

PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN LECHE MATERNA EN SANTA FE, ARGENTINA

Argelia Lenardón¹, María Inés Maitre, Eduardo Lorenzatti y Susana Enrique.

Laboratorio de Medio Ambiente. Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química – INTEC- (UNL-CONICET) Güemes 3450 - (3000) Santa Fe, Argentina
e-mail: lenardon@alpha.arctide.edu.ar

RESUMEN: Lenardón, A., Maitre, M. I., Lorenzatti, E. y Enrique, S. *Plaguicidas organoclorados en leche materna en Santa Fe, Argentina. Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 2-4.* Se estudió el nivel de contaminación por plaguicidas organoclorados en leche materna de un grupo de mujeres que viven en Santa Fe, Argentina. Se analizaron cincuenta y dos muestras de leche materna recolectadas en hospitales públicos regionales, para determinar la concentración de 12 compuestos usados en el control de plagas. Con el mismo objetivo se estudiaron cinco marcas comerciales de leche en polvo maternizadas. Se empleó un método miniaturizado de extracción, seguido de limpieza de extractos, concentración y posterior uso de cromatografía gaseosa con detectores ECD Ni⁶³. Los resultados analíticos señalan que el 86 % de las muestras tuvo residuos de al menos un plaguicida, siendo los más frecuentemente hallados, heptacloro epóxido, aldrin, p,p'DDE y γ -HCH. En menos del 15 % de las muestras se detectó endrin, HCB, p,p'DDT, dieldrin y α -HCH. El estudio permite conocer el grado de exposición humana, analizar las posibles relaciones con el uso de biocidas como control de plagas, con la ingesta alimenticia por bioacumulación en la cadena alimentaria y a la vez sienta las bases para futuras investigaciones. Comparándolo con estudios anteriores realizados en Argentina, en América Latina y en otros continentes, los niveles de contaminación hallados muestran concentraciones inferiores a aquellos.

ABSTRACT: Lenardón, A., Maitre, M. I., Lorenzatti, E. y Enrique, S. *Organochlorine pesticides in breast milk in Santa Fe, Argentina. Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 2-4.* Fifty two mother milk samples were collected from Public Hospitals in Santa Fe, Argentina, to determine the concentration of organochlorine pesticides. With the same purpose, five infant powder milk formulae were also analyzed. A miniaturised extraction, clean up and concentration method was used, with gas chromatographic determination by a Ni⁶³ electron capture detection. Analytical results show pesticide residues in 86 % of samples, the most frequent being heptachlor-epoxide, aldrin, p,p'DDE and γ -HCH. Endrin, HCB, p,p'DDT, dieldrin and α -HCH were also detected. This study allows to know human health risk from pesticides, the exposure-bioaccumulation relationship and it is useful for future research. The results of this study are below the levels detected by other studies in Argentina, Latin America and other continents.

PALABRAS CLAVES: leche materna – plaguicidas organoclorados – contaminación ambiental

KEY WORDS: breast milk –organochlorine pesticides – environmental contamination.

PALAVRAS CHAVES: leite materna – pesticidas clorados – contaminação ambiental

INTRODUCCIÓN

Una característica importante de los plaguicidas es su habilidad para concentrarse a través de la cadena alimentaria, alcanzando las mayores concentraciones en los niveles tróficos superiores, debido a que son lipofílicos y tienen baja solubilidad en agua. De esta forma penetran en vegetales y animales y son incorporados a las fases lipídicas de fluidos y tejidos, incluyendo al hombre⁽¹⁾.

Estudios realizados en Canadá, México, España, Australia y Brasil⁽²⁻⁶⁾, muestran que es frecuente encontrar contaminación en leche materna y que la concentración varía con innumerables factores tales como sociales, edad, partos, condiciones de trabajo, etc., además de lo estrictamente relacionado al uso de plaguicidas.

En algunos lugares de Sud América, como en otras regiones de Argentina, se han desarrollado estudios de plaguicidas en leche materna⁽⁶⁻¹⁰⁾. En investigaciones previas, los autores determinaron la presencia de organoclorados en leche de vaca, y manteca^(11,12) y los niveles de residuos en peces y agua de ríos usados como fuente de agua potable⁽¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁾.

Dado que la leche materna es al mismo tiempo una de las vías de excreción de los tóxicos del organismo y por otro lado la forma ideal de alimentación infantil, resulta interesante conocer los niveles de contaminación en una muestra de la población local.

Desde hace pocos años atrás, Argentina restringe legalmente el uso de la mayoría de los compuestos organoclorados, coincidiendo con el advenimiento del MERCOSUR (Mercado Común del Sur); a pesar de ello el lindano (γ -hexaclorociclohexano) y endosulfan aún se utilizan legalmente. Estos y otros compuestos no permitidos se encuentran en ambientes naturales de la región^(15, 17).

El trabajo aporta nuevos registros y actualiza la información de los contenidos de residuos de plaguicidas en un país agroproductor y en una región antes no estudiada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con una población de madres voluntarias, con edad y número de partos diferentes, pertenecientes a una clase socioeconómica y culturalmente bajas.

Fueron recolectadas 52 muestras de leche materna en el Hospital de Niños y en un hospital zonal en el norte de la ciudad de Santa Fe.

Las muestras se tomaron mediante dispositivos mecánicos de succión y fueron colocadas en recipientes de vidrio; se congelaron y se transportaron al laboratorio para su análisis.

Paralelamente se estudiaron cinco diferentes marcas comerciales de leche en polvo maternizadas, para determinar si existe presencia de residuos de los mismos plaguicidas organoclorados

DETERMINACIÓN ANALÍTICA

Para extraer los plaguicidas de la leche materna se tomaron 2 g de muestra que se mezclaron con Florisil activado (5 g) transfiriéndolos a una columna empacada con 10 g de Florisil desactivado al 3% p/v. Los pesticidas se eluyeron con una mezcla de éter de petróleo y cloruro de metileno (4:1 v/v). El solvente remanente se removió en rotavapor con una corriente de nitrógeno y el extracto se resolvió con 2 ml de isooctano⁽¹⁸⁾. El extracto orgánico se analizó por cromatografía gaseosa con columna DB-608 y DB-5, de 30 m y detector de captura de electrones Ni⁶³.

Las leches maternizadas se procesaron de acuerdo al procedimiento empleado para leches vacunas⁽¹¹⁾, reconstituyéndose previamente la leche (100 g más 100 ml de agua destilada).

Se analizaron los siguientes compuestos: hexaclorobenceno (HCB), hexaclorociclohexano (α and γ -HCH) heptacloro y su epóxido, aldrin, dieldrin, clordano, endosulfan, p,p'DDT y p,p'DDE. El porcentaje de grasa se determinó siguiendo la técnica de AOAC⁽¹⁹⁾.

¹ Correspondencia a la Dra. Argelia Lenardón

RESULTADOS

En ninguna muestra se encontraron todos los compuestos investigados, mientras que en el 86 % de ellas se detectó con frecuencia la presencia de al menos uno de los plaguicidas analizados. Los valores medios y rango de concentración así como los límites de detección se detallan en la Tabla 1. En las muestras de leche en polvo no se detectaron residuos de plaguicidas organoclorados superiores a los límites de detección del método.

Tabla 1. Plaguicidas organoclorados en leche materna y recuperación en muestras sembradas.

Plaguicidas	Muestras positivas	Valor medio (mg/kg)*	Rango (mg/kg)*	Recup. (%)	Límite detecc. (mg/kg)
HCB	11	0,011	0,002-0,15	97	0,0014
α -HCH	14	0,038	0,005-0,819	114	0,0017
γ -HCH	21	0,072	0,003-0,873	86	0,0018
Heptacloro	19	0,052	0,007-0,43	94	0,005
Aldrin	25	0,065	0,004-0,630	82	0,003
Heptacloro epóxido	27	0,046	0,006-0,513	73	0,005
Clordano	17	0,073	0,008-0,274	100	0,005
Endosulfan	16	0,077	0,006-0,701	86	0,006
Dieldrin	13	0,048	0,001-0,859	92	0,001
Endrin	9	0,007	0,001-0,057	78	0,001
p,p'DDE	21	0,098	0,007-0,667	84	0,003
p,p'DDT	14	0,048	0,003-0,880	75	0,003

* en grasa

El heptacloro epóxido es el compuesto que se presenta un mayor número de veces, siguiendo en orden de importancia el aldrin, y con el mismo número de apariciones p,p'DDE y γ -HCH.

La concentración media más elevada que se encontró correspondió al p,p'DDE, siendo la secuencia decreciente la siguiente: endosulfan, clordano, γ -HCH, aldrin, heptacloro y dieldrin, presentándose los otros compuestos analizados en un valor menor de 0,05 mg/kg.

El valor máximo detectado corresponde al p,p'DDT, siendo relevante las cantidades de γ -HCH, dieldrin, α -HCH, endosulfan, p,p'DDE, aldrin y heptacloro-epóxido.

DISCUSIÓN

Los valores hallados en general son menores que los reportados por otros autores en trabajos realizados en Canadá⁽²⁾, México⁽³⁾, Brasil⁽⁶⁾ y España⁽⁴⁾ (Tabla 2). Comparando con los datos publicados en América Latina, el DDT y su metabolito se encuentran en concentraciones marcadamente inferiores a los informados para México⁽³⁾ y Brasil⁽⁶⁾. La presencia de los metabolitos del DDT y del Heptacloro indicarían la biotransformación de los compuestos originales^(20,21).

Tabla 2. Comparación entre la concentración media de compuestos organoclorados en leche materna y bovina en Argentina.

Plaguicidas	(mg/kg)* en leche materna	(mg/kg)** en leche de vaca
HCB	0,0110	0,0068
α -HCH	0,0380	0,0085
γ -HCH	0,0720	0,0421
Heptacloro+ epoxi	0,0490	0,0549
Aldrin+dieldrin	0,0460	0,0388
Clordano	0,0731	0,0232
Endosulfan	0,0770	0,0169
DDT (suma de isómeros)	0,6950	0,9900

* en grasa ^a Maitre M. 1994

Resulta llamativo que para todos los compuestos en estudio, los tenores hallados en este trabajo son marcadamente menores a los reportados por Bordet para Francia⁽²²⁾.

En estudios recientes, Lenardón y colaboradores encontraron residuos de organoclorados en muestras ambientales de regiones próximas a la de este estudio, señalando la persistencia de compuestos con uso restringido y prohibido^(12, 23-24). Por otra parte, el incremento del consumo de agroquímicos en Argentina durante la última década se debe primordialmente a herbicidas y en segundo lugar a piretroides⁽²⁵⁾, y ésto puede explicar el hecho de que los valores hallados en esta investigación son generalmente inferiores a los señalados en trabajos realizados hace algunos años en el país⁽⁹⁻¹⁰⁾ así como en otros países⁽²⁶⁻²⁷⁾ (Tabla 3).

Tabla 3. Valores medios de plaguicidas organoclorados detectados por los autores y los hallados en otros países (mg/kg grasa).

Plaguicidas	Autores	Canadá ^a	España ^b	Francia ^c	México ^d	Australia ^e	Brasil ^f
HCB	0,011	0,0145	0,0008	0,147	0,047	0,1	0,02
α -HCH	0,038	0,0003	0,0342	0,052	0,018	0,071	0,04
γ -HCH	0,072	0,00021	0,0105	0,037	0,022	0,108	0,0344
Heptacloro	0,052	...	0,1	0,02	...
Aldrin	0,065	...	0,0311	0,097	...	0,061	0,02
Hept. Epoxi	0,046	0,00377	...	0,024	...	0,02	...
Clordano	0,073	0,00037	...	0,084	...	0,01	...
Endosulfan	0,076
Dieldrin	0,048	0,00978	0,0039	0,19	...	0,05	1,31
Endrin	0,007
p,p'DDE	0,098	0,222	0,6041	2,183	5,017	0,96	2,53
p,p'DDT	0,048	0,0221	0,012	0,044	1,271	0,8	0,862

^a Newsome 1995, ^b Hernandez 1993, ^c Bordet 1993, ^d Waliszawski 1996,

^e Stevens 1998, ^f Mattuo 1992.

