

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



**Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Magíster en Salud Ambiental**

**TÍTULO: “Evaluación del impacto de la exposición a  
mezclas de agroquímicos presentes en escorrentías de  
cultivos extensivos utilizando como biomarcadores el  
daño oxidativo y genotóxico en *Cnesterodon  
decemmaculatus*”**

**Maestrando: Néstor Abel Pautasso**

**Director de Tesis: Dra. María Fernanda Simoniello**

**Co-director de Tesis: Dra. María Carolina Sasal**

**Lugar de realización: Campo Experimental/Laboratorios del INTA Paraná  
Laboratorios Cátedra Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal  
F.B.C.B.**

**Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas – UNL**

**Año 2017**

## **Índice**

	<b>Página</b>
<b>Abreviaturas y Símbolos</b>	<b>7</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivos del trabajo</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo General	18
2.2. Objetivos específicos	18
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>19</b>
3.1. Especie indicadora utilizada	19
3.2. Sitio de estudio, rotación de cultivos y plaguicidas aplicados	22
3.3. Limnocorrales y su ubicación en el tajamar	24
3.4. Diseño Experimental	26
3.4.1. Valores Basales	26
3.4.2. Aplicaciones de Plaguicidas, Escorrentía y Muestreo de agua	28
3.4.4. Bioensayo	30
3.5. Análisis químico de plaguicidas en agua	31
3.6. Biomarcadores	32
3.6.1. Obtención de células de tejido branquial	32
3.6.2. Evaluación de daño oxidativo y genotóxico	33
3.7. Análisis Estadístico	35
<b>4. Resultados</b>	<b>36</b>
4.1. Resultados de los análisis de agua	37
4.2. Control de talla y peso para los distintos grupos evaluados	38
4.3. Determinación de basales y controles para cada biomarcador	39

---

4.4. Daño oxidativo	41
4.5. Evaluación del daño genotóxico utilizando Ensayo cometa	42
4.6. Integración y relación de los resultados	43
<b>5. Discusión de Resultados y Conclusiones</b>	<b>46</b>
5.1. Medidas de prevención y mitigación propuestas	52
<b>6. Resumen</b>	<b>55</b>
<b>Palabras Claves</b>	<b>55</b>
<b>6.1 Abstract</b>	<b>56</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>57</b>
<b>8. Agradecimientos</b>	<b>65</b>
<b>9. Presentaciones en Reuniones Científicas</b>	<b>66</b>
<b>10. Información del Director y Co-director</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>68</b>

**Índice de Figuras**

	Página
Figura 1. Evolución de importación de plaguicidas y superficie agrícola	10
Figura 2. Formación de radicales libres, mecanismos antioxidantes y biomarcadores	14
Figura 3. Ejemplares de peces en su medio natural	17
Figura 4. Peces adultos de <i>C. decemmaculatus</i>	19
Figura 5. Reserva Natural, lugar extracción de los peces	21
Figura 6. Sistema de recría de <i>C. decemmaculatus</i>	22
Figura 7. Ubicación de la zona del bioensayo	23
Figura 8. Escurrimiento superficial ante un evento de lluvia	23
Figura 9. Ubicación de los limnocorrales	25
Figura 10. Cronología del diseño experimental	26
Figura 11. Tarea de aplicación de plaguicidas sobre el lote	28
Figura 12. Instalaciones de piletas de esorrentías	29
Figura 13. Extracción de muestras de agua	30
Figura 14. Preparación de muestras para el análisis	33
Figura 15. Evaluación temporal en condiciones de campo	36
Figura 16. Gráfica valores individuales de plaguicidas	38

---

Figura 17. Distribución del largo total de los peces por tratamiento	38
Figura 18. Distribución del peso de los peces por tratamiento	39
Figura 19. Determinación de Actividad enzimática de Catalasa	39
Figura 20. Determinación de la Peroxidación Lipídica	40
Figura 21. Determinación de daño en el ADN con Ensayo Cometa	40
Figura 22. Gráfica actividad enzimática comparando cada exposición	41
Figura 23. Gráfica comparación lipoperoxidación en cada exposición	42
Figura 24. Campo visión de área con microscopía de fluorescencia	42
Figura 25. Gráfica comparando nivel de daño en cada exposición	43
Figura 26. Medias marginales estimadas en valores de Catalasa	44
Figura 27. Medias marginales estimadas para valores de TBARS	44
Figura 28. Medias marginales estimadas en Ensayo cometa	45

***Índice de Tablas***

	Página
Tabla 1: Plaguicidas aplicados en la campaña agrícola	24
Tabla 2. Diseño temporal en condiciones de campo	26
Tabla 3. Parámetros ambientales y análisis químicos	37

**Abreviaturas y símbolos**

AMPA Ácido aminometilfosfónico

ADN ácido desoxirribonucleico

C18 Columna HPLC fase inversa

°C Grados centígrados

Ca Calcio

CAS Identificación Numérica Única para compuestos químicos

CAT Catalasa

EC Ensayo cometa

EROs Especies Reactivas de Oxígeno

EFS-SPE Extracción en Fase Sólida

eV Electronvoltio

Ha Hectárea

UHPLC-MS/MS Método analítico de cromatografía en línea de extracción en fase sólida-líquida acoplado a espectrometría de masas

hs Horas

g Gramos

GCB Carbón negro grafitado

ID Índice de daño

i.e. Índice de escurrimiento

INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IUCN Unión Internacional para la conservación de la naturaleza

Kg Kilogramo

Km Kilómetros

LC Límite de cuantificación

LD Límite de detección

Lt Litro

MDA Malondialdehído

Mg Magnesio

mg Miligramos

n Tamaño de muestra

Nm Nanómetro

OMS Organización Mundial de la Salud

pH Concentración de iones de hidrógeno

PBS Buffer fosfato salino

POL Peroxidación de lípidos

PSA Amina primaria/secundaria

QL Límite de Cuantificación

REDOX Reducción-Oxidación, Óxido-Reducción

RL Radicales Libres

SE Error estándar

SENASA Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SD Siembra directa

SIIA Sistema de Información Integral Actualizado

TBARS Sustancias reactivas al Acido Tiobarbitúrico

UE Unión Europea

µg/l Microgramo por litros

µl Microlitro

UV Ultravioleta

## **1. Introducción**

En los últimos años la mayoría de los ecosistemas han sido dominados y modificados por el hombre, ninguno de ellos está libre de su influencia, siendo el uso de tierras para la producción y los servicios la principal alteración sobre su estructura y funcionamiento (Zhang y col., 2007). La agricultura moderna se caracteriza por una producción intensiva de cultivos muy dependiente de plaguicidas, fertilizantes, cultivos genéticamente modificados y nuevas tecnologías de aplicación (Tilman y col., 2002).

Argentina posee factores determinantes para el desarrollo agropecuario, como la calidad de recursos naturales, la baja densidad poblacional, el clima y la tradición en producción agropecuaria extensiva; marcado en los últimos años por un intenso proceso de agriculturización (Peiretti y Dumanski, 2014).

El esquema productivo pasó de la agricultura convencional a una simplificada, caracterizada por la siembra directa (SD) con alta dependencia al uso de agroquímicos y un avance de la frontera agrícola sobre ambientes vulnerables. Si bien esta forma de producción crearon las condiciones de base favorables para que la agricultura argentina diera un salto en magnitud sin precedentes, se produjeron significativos cambios de actores sociales, productivos y ambientales (Huerga y San Juan, 2004). Esto condujo a una creciente preocupación de la sociedad por la conservación de los recursos naturales y la agricultura ha sido señalada como una de las actividades responsables de su degradación (Sasal y col., 2010). Esto puede justificarse si se considera que en los últimos 20 años, en la Argentina el área para la producción de cultivos extensivos pasó de 21,9 a 37,8 millones de hectáreas (SIIA, 2016) y el volumen de importación de pesticidas pasó de 215 a 356 millones de Kg/Lt (SENASA, 2017) (Figura 1).

### Evolución de importación de plaguicidas y superficie agrícola

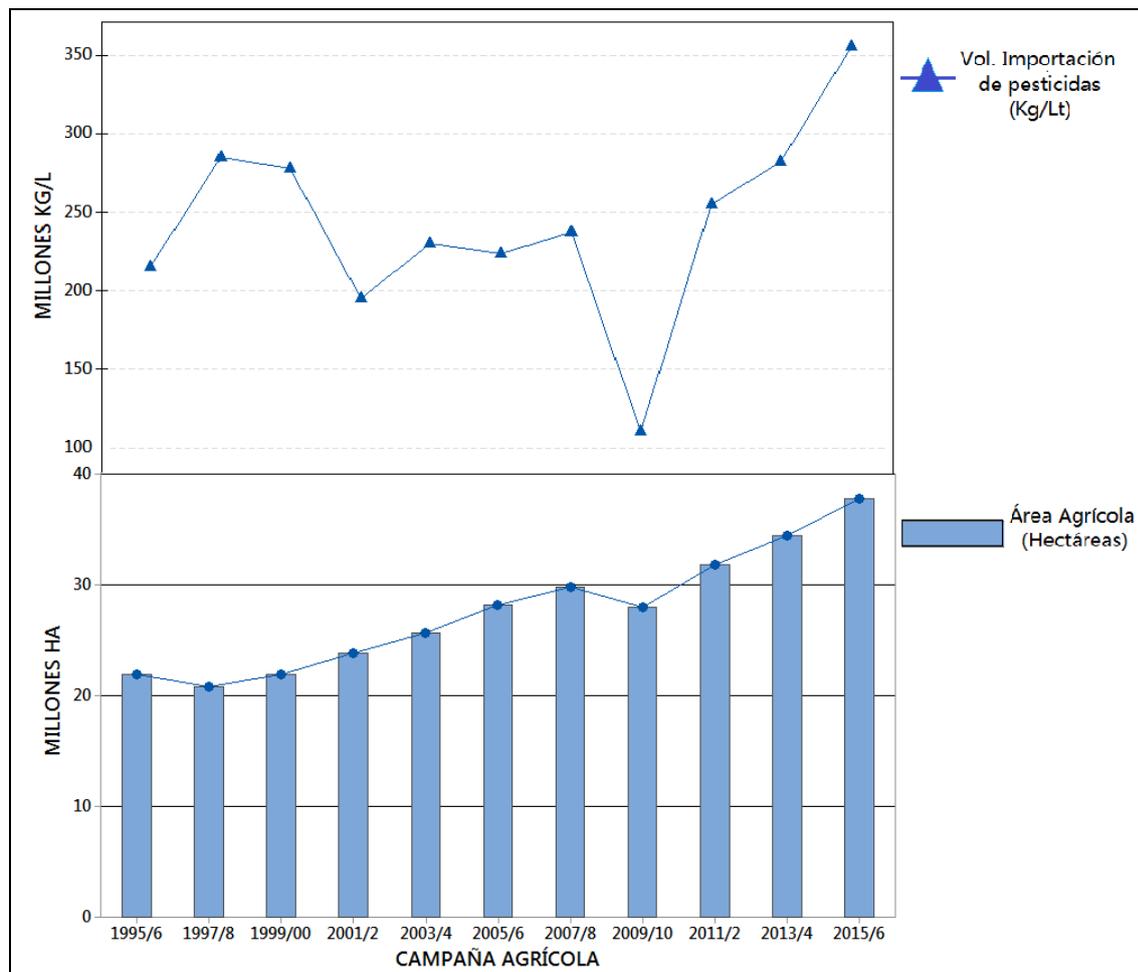


Figura 1. Volumen de Importación de Pesticidas y Reporte del área Agrícola por campaña, elaborada con datos oficiales de SIIA y SENASA

La aplicación de tecnologías de producción, como la SD, variedades de semillas con resistencia genética y la rotación de cultivos han incorporado importantes ventajas en el resultado económico y en la conservación del suelo. Pero en cuanto al panorama fitosanitario se ha visto incrementada la incidencia de enfermedades causadas por plagas, fundamentalmente hongos e insectos y por la aparición de malezas resistentes. Esta situación condujo a un importante aumento en el uso de mezclas de plaguicidas (Senigagliesi, 2012).

En consecuencia esto justifica el continuo proceso de evaluación de riesgo cuando nuevos plaguicidas o nuevas combinaciones son utilizadas en el medio ambiente (Solomon, 2010).

Las condiciones climáticas constituyen el principal factor para la realización de labores agrícolas (siembra, aplicación de agroquímicos) así como la ocurrencia de procesos biológicos (aparición de plagas, enfermedades, período de floración) lo que condiciona el escurrimiento y el transporte de agroquímicos hacia aguas superficiales (Gil y col., 2010). En este contexto el aumento de eventos de lluvias intensas generado por el cambio o la variabilidad climática, agudizaría los problemas de contaminación (Zak y col., 2008).

La evaluación de los potenciales impactos negativos debido a la implementación de prácticas agrícolas sobre el ambiente es compleja ya que deben contemplarse aspectos climáticos, edáficos, geomorfológicos, fisiográficos, hidrográficos y agroeconómicos (Sasal y col., 2011a).

Por ello, es necesario caracterizar y comprender los procesos que definen el destino final, identificar los compartimentos ambientales potencialmente afectados, los vehículos de su transporte y estudiar la toxicidad no prevista de los plaguicidas para finalmente evaluar el riesgo en la salud y el ambiente asociado a su uso. En general, se puede englobar al comportamiento ambiental de estas sustancias dentro de lo que se conoce como “contaminación difusa”, caracterizadas por no originarse en un punto definido, sino más bien en múltiples puntos, poco identificables. En este contexto, las evaluaciones de los impactos ambientales sobre los recursos naturales como el suelo y el agua provenientes de fuentes de contaminación difusa a escala regional son necesarias para lograr el desarrollo sostenible. La contaminación difusa por agroquímicos en las zonas rurales y el entorno urbano requiere un análisis exhaustivo de causa y efecto, suministrando información para la toma de decisiones que contribuya a la reducción y mitigación de contaminantes del ambiente (Novotny, 1999).

En la llanura pampeana de la provincia de Entre Ríos se hallan suelos agrícolas que se caracterizan por presentar pendientes entre 1,5 al 3% y hasta 8% con fases de erosión; con índice de escurrimientos (i.e.) moderados y una baja permeabilidad (Panigatti, 2010). Esta peculiaridad los vincula con dos

problemas que ponen en riesgo la calidad del agua superficial y hasta subterránea por efecto de la producción agrícola. Por un lado, el aporte difuso de las fugas de agroquímicos desde agro-sistemas por escurrimiento. Por otro, el aporte puntual debido a malas prácticas como la carga y el lavado de equipos aplicadores en cursos de agua superficiales (Sasal y col., 2011b).

Se reconoce actualmente que distintas sustancias tienen efectos sobre el ambiente acuático y los seres vivos a distintos niveles tanto químicos, como físicos y biológicos; que estos efectos pueden ser directos o indirectos y que, muchas veces, son el resultado de exposición crónica a cantidades muy pequeñas, razón por la cual no siempre pueden detectarse de inmediato o por los métodos habituales (Carballo y col., 2006).

Para tener una dimensión del impacto de los plaguicidas en el ambiente y su potencial efecto adverso sobre la salud humana, es necesario, poner especial énfasis en aquellos organismos vivos “no blanco” como indicadores de la exposición. Estos organismos permiten estimar el riesgo para los ecosistemas y la salud humana. En ese sentido, los invertebrados acuáticos, peces, anfibios y aves nativas son excelentes indicadores de la salud ambiental y la potencial toxicidad para los humanos (Sanchez-Bain y col., 2004). En las últimas décadas, se han desarrollado múltiples métodos de biomonitoreos, bioensayos y biomarcadores como herramientas rutinaria de diagnóstico, monitoreo e incluso de gestión para las entidades ambientales (De la Torre, 2001).

Los peces son vertebrados acuáticos adecuados para emplearse como organismos bioindicadores de compuestos potencialmente peligrosos que pueden provenir de variadas fuentes y que pueden contribuir a la contaminación acuática (Pellacani y col, 2006).

Una herramienta válida para evaluar los efectos de los agroquímicos fuera del objetivo blanco de tratamiento, es la medición de las respuestas biológicas en organismos centinelas, conocidas como biomarcadores (Bianco y col, 2013). Los principales biomarcadores identificados y reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) pueden ser clasificados en:

Biomarcadores de exposición: señala la presencia de una sustancia exógena, su metabolito o el producto de una interacción entre el agente y alguna molécula o célula diana.

Biomarcadores de efecto: indicador de una alteración bioquímica, fisiológica, genética o conductual medible en el organismo, resultado de la exposición a un xenobiótico.

Biomarcadores de susceptibilidad: indicador de limitación adquirida o inherente de un organismo para responder a la exposición de un xenobiótico (Depledge y col, 1994).

Para su elección deben considerarse la especificidad, sensibilidad, relevancia, factibilidad, y variación interespecífica y estacional (Mudry y Greizerstein, 2006).

Dentro de los biomarcadores de efecto se incluyen los biomarcadores de estrés oxidativo, caracterizado por el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) y los mecanismos antioxidantes. Entre los múltiples puntos finales vinculados a este mecanismo de toxicidad, la peroxidación lipídica (POL) y las enzimas que componen las defensas antioxidantes son ampliamente utilizadas (Zwart y col., 1999; Figura 2).

Los pesticidas pueden ocasionar desbalances en diferentes vías bioquímicas, en el estado normal redox (Reducción-Oxidación, Óxido-Reducción) y causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes celulares, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (ácido desoxirribonucleico). El equilibrio de reducción-oxidación intracelular supone la presencia de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de destruir o neutralizar las EROs. El daño oxidativo se cree que es un mecanismo importante del efecto nocivo de los plaguicidas (Banerjee y col., 1999; Halliwell, 2002).

Los plaguicidas en general pueden generar EROs y alterar los sistemas antioxidantes (Bagchi y col., 1995; Delescluse y Fossi., 1994).

