in Fig. 5. The other data were excluded from the calculations because steady state was reached. However, no correlation was found ($r^2 = 0.14$) during elimination.

DISCUSSION

Carbaryl toxicity to *P. patula* (96-h $LC_{50} = 14.6 \mu\text{g/mL}$) was similar to the toxicities evaluated in clam, mussel, oyster (ranged from 1 to 10 $\mu\text{g/mL}$), and *Lymnaea stagnalis* snail (21 $\mu\text{g/mL}$).

The sensitivity of aquatic organisms to toxic agents in water is dependent on the chemical characteristics of the medium. Consequently pH, temperature, and dissolved oxygen all influence carbaryl toxicity (Fisher and Lohner, 1986). This makes it difficult to infer toxicity from measurements of carbaryl concentrations in water only. In these circumstances, contaminant concentrations in the body organisms may

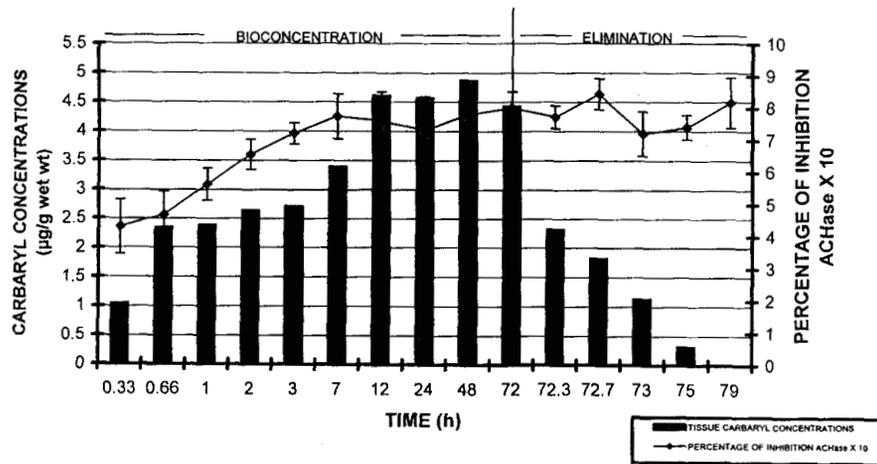


FIG. 4. Bioconcentration in digestive gland and time course of AChase inhibition percentage of *P. patula* exposed to 1.46 $\mu\text{g/mL}$ of carbaryl for 72 h. Elimination: carbaryl concentrations in tissue of organisms transferred to clean water after exposure period and effect on AChase activity.

be more constant than water concentrations. An alternative is to determine the carbaryl toxicokinetics and to evaluate the relationship between this parameter and toxicity.

Furthermore, a model capable of demonstrating the relationship between carbaryl toxicokinetics and resultant toxic effects would be useful for extrapolation of toxicological data from one organism to another. The principal cause in the toxic response variation can be ascribed, in many instances, to differences in this phase.

The semistatic method with medium adjusted to pH 6.5 was chosen to provide a high degree of carbaryl stability so that the constancy of the relationship between toxicity and bioconcentration could be evaluated in water without changes in the bioavailability of the contaminant. If these changes occur and are not considered in the bioassay or toxicokinetic model, the rate of contaminant flux and thus potential for bioconcentration and BCFs may be inappropriately esteemed (Harkey *et al.*, 1994). In these circumstances the distribution of carbaryl between water and snails depends on lipophilicity.

On the other hand, the uptake and elimination rates reported here, which together determine the equilibrium concentration, are probably different by using other methods. The uptake rate may have been higher in this study, perhaps due to the artificial nature of the contamination (higher bioavailability). However, the results may be useful for predicting toxic effects.

The three-step bioconcentration kinetics described has already been observed in benthic invertebrates exposed to other pesticides (Streit, 1979). The first phase represents a period of transfer of carbaryl from water to the hemolymph, and next is a gradual contamination of the snail organs through circulation. Last, the plateau represents a steady-state period where the uptake and elimination of the toxic agent are in equilibrium.

Carbaryl in *P. patula* exhibited a rapid bioconcentration in digestive gland probably correlated with the high blood circulation in this organ, although BCFs was relatively low (2.38–2.97), with an equilibrium concentration of $3.99 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$. Kanasawa (1975) noted similar high uptake rates in Motsugo fish (*Pseudorasbora parva*) following 24 h of exposure to 1 ppm of carbaryl, with a maximum concentration of $7.5 \mu\text{g/g}$.