... sin datos.

En las leches maternizadas no se detectaron los compuestos estudiados y su comparación con los datos proveniente de leche de vaca de la misma zona geográfica (leche y manteca), podría sugerir que en las primeras el proceso de secado spray ayuda a la eliminación de los compuestos o que la materia prima provenga de otra región con menor grado de contaminación⁽²⁸⁾.

Las concentraciones altas encontradas en las leches humanas respecto a las de vacas⁽¹¹⁾ (Tabla 2), ambas para la misma región geográfica, pueden explicarse por el proceso de bioacumulación.

Los niveles de contaminación de leche materna y la información de otros autores sugieren una estrecha relación con el uso de agroquímicos en un pasado reciente y aún en la actualidad, tanto en actividad agrícola, granjas, en el hogar, como la ingesta que a través de la cadena alimentaria. Los plaguicidas organoclorados, incluidos dentro de los Poluentes Orgánicos Persistentes (POP) fueron estudiados por Wania⁽²⁹⁾, demostrando la movilidad y la presencia de los mismos en el planeta.

Como lo señala Allsop⁽⁷⁾, el Límite Máximo de Residuos no puede ser regulado, ya que como es obvio, la situación ideal es la ausencia de contaminación.

Este trabajo que representa a una parte relativamente pequeña de la población regional, contribuye al conocimiento de una problemática mundial, nacional y regional.

AGRADECIMIENTOS

A los directores de Hospitales de la Provincia y sus profesionales, por su atenta colaboración. El estudio fue financiado por un Proyecto (CAI+D), Universidad Nacional del Litoral.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-World Health Organization. Regional Office for Europe. European Regional Programme on Chemical Safety (1985). Organohalogen Compounds in Human Milk and Related Hazard. Bilthoven: WHO; 9-11.
- 2-Newsome W.H. Davies D. and Doucet J. (1995). PCB and organochlorine pesticides in Canadian human milk, *Chemosphere* 30 (11): 2143-2153.
- 3-Waliszewski S. M, PardoSedas V. T., Chantiri J.N., Infanzón R.M. y Rivera J. (1996). Organochlorine pesticide residue in human milk from tropical areas in Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 22-28.
- 4-Hernandez L.M. Fernandez M. A. Hoyas E. Gonzalez M. J. and Garcia J. F. (1993). Organochlorine insecticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast milk in Madrid (Spain). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50 308-315.
- 5-Stevens M.F., Ebell G.F. and Psaila-Savona (1993). Organochlorine pesticide residues in western Australian nursing mothers. *The Medical Journal of Australia*. 158, 15th 238-241.
- 6-Mattuo Y, Lopes J, Casanova Y, Matuo T, Lopes L. (1992). Organochlorine pesticide residues in human milk in the Riberao Preto Region, State of Sao Paulo. Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 167-175.
- 7-Allsopp M., Stringer R. and Johnston P. (1998). Persistent Organochlorines in Humans. Greenpeace Laboratories, Dept. Biological Sciences. University of Exeter. Prince of Road, Exeter EX4 4PS, UK.
- 8-Bauzá C. A. (1975). Residuo de plaguicidas organoclorados en leche de madres de Montevideo. *Contaminación Ambiental y Pediatría* vol. 46.
- 9-Albert L. (1981). Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 91 (1): 15 - 29.
- 10-García Fernández J. (1974). Estudios y comentarios sobre impregnación materna por plaguicidas organoclorados en la República Argentina. *Medicina* 34: 393 - 410.
- 11-Maitre Ml. de la Sierra P, Lenardón A, Enrique S, and Marino F. (1994). Pesticide residue levels in Argentinian pasteurised milk. *Sci. Total Environ.* 155: 105-108.
- 12-Lenardón A, Maitre de Hevia Ml, Enrique de Carbone S. (1994). Organochlorine pesticides in Argentinian butter. *Sci. Total Environ.* 144: 273-277.
- 13-Lenardón A, Maitre de Hevia Ml, Fusé J, Nochetto C, Depetris, P. (1984). Organochlorine and Organophosphorous pesticides in the Parana River. Argentina. *The Science of Total Environmental*; 289-297.
- 14-Lenardón A, Hevia M. (1987). Pesticidas organoclorados y organofosforados en el Río Paraná, II parte. *Ciencia y Tecnología del Agua* 1: 14-20.
- 15-Lenardón A, Peleato M, Lorenzatti E. (1993). Análisis de plaguicidas en el río Santa Fe (Argentina). *Revista Técnica de Medio Ambiente* (Barcelona); 49-53.
- 16-Lenardón Argelia y Lorenzatti Eduardo (2000). Un arma de doble filo. *Enfasis Alimentación*. (RNPI 396.624); (2): 38-40.
- 17-Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina. Perfil Nacional de Gestión de Sustancias Químicas. Foro Intergubernamental, OPS, OMS. Ministerio de Salud y Acción social. ed. Bs As. (1997).
- 18-Stijve T. (1983). Miniaturised methods for monitoring organochlorine pesticide residues in milk. IUPAC. Pesticide Chemistry. Human Welfare and the Environment. Ed. I Miyamoto et al. Pergamon Press.
- 19-AOAC. Official Methods of Analysis, vol. 2 (1990). Ed. Kenneth Helrich.
- 20-Klein D, Dillon J C, Jirou-Najou, Gagey J, Debry G. (1986). Cinétique d'élimination des composés organochlorés au cours de la première semaine d'allaitement maternel. *Fd. Chem. Toxic.* 24 (8): 869-873.
- 21-Nriangu J, Simmons M. (1990). Food Contamination from Environmental Sources. *Advances in Environ. Sci Technol.* Vol. 23 Wiley Series
- 22-Bordet F., Mallet J., Maurice L., Borrel S. and Venant A. (1993). Organochlorine pesticides and PCB's congener content of French human milk. *Bull. Environ. contam. Toxicol* 50: 425-432.
- 23-Lenardón, A., Lorenzatti E y Enrique S. (1998). Monitoreo de insecticidas organoclorados y organofosforados en el río Paraná (km 600). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicología e Meio Ambiente* 8: 57-66.
- 24-Lenardón, A, y Enrique S. Plaguicidas organoclorados en peces del río Paraná. *Nature Neotropicalis* 29 (2); en prensa.
- 25-Cámara de la Sanidad y Fertilizantes (1999). Disponible en <http://www.casafe.org.ar>
- 26-Schlaum M., Seidle A., Salje., Berhent W Schwartz F Ender M., Knoll A. and Grugel C. (1995). Organochlorine residues in human breast milk analysis through a sentinel practice network. *J. Epidemiol. Community Health* 49: 17-21.
- 27-Declaracion de Innocenti. Sobre la Protección, Promoción y Apoyo de la Lactancia Materna (1990). Florencia, Italia. Disponible en <http://www.io.org/~infacto/innocent.htm>
- 28- Langlois, B.E., Loska, B.J., Hill D.L. (1965). The effects of processing and storage dairy products on chlorinated insecticides residues. II Endrin, Dieldrin and heptachloro. *J. Milk Food Technology* 28: 9-11.
- 29-WANIA Franck and mackay Donald (1996). Tracking the distribution of persistent Organic Pollutants. *Environmental Science & Technology* 30 (9): 390-396.

UNA TECNICA DE BIOENSAYO EMPLEANDO A LOS CILIADOS DE VIDA LIBRE *Stentor coeruleus* Enrenberg y *Spirostomum ambiguum* Enrenberg PARA LA EVALUACION DE LOS EFECTOS DEL MERCURIO Y ARSENICO

Iannacone Oliver, José Alberto,* Alvaríño Flores, Lorena y Ramirez Rodríguez, Pedro

Laboratorio de Ecofisiología. Area de Biodiversidad Animal.

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas,

Universidad Nacional Federico Villarreal.

Calle San Marcos 383, Pueblo Libre. Lima 21, PERÚ.

TE: ++5112766362. Fax ++5114600930 e-mail: joselorena@terra.com.pe

RESUMEN: Iannacone Oliver, J. A., Alvaríño Flores, L. y Ramirez Rodríguez, P. *A técnica de bioensayo empleando a los ciliados de vida libre Stentor coeruleus Enrenberg y Spirostomum ambiguum Enrenberg para la evaluación de los efectos del mercurio y arsénico.* Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 5-9. Se evaluó el efecto letal del cloruro de mercurio y del arseniato de sodio en un ensayo de toxicidad aguda estático sobre los protistas alfa-mesosapróbicos *Stentor coeruleus* y *Spirostomum ambiguum* después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los valores de CI_{50} frente a concentraciones nominales del ión Hg^{2+} fueron para *S. coeruleus* de 1,99 (24 h); 1,64 (48 h) y 1,49 $\mu g/L$ (72 h) y para el ión As^{5+} 6 595 (24 h); 4 659 (48 h) y 3 494 (72 h) $\mu g/L$ respectivamente; los valores de CI_{50} para *S. ambiguum* frente al Hg^{2+} fueron de 7,26 (24 h); 4,31 (48 h) y 2,11 $\mu g/L$ (72 h) y con el As^{5+} fueron de 6 12 847 (24 h); 16 383 (48 h) y 6 822 $\mu g/L$ (72 h). Los resultados muestran que *Stentor* es más sensible que *Spirostomum* para ambos metales evaluados a los tres tiempos de exposición ensayados. Ambos ciliados son más sensibles al mercurio que al arsénico. El protocolo del nuevo bioensayo propuesto muestra que *Stentor coeruleus* y *Spirostomum ambiguum* presentan como ventaja su menor costo de cultivo, simplicidad de manipuleo, sensibilidad a Hg^{2+} y As^{5+} y concordancia ecológica al ser comparados con otras pruebas ecotoxicológicas para evaluar la calidad del agua.

ABSTRACT: Iannacone Oliver, J. A., Alvaríño Flores, L. y Ramirez Rodríguez, P. *A bioassay technique using the free living ciliates Stentor coeruleus Enrenberg and Spirostomum ambiguum Enrenberg for the assessment of the effects of mercury and arsenic.* Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 5-9. In this research was evaluated the lethal toxic effect of chlorine mercury and sodic arseniate in an acute toxicity bioassay with the alpha-mesosaprobic protists *Stentor coeruleus* and *Spirostomum ambiguum* after 24, 48 and 72-hour exposure. The IC_{50} with nominal concentrations of the ion Hg^{2+} and As^{5+} were to *S. coeruleus* of 1,99 (24h); 1,64 (48 h) and 1,49 $\mu g/L$ and 6 595 (24 h); 4 659 (48 h) and 3 494 (72 h) $\mu g/L$ respectively; the IC_{50} to *S. ambiguum* for Hg^{2+} was 7,26 (24 h); 4,31 (48h) and 2,11 $\mu g/L$ (72 h) and with As^{5+} was 6 12 847 (24 h); 16 383 (48) and 6 822 $\mu g/L$ (72 h). The results indicated that *Stentor* was more sensitive than *Spirostomum* for the two heavy metals evaluated at three times-exposure. Also, both ciliates were to sensitive for mercury than to arsenic. The protocol of the proposed bioassay with *Stentor coeruleus* and *Spirostomum ambiguum* show the advantage of their low cost of culture, easy handling sensitivity to Hg^{2+} and As^{5+} and ecological concordance compared with other ecotoxicological probes to evaluate water quality.