### Formación de radicales libres, mecanismos antioxidantes y biomarcadores

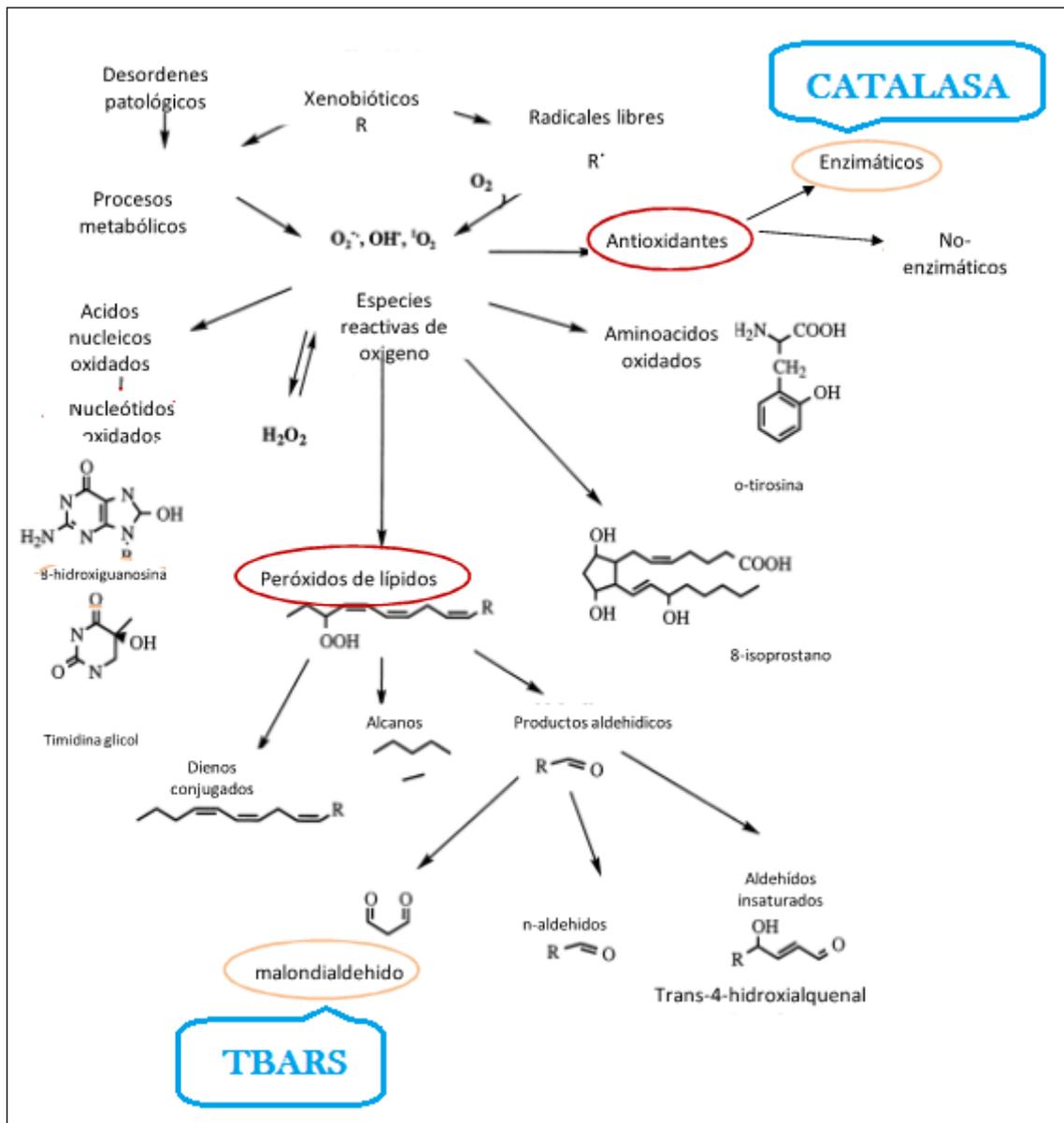


Figura 2. Alteraciones por radicales libres y biomarcadores para su evaluación. Zwart y col, 1999 con modif. (TBARS: Sustancias reactivas al Acido Tiobarbitúrico).

La POL es probablemente el proceso inducido por radicales libres más investigado. La sensibilidad de la medición de las sustancias reactivas con el Acido Tiobarbitúrico (TBARS) lo ha hecho el ensayo de elección para el monitoreo y cribado de la POL, y además un indicador importante de daño oxidativo (Zwart y col., 1999).

Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas, utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres (RL). La Catalasa (CAT) forma parte de las defensas antioxidantes enzimáticas (Halliwell y Gutteridge, 2006; Halliwell, 2002).

Por otra parte, es posible observar el daño en el material genético, existen biomarcadores de efecto que permiten cuantificar los mecanismos de genotoxicidad (Kassie y col., 2000). El análisis de alteraciones del ADN en vertebrados acuáticos ha demostrado ser un método muy adecuado para la evaluación de la contaminación de ambientes con compuestos potencialmente genotóxico. Siendo posible detectar cambios causados por exposición a bajas concentraciones de contaminantes en una amplia gama de especies (Viarengo y col., 2007). En general, estos métodos tienen la ventaja de detectar y cuantificar el impacto genotóxico sin necesidad de un conocimiento detallado de la identidad y las propiedades físico/químicas de los contaminantes presentes. Las pruebas que evalúan directamente roturas de la cadena de ADN, u otros daños en el ADN, se utilizan comúnmente para evaluar el efecto genotóxico en los ambientes acuáticos contaminados (Frenzilli y col., 2009). El ensayo cometa (EC) permite la detección de roturas de ADN de cadena doble, simple y reparación por escisión incompleta (Singh y col., 1988).

En particular, el EC ha aumentado su relevancia para el monitoreo ambiental del medio acuático siendo cada vez más utilizado en los últimos años (Jha, 2008; Mustafa y col., 2015). Este ensayo ha encontrado una amplia aplicación como un método simple y sensible para la evaluación de los daños del ADN *in vivo* en diferentes tejidos de los peces (branquias, hígado, sangre) después de la exposición a diversos xenobióticos en el medio acuático. Numerosos estudios (Lee y Steinert, 2003; Jha, 2008; Russo y col., 2004; Frenzilli y Nigro, 2009) han concluido que el EC es una herramienta muy útil en la evaluación de potenciales agentes genotóxicos, fundamentalmente cuando se utilizan células que provienen del sitio de acción, que es donde estas sustancias generan su impacto en los distintos organismos (Hartmann y col., 2004).

Al comparar los resultados obtenidos en células de diferentes tejidos, se demostró que las células branquiales presentan mayor sensibilidad que las células sanguíneas circulantes. Esto puede ser debido al hecho que las branquias están en contacto directo con un entorno potencialmente estresante (Simoniello y col., 2009a; Poletta y col., 2013b). Además, se ha demostrado que determinados plaguicidas, pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud de los organismos expuestos. Estos cambios pueden ser detectados utilizando el EC.

En trabajos previos en branquias del pez *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) ensayando la respuesta genotóxica en expuestos a Cipermetrina mediante el Ensayo del Cometa Alcalino se observaron modificaciones en 72 hs (Simoniello y col., 2009b; Poletta y col., 2013b).

Existen numerosos informes de bioensayos con marcadores de genotoxicidad y daño oxidativo realizados en laboratorio que evalúan la toxicidad de una sola clase de plaguicidas o de combinaciones puntuales, pero son escasos los estudios llevados a cabo en aguas superficiales naturales que reciben esorrentías de las prácticas agrícolas más comunes y cuantifican los efectos genotóxico en la biota autóctona (Carriquiriborde y col., 2007).

Toda la complejidad a la que están sometidos los organismos de un ecosistema no puede ser llevada a un laboratorio; y las reacciones generales de estos ante diversas intervenciones del hombre, la producción y el ambiente están poco estudiadas. Por ello, se propone en este estudio, utilizar un organismo nativo del ecosistema pampeano, para evaluar el efecto de la exposición a distintas mezclas de las esorrentías de una parcela agrícola en un ambiente natural, como parte de un sistema influenciado por las condiciones ambientales, físicas, químicas y climáticas.

El modelo experimental seleccionado, *Cnesterodon decemmaculatus* es un pez nativo de amplia distribución que habita estanques de poca profundidad dentro de las zonas agrícolas más productivas de América del Sur (Figura 3). Este pez es un pequeño ovovivíparo, micro omnívoro, con hábitos

pelágico-bentónico, no migratorio. La especie presenta un marcado dimorfismo sexual, la aleta anal modificada en los machos permite su identificación sexual.

El rango de tolerancia de *C. decemmaculatus* a ambientes degradados es comparativamente mayor con respecto a otras especies, por pertenecer Orden de los *Cyprinodontiformes* posee características que los hace capaces de respirar el oxígeno de las capas superiores del agua donde la concentración del mismo es mayor (Roberts, 1972; Tagliani y col., 1992). Resultando un modelo experimental abundante y de presencia anual para el biomonitoreo de ecosistemas acuáticos (Vera Candiotti y col., 2013; De la Torre y col., 2005; Bistoni y col., 1999).

Sin embargo, es esencial determinar los valores de referencia o también denominados basales cuando se emplean biomarcadores para evaluar daño en alguna estirpe celular, de un organismo en particular, que no haya sido previamente utilizada.

#### Ejemplares de peces en su medio natural

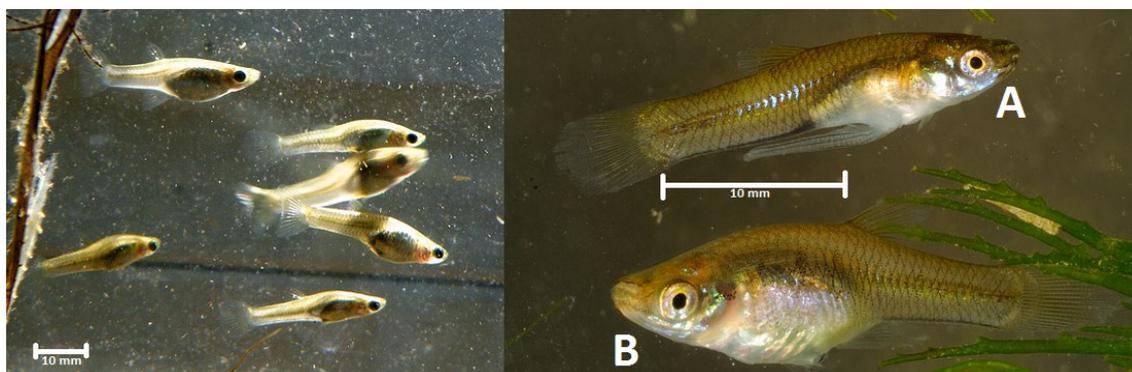


Figura 3. Izquierda: Grupo de ejemplares adultos. Derecha: (A) macho y (B) hembra de *C. decemmaculatus*. Fotos: Enciclopedia y Naturaleza.

Al establecer los valores basales de la especie utilizando biomarcadores de efecto en células branquiales permitirá además definir si la especie seleccionada es útil como un organismo centinela para el diseño experimental seleccionado (Poletta y col., 2008).

Por los antecedentes expuestos, la incorporación de biomarcadores de efecto en una especie nativa, en situaciones reales del sistema agro-productivo, permitirá profundizar nuestros conocimientos y relacionar la

presencia de residuos de plaguicidas en muestras de agua superficial con gradientes de contaminación y niveles de daño genotóxico y oxidativo.

## **2. Objetivos del trabajo**

### **2.1. Objetivo general:**

Evaluar el impacto de las mezclas generados por el escurrimiento de una parcela bajo producción agrícola con un sistema de rotación de cultivos y tratamiento con plaguicidas, sobre la salud de los ecosistemas dulceacuícolas usando *C. decemmaculatus* como organismo centinela del medio acuático.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- ✚ Monitorear parámetros ambientales (precipitaciones, índice de escurrimiento (i.e.), pH y temperatura del agua) y cuantificar analitos de plaguicidas en agua superficial de un embalse receptor del escurrimiento de una microcuenca agrícola.
- ✚ Determinar los valores basales de la especie *C. decemmaculatus* sobre el ADN y los componentes lipídicos en células y membranas branquiales, a través de los biomarcadores: Catalasa, TBARS y Ensayo Cometa.
- ✚ Evaluar el daño oxidativo y genotóxico en células branquiales de *C. decemmaculatus* midiendo la actividad de la enzima Catalasa (CAT), la peroxidación lipídica (POL) y el índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa (EC) en los ejemplares expuestos a la escorrentía proveniente de la microcuenca de estudio.
- ✚ Definir qué evento de aplicación seguido de escorrentía impactó con mayor intensidad al pez *C. decemmaculatus*, asociado a un efecto de gradiente sobre el sistema.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Especie indicadora utilizada**

*Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), conocida con el nombre vulgar de madrecita de agua es una especie nativa, muy común en aguas estancadas como charcas y zanjas. Aunque también habita en arroyos, lagos, lagunas, ríos, cañadas y embalses, con abundante vegetación.

La especie no se encuentra en condición amenazada: por no estar integrando la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016).

##### **3.1.1- Clasificación taxonómica y características generales**

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Osteichthyes

Orden: Cyprinodontiformes

Familia: Poeciliidae

Género: *Cnesterodon*

Especie: *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)

Nombre Vulgar: Madrecita de agua (Figura 4)

##### **Peces adultos de *C. decemmaculatus***

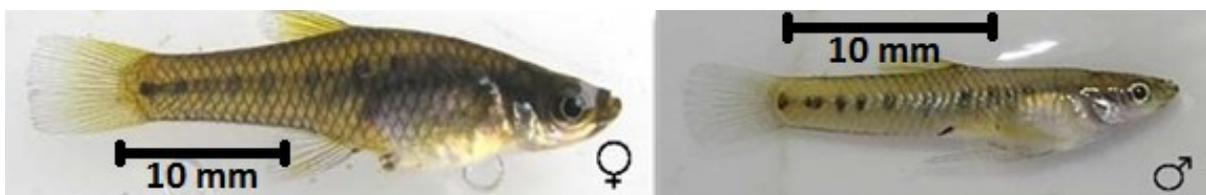


Figura 4. Ejemplares de hembra y macho de *C. decemmaculatus*.

*C. decemmaculatus* se encuentra en Argentina y Uruguay, en climas subtropicales con un rango de preferencia térmica de 17 a 21°C. Es una especie bentopelágica, de agua dulce a salobre (rango de pH: 7,5-8,2; dureza:

0,5-3,9 mmol CaCO<sub>3</sub>L<sup>-1</sup>), tolerante a variaciones de salinidad y temperatura (Gomez, 1996; Gomez y col., 1998).

Este pez es un pequeño ovovivíparo, micro omnívoro, con hábitos pelágico-bentónico, no migratorio. La especie presenta un marcado dimorfismo sexual, presencia de gonopodio (aleta anal modificada) en los machos que permite su identificación.

Su alimentación omnívora está compuesta principalmente de pequeños crustáceos (zooplancton), invertebrados acuáticos (larvas de insectos) y algas (Ringuelet y col., 1975; Escalante, 1983).

Posee gran éxito en su estrategia reproductiva, son de rápido crecimiento y corta vida generacional, en promedio no viven más de 1 año y medio (Molero y Pisanó, 1987).

### **3.1.2- Origen, captura y traslado de los animales utilizados**

Los ejemplares fueron extraídos del Arroyo las conchas sobre la traza del Parque General San Martín ubicado en la Ruta Nacional N° 12 kilómetro 23,5 Departamento Paraná, Provincia de Entre Ríos. Zona declarada Reserva Natural de Uso Múltiple en el año 1995 bajo la Ley N° 8.967 con una superficie de 594 ha., funciona como Sistema Provincial de Áreas Naturales Protegidas.

El lugar de extracción constituye un relicto distanciado en 3.500 metros (m) aproximadamente a lotes de cultivos extensivos más cercanos, siendo una zona alejada de prácticas agrícolas y de fuentes de contaminación directa que presenta una zona de monte sobre ambas márgenes (Figura 5).

Las capturas se realizaron con una red tipo bolsa (salabardo) de 0,5 m de diámetro con mango y malla en forma de rombo de 1mm de tramado. Se extrajeron unos cien ejemplares aproximadamente entre machos, hembras, adultos y juveniles. Fueron trasladados en recipientes con agua del mismo arroyo y aireados hasta el lugar de recría. Del grupo se seleccionaron 24 adultos (12 machos y 12 hembras no preñadas) para su traslado al laboratorio, que en un transcurso menor a dos horas fueron sacrificados para la determinación de los valores basales de la especie.

### Reserva Natural, lugar extracción de los peces

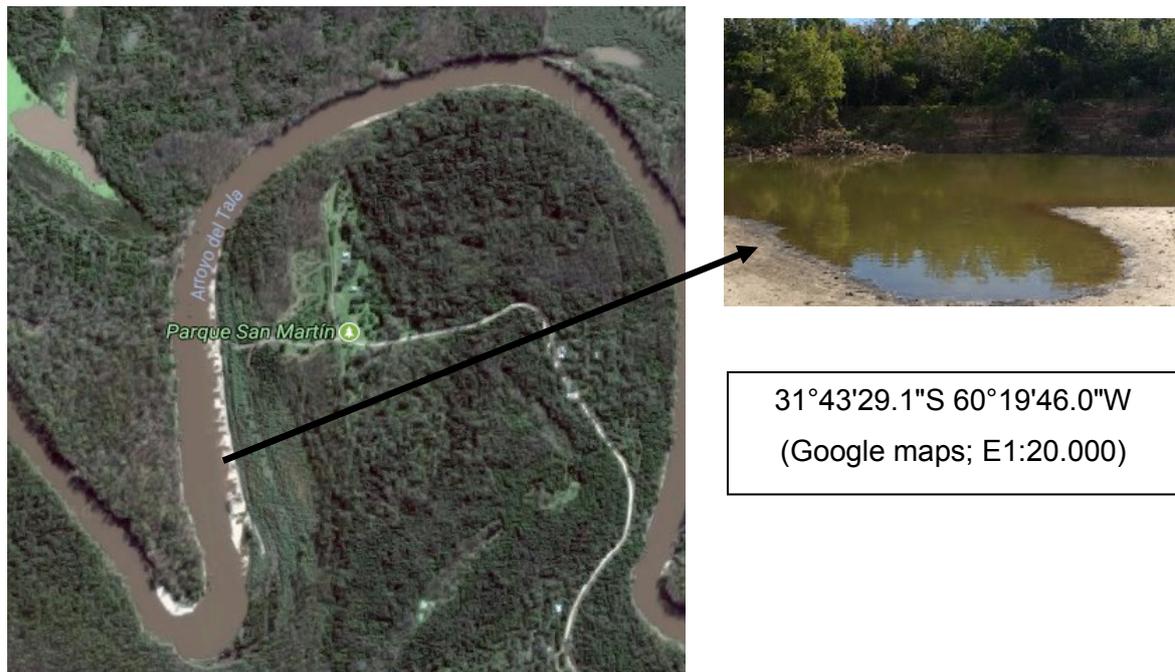


Figura 5. Sitio extracción de los ejemplares para valores basales. Fuente modificado de Google maps y foto propia

La recría se inició con los animales silvestres en un estanque de 2,5 m x 1,80 m x 0,30 m con un volumen aproximado de 1.300 litros de agua no clorada, fabricado en lona con una oxigenación leve; se incorporaron plantas acuáticas del mismo ambiente asimilando una situación natural (Figura 6).