Numerous researchers have reported inhibition of ACHase by insecticides, although this parameter is not a toxic effect per se; it is an index of the probability that acute toxicity will occur (Taylor, 1980). Just a few authors have studied the relationship between toxicokinetics and ACHase activity and there has been much less work on aquatic invertebrates.

Under the current conditions, when snails were exposed to carbaryl during different times (0.33–72 h), the results indicated a linear relationship between ACHase inhibition and bioconcentration, for 7 h. Reddy *et al.* (1990) were able

to demonstrate the effect of carbaryl uptake on ACHase inhibition in tissues of prawn *Metapenaeus monoceros* exposed to commercial and technical grade carbaryl. Data indicated that the rate of inhibition of commercial grade was greater probably due to the effectiveness of the emulsifier system of the pesticide formulation. However, these authors did not establish the relationship between bioconcentration kinetics and enzymatic inhibition.

In the same way, some of the existing data sets (66, 60, and 50% of ACHase inhibition at 3, 6, and 8 h) reported by Balasubramanian and Ramaswami (1991) with brain tissue of *Oreochromis mossambicus* exposed to 25 ppm of carbaryl were reexamined. It was possible to observe a certain pattern similar to the positive relationship between the inhibition of ACHase and time, determined in the present study, although the authors did not report this relationship.

Finally, the snails transferred to toxic-free water exhibited a lack of recovery in ACHase activity, although the carbaryl elimination was rapid with $t_{1/2}$ of 1.0 h. The inhibitory pattern of ACHase activity and carbaryl concentration tissues did not exhibit any correlation. Reddy *et al.* (1990) and Jayaprada and Rao (1991) obtained a similar lack of recovery with *M. monoceros* after 10 days in clean water. This is also in agreement with the results of Mahendru and Agarwal (1983), who found that there was significant recovery in ACHase activity of *Lymnae acuminata* snail following 7 days in uncontaminated water, after treatment with 2.5 ppm of mexacarbate for 48 h. This lack of recovery found in ACHase activity in *P. patula* was probably due to the experimental method and conditions used to determine toxicity, since the purpose of the experimental design was to arrive at a constant carbaryl concentration. Studies have found that recovery following pulsed exposure to carbaryl and others contaminants can be quite different from continuous exposure (Kallander *et al.*, 1997; Parsons and Surgeoner, 1991). In the same way, Fisher and Lohner (1986) demonstrated that the carbaryl stability was correlated with significant changes in the acute toxicity. Another parameter which could contribute to the differences in recovery of ACHase inhibition is the sensitivity between species (Matsumara, 1985).

Wallace and Herzberg (1988) observed a lack of significant spontaneous reactivation of dimethyl phosphorylated serum esterases from birds dosed with demeton-S-methyl. They noted that it may be due to either (1) the aging of the dimethyl phosphorylated enzyme or (2) the presence in excess of the parent compound, demeton-S-methyl, or its sulfoxide or sulfone derivatives, in the free state or nonspecifically bound to nonesteratic protein, e.g., albumin (Martin *et al.*, 1981). In the later case, reactivation would be masked by further inhibition. Clarification of this phenomenon with *P. patula* should be associated with measurements of receptor binding and the rate of ACHase carbamylation.

CONCLUSION

This study demonstrated the possibility of using a model based on toxicokinetics, which is essential to the extrapolation of toxicological data from one organism to another. It could also be used for monitoring bioavailability in environmental samples (rapid equilibration, within 3 days), and as a model for design of measures protective against exposure to cholinesterase inhibitors.