PALABRAS CLAVE: ecotoxicología, metales pesados, *Stentor coeruleus*, *Spirostomum ambiguum*, ciliados, bioensayo agudo.
KEY WORDS: ecotoxicology, heavy metals, *Stentor coeruleus*, *Spirostomum ambiguum*, ciliates, acute bioassay.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de bioensayos son usadas rutinariamente, en otros países, con el fin de determinar la toxicidad de productos y desechos químicos, para descifrar los niveles de impacto ambiental como consecuencia de su disposición o contacto con los ecosistemas naturales. Inclusive estas técnicas contribuyen a normar las descargas de efluentes líquidos y ayudan en la toma de decisiones sobre la disposición final de los desechos industriales. En el Perú no existe normativa alguna que estipule la utilización de estos sistemas de evaluación con los fines antes señalados, pese a que su utilidad y confiabilidad han sido comprobadas por numerosas instituciones gubernamentales y académicas de otras latitudes^(1, 7, 28).

El Reglamento ambiental Peruano para las actividades Minero-metalúrgicas promulgado con D.S. N° 016-93-EM, del 01 de mayo de 1993, establece en su artículo 9° que los titulares de las actividades minero-metalúrgicas que se encuentran operando hasta antes de la fecha indicada deberían presentar al Ministerio de Energía y Minas el Programa de Adecuación y Manejo Ambiental (PAMA) en donde se identifican los problemas ambientales y se propondrían las soluciones para cada una de éstos, con el objeto de reducir sus niveles de contaminación hasta alcanzar los Niveles Máximos Permisibles⁽³⁴⁾. Debido a la extremadamente compleja naturaleza de los efluentes industriales-mineros, los cuales varían continuamente en su composición; y aún obviando esto, la complejidad de la mezcla confiere propiedades aditivas, sinérgicas y antagónicas que resultarían imposibles de predecir sin el apoyo de un adecuado

análisis de ecotoxicidad empleando organismos representativos de las aguas receptoras. Se considera al mercurio y al arsénico como componentes claves de los efluentes minero-metalúrgicos⁽¹³⁾. Zaman & Pardini⁽³⁶⁾ señalan que el principal efecto del mercurio es la alteración en la integridad estructural de la membrana interna de la mitocondria, resultando en la pérdida de selección normal de cationes que permiten un metabolismo oxidativo efectivo. El mercurio tiene una alta afinidad por los fosfatos, por los grupos cisteinil e histidil de las cadenas proteicas, y por las purinas, pteridinas y porfirinas. Estas acciones, junto con la interacción con los grupos tiol de las proteínas, causan interferencias con un gran número de procesos celulares. Los autores mencionados muestran que la toxicidad aguda del arsénico es debido a la inhibición de algunas enzimas del ciclo del Ácido Tricarboxílico (ATC). Además, su ecotoxicidad se atribuye al arsénico trivalente o al anión arsenito, los cuales se unen covalentemente a las proteínas o a los grupos cisteína de las enzimas. El arsénico pentavalente genera aniones AsO_4^{3-} , los cuales tienen una configuración análoga que el anión fosfato, compitiendo con este último y provocando un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, estimulación de la actividad de la ATPasa mitocondrial y la inhibición del NAD reducido.

La utilización en el Perú de técnicas de bioensayos de toxicidad requiere, en primer lugar, un esfuerzo por establecer los procedimientos *estándares* de operación, a fin de definir claramente las situaciones en las cuales sea conveniente la aplicación de dichas técnicas^(4, 15, 35).

*Autor al cual deberá dirigirse toda correspondencia.

Los protozoarios, las algas y las bacterias forman la base de las cadenas de alimentación acuática. Los protozoarios ciliados son importantes en la regeneración de nutrientes, particularmente nitrógeno y fósforo. Algunos ciliados pueden concentrar sustancias químicas tóxicas y participar en la transferencia energética en los ecosistemas acuáticos^(3, 25, 33). Los ciliados, debido a su rápido metabolismo, tienen una posición clave en las cadenas alimenticias bénticas y pelágicas recirculando la materia orgánica⁽²⁹⁾. Además se les considera presas selectas para varios grupos de invertebrados. Este importante grupo de la biocenosis acuática es un intermediario entre procariontes y organismos eucariontes multicelulares por combinar en una célula todas las funciones que los organismos multicelulares presentan en células especializadas, tejidos y órganos⁽⁹⁾.

Los protozoarios ciliados han sido objeto de una investigación intensiva en el campo de la ecotoxicología acuática, por la existencia de receptores de membrana para neurotransmisores y hormonas semejantes a los organismos multicelulares^(5, 27). El empleo potencial de los ciliados como bioensayos estandarizados han sido revisados por numerosos autores^(10, 20, 24). La mayoría de las pruebas ecotoxicológicas con ciliados han sido realizadas con *Tetrahymena pyriformis*^(5, 23, 26, 30, 31), *Colpidium campylum*⁽¹⁰⁾, *Paramecium spp*^(12, 21) y *Euplotes patella*⁽²¹⁾.

Por lo tanto resulta imprescindible el proceso de estandarización de procedimientos experimentales con protozoarios ciliados heterotrichos dulceacuícolas como *Stentor coeruleus* Enrenberg y *Spirostomum ambiguum* Enrenberg, para el análisis de riesgo ecotoxicológico^(7, 8).

El objetivo del presente estudio es evaluar la toxicidad aguda del mercurio (Hg^{2+}) y arsénico (As^{5+}) sobre los ciliados alfa-mesosapróbicos dulceacuícolas *Stentor coeruleus* y *Spirostomum ambiguum* a tres tiempos de exposición: 24, 48 y 72 h y comparar su sensibilidad con otros ensayos biológicos estandarizados que evalúan el efecto agudo de estos metales pesados y de esta forma proponer un protocolo estandarizado de bioensayo con estos dos ciliados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención e identificación de los organismos

Los ciliados *S. coeruleus* y *S. ambiguum* se colectaron entre la vegetación emergente de las Lagunas de Puerto Viejo, Departamento de Lima, Perú a la altura del km 95 de la Panamericana Sur en agosto de 1995, con la ayuda de un cucharón, una pipeta acuática y una malla planctónica. Los especímenes fueron identificados a nivel de especie utilizando las claves de Bick⁽²⁾ y Streble y Krauter⁽³²⁾.

Cultivo de los organismos

Los ciliados fueron aclimatados, cultivados y clonados en medios axénicos. Los cultivos axénicos se lograron por clonación a partir de cultivos individuales. Los protozoarios fueron alimentados dos veces por semana, en un medio a base de leche evaporada (Gloria® por L: proteínas= 25,4 g; carbohidratos= 40,2 g; lípidos= 30,8 g; Ca^{2+} = 902,0 mg; PO_4^{3-} = 840,5 mg; vitamina A= 4 177,0 UI; vitamina C= 52 mg; vitamina D= 327 UI; sólidos totales= 25 % por L) al 1% en agua de grifo.

Características físicas del agua: (pH= 7,38; turbiedad= 0,54 NTU; conductividad específica= 553,32 μ mhos/cm; sólidos

totales= 448,53 mg/L; sólidos disueltos= 437,29 mg/L; sólidos suspendidos= 11,24 mg/L);

Características químicas del agua: (alcalinidad total en CO_3Ca = 100,59 mg/L; dureza total en CO_3Ca = 272,84 mg/L; cloruros= 23,99 mg/L; sulfatos= 170, 24 mg/L; fosfatos= 0,052 mg/L; oxígeno disuelto= 8,68 mg/L; Na^+ = 16,17mg/L; K^+ = 2,31mg/L; Fe^{2+} = 0,05mg/L), debiendo ser hervida y reposada por 24 h, en frascos tipo Falcón de 50 mL. Los medios antes de la inoculación de los ciliados fueron preincubados por tres días. Se mantuvo bajo condiciones de temperatura $20 \pm 2^\circ C$, un oxígeno disuelto adecuado, generalmente entre 5-8 mg/L, determinado con la ayuda de un oxímetro y bajo condiciones de oscuridad siguiendo las recomendaciones de Le Du-Delepierre *et al.*⁽¹⁹⁾.

Sustancias Químicas

Las soluciones stock de los iones de metales pesados se prepararon disolviendo las siguientes sales: cloruro de mercurio ($HgCl_2$) a 1 mg/L; arseniato de sodio ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) a 1000 mg/L en agua destilada (pH= 7,12); (conductividad específica= 70 μ mhos/cm) en matraces aforados de un litro de capacidad. Todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales de iones de metales.

Procedimiento de la prueba

Los ciliados usados en los bioensayos se retiraron de los cultivos clonados a partir de la segunda semana, generalmente alcanzando densidades promedio de 15 células/mL para *S. coeruleus* y 10 células/mL para *S. ambiguum*⁽¹⁹⁾. Los organismos seleccionados de ambas especies siempre presentaron una apariencia saludable para su uso en los ensayos toxicológicos⁽¹⁷⁾. Las pruebas de toxicidad aguda estáticas se realizaron con cuatro réplicas y cinco concentraciones nominales de Hg^{2+} y As^{5+} en un Diseño en Bloque Completamente Randomizado (DBCA). Para el mercurio, con ambos protozoarios, se utilizaron las siguientes concentraciones en orden creciente: 1, 5, 10, 50 y 100 μ g/L y para el arsénico con *Stentor* se utilizaron las siguientes concentraciones: 5000, 10 000, 20 000, 30 000 y 50 000 μ g/L y con *Spirostomum* 1 000, 5 000, 10 000, 25 000 y 50 000 μ g/L. Se usaron 240 especímenes de cada uno de los ciliados *S. coeruleus* y *S. ambiguum* por cada prueba de toxicidad aguda. Cada grupo de 10 ciliados se les colocó en 25 ml de medio acuoso en vasos de precipitado de 50 ml. El medio empleado para todas las pruebas ecotoxicológicas fue una solución amortiguadora (Buffer-fosfato, pH= 7,0): 8,5 mg/L de KH_2PO_4 , 21,75 mg/L de K_2HPO_4 , 33,4 mg/L de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ y 1,7 mg/L de NH_4Cl . Además de otras sales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ = 22 mg/L, $CaCl_2$ = 27,3 mg/L y 0,25 g/L de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ⁽¹⁴⁾. Las lecturas de las pruebas ecotoxicológicas se realizaron a las 24, 48 y 72 h de exposición. Los ciliados no se alimentaron durante el ensayo. Para considerar las pruebas válidas, la mortalidad en el control nunca debió ser mayor del 10%.

Los organismos se mantuvieron durante la prueba bajo condiciones estandarizadas de pH y oxígeno disuelto. El pH fue ajustado en los casos necesarios al inicio de la prueba a 7,0 con una solución de NaOH 0,1M o con HCl 0,1M siguiendo las recomendaciones de Fiskejo⁽¹¹⁾. La temperatura de los ensayos fue de $20 \pm 2^\circ C$ y bajo condiciones de oscuridad.

El punto final de la prueba fue la mortalidad, considerándose a un organismo muerto para el caso de *Sten-*

tor cuando había una desorganización y rompimiento de la membrana (crenación) y despigmentación; en cambio para el caso de *Spirostomum* se observó como punto final el cambio de forma de fusiforme a ovoide (deformación).

Análisis Estadístico

Los datos de mortalidad para ambos ciliados en las concentraciones evaluadas se transformaron debido al incremento poblacional usando la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 (C-T)/C$$

donde C es el número de protozoarios en el control y T es el número de ciliados en las concentraciones de los iones tóxicos⁽²⁶⁾.

La eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un Análisis de Varianza (ANVA) de una vía, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. La Concentración de Inhibición media (CI_{50}) y sus límites de confianza al 95% se calcularon usando un programa computarizado de la EPA versión 1.5 (1993). Los resultados de las réplicas fueron sumados.

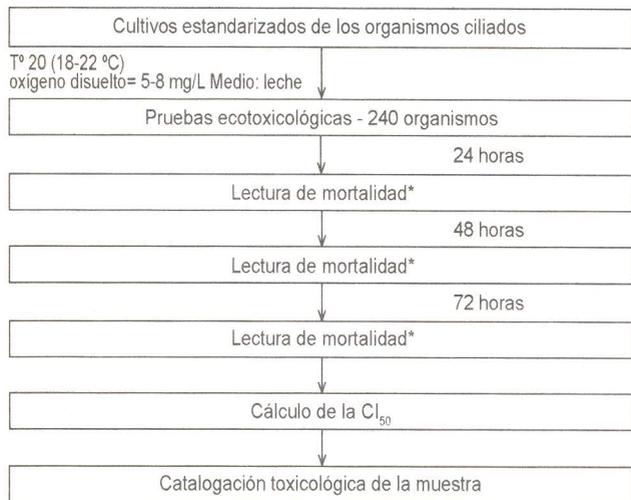
Se realizó una matriz de correlación "r" entre los valores de CI_{50} para ambos ciliados y a los tres períodos de exposición para ambos metales.

Se utilizó la prueba estadística de "t" de Student para comparar pareadamente si los porcentajes de inhibición con Hg^{2+} y As^{5+} eran diferentes a las 24, 48 y 72 h para los dos ciliados evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la secuencia del nuevo protocolo de bioensayo con los ciliados *S. coeruleus* y *S. ambiguum*.

Figura 1. Secuencia del protocolo de bioensayo con los protozoarios ciliados *Stentor coeruleus* y *Spirostomum ambiguum*.



**Stentor*: despigmentación y crenación

**Spirostomum*: deformación

La Tabla 1 indica los valores de CI_{50} frente a concentraciones nominales de los iones de las sales de Hg^{2+} y As^{5+} para *S. coeruleus* y para *S. ambiguum*. En todos los casos, a las 24 h de exposición, se observó que el crecimiento en número de individuos en el control fue entre un 10% a un 25% con relación al número de organismos inicialmente expuestos. *S. ambiguum* frente al As^{5+} presentó una alta variabilidad en la respuesta de CI_{50} para el As^{5+} , lo que explica los límites de confianza muy altos, debido a la poca pendiente

de la curva concentración-respuesta y además porque en la concentración más alta de exposición no alcanzó el 100% de inhibición en comparación con el control. Además, al emplearse una concentración de 1 000 $\mu g/L$, más baja que la usada para As^{5+} para *S. coeruleus*, se observó una inhibición semejante a la encontrada a 5 000 $\mu g/L$.

Tabla 1.- Valores comparativos de CI_{50} (en $\mu g/L$) del mercurio y arsénico sobre *Stentor coeruleus* y *Spirostomum ambiguum*

		<i>Stentor coeruleus</i> CI_{50}	<i>Spirostomum ambiguum</i> CI_{50}
Hg^{2+}	24h	1,99 (0,67-3,69)	7,26 (0,06-20,01)
	48h	1,64 (0,70-2,72)	4,31 (0,25-15,85)
	72h	1,49 (1,21-1,79)	2,11 (0,04- 6,17)
As^{5+}	24h	6595 (2266-10114)	612 847 (102 908- 700000)
	48h	4659 (3815-5366)	16383 (4323-152680)
	72h	3494 (2428-4558)	6822 (735-258254)

S. coeruleus es 3,64; 2,62; 1,41 veces más sensible al Hg^{2+} a 24; 48 y 72 h de exposición que *S. ambiguum*; en cambio se notan valores muy diferentes entre la toxicidad al As^{5+} : 92,92; 3,51; 1,95 veces más sensible que *S. ambiguum* a 24, 48 y 72 h de exposición.

Para el caso de *S. coeruleus* el valor a 72 h de exposición es 1,33 veces más sensible que a las 24 h para el Hg^{2+} ; en cambio para el As^{5+} a 72 h de exposición es 1,88 veces más sensible que a las 24 h de exposición. *S. ambiguum* a 72 h es 3,44 veces más sensible al Hg^{2+} que a las 24 h de exposición y para el As^{5+} a 24 h es 89,83 veces más sensible que a las 72 h de exposición.

Al comparar los dos metales evaluados para *S. coeruleus*, el Hg^{2+} es 2.345 veces más sensible que el As^{5+} ; para *S. ambiguum* al As^{5+} es 3.233 veces menos sensible que al mercurio.

Las figuras 2 a, b, c y d muestran los porcentajes de inhibición de ambos protozoarios expuestos a tres tiempos de exposición con el As^{5+} y el Hg^{2+} .

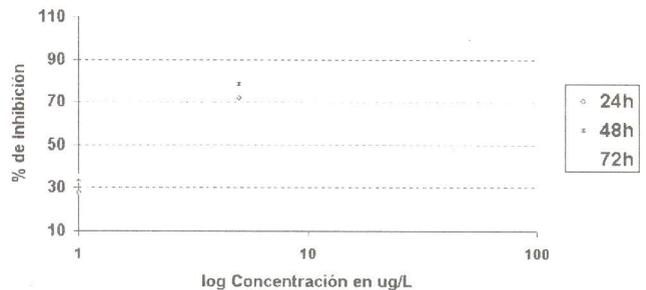


Figura 2a. Porcentaje de inhibición de *Stentor coeruleus* expuesto al mercurio a tres períodos de exposición.

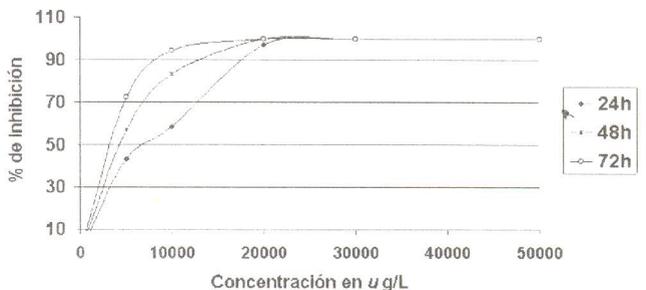


Figura 2b. Porcentaje de inhibición de *Stentor coeruleus* expuesto al arsénico a tres períodos de exposición.

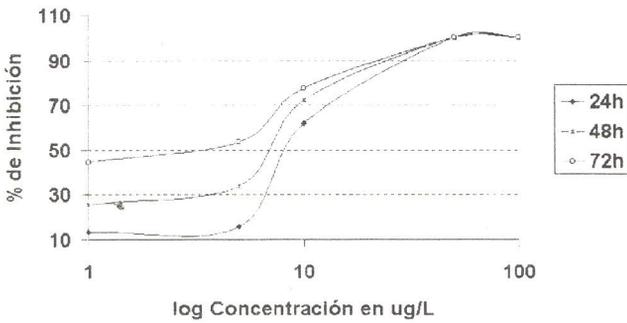


Figura 2c. Porcentaje de inhibición de *Spirosfomum ambiguum* expuesto al mercurio a tres períodos de exposición.

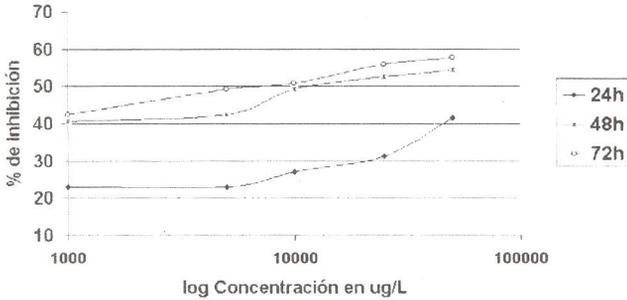


Figura 2d. Porcentaje de inhibición de *Spirosfomum ambiguum* expuesto al arsénico a tres períodos de exposición.

Los resultados muestran que *S. coeruleus* es más sensible que *S. ambiguum* para ambos metales evaluados a los tres tiempos de exposición ensayados. Ambos cilados son más sensibles al Hg^{2+} que al As^{5+} . Para el caso de *S. coeruleus* los valores de CI_{50} para ambos metales en los tres períodos de exposición son bastante cercanos entre sí y se observa una superposición de los límites de confianza, lo cual es confirmado con el estadístico "t" (para todos los casos " t_5 " £ 1; $P > 0,05$) (Tabla 1)⁽¹⁾. Por lo tanto nos permite acortar el tiempo del bioensayo con *S. coeruleus* en 24h de exposición para la catalogación toxicológica de la muestra. Esto no se recomienda para *S. ambiguum*, debido a que en el caso del As^{5+} existen valores muy diferentes de la CI_{50} entre 48 y 72h (" t_5 " = 2,98, $P = 0,031$) (Tabla 1). Al realizar una matriz de correlación entre los valores de CI_{50} y los períodos de exposición (Tablas 2 y 3) se observa en todos los casos un valor de "r" estadísticamente significativo ($P < 0,05$). Así a

Tabla 2. Matriz de correlación de Pearson entre el tiempo de exposición y los valores de CI_{50} para el mercurio y el arsénico para *Stentor coeruleus*

	Tiempo	Hg^{+2}	As^{+5}
Tiempo	1		
Hg^{+2}	-0.997	1	
As^{+5}	-0.966	0.984	1

* Todos los valores con $P < 0,05$.

Tabla 3. Matriz de correlación de Pearson entre el tiempo de exposición y los valores de CI_{50} para el mercurio y el arsénico para *Spirostomum ambiguum*

	Tiempo	Hg^{+2}	As^{+5}
Tiempo	1		
Hg^{+2}	-0.992	1	
As^{+5}	-0.997	0.998	1

* Todos los valores con $P < 0,05$.

mayor tiempo de exposición mayor toxicidad, disminuyendo el valor CI_{50} numéricamente.

Codina *et al.*⁽⁷⁾, Crisinel *et al.*⁽⁸⁾ y Munkittrick *et al.*⁽²²⁾ realizaron una evaluación comparativa relativa con organismos de varios niveles tróficos y filogenéticos para la determinación de la toxicidad de metales pesados. *S. coeruleus* resultó ser altamente sensible a los tóxicos de referencia al ser comparado con otros bioensayos estandarizados de toxicidad dulceacuicolas por Hg^{2+} y As^{5+} para el ambiente dulceacuicola (Tabla 4). En nuestro caso, el Hg^{2+} presentó el siguiente orden relativo de toxicidad ascendente para varias pruebas toxicológicas estandarizadas y utilizadas en otros laboratorios de referencia: *Oncorhynchus mykiss*, Partículas mitocondriales de *Bos taurus*, *Poecilia reticulata*, *Vibrio fisheri*, *Daphnia magna*, *Chironomus calligraphus*, *Moina macrocopa*, *S. ambiguum* y *S. coeruleus*. Se evidencia que los protozoarios son más sensibles al Hg^{2+} que los ensayos ecotoxicológicos con vertebrados acuáticos (Tabla 4), debido a mecanismos diferentes de toxicidad del Hg^{2+} ⁽³⁶⁾. Para el As^{5+} se tiene el siguiente orden relativo de toxicidad ascendente para los siguientes bioensayos *P. reticulata*, *O. mykiss*, *V. fisheri*, Partículas mitocondriales, *C. calligraphus*, *S. ambiguum*, *D. magna*, *M. macrocopa* y *S. coeruleus*. Los cladóceros resultaron ser más sensibles al As^{5+} que el protozoario *S.ambiguum* (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación relativa de bioensayos de toxicidad del mercurio y arsénico

Ensayo	Tiempo de exposición	Hg^{2+} $\mu g/L$	As^{5+} $\mu g/L$	Referencias bibliográficas
Partículas mitocondriales (CI_{50})	30 min	130	21 000	18
<i>Vibrio fisheri</i> (CI_{50})	5 min	30	35 000	22
<i>Daphnia magna</i> (CL_{50})	48 h	30	5 400	22
<i>Moina macrocopa</i> (CL_{50})	48 h	17	3 970	15
<i>Chironomus calligraphus</i> (CL_{50})	48 h	20	11 730	15
<i>Poecilia reticulata</i> (CL_{50})	24 h	60	43 100	14
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (CL_{50})	48 h	210	43 000	22
<i>Stentor coeruleus</i> (CI_{50})	72 h	1.49	3 494	Este trabajo
<i>Spirostomum ambiguum</i> (CI_{50})	72 h	2.11	6 822	Este trabajo

La técnica estandarizada de bioensayo toxicológico muestra que el conteo de individuos al finalizar la prueba requiere conocer adecuadamente ambas especies para discriminar su mortalidad. La deformación observada en *S. ambiguum* ha sido mencionada por otros autores^(6, 16). Se recomienda para considerar un ensayo válido que el crecimiento poblacional de los protozoarios en el control deber ser mayor al 10% a las 24 h de lectura.