La alimentación se efectuó con una misma formulación comercial de marca reconocida en forma de escamas.

Para la reproducción y cría se tomaron las recomendaciones sobre cultivos en estanques de cría del Manual de producción de *C. decemmaculatus* de Somma y col. (2011) y en acuerdo con Directivas Internacionales de la Unión Europea (UE) 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Se estandarizaron las condiciones para la producción de animales aptos para experimentación, evitando la variabilidad de respuestas.

Se usaron ejemplares de cría adultos machos y hembras no preñadas para el diseño experimental, con un largo total promedio 28 mm ( $\pm 4$  mm).

**Sistema de recría de *C. decemmaculatus***

Figura 6. Sistema de cultivo al aire libre de *C. decemmaculatus* (Foto propia).

**3.2. Sitio de Estudio, rotación de cultivos y plaguicidas aplicados**

La zona de estudio abarcó un lote de 16 hectáreas en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que se encuentra a 12,5 km al suroeste de la Ciudad de Paraná, Entre Ríos (31.8494265°S; 60.5352456°W). (Figura 7).

El suelo es *Argiudol ácuico*, en el lote agrícola se practica una secuencia de cultivos maíz-trigo/soja. Tiene más de 20 años de siembra directa, técnica que permite sólo la apertura de un surco estrecho del suelo para depositar las semillas del cultivo, la nutrición se realiza con fertilizantes fosforados y nitrogenados según requerimientos de los cultivos y las plagas (malezas, insectos y enfermedades) se controlan en forma química a través de aplicaciones de plaguicidas.

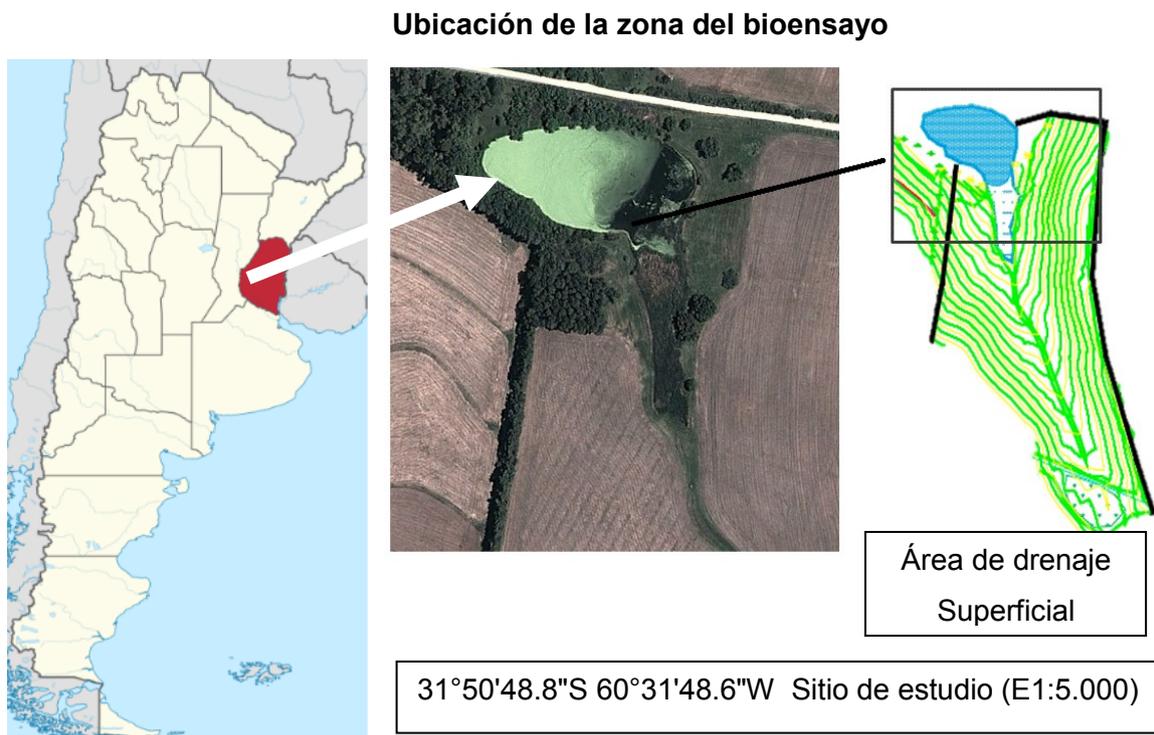


Figura 7. Sitio de estudio y drenaje superficial por escurrimiento. Fuente modificado de Google maps y esquema de elaboración propia

El terreno presenta permeabilidad lenta y ondulaciones con dos pendientes del orden del 4 y 8% (Figura 8) que desaguan hacia un canal central que desemboca primero en un humedal y luego en un sistema superficial natural de agua o tajarar de aproximadamente 1 ha.

#### Escurrimiento superficial ante un evento de lluvia



Figura 8. Dirección del flujo de escurrimiento del lote al sistema, foto propia

Los plaguicidas aplicados en la campaña agrícola durante cada ciclo productivo se informan en la Tabla 1, detallando: mezclas por cultivo, nombre comercial, composición, N° CAS, dosis por hectárea, grupo químico, clasificación según la Organización Mundial de la salud y toxicidad en peces.

**Tabla 1: Plaguicidas aplicados en la campaña agrícola**

Plaguicidas usados en MAÍZ	M. Comercial	Composición	N° CAS	Dosis/Ha	Grupo Químico	Clasificación OMS (x)	Toxicidad en Peces (xx)
Curasemilla Insecticida	Poncho 600 FS	Clotianidina 60%	210880-95-5	50cc	Neonicotinoides	Clase II	Aguda CL <sub>50</sub> : >213mg/l
		Co-formulantes	N/A				
Curasemilla Insecticida	Cruiser 35 FS	Tiametozam 35%	153719-23-4	200cc	Neonicotinoides	Clase III	Sin Información sobre peces
		Inertes/Humectantes	N/A				
Herbicida	Gesaprim 90 WDG	Atrazina 90%	1912-24-9	1,6kg	Triazinas	Clase III	Aguda CL <sub>50</sub> : >4,4mg/l
		Inertes	N/A				
Herbicida	Sulfosato Touchdown	Glifosato 62%	39600-42-5	1,5lt	Fosfito	Clase IV	Sin Información sobre peces
		Coadyuvantes	N/A				
Herbicida	S-Metalacloro Zamba	S-Metalacloro	87392-12-9	1,2lt	Acetanilidas	Clase III	Sin Información sobre peces
		Inertes/Humectantes	N/A				
Herbicida	Dicamba Nufarm	Dicamba	2300-66-5 2	250cc	Ácido Benzoico	Clase III	Aguda CL <sub>50</sub> : >1.000mg/l
		Solventes	N/A				
Plaguicidas usados en Trigo	M. Comercial	Composición	N° CAS	Dosis/Ha	Grupo Químico	Clasificación OMS (x)	Toxicidad en Peces (xx)
Herbicida	Roundup Full II	Acido Glifosato 54%	70901-12-1	2lt	Fosfito	Clase IV	Aguda CL <sub>50</sub> : >48mg/l
		Coadyuvantes	N/A				
Herbicida	Dicamba Nufarm	Dicamba	2300-66-5 2	200cc	Ácido Benzoico	Clase III	Aguda CL <sub>50</sub> : >1.000mg/l
		Solventes	N/A				
Herbicida	Metsulfuron Metil 60 WG	Metsulfuron Metil 60%	74223-64-6	8g	Sulfonilureas	Clase III	Aguda CL <sub>50</sub> : >150mg/l
		Inertes	N/A				
Herbicida	Select	Cletodim	99129-21-2	500cc	Mezcla Concentrado Emulsionable	Clase III	Aguda CL <sub>50</sub> : >13mg/l
		Ácido bencenosulfónico	68953-96-8				
		Nafta Disolvente	64742-94-5				
Coadyuvante	Aceite Emulsionable	Aceite Lubricante	8042-47-5	600cc	Hidrocarburo Alifático	N/C	Aguda CL <sub>50</sub> : >100mg/l
Plaguicidas Usados en Soja	M. Comercial	Composición	N° CAS	Dosis/Ha	Grupo Químico	Clasificación OMS (x)	Toxicidad en Peces (xx)
Curasemilla Fungicida	Efecthor Plus	Carbendazim	10605-21-7	250cc	Mezcla concentrada	Clase IV	Muy Tóxico para peces CL <sub>50</sub> : >0,36mg/l
		Thiram	137-26-8				
		Inoculante	N/A				
Herbicida	Sulfosato Touchdown	Glifosato 62%	39600-42-5	2lt	Fosfito	Clase IV	Sin Información sobre peces
		Coadyuvantes	N/A				
Insecticida	Voliam Targo	Clorantropilprole 4,5%	500008-45-7	100cc	Bisamidas	Clase II	Muy Tóxico para peces CL <sub>50</sub> : >0,285mg/l
		Abamectina 1,8%	65195-56-4		Avemectina		
Fungicida	Amistar Xtra	Azoxistrobina 20%	131860-33-8	250cc	Estrobilurinas	Clase II	Muy Tóxico para peces CL <sub>50</sub> : >0,47mg/l
		Cyproconazole 8%	94361-06-5		Triazoles		
Coadyuvante	A35T Bio	Éteres y polietilenglicoles	N/A	40cc	Alcoholes	Clase IV	Sin Información sobre peces
Insecticida	Engeo	Tiametoxam 14,1%	153719-23-4	200cc	Neonicotinoide	Clase II	Muy Tóxico para peces CL <sub>50</sub> : >0,027mg/l
		Lambdacialotrina 10,6%	91465-08-6		Piretroide		

**N° CAS:** Identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones. Chemical Abstracts Service.

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal Media.

**Dosis/Ha:** volumen de producto por hectárea.

**(x)** Clasificación según la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int>).

**(xx)** Clasificación según SGA, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (<http://www.unece.org>).

**N/A** No Asignado

### 3.3- Limnocorrales y su ubicación en el tajamar

Los bioensayos se realizaron utilizando limnocorrales (*jaulas in situ*) distribuidos en el tajamar a distancias crecientes desde la desembocadura del canal, zona de mayor escorrentía hacia el cuerpo de agua, (Figura 9).

Las jaulas fueron realizadas con tubos de PVC de 110 cm de diámetro y 1 m de largo con 9 perforaciones a lo largo de 10 cm x 10 cm envueltas con malla monofilamento nylon de 0,9 mm y el fondo reforzado con malla tipo mosquitera metálica inoxidable. Se ubicaron en forma vertical en contacto directo sobre el fondo y sobresaliendo sobre la superficie del agua.

Cada limnocorral contenía 10 ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* recolectados del estanque de cría, registrando longitud total (Anderson y Gutreuter, 1983), peso y sexo.

Ubicación de los limnocorrales



Figura 9. Distribución de los limnocorrales en el sistema superficial de agua, fuente modificada de Google maps

El transporte de los peces hasta el lugar del ensayo se realizó en recipientes de 20 litros aireados, verificando que los valores de la temperatura del agua sean similares con los del sitio de estudio y agregando gradualmente agua del medio en los contenedores.

### 3.4- Diseño Experimental

El diseño experimental abarcó una secuencia de tres cultivos en dos años, campaña agrícola con rotación de maíz – trigo / soja y control químico de plagas, aplicando mezclas de plaguicidas con características similares a la producción extensiva predominante en el área de estudio. El período de tiempo del ensayo abarcó desde octubre de 2013 hasta marzo de 2015 (Figura 10).

#### Cronología del diseño experimental

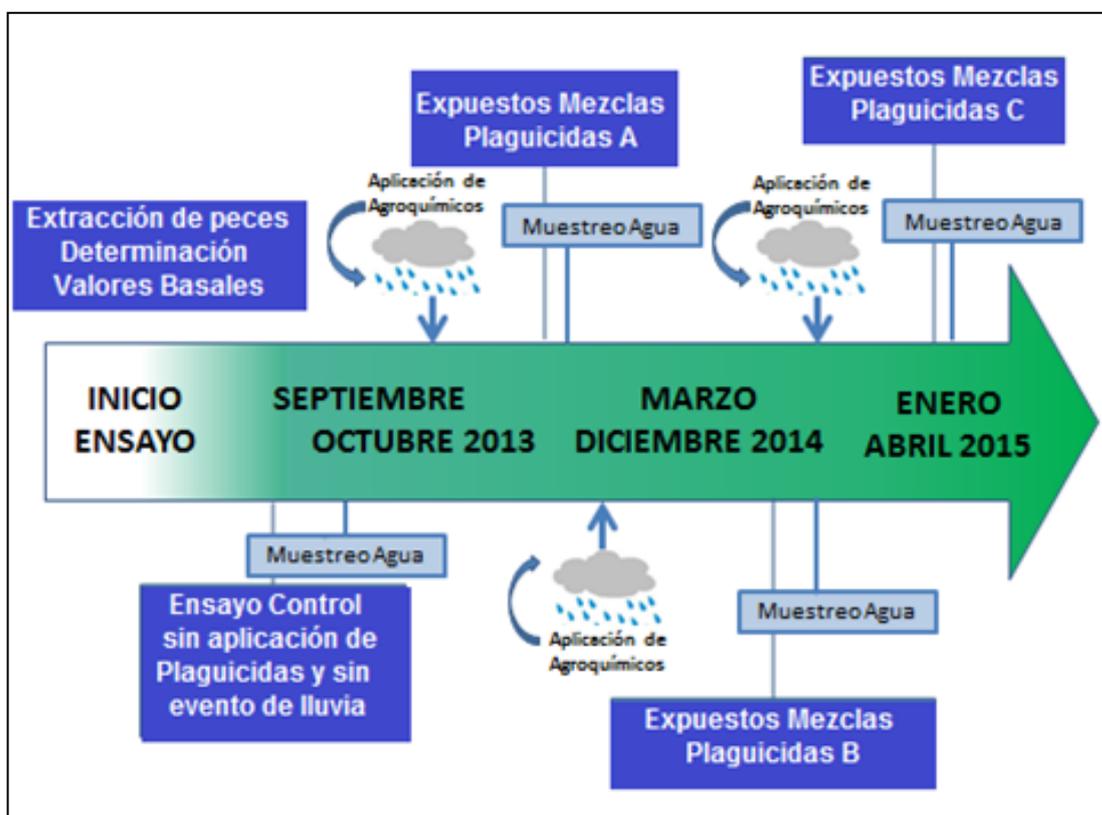


Figura 10. Línea de tiempo del Ensayo durante la campaña agrícola

Para la evaluación temporal (Tabla 2) se registró en cada período: la ubicación de los limnocorrales, fecha de aplicación, mezclas de plaguicidas por cultivos, evento de lluvia, i.e. como el porcentaje de agua escurrida respecto al volumen de lluvia caída durante el ensayo analizado de acuerdo al método de Laloy y Bielder (2008) medido en la microcuenca.

**Tabla 2. Diseño temporal en condiciones de campo**

Nº de Muestra	Fecha	Referencias	
<b>CONTROL</b>	---	06/10/2013	Ubicación de limnocorrales controles
	C1	16/10/2013	Extracción de 3 muestras de agua sin evento de lluvia y antes de las aplicaciones
	C2	16/10/2013	
	C3	16/10/2013	
	---	16/10/2013	Extracción de los limnocorrales
<b>Mezcla Plaguicidas A</b>	---	19/10/2013	Ubicación de limnocorrales
	---	22/10/2013	Aplicación de Plaguicidas , Dosis por Ha: 1,6kg Atrazina - 250cc Dicamba - 1,5lt Sulfosato - 1,2lt Metaclo
	---	25/10/2013	Evento de lluvia : 21,4mm y 1% i.e.
	E1M	26/10/2013	Extracción muestra de agua 1 Maíz
	E2M	26/10/2013	Extracción muestra de agua 2 Maíz
	E3M	26/10/2013	Extracción muestra de agua 3 Maíz
	---	28/10/2013	Extracción de los limnocorrales
<b>Mezcla Plaguicidas B</b>	---	06/06/2014	Ubicación de limnocorrales
	---	09/06/2014	Aplicación de Plaguicidas , Dosis por Ha: 600cc Aceite Emulsionable - 500cc Select - 2lt Glifosato 200 cc Dicamba/Solventes - 8gr Metsulfuron
	---	13/06/2014	Evento de lluvia: 8,2mm y s/i.e.
	E1T	13/06/2014	Extracción muestra de agua 1 Trigo
	E2T	13/06/2014	Extracción muestra de agua 2 Trigo
	E3T	13/06/2014	Extracción muestra de agua 3 Trigo
---	16/06/2014	Extracción de los limnocorrales	
<b>Mezcla Plaguicidas C</b>	---	19/02/2015	Ubicación de limnocorrales
	---	21/02/2015	Aplicación de Plaguicidas , Dosis por Ha: 500cc Carbendazin/Thiram/Azoxistrobina/Cyproconazole 2lt Sulfosato - 100cc Clorantraniliprole/Abamectina 250cc Coadyuvantes/Tiametoxam/Lambdacialotrina
	---	25/02/2015	Evento de lluvia: 88,5mm y 3% i.e.
	E1S	26/02/2015	Extracción muestra de agua 1 Soja
	E2S	26/02/2015	Extracción muestra de agua 2 Soja
	E3S	26/02/2015	Extracción muestra de agua 3 Soja
---	28/02/2015	Extracción de los limnocorrales	

C1-C2-C3 Muestras de Agua Control  
E1M-E2M-E3M Muestras de Agua Exp. Mezcla A  
E1T-E2T-E3T Muestras de Agua Exp. Mezcla B  
E1S-E2S-E3S Muestras de Agua Exp. Mezcla C

### 3.4.1- Valores Basales

De los ejemplares extraídos del ambiente alejado de prácticas agrícolas, Reserva Natural se seleccionaron 24 adultos (12 machos y 12 hembras no preñadas). El traslado hasta el laboratorio se realizó en recipientes con agua del mismo arroyo y aireados, que un lapso menor a dos horas fueron sacrificados para la determinación de los valores basales de la especie.