REFERENCES

- Balasubramanian, S., and Ramaswami, M. (1991). Effect of pesticide sevin on acetylcholinesterase (AChE) activity in different tissues of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Ecobiol.* **3**, 117-122.
- Barnes, H., and Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of sulphophosphovainillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **12**, 103-118.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Edwards, C. A., and Fisher, S. W. (1991). The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In *Cholinesterase-Inhibiting Insecticides*. (P. Mineau, Ed.), pp. 256-265. Elsevier, New York.
- Filov, V. A., Golubev, A. A., Liublina, E. I., and Tolokontsev, N. A. (1979). *Quantitative Toxicology. Selected Topics*, pp. 243-244. Wiley, New York.
- Fisher, S. W., and Lohner, T. W. (1986). Studies on the environmental fate of carbaryl as a function of pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **15**, 661-667.
- Harkey, G. A., Landrum, P. F., and Klaine, S. J. (1994). Partition coefficients of hydrophobic contaminants in natural water, porewater, and elutriates obtained from dosed sediment: A comparison of methodologies. *Chemosphere* **28**, 583-596.
- Hestrin, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **180**, 249-261.
- Jayaprada, P., and Rao, K. V. R. (1991). Carbaryl toxicity on tissue acetylcholinesterase in the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius)—A monitoring study. *Indian J. Comp. Anim. Physiol.* **9**, 38-43.
- Kallander, D. B., Fisher, S. W., and Lydy, M. J. (1997). Recovery following pulsed exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the midge, *Chironomus riparius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 29-33.
- Kanazawa, J. (1975). Uptake and excretion of organophosphorus and carbamate insecticides by fresh water fish, Motsugo, *Pseudorasbora parva*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **14**, 346-352.
- Landrum, P. F., Lee II, H., and Lydy, M. J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 1709-1725.
- Mahendru, V. K., and Agarwal, R. A. (1983). Phorate and mexacarbate induced changes in enzymes of the snail, *Limnaea acuminata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 77-82.
- Martin, A. D., Norman, G., Stanley, P. I., and Westlake, G. E. (1981). Use of reactivation techniques for the differential diagnosis of organophosphate and carbamate pesticide poisoning in birds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 775-782.
- Matsumara, F. (1985). *Toxicology of Insecticides*, 2nd ed. Plenum, New York.
- Metzler, C. M., Elfring, G. L., and McEwen, A. J. (1974). A package of computer programs for pharmacokinetic modeling. *Biometrics* **30**, 562-563.
- Murty, A. S., and Ramani, A. V. (1992). Toxicity of anticholinesterases to aquatic organisms. In *Clinical and Experimental Toxicology of Organo-phosphates and Carbamates* (B. Ballantyne, T. C. Marrs, and W. N. Aldridge, Eds.), pp. 305-317. Butterworth Heinemann, London.
- Parsons, J. T., and Surgeoner, G. A. (1991). Acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae during single- or multiple-pulse exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 1229-1233.
- Peltier, W., and Weber, C. I. (1985). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Fresh Water and Marine Organisms*, 3rd ed., p. 216. Environmental and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH.
- Pharm/PCS, version 4. Pharmacologic calculations system, based on (R. J. Tallarida and R. B. Murray) "Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programme," 2nd ed. (1986). Springer-Verlag, New York.
- Reddy, M. S., Jayaprada, P., and Rao, K. V. R. (1990). Recovery of carbaryl inhibited AChE in penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Biochem. Int.* **22**, 189-198.
- Scheerboom, J. E. M., and Geldof, A. A. (1978). A quantitative study of the assimilation of different diets in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L), introducing a method to prevent (coprophagy). *Proc. Kon. Ned. A. Kad. Wet. Ser. C* **81**, 173-183.
- Singh, O., and Agarwal, R. A. (1981). Toxicity of certain pesticides to two economical species of snails in Northern India. *J. Econ. Entomol.* **74**, 571-586.
- Streit, B. (1979). Uptake, accumulation, and release of organic pesticides by benthic invertebrates. 2. Reversible accumulation of lindane, paraquat and 2,4-D from aqueous solution by invertebrates and detritus. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **55**, 349-372.
- Taylor, P. (1980). Anticholinesterase agents. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A. G. Gillman, L. S. Goodman, and A. Gillman, Eds.), pp. 100-119. Macmillan, New York.
- USEPA (1989). *Measurement of N-Methyl Carbamoyloximes and N-Methyl Carbamates in Drinking Water by Direct Aqueous Injection LC with Post-column Derivatization*. EPA Method 531 by D. L. Foerst, EPA/600/4-851054(1986); Method 5, revised by T. Engels, National Pesticide Survey, Battelle Columbus Lab (1987); Method 531.1, revised by R. L. Graves, EPA, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati (1989).
- Wallace, K. B., and Herzberg, U. (1988). Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 307-314.