La sensibilidad no es el único criterio usado para seleccionar un bioensayo. La facilidad de uso, costo y concordancia ecológica son otros criterios que deben ser considerados^(8, 15).

El protocolo usando *S. coeruleus* tiene ventaja comparativa del menor costo de cría, simplicidad del

manipuleo, sensibilidad de este organismo a las sales de metales; además su realismo ecológico en el ambiente dulce acuícola le favorece frente al ensayo bacteriano *V. fisheri* y el de partículas submitocondriales⁽⁶⁾, debido a que la primera es propia de ambientes marinos y la segunda se extrae de bovinos.

El protocolo de *S. ambiguum* también tiene como ventaja su menor costo de cría, por lo invertido en materiales y los gastos de trabajo. Siendo menos caros que el ensayo *V. fisheri* y el de partículas mitocondriales⁽⁶⁾.

El tamaño relativamente grande de estos organismos unicelulares (> de 1 mm para *S. coeruleus* y > de 2 mm para *S. ambiguum*), así como los movimientos lentos de sus nadados, permite una fácil micromanipulación bajo el microscopio de disección⁽¹⁹⁾.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) (1989). Standard methods for examination of water and wastewater. 17 th. de. American Health Association. Washington, DC.
2. Bick H. (1972). Ciliated protozoa. World Health Organization- Geneva. 198 pp.
3. Bringmann, G.; R. Kuhn (1980). Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water Res.* 14: 231-241.
4. Calzado, L.P. (1997). Caracterización y Categorización de los Problemas ambientales de la Minería en el Perú. Primer Simposio Nacional de Medio Ambiente y Seguridad Minera. 9-12 de junio (Lima-Perú), Tomo II 173 pp.
5. Carter, J.W.; I.L. Cameron (1973). Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. *Water Res.* 7: 951-961.
6. Carter, L. (1957). Ionic regulation in the ciliate *Spirostomum ambiguum*. *J. Exp. Biol.* 34: 71-84.
7. Codina, J.C.; A. Perez-García; P. Romero; A. De Vicente (1993). A Comparison of microbial bioassay for detection of metal toxicity. *Arch. Environ. Toxicol.* 25: 250-254.
8. Crisinel, A.; L. Delaunay; D. Rossel; J. Tarradellas; H. Meyer; H. Saiah; P. Vogel; C. Deslisle; C. Blaise (1994). Cyst-based ecotoxicological tests using Anostracans: Comparison of two species of *Streptocephalus*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 317-326.
9. De Puytorac, P.; J. Grain; J.P. Mignot (1987). Précis de Protistologie, Fondation Singer-Polignac & Société Nouvelle des Editions Boubée. 581 pp.
10. Dive, D.; C. Blaise; A. Le Du (1991). Standard protocol proposal for undertaking the *Colpidium campylum* ciliate protozoan growth inhibition test. *Z. Angew. Zool.* 78: 80-90.
11. Fiskejo, G. (1993). A 12-3 days plant test for toxicity assessment of various chemicals by measuring the mean root growth of a series of onions (*Allium cepa* L.). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 461-470.
12. Fukushima, S.; H. Ogawa; S. Sasagawa (1992). Effects of mutagens on the clonal lifespan on *Paramecium tetraurelia*. *Mut. Res.* 275: 41-46.
13. Giron, I.B. (1997). Toxicología de los metales en efluentes de la industria minero-metalúrgica. Primer Simposio Nacional de Medio Ambiente y Seguridad Minera, 9 al 12 de junio (Lima-Perú). Tomo II. 173 pp.
14. Iannacone, J.A.; L. Alvarino (1998). Acute ecotoxicity of zinc to guppy *Poecilia reticulata*. *Wiñay Yachay* (Perú) 2: 67-74.
15. Iannacone, J.A.; W. E. Dale (1999). Protocolo de bioensayo para determinar metales pesados contaminantes del agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustácea: Cladóceras), en el río Rimac, Lima, Perú. *Rev. per. Ent.* 41: 111-120.
16. Kidawa, A. (1984). Growth and respiration of *Spirostomum ambiguum* Enrenberg (Protozoa) during interphase. *Bull. Pol. Aca. Sci. Biol.* 32: 381-387.
17. Kidawa, A. (1987). Changes in the consumption of a ciliate *Spirostomum ambiguum* caused by food density and cell age. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 34: 119-387.
18. Knobeloch, L. M.; G.A. Blondin; J.M. Harkin (1990). Use of submitochondrial particles for prediction of chemical toxicity in man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 661-668.
19. Le Du-Delepierre A.; G. Persoone; C.A. Groliere (1996). A new low microbiotest with the freshwater ciliate protozoan *Spirostomum ambiguum*: Definition of culturing condition. *Hydrobiologia* 325: 121-130.
20. Lynn, D.H. G.L. Gilron. (1992). A brief review of approach using ciliated and macroinvertebrate community structure. *Verb. Int. Ver. Limnol.* 25: 1954-1957.
21. Madoni, P.; D. Davoli; G. Gorbi (1994). Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 420-425.
22. Munkittrick, K.R.; E.A. Power; G.A. Sergy (1991). The relative sensitivity of Microtox, Daphnids, Rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 35-62.
23. Nilsson J.R. (1989). *Tetrahymena* in citotoxicology with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *J. Protistol.* 25: 2-25.
24. Pauli, W.; S. Berger; S. Schmitz; L. Jaskulka (1994). Chemosensory responses of ciliates: A sensitive end point in xenobiotic hazard assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 341-346.
25. Pritchard, J.B. (1993). Aquatic Toxicology: Past, Present, and Prospects. *Environ. Health Persp.* 100: 249-257.
26. Robert, R.D.; S.G. Berk (1990). Development of a protozoan chemoattraction bioassay for evaluating toxicity of aquatic pollutants. *Tox. Assess.* 5: 279-292.
27. Roberts, R.O.; S.G. Berk (1993). Effect of copper, herbicides, and a mixed effluent on chemoattraction of *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 73-85.
28. Rodriguez, J.; M. Correa; M. Escalpes. (1993). Aplicación de técnicas de bioensayos a problemas de contaminación ambiental. Libro de Resúmenes del VII Congreso Venezolano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 20-25 de junio de 1993. 80 pp.
29. Sarmiento, L.; M.E. Morales. (1998). Protozoarios, turbelarios y nemátodos de los Pantanos de Villa, Lima, Perú: su importancia en el ecosistema. En: Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. UNMSM, Museo de Historia Natural (Perú) (A. Cano y K.R. Young, Eds.). Serie de Divulgación 11: 41-54.
30. Slabbert, J.L.; W.S.C. Morgan (1982). A bioassay technique using *Tetrahymena pyriformis* for rapid assessment of toxicant. *Wat. Res.* 16: 517-523.
31. Slabbert, J.L.; R. Smith; Morgan, W.S.G. (1983). Application of *Tetrahymena pyriformis* bioassay system for the rapid detection of toxic substances in wastewater. *Water S.A.* 9: 81-87.
32. Streble, H.; D. Krauter (1987). Atlas de los microorganismos de agua dulce. Ediciones Omega, S.A. 357 pp.
33. Utsumi, H.; K. Kiyoshige; S. Shimbara; A. Hamada (1994). Comparative studies on cytotoxicity of micropollutants in water: Principle of cytotoxicity matrix. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 333-339.
34. Vidalon, J.; G. Medina (1997). Control de la Contaminación en la Minería Artesanal y Pequeña Minería. Primer Simposio Nacional de Medio Ambiente y Seguridad Minera, 9-12 de junio (Lima-Perú), Tomo III. 175-408 pp.
35. Wong, P.T.; D.G. Dixon. (1995). Bioassessment of water quality. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10: 9-17.
36. Zaman, K.; R.S. Pardini (1996). An overview of the relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. *Toxic Subs. Mech.* 15: 151-181.

EFFECTIVIDAD DE LOCIONES CAPILARES SOBRE POBLACIONES DE *Pediculus capitis* RESISTENTES A INSECTICIDAS

Gastón Mougabure Cueto, Claudia Vassena, Paola Gonzalez Audino, María Inés Picollo y Eduardo Nicolás Zerba.

Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas (CIPEIN) (CITEFA - CONICET)
Zufriategui 4380, Villa Martelli, (1603), Provincia de Buenos Aires - Argentina
T.E: ++54 11-4709-5334, FAX: ++54 11-4709-3210. Correo electrónico: cipein@citefa.gov.ar

RESUMEN: Mougabure Cueto, G., Vassena, C., Gonzalez Audino, P., Picollo, M. I. y Zerba, E. N. *Efectividad de lociones capilares sobre poblaciones de *Pediculus capitis* resistentes a insecticidas.* Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1):10-12. Se estudió la influencia de los distintos componentes en la efectividad de lociones experimentales sobre piojos resistentes a insecticidas piretroides. Se encontró que el aumento de la concentración del insecticida d-fenotrina desde 0,2 % (concentración recomendada en lociones comerciales) hasta 0,5 %, no produjo diferencias significativas ($p=0,495$) en la actividad pediculicida. Por el contrario se encontró un aumento significativo de efectividad de lociones experimentales con d-fenotrina 0,2 % al agregar el alcohol alifático dodecanol en concentración 10 %. El volteo de piojos expuestos se incrementó desde $23,3 \pm 4,7$ % hasta $92,0 \pm 7,5$ % respectivamente. Se encontró además que las lociones conteniendo sólo dodecanol (sin d-fenotrina) producían un volteo significativo de los piojos expuestos ($35 \pm 8,5$). Se comprobó que el volteo producido por la loción con dodecanol mostraba recuperación parcial a las 18 horas, mientras que la efectividad de las lociones que combinaban dodecanol con insecticida aumentaba al cabo de 18 horas alcanzando 100 % de mortalidad. Se postula que la potenciación de actividad pediculicida demostrada para lociones que combinan dodecanol y d-fenotrina podría deberse a daño cuticular producido por el alcohol que favorecería la penetración del insecticida para ejercer su efecto tóxico.