### 3.4.2. Aplicación de Plaguicidas, Escorrentía y Muestreo de agua

La pulverización se realizó aplicando recomendaciones técnicas sobre buenas prácticas sugeridas por INTA (Brambilla, 2012) y CASAFE (Figura 11). Bajo condiciones ambientales adecuadas de velocidad del viento, horario, humedad y temperatura. Respetando una distancia de seguridad al cuerpo de agua establecida en 50 metros.

#### Tarea de aplicación de plaguicidas sobre el lote



Figura 11. Equipo terrestre realizando tarea de pulverización (Foto Dra. Sasal)

El equipo terrestre utilizado para la pulverización de plaguicidas está equipado con pastillas anti-deriva, el botalón se usó a baja altura, con la presión de bomba y tamaño de gota según recomendaciones técnicas para cada aplicación, disminuyendo la probabilidad de deriva fuera del lote.

Se utilizó el registro de las parcelas de escorrentías de la Estación Experimental Paraná ubicadas sobre la misma microcuenca, asimilando el efecto de escurrimiento por la cobertura del lote, determinando el i.e. a campo por evento de lluvia (Figura 12).



Figura 12. Piletas para evaluación de escurrimiento por cada cultivo (Foto Dra. Sasal)

Para analizar las condiciones del agua durante cada período del ensayo se recogieron muestras antes y después de la pulverización e inmediatamente del primer evento de lluvia, en tres lugares cercanos a la ubicación de los limnocorales (Figura 13). Midiendo temperatura y pH en el momento; las muestras se colectaron en envases estériles y luego refrigeradas a  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis multiresiduo de plaguicidas; seleccionando los herbicidas, insecticidas y fungicidas más usados que se relevaron en el registro de aplicación sobre el lote.

### Extracción de muestras de agua



Figura 13. Puntos de muestreo y extracción de agua superficial. Fuente: modificado de Google maps y foto propia

#### 3.4.4. Bioensayo

Luego de establecidos los valores basales para cada biomarcador se evaluaron los posibles efectos de los plaguicidas aplicados al lote, para determinar si las mezclas de las descargas de agua de lluvia por escurrimiento afectan la salud ambiental del sistema acuático.

El ensayo control se realizó durante un período de 10 días que no se registraron eventos de lluvia con escurrimiento sobre el sistema de agua superficial y distanciado en dos meses con la última aplicación de plaguicidas.

La evaluación de los biomarcadores de este ensayo se comparó con los valores basales.

Cada limnocorral contenía diez ejemplares adultos de *C. decemmaculatus*, con un período de adaptación al medio de 96 hs. Después de 72 hs del evento de lluvia (escorrentía) se realizó la extracción y sacrificio de todos los ejemplares destinando cuatro peces para el análisis de genotoxicidad sobre los tejidos branquiales y el resto de los ejemplares se usaron para evaluar daño oxidativo.

Para los 3 períodos de exposición luego de las aplicaciones de plaguicidas en cultivos de maíz, trigo y soja respectivamente, se colocaron

antes de una precipitación los 6 limnocorales, 72 horas después de un evento de lluvia natural se extrajeron los peces expuestos para su análisis.

### **3.5. Análisis químico de plaguicidas en agua**

Según el análisis previo donde se relevaron todos los plaguicidas usados en el lote durante los cultivos de maíz, trigo y soja (Tabla 1). Se seleccionaron las moléculas a analizar, según lista del Anexo A por razones de factibilidad y costo; donde se detalla para cada residuo químico los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Las muestras de agua fueron almacenadas en cámara a menos de 5°C hasta su procesamiento y determinación de pesticidas que se realizó por un método validado en el Centro de Investigación Agroindustrial (CIA), INTA Hurlingham, Buenos Aires, Argentina que emplea extracción en fase sólida (Furlong y col., 2001; Zaugg y col., 1995). Los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UHPLC) de Waters Acquity equipado con un detector de masa de cuádruplo único usando columna XBridge BEH C18 2,5 x 2,1 x 150 mm, ácido acético al 0,1% en agua: metanol en el siguiente gradiente; (95: 5) 0 - 2 min, (95: 5) - (80:20) 2-5 min, (80:20) - (20:80) 5-10 min, (20°C) : 80) - (0: 100) 10 - 11 min, (0: 100) - (0: 100) 11-13 min, (95: 5) ) 14-20 min como la fase móvil. El modo de monitorización de iones seleccionado se utilizó en el análisis de cuantificación. Los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ESI negativo o positivo, el tiempo de retención y la abundancia del ión de confirmación (Ion C) con respecto al ion de cuantificación (Ion Q) como criterios de identificación.

Los análisis de cromatografía gaseosa se realizaron usando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 equipado con un detector de masa cuadripolar único. Se inyectaron volúmenes de muestra de 2,0 µl en el inyector split/splitless programable, en modo splitless con la salida dividida abierta después de 1,5 minutos con la temperatura del puerto del inyector a 250°C. La columna capilar utilizada fue DB-5MS (30 m 0,25 µm I.D., 0,25 mm de grosor de película) (Agilent Technologies). El gas portador de helio se programó con un flujo constante de 1 ml/min. El programa de temperatura del

horno se fijó inicialmente a 80°C con 5 min de retención y ascenso (80-178)°C a 25°C/min, (178-205)°C a 2°C/min, (205 - 300)°C a 30°C/min con una espera de 5 minutos. El modo de monitorización de iones seleccionado se utilizó para el análisis de cuantificación. Los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ionización por impacto de electrones 70eV, tiempo de retención y abundancia del ion de confirmación con respecto al ion de cuantificación como criterios de identificación. En todos los casos, el límite de detección (DL) fue de 1 µg l<sup>-1</sup> y el límite de cuantificación (QL) fue de 4 µg l<sup>-1</sup>.

Para la determinación de glifosato y su metabolito el aminometilfosónico (AMPA), se utilizó un método sin derivatización, método QuPPE 1.3 "Glifosato & Co. Hypercarb" de la U.E. (Anastassiades y col., 2015).

La determinación se realizó con cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), acoplada a una detección/cuantificación por espectrometría de masas (UHPL CMS) Waters SQD. El DL para esta técnica fue de 0,2 µg l<sup>-1</sup>, mientras que QL fue <0,6 µg l<sup>-1</sup>.

### **3.6. Biomarcadores**

#### **3.6.1. Obtención de células de tejido branquial**

Los ejemplares destinados para la obtención de valores basales, (n=24), controles (n=60) y expuestos (n=240) fueron sedados por inmersión en agua fría a 0°C y posteriormente sacrificados por inserción de aguja en la parte superior de la cabeza entre los ojos (Brown, 1988). En todos los casos se realizó la extracción de los arcos branquiales de ambos lados y se lavaron dos veces con solución de fosfato tamponada (PBS: pH 7) libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> para eliminar las células sanguíneas.

Las muestras destinadas para los ensayos de genotoxicidad se procesaron el mismo día. Los arcos branquiales se colocaron en un tubo con PBS disociando suavemente con micropipeta automática durante 1 minuto hasta obtener células aisladas (Pautasso y col., 2014).

Las muestras destinadas para daño oxidativo fueron conservadas a -70°C por un período inferior a 2 meses. Previo a su procesamiento, el tejido fue

pesado y se realizó un homogenato por disgregación con PBS y el agregado de inhibidores de proteasa (Sabatini y col., 2011). Se empleó un kit comercial (Wiener Lab ®) para determinar la concentración de proteínas en cada homogenato.

Las determinaciones se realizaron a ciegas, esto es, todas las muestras fueron codificadas asignándoles un número creciente y registrando en archivo no disponible durante el análisis de los biomarcadores a cuál limnocorral y tratamiento pertenecían.

### **3.6.2. Evaluación de daño oxidativo y genotóxico**

#### **3.6.2.1. Marcadores de daño oxidativo**

##### **Actividad enzimática de la Catalasa**

Para determinar CAT por espectroscopia ultravioleta UV, se utilizó el método de Aebi (1984). Brevemente a 3 ml de  $H_2O_2$  54 nM en 50 nm de buffer de fosfatos, pH 7, se adicionan 10  $\mu$ l de hemolizado (homogenato diluido 1:100). La disminución  $H_2O_2$  es medida a 240 nm a 25°C durante 60 segundos. Con un espectrofotómetro Genwey UV-Visible, cubeta de cuarzo para UV cuyo paso óptico es de 1 cm. Resultados expresados como kU/mgProt.(Figura 14).

##### **Preparación de las muestras para el análisis**



Figura 14. Trabajo de laboratorio, evaluación de daño oxidativo

### **Determinación de peroxidación lipídica**

La sensibilidad de la medición de TBARS lo ha hecho el ensayo de elección para el cribado y monitoreo de la POL, se valoró TBARS utilizando el método de Buege y Aust (1978). Este método se basa en la reactividad del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), lo que genera un producto MDA:TBA rojo fluorescente., que puede ser medido por espectrofotometría a 532 nm.

A 250  $\mu$ l del homogenato se agregó 1 ml de reactivo (Ácido Tiobarbiturico y Acido Tricloroacético) y 25  $\mu$ l Butilhidroxitolueno 4% en etanol.

Se calentó la mezcla 45 minutos a 92°C en baño seco. Finalmente se colocaron los tubos en baño de hielo por 10 minutos y se centrifugaron por 10 minutos a 10.000 x g, para luego medir la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. La concentración de TBARS se calculó usando el coeficiente de extinción  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como nmol de TBARS  $\text{g}^{-1}$  de proteínas.

### **3.6.2.2. Marcador para daño genotóxico**

#### **Viabilidad Celular**

Una fracción del sobrenadante que contiene las células de epitelio branquial se utilizó para determinar la viabilidad celular, con una mezcla de colorantes que se unen específicamente al ADN utilizando microscopía de fluorescencia (Mercille y Masie, 1994). Las células viables se ven color verde, las células necróticas color rojo, y las células en proceso de apoptosis poseen características particulares de vacuolización y fragmentación nuclear, con posible tinción de ambos colorantes dependiendo del estadio de apoptosis en el que se encuentren. Se contaron 200 células para cada muestra y la viabilidad se expresó como porcentaje de células viables.

### **Ensayo cometa**

Posteriormente, otra fracción de las células se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C siguiendo la técnica propuesta por Singh y col., (1988) con modificaciones para la especie. Brevemente, se realizaron dos preparados por cada individuo. Se colocaron en solución de lisis, que contiene sales y detergentes, luego de un periodo inferior a una semana, se procedió al desenrollamiento del ADN en buffer alcalino (pH>13) y posterior electroforesis a 300 mAmp ambos durante un período de 10 minutos. Por último, los preparados fueron neutralizados con tres lavados con buffer tris pH 7,5 y deshidratados en alcohol etílico durante 5 minutos.

Los preparados se visualizaron con microscopía de fluorescencia, teñidos con naranja de acridina. Analizando 100 células por muestra (50 de c/réplica) con un aumento de 400X se clasificaron en 5 categorías: 0: sin daño, 1-4: de daño mínimo a máximo según las recomendaciones realizadas por el método para el conteo visual. Para el cálculo del índice de daño (ID) se utilizó la siguiente fórmula  $ID = n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4$ , siendo  $n_1$  las células incluidas en la categoría 1,  $n_2$  en la categoría 2,  $n_3$  en la categoría 3 y  $n_4$  en la de mayor daño. La categoría 0 no fue incluida en la fórmula ya que corresponde a células sin daño (Collins y col., 2008).

### **3.7. Análisis Estadístico**

Al finalizar los ensayos y las determinaciones en laboratorio, se decodificaron las muestras y se realizaron los análisis estadísticos utilizando el software SPSS 15.0 y Minitab 16.0. Para los datos del largo total y peso se hizo un análisis de la varianza y se comprobó la distribución normal de los datos con Kolmogorov-Smirnov. Los valores basales y controles en cada biomarcador se informaron como resultados medios  $\pm$  error estándar (SE) considerando si eran valores basales, controles o pertenecían a un determinado período expuesto a la mezcla de plaguicidas, se usó la prueba de Mann-Whitney para determinar la similitud de las medianas. Para comparar los expuestos provenientes de los diferentes tratamientos con el grupo control se utilizó el prueba de Kruskal

Wallis para comprobar si difiere o no la mediana y distribución de los valores hallados.

Se utilizó la Prueba de Friedman para determinar si el efecto en cada situación de esorrentía y la distancia a la zona de desagüe del canal de escurrimiento del lote agrícola difiere en un diseño de bloques aleatorizado. Al existir ambientalmente condiciones experimentales uniformes en cada período de exposición se utilizó la unidad de limnocorral como bloque. Se evaluó Resultados vs. Bloques por tratamientos para determinar la existencia de una relación teniendo en cuenta la distancia de los limnocorrales al punto en que la esorrentía entra en el sistema. Una diferencia de  $p < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa usando la prueba No Paramétrica de Friedman.

#### 4. Resultados

En el estudio bajo condiciones de campo se midieron los eventos de lluvia, su escurrimiento y el período de exposición de los peces con la ubicación de los limnocorrales en el cuerpo de agua (Figura 15).

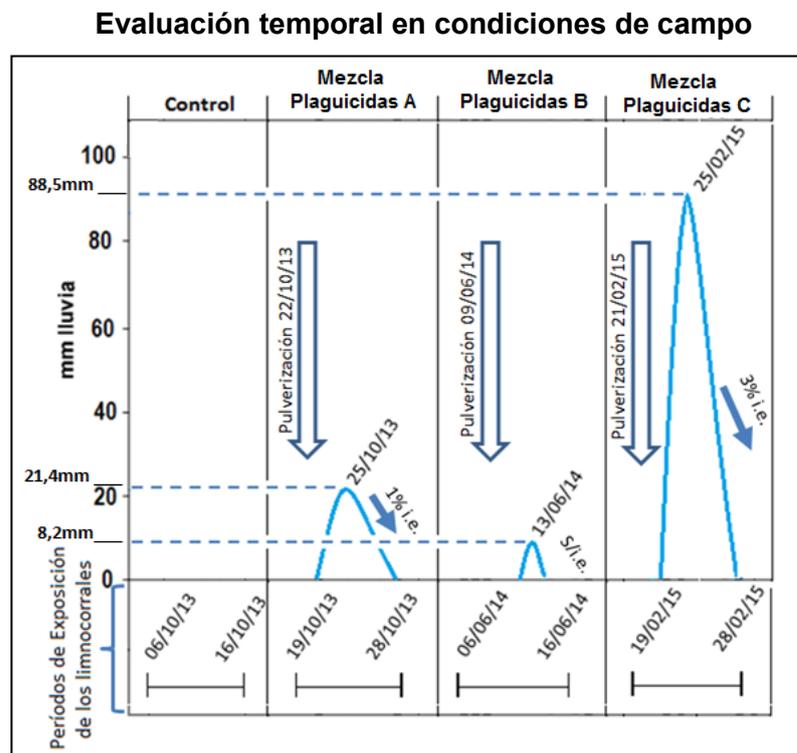


Figura 15. Eventos de lluvia, fechas, i.e., períodos de exposición

### 4.3. Resultados de los análisis de agua

Se midieron durante cada período: temperatura del agua, pH y análisis multiresiduo de plaguicidas, en Tabla 3 sólo se detallan las concentraciones halladas por sobre el nivel mínimo de detección y en Figura 16 se grafican los resultados de los analitos detectados.

**Tabla 3. Parámetros ambientales y análisis químicos**

Parámetros Ambientales		Análisis Químico (µg/lit)			
<b>ENSAYO CONTROL:</b> Período sin aplicación de plaguicida y sin evento lluvia					
Registro de Lluvia	0mm	Nº	Glifosato	AMPA	Atrazina
Índice de Escurrimiento	No Detectado	1	LC	ND	ND
Temperatura del Agua	21,8°C	2	ND	1,3	0,6
pH	7,5	3	LC	ND	ND
<b>EXPUESTOS MEZCLAS DE ESCORRENTÍA "A"</b>					
Registro de Lluvia	21,4mm	Nº	Glifosato	AMPA	Atrazina
Índice de Escurrimiento	1%	1	29,7	119,3	118
Temperatura del Agua	22,5°C	2	39,8	159,8	110
pH	7,1	3	10,9	43,8	27
<b>EXPUESTOS MEZCLAS DE ESCORRENTÍA "B"</b>					
Registro de Lluvia	8,2mm	Nº	Glifosato	AMPA	Atrazina
Índice de Escurrimiento	No Detectado	1	1,8	ND	109
Temperatura del Agua	17,8°C	2	ND	2	92
pH	6,9	3	ND	ND	ND
<b>EXPUESTOS MEZCLAS DE ESCORRENTÍA "C"</b>					
Registro de Lluvia	88,5mm	Nº	Glifosato	AMPA	Atrazina
Índice de Escurrimiento	3%	1	14	2,3	1,09
Temperatura del Agua	23,5°C	2	LC	LC	3,2
pH	7,3	3	ND	ND	ND

Valores Expresados en mg/lit. LC: Límite de Cuantificación - LD: Límite de detección  
 ND: El resultado es menor al límite de detección. Valores expresados en (µg/lit).