ABSTRACT: Mougabure Cueto, G., Vassena, C., Gonzalez Audino, P., Picollo, M. I. y Zerba, E. N. *Effectiveness of capilar lotions against insecticide resistant *Pediculus capitis* populations.* Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1):10-12. Pediculicidal activity of experimental lotions were studied under laboratory conditions against pyrethroid resistant *Pediculus capitis*. The effectiveness of δ -phenothrin lotions didn't show significative difference ($p=0,495$) when the insecticide concentration was increased from 0.2% (concentration recommended for commercial capilar lotions) to 0.5%. Otherwise, the incorporation of an aliphatic alcohol (1-dodecanol) to δ -phenothrin lotion, produced an important increase of the pediculicidal activity. Knockdown of exposed head lice increased from $23.3 \pm 4.7\%$ for 0.2% d-phenothrin lotions, to $92.0 \pm 7.5\%$ for 0.2% d-phenothrin plus 10% dodecanol combined lotions. The knockdown effect was also produced by experimental lotions containing 5% dodecanol (without d-phenothrin), but partial recovery was found 18 hours posttreatment. For dodecanol - d-phenothrin combined lotions no recovery but increased mortality was found at 18 hours. The phenomenon can be attributed to some effect of the aliphatic alcohol on the cuticle that can determine a higher penetration of the insecticide.

PALABRAS CLAVE: *Pediculus capitis*, dodecanol, d-fenotrina, piojo, actividad pediculicida, insecticida
KEY WORDS: *Pediculus capitis*, dodecanol, d-phenothrin, head lice, pediculicide activity, insecticide

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los productos pediculicidas comerciales contienen permetrina como ingrediente activo. El uso continuo e intensivo de este insecticida piretroide para el control de *Pediculus capitis* (piojo de la cabeza), trajo aparejado el desarrollo de resistencia a permetrina ya reportado para Francia⁽¹⁾, el Reino Unido⁽²⁾, Checoslovaquia⁽³⁾, Israel⁽⁴⁾ y Argentina⁽⁵⁾.

Los estudios de laboratorio realizados sobre piojos recolectados en Buenos Aires, demostraron que los piojos resistentes a permetrina desarrollaron además resistencia a otros insecticidas piretroides utilizados como pediculicidas (deltametrina y d-fenotrina) y resistencia cruzada a un novedoso piretroide nunca utilizado en productos pediculicidas (β -cipermetrina)⁽⁶⁾. Estos estudios también demostraron la participación de varios mecanismos involucrados en la resistencia a insecticidas piretroides. Los estudios realizados por Downs et al⁽⁷⁾ demostraron que los piojos de Bristol y Bath, Reino Unido, eran resistentes a los insecticidas disponibles para control de pediculosis. Este fenómeno es preocupante debido a la relativa poca disponibilidad de compuestos suficientemente efectivos sobre piojos y con la suficiente baja toxicidad en mamíferos, como para poder ser utilizados como pediculicidas⁽⁸⁾.

Considerando entonces la limitada posibilidad de cambiar de insecticida, resulta crítico mejorar la formulación del mismo ya que la efectividad final del producto depende del ingrediente activo y de la influencia de los coadyuvantes⁽⁹⁾. Al respecto resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los coadyuvantes de la formulación de cremas capilares pediculicidas comerciales poseían una influencia decisiva en el efecto tóxico final. Se observó que distintos formulados conteniendo el mismo ingrediente activo en igual concentración (permetrina 1%) tenían distinta efectividad pediculicida y que el aumento de concentración o el agregado de otro activo, no

incrementaba dicha efectividad⁽¹⁰⁾.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto sobre la actividad pediculicida de lociones capilares experimentales, producido por la incorporación de un alcohol alifático de cadena larga (dodecanol) en la formulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se recolectaron piojos de cabezas infestadas de niños de 6 a 12 años que concurrían a escuelas ubicadas en Buenos Aires. La colonia de piojos seleccionada para este estudio fue Luján Porteño (recolectada en el barrio de Flores de la Ciudad de Buenos Aires) con resistencia demostrada a permetrina (>90,9x), δ -fenotrina (>100x) y deltametrina (>100x) (5, Picollo et al 1998).

Los insectos se enviaron al laboratorio y se seleccionaron de acuerdo a su vitalidad y estado de desarrollo⁽⁵⁾. Se utilizaron adultos y ninfas III en los ensayos biológicos, ya que Mumcough et al⁽⁴⁾ reportaron susceptibilidad similar entre ambos estadios.

Compuestos Químicos

D-fenotrina (94,4% i.a.) (Sumitomo Chemical, Osaka, Japón); 1-dodecanol (98% i.a.) (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, USA). Se utilizaron solventes de grado analítico (Merck, Buenos Aires, Argentina).

Para la preparación de lociones experimentales se disolvió la cantidad necesaria del insecticida (d-fenotrina) en 70 ml de alcohol absoluto, se agregó 2 ml de glicerina y completó con agua deionizada hasta 100 ml de solución final.

Las lociones con dodecanol se prepararon disolviendo las concentraciones necesarias del insecticida y de dodecanol en el alcohol absoluto previo a la incorporación

de la glicerina y el agua.

Las lociones controles de dodecanol se prepararon de igual manera pero con distinta concentración de este alcohol y sin insecticida. La loción blanco de formulación se preparó con alcohol absoluto, glicerina y agua.

Ensayo Biológico

Para evaluar en forma comparativa la efectividad de las lociones experimentales se utilizó el método de exposición por inmersión⁽¹⁰⁾. Grupos de 10 piojos se sumergieron durante 2 minutos en 1 ml de la loción experimental, posteriormente se colocaron en una malla metálica y se lavaron con 100 ml de agua corriente. Una vez lavados, se colocaron sobre papel de filtro (Whatman N° 1) y se registró el número de insectos volteados a los 10 minutos posteriores al comienzo de la inmersión. Los insectos volteados a los 10 minutos se mantuvieron en las condiciones óptimas para la supervivencia de controles en el laboratorio (18 ± 1 °C y 70-80 % HR) durante 18 horas para medir mortalidad⁽⁵⁾.

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado y las condiciones ambientales de los mismos fueron 25 ± 1 °C y 50-70% HR.

Análisis estadístico

Se procesaron los datos por medio del método de análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a cada caso⁽¹¹⁾ y el nivel de significación se aclara en cada figura.

RESULTADOS

La figura 1 resume el volteo promedio de piojos expuestos a lociones experimentales conteniendo concentraciones crecientes del insecticida d-fenotrina, partiendo de la concentración recomendada en lociones comerciales (0,2%).

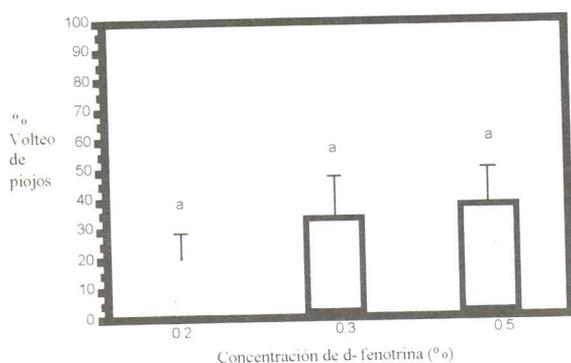


Figura 1. Efectividad piojicida de lociones experimentales conteniendo distintas concentraciones de d-fenotrina

Grupos de 10 piojos de la colonia LP (resistente a piretroides) se sumergieron durante 2 minutos en lociones experimentales basadas en alcohol:glicerina (80:2). Se registró el número de insectos volteados a los 10 minutos posteriores a la exposición. Barras con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.01$).

La mortalidad en todos los casos fue menor al 40% y no se observó diferencia significativa ($p = 0,495$) en la actividad al aumentar la concentración de insecticida desde 0,2 hasta 0,5 % indicando que en este caso el solo hecho de aumentar la concentración del ingrediente activo no se traduce necesariamente en un aumento de efectividad. En cambio, se encontró un aumento significativo de la actividad de la loción experimental con d-fenotrina 0,2% al agregar dodecanol en

concentración 10%.

La figura 2 muestra que el volteo promedio producido por la loción con el insecticida ($23,3 \pm 4,7\%$) aumentó significativamente ($92,0 \pm 7,5\%$) en presencia de dicho alcohol. También se observó alto volteo de piojos ($47,5 \pm 8,3\%$) expuestos a lociones con dodecanol (sin insecticida).

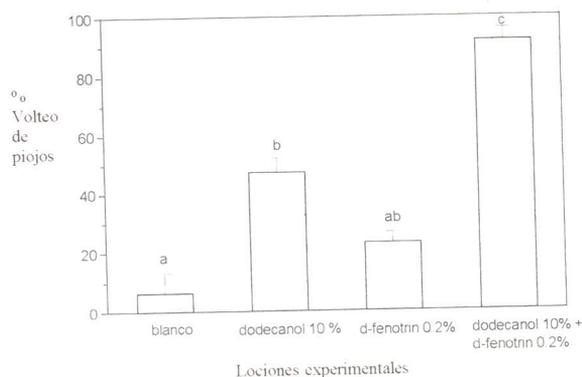


Figura 2. Efecto del dodecanol en la actividad piojicida de lociones pediculicidas experimentales.

Grupos de 10 piojos de la colonia LP (resistente a piretroides) se sumergieron durante 2 minutos en lociones experimentales basadas en alcohol:glicerina (80:2). Se registró el número de insectos volteados a los 10 minutos posteriores a la exposición.

Barras con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.01$).

Se encontró además correlación entre la concentración de dodecanol y la efectividad de lociones conteniendo sólo dodecanol ó combinando dodecanol con insecticida (d-fenotrina 0,2%). Para cada concentración de dodecanol el volteo fue significativamente mayor en piojos expuestos a lociones conteniendo ambos productos ($p < 0,01$) (Figura 3).

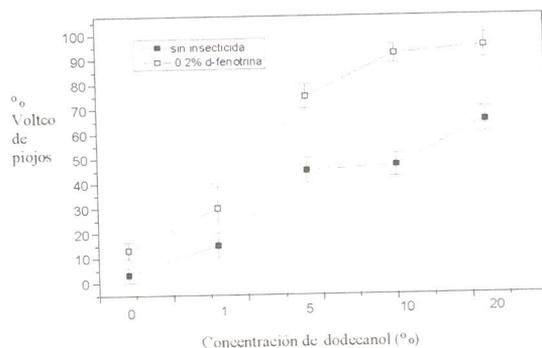


Figura 3. Efecto sinérgico de distintas concentraciones de dodecanol incorporado a lociones pediculicidas.

Grupos de 10 piojos de la colonia LP (resistente a piretroides) se sumergieron durante 2 minutos en lociones experimentales basadas en alcohol:glicerina (80:2). Se registró el número de insectos volteados a los 10 minutos posteriores a la exposición.

Para cada concentración de dodecanol el volteo fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en piojos expuestos a lociones conteniendo ambos productos (dodecanol e insecticida).

Respecto a la evolución del efecto insecticida se observaron diferencias significativas entre los piojos volteados a 10 minutos y mortalidad a 18 hs ($p < 0,05$). Se comprobó que el volteo inicial producido por la loción experimental con 5% de dodecanol sin insecticida, mostraba recuperación parcial a las 18 horas, mientras que la mortalidad producida por la loción que combina dodecanol con insecticida, aumentó al cabo de 18 horas (Figura 4).

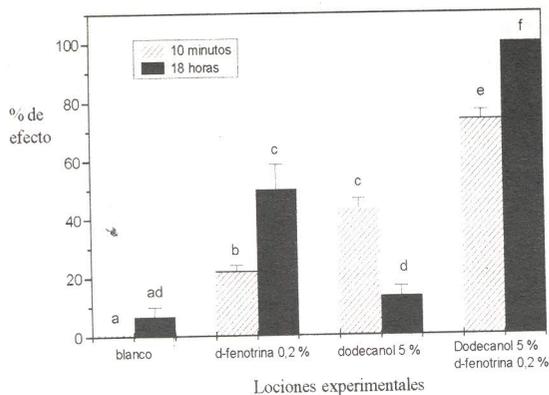


Figura 4. Volteo y mortalidad de piojos expuestos a lociones experimentales. Grupos de 10 piojos de la colonia LP (resistente a piretroides) se sumergieron durante 2 minutos en lociones experimentales basadas en alcohol:glicerina (80:2). Se registró el número de insectos volteados a los 10 minutos posteriores a la exposición y la mortalidad a las 18 horas. Barras con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Las lociones experimentales conteniendo δ -fenotrina mantuvieron su baja actividad piojicida a pesar del aumento de la concentración de insecticida desde 0.2 % (recomendada para lociones comerciales) hasta 0,5 % v/v. Esta falta de correlación dosis respuesta indica que la baja actividad de las lociones experimentales (20-40 % de volteo de los piojos expuestos) puede ser atribuida al muy alto factor de resistencia de la cepa de piojos utilizada. Estos resultados concuerdan con lo observado para cremas capilares pediculicidas de uso comercial, cuya evaluación en laboratorio demostró que distintos formulados conteniendo el mismo ingrediente activo a igual concentración (permetrina 1 %) poseían distinta efectividad y que el aumento de concentración o el agregado de otro insecticida no incrementaba la actividad piojicida en cepas resistentes⁽¹⁰⁾.

La incorporación de dodecanol en concentración 10% a las lociones experimentales con d-fenotrina 0,2 % resultó en un aumento significativo en el volteo de los piojos expuestos. Se observó además un importante efecto de volteo de lociones con dodecanol sin insecticida. El poder de volteo del dodecanol fue claramente dependiente de la concentración, aumentando progresivamente al aumentar la concentración desde 1 a 20 %. Este efecto insecticida del dodecanol y de otros alcoholes alifáticos de cadena larga fue observado por B. Sinniah⁽¹²⁾ sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *A. scutellaris*. El autor encontró que los alcoholes alifáticos 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol resultaron muy efectivos como ovicidas y larvicidas sobre 2 especies de *Aedes*, y atribuyó el fenómeno a las propiedades lipofílicas y deshidratantes de los alcoholes que determinan su capacidad de penetrar y romper la estructura lipídica de estos estados acuáticos de mosquitos.

Un efecto semejante al descrito por Sinniah podría explicar el volteo de piojos producido por las lociones experimentales que sólo contienen dodecanol. En este caso, la particular lipofílicidad del alcohol alifático podría producir un rápido volteo, ya que es conocida la capacidad que poseen los piojos para inactivarse rápidamente en un ambiente desfavorable. Si se suspende la exposición mediante el lavado con agua corriente, los insectos podrían recuperar su actividad siempre y cuando el tiempo de exposición o la concentración de alcohol alifático a los que fueron sometidos, resultaran

subletales. Esto explicaría la menor mortalidad de piojos observada a 18 horas respecto a los insectos volteados por exposición a lociones con dodecanol y sin insecticida.

En el caso de las lociones que combinan dodecanol y d-fenotrina, el daño cuticular que produciría el alcohol podría favorecer la penetración del insecticida y por lo tanto incrementar su efecto tóxico⁽¹³⁾. La acción conjunta de ambos productos resulta entonces en un incremento del efecto de volteo inicial y de la mortalidad final.

Esta potenciación de actividad pediculicida demostrada para lociones que combinan un alcohol alifático de uso farmacéutico con un insecticida (Picollo et al, Patente Argentina en trámite Acta N° P 990104387), representa una alternativa de control químico para poblaciones de piojos resistentes a insecticidas piretroides actualmente usados para formulados pediculicidas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos muy especialmente a Laura Panio y a los docentes de la escuela Luján Porteño por su valiosa colaboración. Este trabajo fue subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina) y por Interbelle Cosmetics (Argentina).

BIBLIOGRAFÍA

- Coz, J.; Combescot-Lang, C. et Verdier, V. (1993). Resistance du pou tete *Pediculus capitis* L. 1758 aux pyrethrinoides d-phenothrine et permethrine en France. Bull. Soc. Française Parasitol., 11, 2: 245-252.
- Burgess, I. (1995). *Pediculus humanus capitis* in school children. The Lancet. 345: 730-731.
- Rupes, V.; Moravec, J.; Chmela, J.; Ledvinka, J. and Zelencová, J. (1995). A resistance of head lice *Pediculus capitis* to permethrin in Czech Republic. Centr. Eur. J. Publ. Hlth. 3, 1: 30-32.
- Mumcuoglu, K. Y.; Hemingway, J.; Miller, J.; Ioffe-Uspensky, I.; Klaus, S.; Ben-Ishai, F. and Galun, R. (1995). Permethrin resistance in the head louse *Pediculus capitis* from Israel. Med. Vet. Entomol. 9: 427-432.
- Picollo, M. I.; Vassena, C.; Casadio, A.; Massimo, J. and Zerba, E. N. (1998). Laboratory Studies about susceptibility and resistance to insecticides in the head lice *Pediculus capitis*. J. Med. Entomol. 35: 814-817.
- Picollo, M.I., C.V. Vassena, G. Mougabure Cueto, M. Vernetti and E.N. Zerba. 2000. Resistance to insecticides and effects of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Phthiraptera, Pediculidae) from Buenos Aires. J. Med. Entomol. (en prensa).
- Downs, A.M.R.; Stafford, K.A.; Harvey, I. and Coles, E.C. (1999). Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. British Journal of Dermatology 141: 508-511.
- Gratz, N. G. (1977). Treatment resistance in louse control. In M. Orkin, M.I. Maibach, L.C. Parisch and R.M. Schwartzman [eds], Scabies and Pediculosis. Lippincott. Philadelphia, pp 179-190.
- Zerba, E.N. (1999). Past and present of Chagas vector. Control and future needs. Position paper. Global collaboration for development of pesticides for public health, WHO Pesticides Evaluation Scheme (WHOPES/GCDPP/99.1.)
- Picollo, M.I. (1999). Riesgos y beneficios en el uso de pediculicidas. Rev. Soc. Entomol. Argent. 58 (1-2): 238-242.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). Biometry. second ed. W.H. Freeman, New York.
- Sinniah, B. (1983). Insecticidal effects of aliphatic alcohols against aquatic stages of *Aedes* mosquitoes. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77, 1: 35-38
- Zerba, E. N., S. de Licastro, E. Wood, and M. I. Picollo (1987). Insecticides: mechanism of action, pp 103-106. In R. Brenner and A. Stoka [eds.], Chagas' disease vectors, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, FL.

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DIURÉTICOS EN ORINA POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

Valentina Olmos, Alejandro Cohen, Edda C. Villaamil Lepori, Clara M. López y Otmario E. Roses*.

Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
Junín 956 - 7° piso - (1113) Buenos Aires - Argentina - Tel/Fax: ++54-11-4964-8283/8284.
e-mail: oroses@ffyb.uba.ar

RESUMEN: Olmos, V., Cohen, A., Villaamil Lepori, E. C., López, C. M., y Roses, O. E. *Aislamiento e identificación de diuréticos en orina por cromatografía en capa delgada. Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 13-15.* Se investigó mediante cromatografía en capa delgada la presencia de acetazolamida, ácido 4-sulfonamido benzoico, amiloride, bendroflumetiazida, bumetanida, dihidroclorotiazida, espironolactona, furosemida y triamtireno en muestras de orina enriquecidas. La fase fija fue silicagel 60 GF 254 y la fase móvil acetato de etilo. El revelado de las máculas fue secuencial. El sistema cromatográfico separó e identificó los nueve diuréticos ensayados con diferente sensibilidad. El amiloride, la bendroflumetiazida, la furosemida y el triamtireno pudieron ser observados a concentraciones de 0,1 µg/ml; el ácido 4-sulfonamido benzoico, la dihidroclorotiazida y la espironolactona a concentraciones de 2 µg/ml y la acetazolamida y bumetanida a concentraciones de 5 µg/ml. Este método es rápido, sencillo y económico para investigar la presencia de diuréticos en muestras de orina, por lo que resulta adecuado para ser usado en el "screening" de diuréticos en el análisis antidopaje.

ABSTRACT: Olmos, V., Cohen, A., Villaamil Lepori, E. C., López, C. M., y Roses, O. E. *Isolation and identification of diuretics in urine by TLC. Acta Toxicol. Argent. (2000) 8 (1): 13-15.* Acetazolamide, ácido 4-sulfonamido benzoico, amiloride, bendroflumetiazide, bumetanide, dihidroclorotiazida, spironolactone, furosemide and triamtirene were investigated in spiked urine sample by thin layer chromatography. Ethyl acetate and silicagel GF254 were used as mobile and stationary phases respectively. The spots were detected by sequential sprinkling of different reagents. The system has been proved to be adequate for the analysis of nine diuretics assayed and showed differential sensitivity to them. 0,1 µg/ml of amiloride, bendroflumetiazide, furosemide, triamtirene; 2 µg/ml of ácido 4-sulfonamido benzoico, dihidroclorotiazide, spironolactone and 5 µg/ml of acetazolamide and bumetanide were detected. This method is simple, rapid and effective for the investigation of diuretics in urine sample and it is reliable to do the screening of these compounds in the antidoping analysis.

PALABRAS CLAVE: diuréticos - orina - CCD - screening - análisis antidopaje
KEY WORDS: diuretics - urine - TLC - screening - antidoping analysis

INTRODUCCIÓN

Los diuréticos constituyen un importante grupo de agentes terapéuticos que son utilizados para controlar el volumen y la composición de los fluidos corporales en una gran variedad de patologías entre las que se incluyen la hipertensión arterial, las cardiopatías agudas y crónicas, el síndrome nefrótico y la cirrosis, entre otras⁽¹⁾.

En el ser humano producen un aumento de la excreción urinaria de agua y electrolitos y su efecto adverso más importante es la alteración del balance hidrosalino manifestado por hiponatremia, hipocalemia, hipomagnesemia y alcalosis metabólica con hipocloremia^(2,3,4,5).

Las intoxicaciones producidas por el uso exclusivo de los diuréticos son poco frecuentes; sin embargo pueden estar involucrados indirectamente cuando forman parte de una formulación farmacéutica en el caso en que otro fármaco sea el responsable principal del cuadro tóxico.

Un grupo de riesgo potencialmente propenso a sufrir las anomalías metabólicas provocadas por los diuréticos es el constituido por pacientes con trastornos alimentarios que desean bajar de peso rápidamente y que los usan excesivamente⁽⁶⁾. Estos pacientes frecuentemente niegan su consumo y provocan desconcierto al médico tratante.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una metodología sencilla para detectar la presencia de diuréticos en orina utilizando una técnica versátil y económica como la cromatografía en placa delgada (CCD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron pro-análisis. El acetato de etilo, el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el fosfato disódico y el nitrito de sodio empleados eran marca Mallinckrodt. El biclorhidrato de N-naftiletilediamina fue marca Fluka. El metanol fue marca Merck.

*Autor a quien dirigir la correspondencia

Para la extracción en fase sólida se utilizaron columnas Worldwide Monitoring XRODH515 y para la CCD cromatoplacas de silicagel 60 GF 254 (20 x 10 cm) de Merck Química Argentina.

Los diuréticos utilizados fueron: acetazolamida, ácido 4-sulfonamido benzoico, amiloride, bendroflumetiazida, bumetanida, dihidroclorotiazida, espironolactona, furosemida y triamtireno. Las drogas sólidas, de calidad analítica, fueron provistas por los laboratorios farmacéuticos que las formulan en la Argentina.