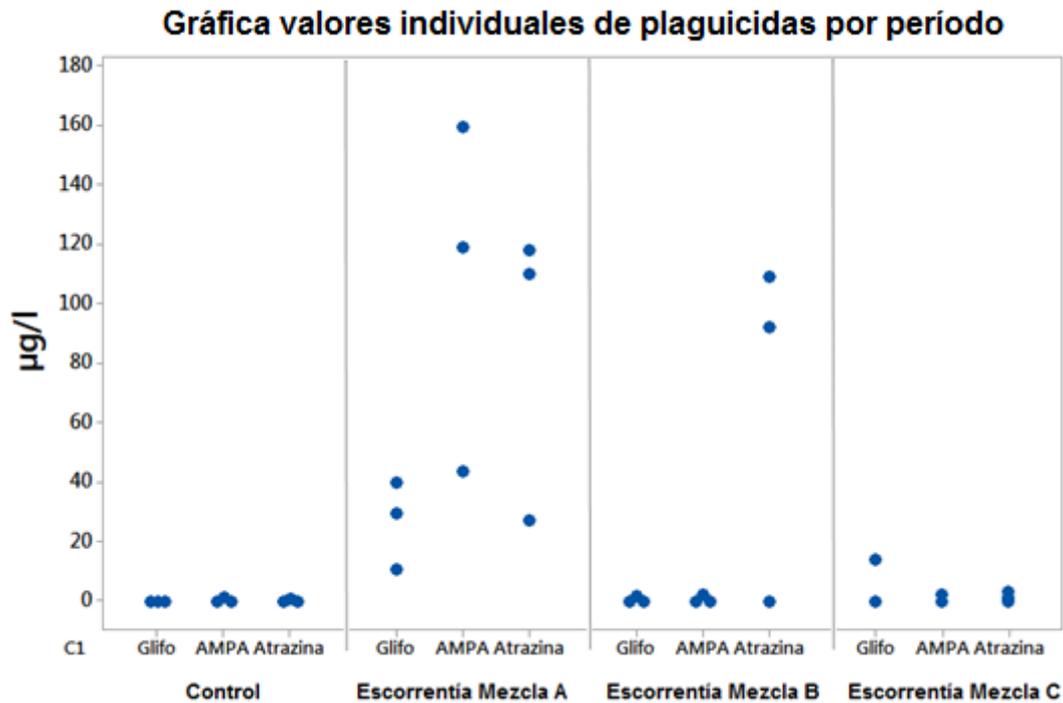


Figura 16. Gráfica de valores individuales con las concentraciones de plaguicidas halladas en cada período.

#### 4.4. Control de talla y peso para los distintos grupos evaluados

Se utilizaron en todos los experimentos ejemplares adultos machos y hembras no preñadas, se registró el largo total promedio con su desvío estándar 28 mm ( $\pm 4$  mm) y el peso 86 mg ( $\pm 50$  mg) de los individuos. Cuando se consideró este factor para los distintos períodos no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$  en ambos casos), corroborando que no constituía un factor de confusión (Figura 17 y 18).

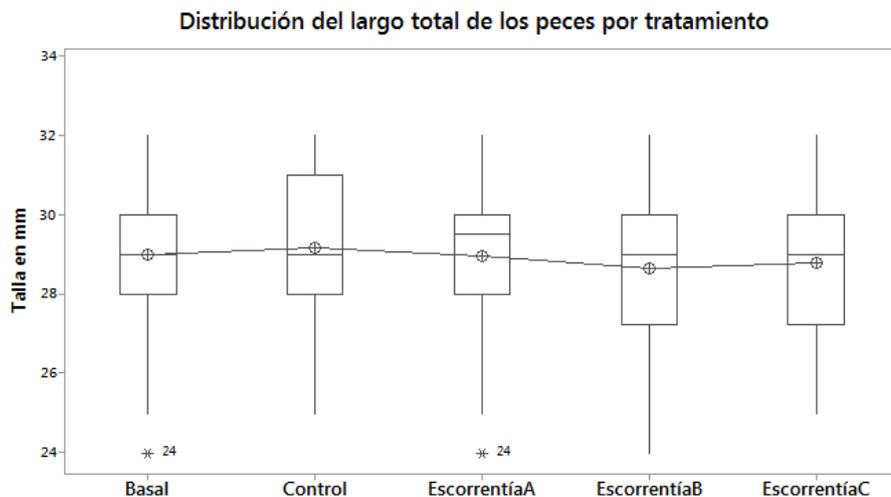


Figura 17. Largo total de los peces en mm para cada tipo de tratamiento (Kolmogorov-Smirnov  $P \geq 0,949$ ).

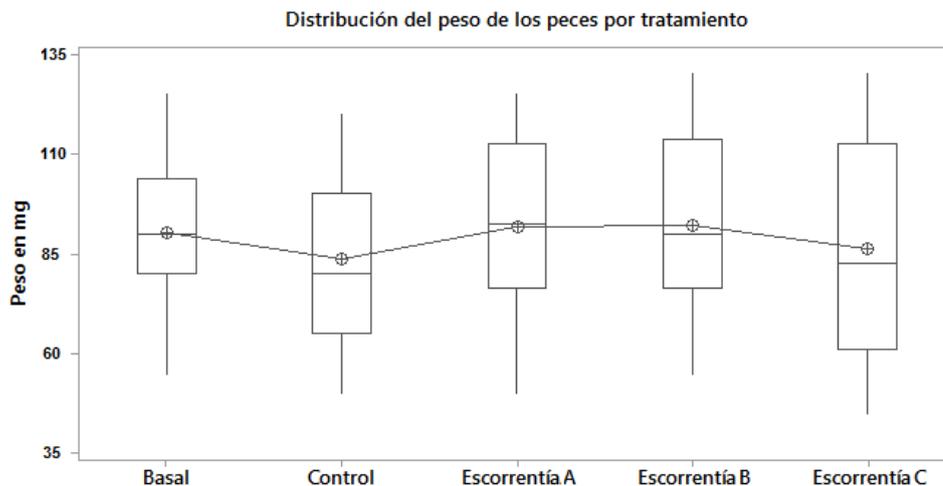


Figura 18. Pesos (mg) de los peces para cada tipo de tratamiento (Kolmogorov-Smirnov  $P \geq 0,210$ ).

#### 4.5. Determinación de basales y controles para cada biomarcador

Se analizaron las observaciones de CAT, POL y EC para valores basales y controles del diseño experimental (sin escurrimiento de plaguicidas) en células branquiales de *C. decemmaculatus* (Figuras 19, 20 y 21).

La viabilidad celular debe ser evaluada antes de la realización del EC, de modo de asegurar que las células de tejido no han sufrido cambios generados por el aislamiento o por el tratamiento que pudieran desencadenar procesos de citotoxicidad. En todos los casos, los resultados de células viables fueron superiores al 95%.

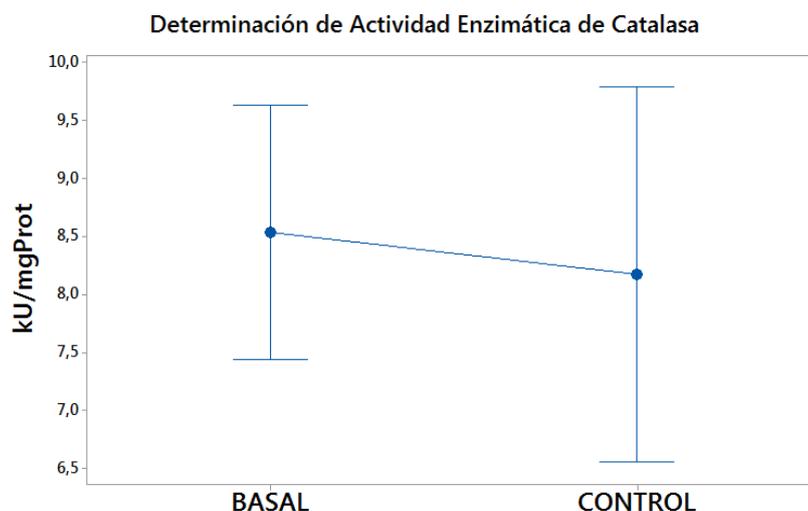


Figura 19. Diferencia no significativa para los valores de CAT ( $n=24$ ) - (P. Mann-Whitney  $p=0,665$ ).

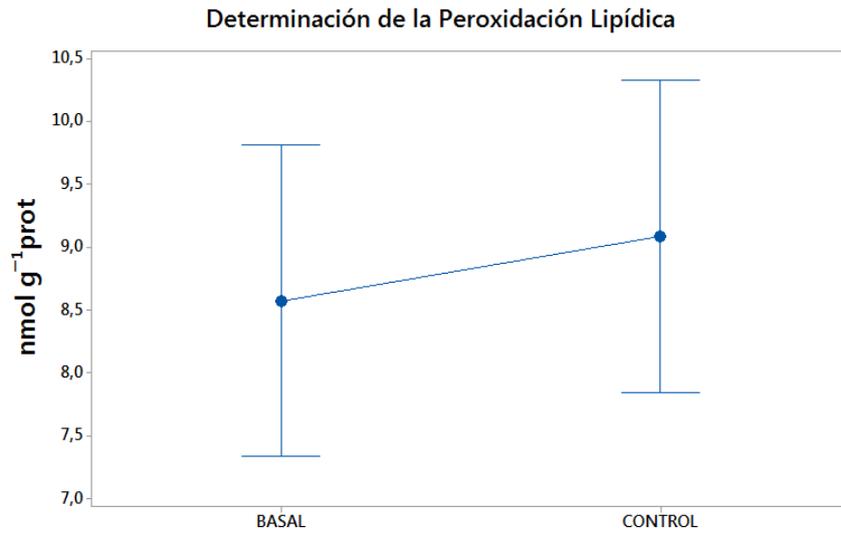


Figura 20. Diferencia no significativa para los valores de POL (n=24) - (P. Mann-Whitney  $p > 0,624$ ).

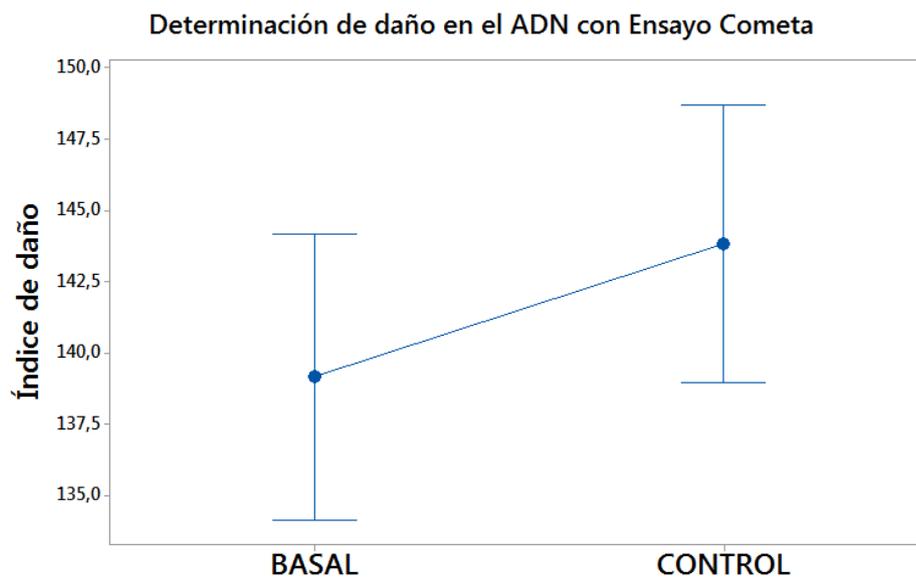


Figura 21. Diferencia no significativa para los valores del ID (n=24) - (P. Mann-Whitney  $p = 0,10$ ).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Basal y Control para los tres biomarcadores seleccionados, analizando la mediana y frecuencia de los distintos grupos (Mann Whitney  $p > 0,05$  en todos los contrastes).

#### 4.6. Daño oxidativo

Durante la extracción de los ejemplares expuestos en los limnocorrales a la escorrentía de las mezclas de plaguicidas, no se observó mortalidad ni diferencias de tallas y pesos significativas entre tratamientos.

##### 4.6.1 Actividad Enzimática en células branquiales

Se determinó la actividad enzimática de CAT en individuos expuestos luego de transcurridas 72 hs del evento de lluvia. Se hallaron diferencias significativas en todos los grupos respecto al control, observándose distintos grados de inhibición de la actividad de CAT con respecto al grupo control. (Figura 22).

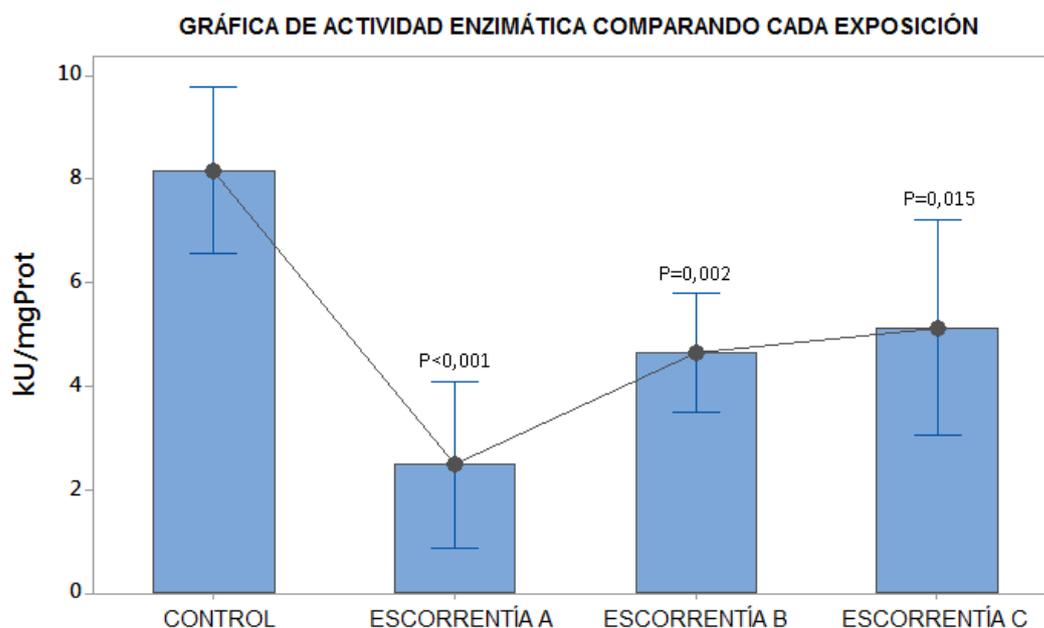


Figura 22. Diferencias significativas comparando los valores de CAT (n=24) (Test Kruskal-Wallis chi-squared) ( $\pm$  SEM).

##### 4.6.2. Peroxidación lipídica en células branquiales de *C. decemmaculatus*

Los resultados de TBARS como medición indirecta de la POL mostraron un aumento estadísticamente significativo en dos de los grupos expuestos respecto al control (Figura 23).

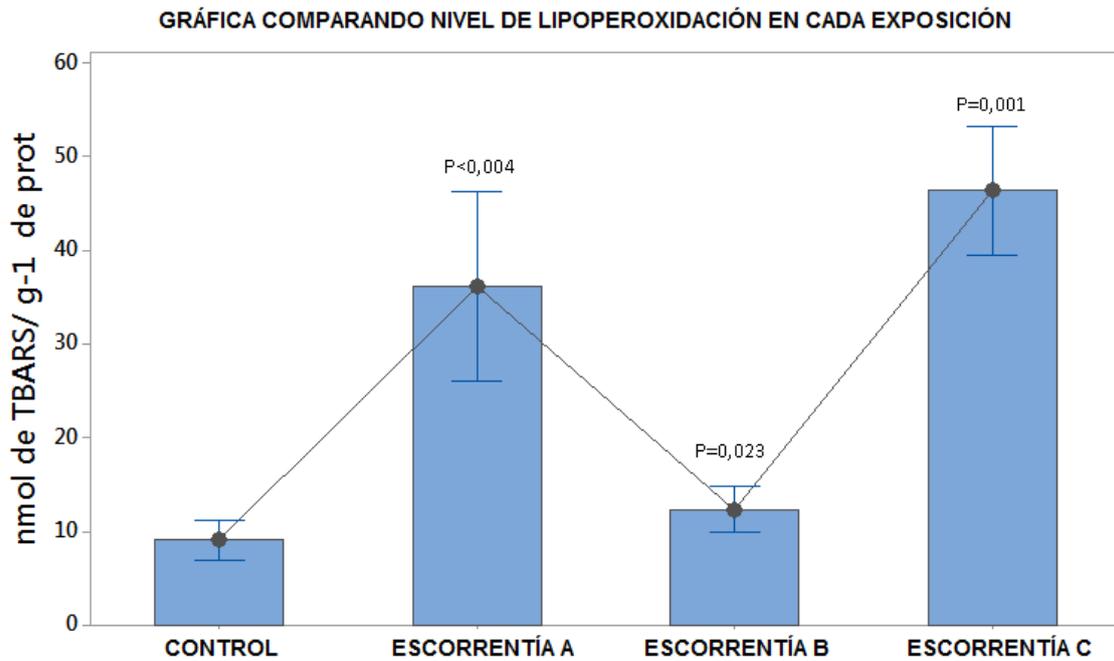


Figura 23. Diferencias significativas comparando los valores TBARS (n=24) (Test Kruskal-Wallis chi-squared) ( $\pm$ SEM)

#### 4.7. Evaluación del daño genotóxico utilizando Ensayo Cometa

Se visualizaron 100 células por muestra y se asignó un valor al daño para el cálculo del ID, según el método de Collins y col. (2008) (Figura 24).

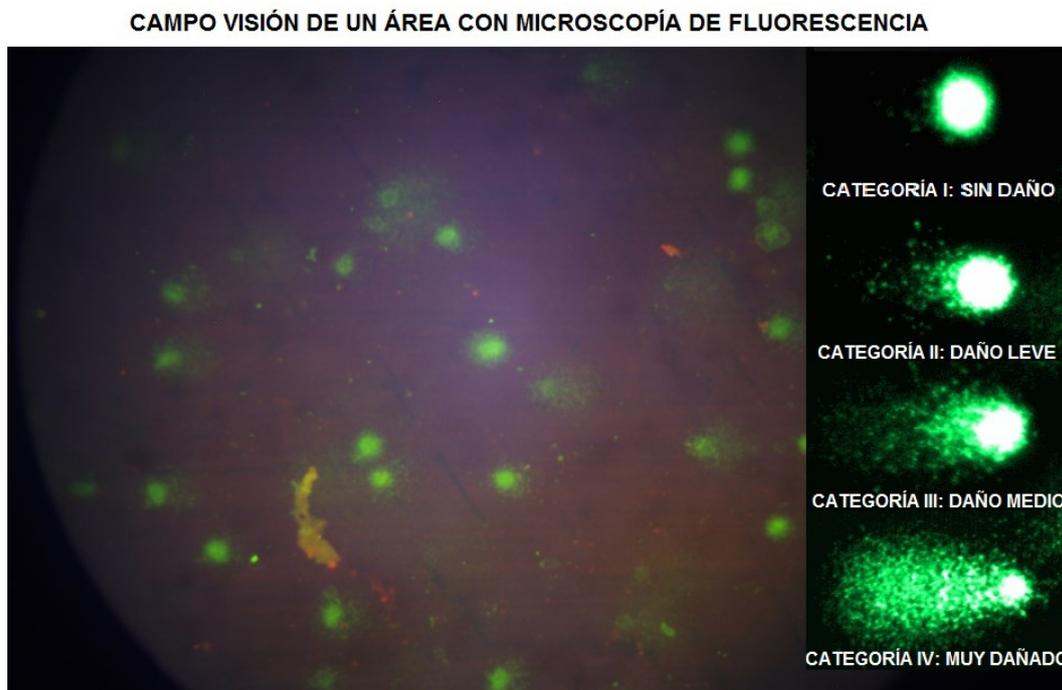


Figura 24. Asignación numérica por categoría al daño celular (Foto Propia)

Al analizar los resultados del ID de los grupos expuestos luego de 72hs del evento de lluvia con respecto al control se hallaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 25).

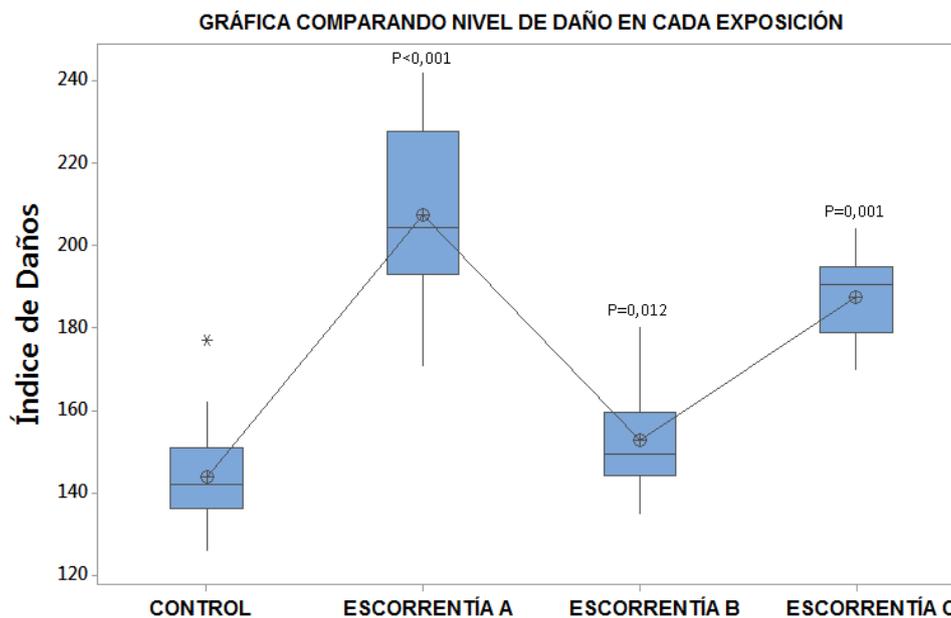


Figura 25. Diferencias significativas comparando los valores de ID (n=24) (Test Kruskal-Wallis chi-squared) ( $\pm$ SEM)

#### 4.8. Integración y relación de los resultados

Se realizó un diseño de bloques completamente al azar para comparar los períodos y las unidades de limnocorrales experimentales donde el factor fue la distancia a la zona de desagüe del canal de escurrimiento del lote agrícola y en forma independiente para cada biomarcador, reduciendo la varianza del error para mayor precisión (Figuras 26, 27 y 28).

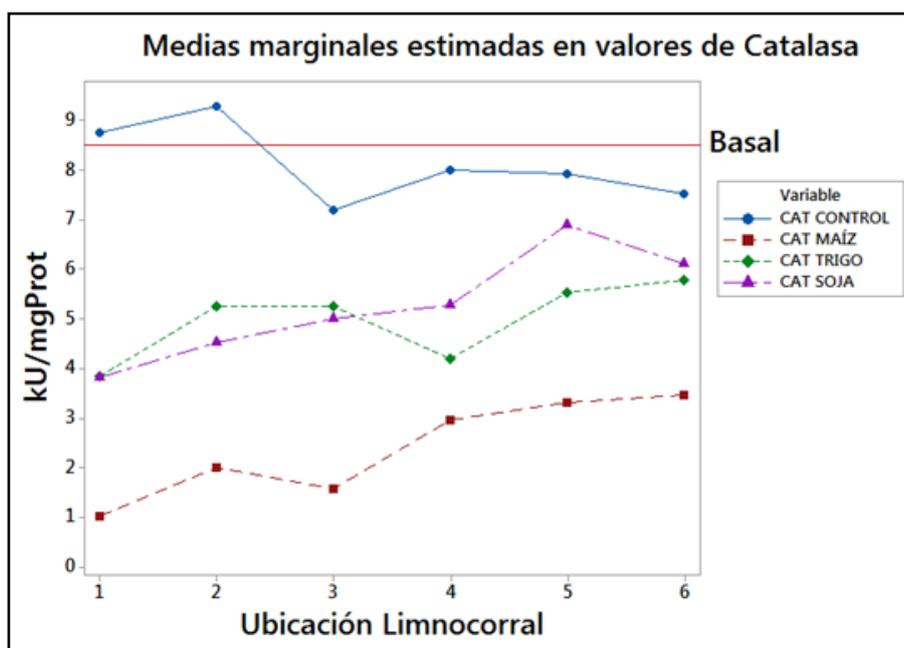


Figura 26. Los resultados muestran que para la actividad enzimática de la CAT los limnocorrales más cercanos a la cabecera de la escorrentía del lote manifiestan una mayor inhibición con respecto a los más alejados. Valor de  $p=0,141$  para bloques y  $p=0,0001$  para Variable Tratamiento.

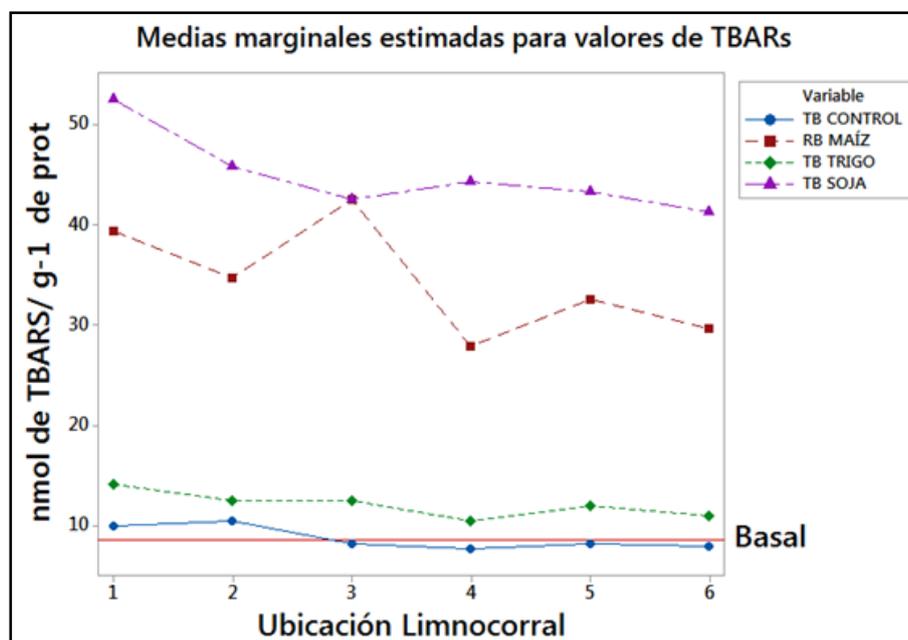


Figura 27. Los resultados muestran que para los valores de TBARS hallados en peces de los limnocorrales más cercanos a la cabecera de la escorrentía del lote manifiestan una débil tendencia de mayor nivel de lipoperoxidación con respecto a los más alejados. Valor de  $p=0,041$  para bloques y  $p=0,0001$  para Variable Tratamiento.

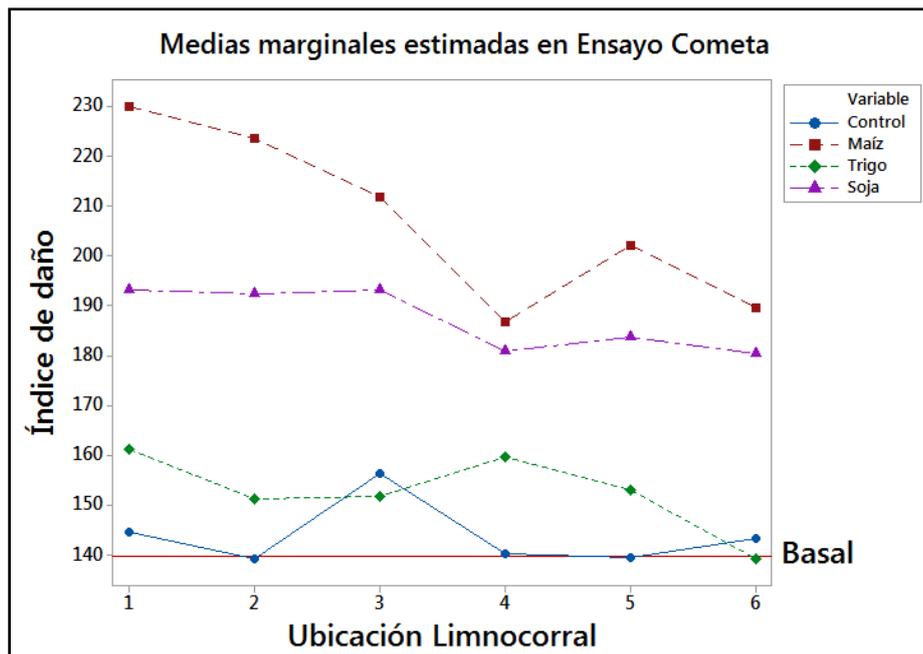


Figura 28. Los resultados muestran como tendencia que para el Ensayo Cometa el efecto disminuye con la distancia de ingreso. Valor de  $p=0,736$  para bloques y  $p=0,0001$  para Variable Tratamiento.

## **5. Discusión de Resultados y Conclusiones**

Los resultados obtenidos en el ensayo experimental aplicado a campo sobre una microcuenca agrícola de características similares en el tratamiento y aplicación de plaguicidas con los cultivos productivos de la zona, aporta información para evaluar *in situ* el impacto generado por las mezclas del escurrimiento sobre una especie autóctona, el *C. decemmaculatus* utilizada como organismo centinela, considerando biomarcadores de daño oxidativo y genotóxico.

En el desarrollo experimental se logró evaluar durante cada período con diferentes cultivos la práctica de pulverización de agroquímicos, la cuantificación de sus analitos en el agua superficial y los cambios subclínicos en los bioindicadores colocados en limnocorrales luego de un evento de lluvia con medición de esorrentía.

Durante el período evaluado, los peces estuvieron expuestos a la influencia de los distintos tratamientos de cada cultivo. Se identificaron tres eventos de lluvias y sus posteriores efectos. El tiempo transcurrido entre el evento de lluvia y la aplicación de la mezcla A sobre el cultivo de maíz fue el menor medido en horas y constituyó un evento de bajo volumen (21,4 mm) con intensidad media/alta, que provocó un pulso de concentración por escurrimiento. Los resultados de los análisis químicos durante este período detectaron glifosato, su metabolito AMPA y atrazina, resultando ser las concentraciones de analitos más elevadas con respecto a los otros períodos y momentos muestreados. Resultados similares fueron hallados en un estudio con simuladores de lluvia y medición de escurrimiento sobre ocho microcuencas del Arroyo Pergamino. A la salida de dicha cuenca se detectaron los mismos tres analitos en distintos períodos del año (Darder y col., 2016).

Luego de la aplicación de mezclas de plaguicidas en trigo se registró un evento de lluvia de bajo volumen (8 mm), sin detectar escurrimiento sobre el sistema. En los análisis de los resultados químicos se halló atrazina en una muestra y a nivel de trazas para glifosato y AMPA, este resultado coincide con

la detección de atrazina durante períodos similares en un año agrícola en puntos de muestreo en agua superficial en la base de acuíferos que reciben la influencia de la producción agrícola y con alta persistencia para el grupo de las triazinas permaneciendo mayor tiempo y su degradación más lenta en el medio ambiente acuático (Darder y col., 2016).

El tercer período evaluado, abarcó parte del tratamiento sobre el cultivo de soja, luego de la aplicación de plaguicidas se produjo un evento de lluvia con alto volumen (88 mm) y un i.e. del 3% que supone una dilución por escurrimiento, situaciones similares se pudieron comprobar en la medición de pérdidas de Glifosato con simuladores de lluvia realizados en parcelas de escurrimiento (Sasal y col., 2010b) y el modelo paramétrico de transferencia de escorrentía a escala de cuenca (Contreras y col., 2009).

Se consideraron los parámetros en el agua para descartar factores de confusión y atendiendo a la multicausalidad de los posibles efectos de exposición en la complejidad de un diseño ambiental. El análisis de los resultados de temperatura del agua y pH durante los cuatro períodos estudiados estuvieron dentro del rango de preferencia y tolerancia de la especie, confirmando con los valores de los estudios realizados por Somma y col. (2011) en el Manual de producción para laboratorio y por Gomez, (1996) en el ensayo de evaluación a la resistencia de temperatura y salinidad de la especie, *C. decemmaculatus* en el Río de la Plata.

Los ejemplares de *C. decemmaculatus* destinados para el diseño experimental se obtuvieron a partir de una cría controlada según el manual de producción de Somma y col., 2011 usando ejemplares adultos donde no se observaron diferencias significativas en su peso y talla. Previo a la realización del experimental, se descartaron los individuos fuera del rango estipulado para evitar un factor de confusión, homogeneizando la población expuesta. Además, durante el desarrollo de esta Tesis, los animales no evidenciaron diferencias significativas intergrupales e intragrupalas en su peso y talla.

La pulverización se realizó aplicando recomendaciones sugeridas por INTA y manuales sobre buenas prácticas agrícolas evitando la deriva y la aplicación directa sobre el sistema acuático, lo cual quedó evidenciado al no

registrarse casos de mortalidad ni alteraciones de comportamiento en los peces observados durante la exposición *in vivo*. Se tomaron registro de las mezclas de herbicidas, fungicidas, e insecticidas aplicados en el barbecho y durante la protección del cultivo; siendo los productos de mayor volumen por Ha la atrazina y el glifosato.

Los valores basales de daño oxidativo y genotóxico evaluados en los ejemplares extraídos de una zona sin prácticas agrícolas fueron estadísticamente similares a los controles en el sitio de estudio. En la búsqueda de antecedentes al momento del inicio de este trabajo, no se pudo verificar en la especie estudios previos que utilicen valores basales en tejido epitelial de los arcos branquiales; sí se han evaluado los valores basales en otra especie nativa, *Prochilodus lineatus* (sábalo) para determinar el daño en el epitelio branquial de ejemplares expuestos (Poletta y col., 2013).

En la evaluación de la CAT como marcador de las defensas antioxidantes se determinó una disminución de la actividad enzimática en un rango que va desde el 48 al 73% respecto al grupo control, siendo el grupo expuesto a la mezcla de escorrentías durante el período del cultivo de maíz el que mostró mayor inhibición enzimática. No se conocen antecedentes en nuestro país, de ensayos a campo similares a los evaluados en este trabajo, pero en otro estudio realizado en branquias de peces *Goodea atripinnis* expuestos en forma aguda a distintos formulados de glifosato, en el cual se evaluaron distintos grados de toxicidad del principio activo en combinación con tensioactivos, se determinó que la exposición a dosis sub-letales en formulaciones que incorporan mayor cantidad de coadyuvantes, la actividad de CAT se redujo en branquias, pero aumentó en hígado (Ortiz-Ordoñez y col., 2011). En concordancia, el estudio de Ahmad y col. (2010) que demostró una depleción de la actividad enzimática en tejidos branquiales de la especie *Channa punctatus* expuestos a diferentes clases de contaminantes del medio acuático entre ellos plaguicidas organofosforados.