De cada diurético se prepararon soluciones madre de 1 mg/ml en metanol. A partir de cada solución madre se prepararon soluciones de trabajo en metanol, de las siguientes concentraciones: 0,01; 0,015; 0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 mg/ml.

Preparación de las muestras de orina enriquecidas con diuréticos

Se emplearon tres muestras de orina obtenidas de voluntarios sanos que no habían consumido diuréticos durante 30 días previos al ensayo. Todas las muestras fueron enriquecidas con los diuréticos mencionados a concentraciones de 0,1; 2,0 y 5,0 µg/ml. Tanto las soluciones de trabajo como las muestras enriquecidas se conservaron a 4 °C.

Equipamiento

Lámpara UV que emita a 254 y 366 nm.

Extracción en fase sólida

De cada muestra de orina, 5 ml se llevaron a pH 7,0 con fosfato disódico sólido y se sembraron en las columnas de extracción en fase sólida, previamente acondicionadas con 5 ml de metanol y 5 ml de agua destilada.

Las columnas fueron lavadas con 2,0 ml de agua destilada y, posteriormente, se procedió a eluir las muestras con 3,0 ml de metanol.

Los eluatos fueron evaporados a 40 °C bajo corriente

de nitrógeno y reconstituidos con 20 μ l de metanol.

Cromatografía en Capa Delgada

Como fase fija se utilizaron cromatoplasmas de silicagel 60 GF 254 y como fase móvil acetato de etilo⁽⁷⁾. La siembra de los testigos y de los extractos fue realizada con un capilar graduado de 5,0 μ l y el volumen de siembra fue de 10,0 μ l.

La cromatografía se dejó desarrollar 10 cm y luego se procedió a visualizar las máculas siguiendo el revelado secuencial establecido por Clarke⁽⁷⁾ con algunas modificaciones efectuadas por los autores:

- observación al UV (254 nm y 366 nm);
- aspersión con CIH concentrado, calentamiento de la placa a 110 °C durante 10 minutos y observación al UV a 366 nm;
- aspersión con H₂SO₄ 9 M y observación al UV a 366 nm;
- aspersión con solución acuosa de NO₂Na al 1% y biclorhidrato de N-naftiletilendiamina al 0,5%.

El nitrito de sodio y el biclorhidrato de N-naftiletilendiamina fueron preparados inmediatamente antes de su uso.

Después de cada aspersión la placa cromatográfica fue secada empleando una corriente de aire tibio.

RESULTADOS

El desarrollo de la cromatografía en capa delgada en acetato de etilo como fase móvil y el posterior revelado secuencial permitió la separación e identificación de los 9 diuréticos ensayados, incluyendo aquellos no descritos por Clarke⁽⁷⁾, como la espirolactona, la bumetanida, el triamtireno, el amiloride, la acetazolamida y el ácido 4-sulfonamidobenzoico.

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos con el revelado secuencial y los valores de Rf absolutos y relativos a la furosemida de cada diurético. La furosemida se eligió como referencia para el cálculo del Rf relativo porque es el diurético que más se usa y porque en el sistema cromatográfico empleado tiene un Rf intermedio de 0,53.

Tabla 1. Revelado secuencial de los testigos de diuréticos ensayados en la CCD

Diurético	Rf (254 nm)	Rf relativo la furosemida	Fluorescencia (366 nm)	CIH cc Fluorescencia (366 nm)	SO ₄ H ₂ 9M Fluorescencia (366 nm)	NO ₂ Na (color)	Naftil-Etilendiamina (color)
Ac.4-sulfonamido benzoico	0,54+/-0,02	1,02	-	-	-	-	-
Acetazolamida	0,52+/-0,04	0,98	-	-	-	-	-
Amiloride	0,00+/-0,00	0,00	Celeste	↑Celeste	↑↑Celeste	-	-
Bendroflumetiazida	0,91+/-0,02	1,73	-	-	-	-	Rojo
Bumetanida	0,62+/-0,09	1,17	Celeste	↑Celeste	-	-	Rosado
Dihidroclorotiazida	0,59+/-0,04	1,11	-	-	-	-	Rosado
Espironolactona	0,78+/-0,05	1,48	-	Amarillo	↑Amarillo	-	Amarillo
Furosemida	0,53+/-0,09	1,00	-	-	-	-	Rosado
Triamtireno	0,01+/-0,00	0,02	Celeste-verdosa	↑Celeste-verdosa	↑↑Celeste-verdosa	-	-

La observación de la placa expuesta a la luz ultravioleta a 254 nm (absorción) permitió distinguir todos los testigos de diuréticos empleados (Figura 1). El menor valor Rf observado (0,01) correspondió al amiloride y triamtireno, los cuales permanecieron en el punto de siembra; mientras que el máximo fue el de la bendroflumetiazida con un valor de 0,91.

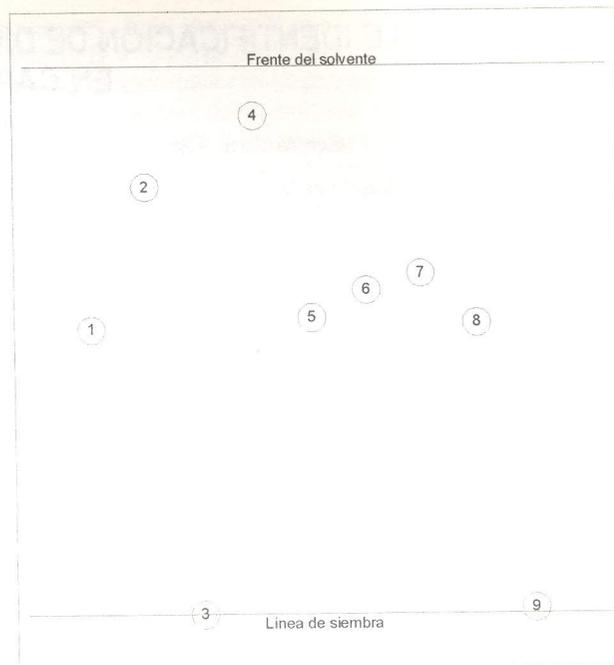


Figura 1

Figura 1. Diagrama de la placa cromatográfica observada bajo luz ultravioleta (254 nm).

- acetazolamida; (2) espirolactona; (3) amiloride; (4) bendroflumetiazida; (5) ácido 4-sulfonamido benzoico; (6) dihidroclorotiazida; (7) bumetanida; (8) furosemida; (9) triamtireno.

↑: Aumento de la fluorescencia

La aspersión con CIH concentrado y la observación posterior a 366 nm produjo un incremento de la fluorescencia celeste del amiloride y de la bumetanida y también la fluorescencia celeste-verdosa del triamtireno. En esta etapa, la espirolactona reveló con una fluorescencia color amarillo.

Al asperjar con la solución de H₂SO₄ 9 M, la bumetanida perdió la fluorescencia observada precedentemente a 366 nm, mientras que se incrementó la del amiloride, triamtireno y espirolactona a la misma longitud de onda.

El nitrito de sodio hizo desaparecer la fluorescencia anteriormente descrita de los testigos utilizados.

La aspersión con la solución de N-naftiletilendiamina al 0,5 % permitió observar la aparición de máculas coloreadas que se correspondieron con los testigos de bendroflumetiazida (rojo); dihidroclorotiazida, bumetanida y furosemida (rosado) y espirolactona (amarillo).

El ácido 4-sulfonamido benzoico y la acetazolamida sólo fueron observados por exposición de la placa a 254 nm.

En la tabla 2 se muestran los límites de detección obtenidos para cada uno de los testigos de diuréticos utilizados en solución metanólica y las cantidades mínimas encontradas en las muestras de orina enriquecidas después de la extracción en fase sólida.

Tabla 2. Límites de detección encontrados en las soluciones metanólicas de los testigos de diuréticos y en las muestras de orina enriquecidas.

Diurético	Límite de detección solución metanólica (microgramos)	Límite de detección en las muestras de orina enriquecidas (µg/ml)
Acetazolamida	0,25	5,0
Acido 4-Sulfonamido-benzoico	0,50	2,0
Amiloride	0,15	0,1
Bendroflumetiazida	0,15	0,1
Bumetanida	0,50	5,0
Dihidroclorotiazida	0,25	2,0
Espironolactona	0,25	2,0
Furosemida	0,10	0,1
Triamtireno	0,15	0,1

DISCUSIÓN

La cromatografía en capa delgada es una técnica de sencilla implementación que no requiere instrumentos de alta complejidad. Se desarrolla en poco tiempo, es económica y suficientemente flexible porque permite usar una gran variedad de fases estacionarias, fases móviles y reveladores^(8, 9).

El sistema cromatográfico descrito permitió separar y revelar los 9 diuréticos ensayados.

El uso de cromatoplasmas con indicador fluorescente permitió visualizar el ácido 4-sulfonamido benzoico y la acetazolamida que no se hicieron visibles con la aspersion de los diferentes líquidos reveladores.

La sensibilidad del sistema cromatográfico no fue idéntica para todos los compuestos. El límite de detección para la furosemida fue de 100 nanogramos mientras que el del bumetanida y el ácido 4-sulfonamido benzoico fue cinco veces más elevado (500 nanogramos).

En las muestras de orina enriquecidas, la amiloride, la bendroflumetiazida, la furosemida y el triamtireno pudieron ser observados a concentraciones de 0,1 µg/ml; el ácido 4-sulfonamido benzoico, la dihidroclorotiazida y la espironolactona a concentraciones de 2 µg/ml y la acetazolamida y bumetanida en concentraciones de 5 µg/ml. Este método puede ser aplicado para la investigación de acetazolamida, ácido 4-sulfonamido benzoico, amiloride, bendroflumetiazida, bumetanida, dihidroclorotiazida, espironolactona, furosemida y triamtireno en muestras de orina humana.

La elevada sensibilidad encontrada, la especificidad y su bajo costo indican que podría usarse sistemáticamente como "screening" en el control de sustancias prohibidas en los diferentes deportes.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al ingeniero Diego C. López por su colaboración en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwin K. Jackson (1996). "Drugs Affecting Renal and Cardiovascular Function. Diuretics". Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th Ed. CD Rom
2. Ralph A. Kelly, Thomas W. Smith (1996). "Metabolic Consequences of Diuretics Therapy. Drugs Affecting Renal and Cardiovascular Function. Diuretics". En: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th Ed. CD Rom
3. Harry G. Preuss and James F. Burris (1996). "Adverse Metabolic Effects of Antihypertensive Drugs. Implications for Treatment". Drug Safety 14 (6): 355-364.
4. Arno W. Hoes, Diederick E. Grobbee and Jacobus Lubsen (1997). "Sudden Cardiac Death in Patients with Hypertension. An association with Diuretics and Beta-Blockers?" Drug Safety 16 (4): 233-241.
5. Alain Baglin, Jean Christophe Boulard, Thomas Hanslik and Jacques Prinseau (1995). "Metabolic Adverse Reactions to Diuretics. Clinical Relevance to Elderly Patients" Drug Safety 12 (3): 161-167.
6. J. Perrone (1998). "Dieting agents, regimens and food supplements" En: Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 6ta. edición, Appleton & Lange, Stanford, Connecticut, pág. 648.
7. Clarke's Isolation and Identification of Drugs (1986). Ed. A.C. Moffat, London, The Pharmaceutical Press. pág. 32.
8. Tibor Cserháti and Esther Forgács (1996). "Thin layer chromatography". En: Chromatography Fundamentals, Applications and Troubleshooting. Preston Publications, Illinois, USA.
9. Basic Analytical Toxicology (1995). International Programme on Chemical Safety, WHO. pp 26-31.