TBARS, como marcador indirecto de POL, resultó ser un método sensible con un rango de incrementos generados por acción de las escorrentías que van desde el 27 al 80%. Siendo estadísticamente significativo

el aumento en los individuos expuestos a las mezclas de escorrentías A y C durante los tratamientos de maíz y soja, con incrementos muy marcados durante este último período.

En diferentes estudios con especies nativas, se ha destacado a los plaguicidas como agentes promotores de estrés oxidativo y de cambios en las respuestas antioxidantes, como ha sido demostrado en condiciones controladas de laboratorio por Menéndez (2013) donde se observó mayor actividad oxidativa en *Piaractus brachypomus* (Pacú blanco) expuesto al herbicida glifosato más el surfactante con respecto al principio activo solo. En otro trabajo, utilizaron *Leporinus obtusidensa* (Boga de agua dulce) y se expuso los ejemplares a distintas formulaciones comerciales de glifosato corroborándose el aumento de TBARS en hígado (Gluszczak y col., 2011).

Martinez-Coscollá y colaboradores (1993) demostraron que los surfactantes incrementan la absorción de xenobióticos en tejido epiteliales. La utilización a campo de formulados y adyuvantes podría, por tanto, favorecer la entrada de los distintos xenobióticos a los tejidos y propiciar los diferentes mecanismo de daño subclínico. Durante el ciclo agrícola, sustancias de diferentes estructuras químicas forman parte de las formulaciones comerciales o son agregadas como mejoradores en el tanque del pulverizador para vencer la barrera de los tejidos vegetales y así podrían también contribuir con el daño observado en el presente estudio.

Estos resultados también podrían responder a la exposición a mezclas de los distintos principios activos, los coadyuvantes y sus posibles efectos sinérgicos. Es importante considerar que los efectos de las mezclas pueden modificarse según el punto final y la especie seleccionada para la evaluación. En estudios previos, realizados en condiciones controladas de laboratorio, se han evaluado los efectos de las mezclas (equitóxicas y no equitóxicas) producida por la combinación entre glifosato y cipermetrina encontrándose resultados contradictorios entre renacuajos de *Rhinella arenarum* y *C. decemmaculatus* (Brodeur y col., 2014; 2016 ).

En el presente estudio se observaron los mayores daños oxidativos medidos a través de POL en branquias de *C. decemmaculatus* durante el

período afectado por las mezclas de escorrentías provenientes de los plaguicidas aplicados al cultivo de la soja. Se aplicaron por hectárea 2 litros de glifosato que en su formulación incorpora coadyuvantes a razón de 100 cm<sup>3</sup> por litro de producto, junto al insecticida Clorantraniliprole (nombre comercial: Voliam Targo) clasificado por el laboratorio como Muy Tóxico por sus efectos agudos en organismos de agua y peces (Syngenta, 2016).

En el análisis del ADN se observaron incrementos significativos en el daño de las células epiteliales branquiales durante todos los períodos expuestos con un  $p < 0,05$  en todos los casos. En relación a estos resultados, se puede afirmar que la utilización de células epiteliales de las branquias de esta especie para determinar daño genotóxico con el EC, lo constituye en un biomarcador sensible con el aumento de las concentraciones de plaguicidas luego de un evento de escorrentías. Estos resultados coinciden con un trabajo basado en exposición aguda (96h) a Roundup® en la especie *Prochilodus lineatus* (sábalo) que confirmó daño en las células branquiales, presentando una mayor migración del ADN hacia el ánodo y una mayor intensidad de fluorescencia, siendo el EC en células epiteliales de los arcos branquiales un buen indicador de exposición a sustancias genotóxicas (Cavalcante, D. y col., 2008). Resultados similares en el mismo tipo celular, de la misma especie, fueron determinados por Poletta y col. (2013) al exponer los peces a distintas concentraciones de cipermetrina durante 96 hs en condiciones controladas de laboratorio.

Se observó una relación de los pulsos de contaminación con el gradiente de concentración de plaguicidas provenientes de la escorrentía. Los resultados obtenidos de Glifosato, AMPA y Atrazina mostraron su movilidad hacia el cuerpo de agua causados por eventos de lluvia con excedente de agua sobre el lote, detectados a través del i.e. El efecto de concentración o dilución de los plaguicidas se relacionó con el daño genotóxico en el organismo estudiado y la distancia desde el punto de ingreso al sistema, cabecera de escurrimiento, hasta su dilución dentro del cuerpo de agua superficial. El EC permitió detectar una relación con el gradiente de la escorrentía, generado por la distancia, en el sistema superficial de agua.

A partir del trabajo realizado, considerando los resultados obtenidos y que las mezclas de las escorrentías son muy complejas se requieren de futuros ensayos diseñando modelos que permitan diferenciar los posibles efectos a la escorrentía *per se* o a los plaguicidas aplicados que llegaron al cuerpo de agua.

El análisis estadístico de los resultados y la ubicación de los limnocorales en el sistema hídrico bajo un modelo de diseño de bloques completamente al azar y reduciendo la varianza del error experimental, arrojó como resultados que tiende a disminuir el daño genotóxico en función de la distancia desde el punto de ingreso de la escorrentía ( $p= 0,0001$ ), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada limnocorral ( $p= 0,196$ ). La situación ensayada durante el período de trigo fue muy similar al control, pudiendo tener una fuerte relación la ausencia de i.e. comprobada durante el evento de lluvia medido.

Cuando la producción agrícola se práctica cerca de ambientes acuáticos y donde la influencia de las intervenciones pueden impactar en la fragilidad de los sistemas de agua superficial; es importante conocer el grado de afectación no sólo a través de herramientas analíticas en muestras puntuales de agua, sino también, incorporando bioindicadores de la salud del ambiente. Este trabajo demostró que, el uso de biomarcadores de daño oxidativo y genotóxico podría resultar adecuado para las evaluaciones ambientales requeridas por la sociedad, considerando que el destino de los plaguicidas en el ambiente responden a un complejo comportamiento químico dependiente de muchas variables.

La evaluación de organismos bioindicadores en un sistema acuático a través de marcadores de genotoxicidad resultó ser eficaz y complementario a los análisis de agua para la evaluación de posibles pulsos de contaminación y gradientes de concentración debido a la fragilidad de los sistemas por efectos de escurrimientos de lotes tratados con plaguicidas.

Ante la información generada sobre las consecuencias del impacto de los agroquímicos como fuentes de contaminación difusa en los agroecosistemas y los conflictos socio ambientales que surgen relacionados a partir del uso masivo y las mezclas de plaguicidas, no alcanza sólo con la

implementación de las buenas prácticas agrícolas en los procesos de aplicación de fitosanitarios, hace falta implementar y seleccionar en cada situación y dependiendo del entorno eco-sistémico, medidas de prevención y mitigación para evitar fugas de contaminantes que atiendan a los procesos de deterioro y degradación ambiental emergentes.

### **5.1 Medidas de prevención y mitigación**

Resulta importante mencionar recomendaciones brindadas como herramientas de buenas prácticas agrícolas:

Prácticas culturales y agronómicas:

- ✓ Manejo integrado de plagas, monitoreo de valores umbrales
- ✓ Buenas prácticas en el procedimiento de pulverizaciones
- ✓ Selección de productos de menor impacto
- ✓ Evitar mezclas de sustancias que puedan provocar potenciación o sinergismos en sus efectos de toxicidad
- ✓ Tecnología de aplicación con corte de secciones sobre el barral según presencia de malezas, plagas y distancias de seguridad
- ✓ Distanciamiento entre fertilizaciones fosforadas y aplicación de glifosato
- ✓ Al momento de aplicar buscar condiciones climáticas favorables y el mayor distanciamiento ante un evento de lluvia posterior

Usos de la tierra y zonas buffer:

- ✓ Alternancias y rotaciones de cultivos con mayor presencia de gramíneas
- ✓ Control de malezas con cultivos de coberturas
- ✓ Sistematización de lotes, curvas de nivel vegetadas y canales de recolección
- ✓ Barreras vivas en las zonas perimetrales al área de protección

Es necesario continuar con estudios de monitoreo y explorar sobre el uso de bioindicadores ambientales que permitan evaluar el impacto luego de aplicar medidas de amortiguación sobre las posibles salidas de los agroquímicos a compartimentos más vulnerables del sistema. Si bien los efectos resultantes de los biomarcadores como las modificaciones oxidativas y el daño genotóxico pueden ser inducidos por múltiples agentes, ofrecen una instancia significativa en la comprensión del impacto y del complejo mecanismo de acción de los agentes xenobióticos y sus mezclas.

Al realizar comparaciones de exposición y potenciales efectos en la salud de los ecosistemas y sobre las poblaciones expuestas *in situ* permite poseer elementos de discusión sobre la eficacia de las medidas correctivas para mitigar la contaminación, además ayudará para establecer vínculos entre las pruebas de laboratorio en condiciones controladas y los efectos analizados a campo, aportando métodos estandarizados para evaluaciones de ecotoxicidad con especies autóctonas y representativas de nuestros ambientes, como resultó ser *C. decemmaculatus* demostrando sensibilidad para los biomarcadores CAT, TBARS y EC entre las poblaciones controles y expuestas.

En numerosos trabajos (Saona G., 2015; Mastrángelo y Ferrari, 2013; Casares, y coll., 2012; Vera-Candioti, y col., 2013; Di Marzio, y col., 2005; Gómez, y col., 1998; de la Torre, y col., 1997) se ha confirmado el uso de la especie como adecuada para evaluaciones ecotoxicológicas y propuesta como centinela para alertar en forma anticipada los riesgos en la salud por la exposición ante contaminantes ambientales. Los resultados obtenidos en este trabajo con la especie y tejido celular seleccionados demostraron ser sensibles a las intervenciones generadas en el ambiente, lo que justifica ser utilizado en futuras evaluaciones del sistema productivo, validando esta herramienta ecotoxicológica. Este trabajo aporta instrumentos específicos de evaluación *in situ* con una especie nativa y brinda información adicional con respecto a la información que se desprende de los análisis toxicológicos de referencia en cada plaguicida.

Como conclusión de este trabajo de tesis se logró evaluar el impacto generado por el escurrimiento de un lote agrícola con el control químico de

plaguicidas usados en un ciclo productivo de rotación de cultivos con influencia sobre un sistema superficial de agua. Con la complejidad de un sistema que requiere de nuevas propuestas experimentales que permitan valorar las interacciones físicas, químicas y biológicas.

Las actividades antropogénicas impactan sobre la conservación y el equilibrio de la biodiversidad en los agro-ecosistemas, afectando los servicios eco-sistémicos que éstos prestan y en ocasiones se ve agravado el factor de estrés por fenómenos ambientales extremos a partir del aumento de eventos de lluvias intensas por el cambio o la variabilidad climática; que pueden hacer sobrepasar los límites de la capacidad natural de depuración y resiliencia de la naturaleza, viéndose amenazada la sustentabilidad productiva del sistema agropecuario y aumentada la vulnerabilidad del ambiente a la contaminación.

## **6. Resumen**

La contaminación difusa producida por agroquímicos en ambientes urbanos, periurbanos, rurales y zonas de mayor fragilidad ambiental constituye una preocupación importante para nuestra sociedad. Se requiere un análisis global de causa y efecto, con el fin de proporcionar información esencial para tomar decisiones que contribuyan a la reducción y mitigación de los diferentes tratamientos que afectan al medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el daño oxidativo y en el ADN causado por la mezcla de contaminantes provenientes de las escorrentías de un lote agrícola en el pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), un organismo de amplia distribución en América del Sur. Los bioensayos se llevaron a cabo utilizando limnocorrales situados en un sistema natural superficial de agua que recibe los excedentes de lluvia por escurrimiento de lotes bajo producción agrícola con rotación de cultivos, incluyendo maíz, trigo y soja. Se evaluó el daño oxidativo y genotóxico en células branquiales de *C. decemmaculatus* midiendo la actividad de la enzima antioxidante Catalasa (CAT), la peroxidación lipídica (POL) y el índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa (EC) en ejemplares expuestos a las mezclas de contaminantes en escorrentía del lote después de un evento de lluvia. Durante estos períodos, se realizaron análisis de agua para residuos de plaguicidas, pH y temperatura. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el daño oxidativo y genotóxico sobre el epitelio branquial de los individuos expuestos, en comparación con el valor de control previamente determinado. Estos resultados muestran la utilidad de esta especie como centinela de contaminación por las mezclas de las escorrentías y la sensibilidad de los biomarcadores utilizados. Más aún, ponen de relieve la necesidad de comprender, prevenir y corregir los conflictos ambientales implementando medidas de mitigación y protección del ambiente asociado a las prácticas agrícolas en sistemas extensivos de producción primaria, para contribuir a la sostenibilidad y recuperación socio-agroambiental.

**Palabras Claves:** Escorrentía, Daño Oxidativo, Genotoxicidad, *C. decemmaculatus*.

## **6.1 Abstract**

The difused contamination in urban, periurban, rural environments and areas of major fragility produced by agrochemicals constitutes one of the most important concerns for our society today. A global cause-effect analysis is required in order to provide essential information so that measures which contribute to the decrease and mitigation of the different treatments that affect the environment can be taken.

The aim of this work was to evaluate the harm caused by the runoff from productive areas over the lipid components of the membrane and DNA of the *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) which is a widespread organism throughout South America.

Bioassay have been carried out using limno corrals located in superficial natural water systems that receive rain excess flowing from agricultural productive areas with crop rotation, including corn, wheat and soya.

Oxidation and genotoxic harm on gill cells of the *Cnesterodon decemmaculatus* has been evaluated through the measuring of the activity of the antioxidant enzyme catalasa (CAT), the lipidic peroxidation (POL) and the harm index on the DNA through the use of comet trials on specimen exposed to the overflow from these areas after rain. During these periods, water analysis was performed to identify level of pesticidal waste, pH and temperature.

The results showed significant statistical differences ( $p < 0,05$ ) on the oxidation and genotoxic on the gill epithelial of the exposed individuals compared to the values from the previous controls. These results highlight the need to understand, prevent and mend the environmental conflicts due to the use of agrochemicals on extensive systems of primary production, implementing mitigation and protection measures to contribute to the social-agriculture environmental recovery and sustainability.

## **7- BIBLIOGRAFÍA**

Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.; Jain, S y Athar, M, Raisuddin S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure - *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1523:37-48.

Anastassiades, M.; Kolberg, E.; Eichhorn, A.; Benkenstein, S.; Lukačević, D.; Mack, C.; Wildgrube, I.; Sigalov, D. y Dörk, A. (2015). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method). <http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/methQuPPE.pdf> Fecha de acceso 15/04/2017.

Anderson, R. y Gutreuter, S. (1983). Length, weight, and associated structural indices. In: *Fisheries techniques*. American Fisheries Society. VII: 284-300.

Banerjee, B.; Seth, V.; Bhattacharya, A.; Pasha, S. y Chakraborty A. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 107: 33-47.

Bagchi, D.; Bagchi, M.; Hassoun, E.; Kelly, J. y Stohs, S. (1995) Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology*. 95: 1-9.

Bianco, K.; Yusseppone, M.; Otero, S.; Luquet, C.; De Molina, M. y Kristoff, G. (2013). Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. *Aquatic toxicology*, 144, 26-35.

Bistoni, M.; Hued, A.; Videla M. y Sagretti L. (1999). Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región central de Argentina. *Rev. Chil. De Historia Natural* 72: 325-335.

Brambilla, L. (2012). INTA-BPA Aplicación de Fitosanitarios. <https://inta.gob.ar/documentos/pautas-de-buenas-practicas-para-el-manejo-de-fitosanitarios>. Fecha de acceso 24/04/2017.

Brodeur, J.; Malpel, S.; Anglesio, A.; Cristos, D.; D'Andrea, M. y Poliserpi, M. (2016). Toxicities of glyphosate-and cypermethrin-based

pesticides are antagonistic in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere*, 155, 429-435.

Brown L. (1988). Anesthesia in fish. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice* 18 (2), 317-20.

Buege, J. y Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation - Methods in enzymology, 52, 302-310.

Carballo M.; Mudry M. y Lopez Nigro M. (2006). *Genética Toxicológica. Capítulo XIX Ambiente y Salud: Tóxicos Ambientales*, ed. Mudry MD. y Carballo, MA. *Genética Toxicológica*, De los cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina, 495-521.

Carrquiriborde, P.; Díaz, J.; Mugni, H.; Bonetto, C. y Ronco, A. E. (2007). Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere*. Vol. 68(4): 613-621.

Cavalcante, D.; Martinez, C. y Sofia, S. H. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655(1), 41-46.

Collins, A. R.; Oscoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivao, I., Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C y Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, Vol. 23(3): 143-151.

Contreras, E.; Egüen, M.; Nofuentes, M. y Polo, M. J. (2009). Modelo paramétrico distribuido de transferencia de sustancias al flujo de escorrentía superficial a escala de cuenca. *Estudios en la Zona o Saturada del Suelo* - 9, 377-384.

Darder, M. L.; Caprile, A. C. y Delaye. (2016) Contaminación en Agroecosistemas, estudio de caso de la cuenca del Arroyo Pergamino. *INTA - Suelo y Recursos*. 61: 429 - 472.

De la Torre, F. R. (2001). Estudio integrado de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés ambiental (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

De la Torre F.; Ferrari, L., y Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59(4), 577-583.

Delescluse, C.; Ledirac, N.; Li, R.; Piechocki, M.; Hines, R. y Gidrol, X. (2001). Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative

stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Bio.Pharmacol* 61 4:399–407.

Depledge, M. y Fossi, M. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology*, 3(3), 161-172.

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, (2010). DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. [http://eur-lex.europa.eu/search.html?DTN=0063&DTA=2010&qid=1509030936066&CASE\\_LAW\\_SUMMARY=false&DTS\\_DOM=ALL&type=advanced&lang=en&SUBDOM\\_INIT=ALL ALL&DTS SUBDOM=ALL ALL](http://eur-lex.europa.eu/search.html?DTN=0063&DTA=2010&qid=1509030936066&CASE_LAW_SUMMARY=false&DTS_DOM=ALL&type=advanced&lang=en&SUBDOM_INIT=ALL ALL&DTS SUBDOM=ALL ALL). Fecha de acceso 04/09/2013.

DUPONT Argentina, Líneas de productos agrícolas, protección de cultivos (2017). [http://www.dupont.com.ar/content/dam/assets/products-and-services/crop-protection/assets/MSDS\\_Coragen\\_v2.pdf](http://www.dupont.com.ar/content/dam/assets/products-and-services/crop-protection/assets/MSDS_Coragen_v2.pdf). Fecha de acceso 31/08/2017.

Enciclopedia Animal, Ovovivíparos, *Cnesterodon decemmaculatus*. <https://enciclopediaanimal.wordpress.com/ovoviparos-pocos-conocidos/cnesterodonde1/>. Fecha de acceso 05/02/2017.

Escalante, A. H. (1983). Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área platense. III. Otras especies. *Limnobiós*, 2(7), 453-463.

Frenzilli, G.; Nigro, M. & Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. Vol. 681(1): 80-92.

Furlong, T.D.; Anderson B.D.; Werner S.L.; Soliven P. P.; Coffey L.J., y Burkhardt M.R., (2001). Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Determination of Pesticides in Water by Graphitized Carbon-Based Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Water-Resources Investigations Report 01–4134.

Frenzilli, G.; Nigro, M. y Lyons, B. (2009). The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutat. Res.* 681: 80–92.

Gil, I.; Martelo, M. M. T.; Macias, M. P.; Moreno, O. y Mendoza, M. C. (2010). Estudio del impacto del cambio climático sobre la agricultura y la seguridad alimentaria en la República Bolivariana de Venezuela. *FAO – INIA*. 3: 64-79.

Gluszczak, L.; Loro, V. L.; Pretto, A.; Moraes, B. S.; Raabe, A.; Duarte, M. F. y De Sousa V. (2011). Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Environmental contamination and toxicology, 61(4), 624-630.

Gómez, S. E. (1996). Resistenza alla temperatura e salinitá in pesci della Provincia di Buenos Aires (Argentina), con implicazioni zoogeografiche. Acti, 4, 171-192.

Gómez, S.; Villar, C., y Bonetto, C. (1998). Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. Environmental Pollution. Vol. 99(2): 159-165.

Halliwell B. y Gutteridge J. (2006) Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford. (4): 78-93.

Halliwell B. (2002). Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? Free Radic Biol Med. 32,10: 968–974.

Hartmann, A.; Schumacher, M.; Plappert-Helbig, U.; Lowe, P.; Suter, W. y Mueller, L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis. Vol.19(1): 51-59.

Huerga, M., y San Juan, S. (2005). El control de las plagas en la agricultura argentina. Banco Mundial/Centro de Inversiones FAO. <http://siteresources.worldbank.org/INTARGENTINAINSPANISH/Resources/InformeDEF14.pdf>. Fecha de acceso 02/05/2016.

Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis. Vol. 23(3): 207-221.

Kassie, F.; Parzefall, W. y Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human Biomonitoring studies. Mutat. Res, 463:13- 31.

Laloy, E. y Biielders, C. L. (2008). Plot scale continuous modelling of runoff in a maize cropping system with dynamic soil surface properties. Journal of hydrology, Vol. 349(3): 455-469.

Lee, S. y Steinert S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, Mutat. Res. 544: 43–64.

Manual de uso responsable de los productos para protección de cultivos Disponible en: <http://www.casafe.org/pdf/2015/DOCUMENTOS/Manual-Uso-Responsable.pdf> Acceso 06/04/2017.

Molero, A. M. y Pisanó, A. (1987). Estadios de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Rev. Bras. Biol, Vol. 47: 115-125.

Martinez-Coscollá, A.; Miralles-Loyola, E.; Garrigues, T.; Sirvent, M.; Salianas, E. y Casabó, V. (1993). Studies on the reliability of a novel absorption-lipophilicity approach to interpret the effects of the synthetic surfactant on drug and xenobiotic absorption. *Arzneim Forsch.* 43: 699-705.

Menéndez Helman, R. J. (2013). Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Mercille, S. y Massie, B. (1994). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering.* 44: 1140-1154.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca. (2013) Argentina. <http://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/Pautas%20sobre%20Aplicaciones%20de%20Productos%20Fitosanitarios%20en%20Zonas%20Periurbanas.pdf>. Fecha de Ingreso 01/04/2017.

Mustafa, S. A.; Kariab, S. S.; Davies, S. J.; y Jha, A. N. (2015). Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis*, 30(1), 107-116.

Navarrete, D.; Gallopín, G.; Blanco, M.; Díaz Zorita, M.; Ferraro, D.; Herzer, H.; Lattera, P.; Morello, J.; Murmis, M.; Pengue, W.; Piñeiro, M.; Podestá, G.; Satorre, E.; Torrent, M.; Torres, F.; Viglizzo, E.; Caputo, M. y Celis, A. (2006). Análisis sistémico de la agriculturización en la pampa húmeda argentina y sus consecuencias en regiones extrapampeanas: sostenibilidad, brechas de conocimiento e integración de políticas. Identificación de lagunas de conocimiento: elementos para la agenda de investigación. United Nations Publications CEPAL. Chile. (Vol. 118): 14-38.

Novotny, V. (1999). Diffuse pollution from agriculture a worldwide outlook. *Water Science and Technology.* Vol. 39 (3): 1-13.

Ortiz-Ordoñez E.; Uría-Galicia E.; Ruiz-Picos R.A.; Sánchez Duran A.G.; Hernández Trejo Y.; Sedeño-Díaz J.E. y López-López E. (2011). Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and

histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 443-452.

Panigatti, J.L. (2010). Argentina 200 años, 200 suelos. INTA Buenos Aires. 66: 109-113.

Pautasso, N.; Poletta, G.; Sasal, C. y Simoniello, M. (2014). Evaluación de daño en el ADN en *Cnesterodon decemmaculatus* generado por el escurrimiento de parcelas experimentales de maíz después de las aplicaciones de plaguicidas. Congreso Iberoamericano de Toxicología C. Rivadavia. *Acta Toxicologica Argentina*. (2014) 22(3):1-55.

Peiretti, R. y Dumanski, J. (2014). The transformation of agriculture in Argentina through soil conservation. *Intern. Soil an Water Conserv. Elsevier*, Vol. 2: 14-20.

Pellacani, C.; Buschini, A.; Furlini, M.; Poli, P. y Rossi, C. (2006). A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic toxicology*. Vol.77(1): 1-10.

Poletta, G. L.; Gigena, F.; Loteste, A.; Parma, M. J.; Kleinsorge, E. C. y Simoniello, M. F. (2013). Comet assay in gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed in vivo to cypermethrin. *Pesticide biochemistry and physiology*. Vol.107(3): 385-390.

Ringuelet, R. A.; Arámburu, R. H. y Alonso de Arámburu, A. S. (1967). Los peces argentinos de agua dulce. *Ecosur*. Vol.2: 389-396.

Roberts T. R., (1972) Ecology of fishes in the Amazon and Congo basins. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, Harvard University* Vol. 143: 117-147.

Russo, L.; Rocco, M.A.; Morescalchi, V. y Stingo. (2004). Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotox. Environ*. 57:168–174.

Sabatini, S.; Rocchetta, I.; Nahabedian, D.; Luquet, C.; Eppis, M.; Bianchi, L. y Molina, M. (2011). Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comp. Biochemistry and Physiology*. C154: 391-398.

Sasal M. C.; Andriulo A. E.; Wilson M. G. y Portela S. I. (2010a). Pérdidas de glifosato por drenaje y escurrimiento en Molisoles bajo siembra directa. *Información Tecnológica*. 21:135-142.

Sasal, M. C.; Castiglioni, M. G. y Wilson, M. G. (2010b). Effect of crop sequences on soil properties and runoff on natural-rainfall erosion plots under no tillage. *Soil and Tillage Research*, 108(1): 24-29.

Sasal, C.; Wilson, M. G.; Santi, M.; Oszust, J. D.; Schulz, G. A.; Pausich, G., & Bedendo, D. (2011). Aplicación del modelo DRASTIC en la cuenca del arroyo Las Conchas, Entre Ríos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(2), 150-158. <http://ria.inta.gov.ar/?p=910> Fecha de Acceso 04/03/2016.

SENASA (2017) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.ciafa.org.ar/informes/>. Fecha de acceso 12/06/2017.

Senigagliesi, C. A. (2012). La agricultura pampeana hoy. Un aporte en el análisis de su sustentabilidad. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. Tomo LXVI, 325-338.

SIIA (2017) Ministerio de Agricultura – Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Disponible en: <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Fecha de acceso 17/04/2017.

Simoniello, M. F.; Gigena, F.; Poletta, G.; Loteste, A.; Kleinsorge, E.; Campana, M.; Scagnetti, J. y Parma, M. J. (2009). Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. Vol.83(2): 155-158.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.

Solomon K. (2010). Ecotoxicological Risk Assessment of Pesticides in the Environment. Chapter 56. In Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology Third Edition EDITED BY Robert Krieger. Academic Press. p1191-1217.

Somma, L.A.; Mastrángelo, M. y Ferrari, L. (2011). Manual de producción de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Ushuaia: Editorial Utopías. ISBN: 978-987-1529-87-2.

Tagliani P.A.; Barbieri E. y Neto A. C. (1992). About a sporadic phenomenon of fish mortality by environmental hypoxia in the Senandes streamlet, S tate of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciencia e Cultura* 44: 404-406.

Tilman D.; Cassman K.G.; Matson P.A.; Naylor R., y Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-676.

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/e43a9ef50f121a8cc2a4c424b41cfb22/source/tree> Fecha de Acceso 04/05/2016.

Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS), Disponible en: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html) Acceso 10/04/2017.

Vera-Candioti; J., Soloneski; S. y Larramendy, M. L. (2013). Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*. Vol. 98: 368-373.

Viarengo, A.; Lowe, D.; Bolognesi, C.; Fabbri, E. y Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.

World Health Organization. (1993). Biological monitoring of chemical exposure in the workplace: guidelines. WHO. Geneva. Vol.I, 237-252.

Zak, M.R.; Cabido, M.; Cáceres, D. y Díaz, S. (2008). What drives accelerated land coverchange in Central Argentina? Synergistic Consequences of Climatic, socioeconomic, and Technological Factors. *Environ. Manage.* 42, 181–189.

Zaugg, S.D.; Sandstrom, M.W.; Smith, S.G. y Fehlberg, K.M., (1995), Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Determination of pesticides in water by C-18 solid-phase extraction and capillary-column gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring: U.S. Geological Survey Open-File Report 95-181, 49 p.

Zhang W.; Ricketts T.H.; Kremen C.; Carney K. y Swinton S.M. 2007. Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecological Economics* 64: 253-260.

Zwart, L. L.; Meerman, J. H.; Commandeur, J. N. y Vermeulen, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1): 202-226.

## **8. Agradecimientos:**

Al INTA por otorgarme la beca de posgrado y los proyectos de investigación que hicieron posible la realización de esta tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por permitirme realizar la carrera de Posgrado Maestría en Salud Ambiental y por brindar las instalaciones y los elementos necesarios para desarrollar las actividades académicas y de investigación.

A la Estación Experimental Agropecuaria Paraná por haberme autorizado al análisis de campo en los distintos procesos productivos y permitir el uso de equipos e instalaciones.

A mi Directora de Tesis Dra. María Fernanda Simoniello, por la dedicación y el tiempo de enseñanza con gran paciencia y confianza.

A mi Codirectora de Tesis Dra. Carolina Sasal, por el apoyo y la oportunidad de integrar el trabajo en los Proyectos de Investigación del INTA.

A mis compañeros del INTA Paraná por todo el apoyo durante estos años, el ofrecimiento desinteresado en la información precisada y su importante colaboración permanente.

A la Dra. Gisela Poletta, a la Lic. Lucía Odetti y demás colaboradores de la Cátedra de Toxicología y Bioquímica Legal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, por las experiencias compartidas y hacerme sentir uno más del equipo.

A mis padres que en la entrega diaria y generosa marcaron un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi maravillosa familia por el incondicional apoyo, mi amor Marina y nuestros seis hijos que son lo más importante y me sostienen para seguir.

Finalmente y lo más importante a Dios, que sin su providencia generosa nada sería posible.

***“Si miramos la superficie, más allá de algunos signos visibles de contaminación y de degradación, parece que las cosas no fueran tan graves y que el planeta podría persistir por mucho tiempo en las actuales condiciones, Este comportamiento evasivo hace que sigamos con nuestros estilos de vida, de producción y de consumo, postergando las decisiones importantes para sanar el daño a nuestra casa común”***

*Papa Francisco, Enc. Laudato si' (Mayo, 2015).*

## **9. Presentaciones en Reuniones Científicas:**

Parte de los resultados obtenidos han sido presentaciones científicas como Poster y Resúmenes

“Evaluación de daño oxidativo en lípidos y ADN en *C. decemmaculatus* generado por escurrimiento de plaguicidas provenientes de cultivos extensivos”. Pautasso N.; Poletta G.; Sasal C.; Simoniello M. (2016). 1ª Reunión Científica Programa Nacional de Recursos Naturales, Gestión Ambiental y Ecorregiones. INTA Ediciones. Colección Investigación, Desarrollo e Innovación (Buenos Aires, Argentina).

“Glyphosate in environmental samples from Argentina”. Beldoménico H.; Repetti M.; Demonte L.; Sasal C.; Pautasso N.; Wilson M. (2015). 5º Workshop Latinoamericano sobre Residuos de Pesticidas (LAPRW 2015, Santiago, Chile).

“Evaluación de daño al ADN en *Cnesterodon decemmaculatus* generado por escurrimiento de plaguicidas provenientes de parcelas experimentales de maíz, trigo y soja”. Pautasso N.; Poletta G.; Sasal C.; Simoniello M. (2015). V Congreso SETAC Argentina 2015 – Sustentabilidad, medio ambiente y compromiso social (Neuquén, Argentina).

“Evaluación de daño en el ADN en *Cnesterodon decemmaculatus* generado por el escurrimiento de parcelas experimentales de maíz después las aplicaciones de plaguicidas”. Pautasso N.; Poletta G.; Sasal C.; Simoniello M. (ATA 2014). III Congreso Iberoamericano de Toxicología. Acta Toxicol. Argent. (2014) 22 (3): 1-55.

“Evaluation of DNA damage in *C. decemmaculatus* generated in runoff from experimental plots of corn after pesticide applications”. Premio MEJOR POSTER otorgado por el Comité Alexander Hollaender de la Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) de los Estados Unidos. UNL. Santa Fe, Argentina 2014.

## **10- Información del Director y Co-director**

### **INFORMACIÓN DEL DIRECTOR**

Nombre y Apellido: María Fernanda Simoniello  
D.N.I.: 20.180.191  
Título: Bioquímica  
Posgrado: Doctorado en Ciencias Biológicas  
Cargo:  
Unidad Académica: Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas - UNL  
Domicilio: Chacabuco 1612 – Santa Fe  
Teléfono: 0342 – 4532952  
Correo Electrónico: [fersimoniello@yahoo.com.ar](mailto:fersimoniello@yahoo.com.ar)  
Currículum: Anexo I

### **INFORMACIÓN DEL CO-DIRECTOR**

Nombre y Apellido: María Carolina Sasal  
D.N.I.: 23.534.635  
Título: Ingeniera Agrónoma  
Posgrado: Doctorado en Agronomía  
Cargo: Coordinadora Proyecto Investigación INTA.  
Unidad: Estación Experimental Agropecuaria Paraná  
Domicilio: Lebensohn 3325 – Paraná  
Teléfono: 0343 – 4455168  
Correo Electrónico: [sasal.maria@inta.gob.ar](mailto:sasal.maria@inta.gob.ar)  
Currículum: Anexo II



## ANEXO I

## Laboratorio de Contaminantes Químicos

Nicolas Repetto y de los Reseros s/n (1686), Hurlingham

Tel: 4621 0446

## Informe de Resultados Análisis de Agua

	LD (mg/lt)	LC (mg/lt)		LD (mg/lt)	LC (mg/lt)		LD (mg/lt)	LC (mg/lt)
2,4-D	0,005	0,01	Carboxin	0,005	0,01	Monocrotophos	0,005	0,01
Abamectin	0,005	0,01	Chlorpyrifos	0,005	0,01	Omethoate	0,005	0,01
Acetamiprid	0,005	0,01	Chlorpyrifos-methyl	0,005	0,01	p,p'-DDD	0,005	0,01
Acetochlor	0,005	0,01	Clofentesine	0,005	0,01	p,p'-DDT	0,005	0,01
Alachlor	0,005	0,01	Cyprodinil	0,005	0,01	Parathion	0,005	0,01
Aldicarb	0,005	0,01	Diazinon	0,005	0,01	Parathion-methyl	0,005	0,01
Aldicarb-sulfone	0,005	0,01	Difenoconazole	0,005	0,01	Permethrin	0,005	0,01
Aldicarb-sulfoxide	0,005	0,01	Dimethoate	0,005	0,01	Phosmet	0,005	0,01
Aldrin	0,005	0,01	Fenvalerate	0,005	0,01	Triazophos	0,005	0,01
Amitraz	0,005	0,01	Fluvalinate	0,005	0,01	Chlorothalonil	0,005	0,01
Atrazine	0,005	0,01	Folpet	0,005	0,01	Coumaphos	0,005	0,01
Azinphos-methyl	0,005	0,01	Gamma-cyhalothrin	0,005	0,01	Cyfluthrin	0,005	0,01
Azoxystrobin	0,005	0,01	Lindane	0,005	0,01	Cyhalothrin lambda	0,005	0,01
Bifenthrin	0,005	0,01	HCH, alpha-	0,005	0,01	Cypermethrin	0,005	0,01
Captan	0,01	0,015	HCH, beta-	0,005	0,01	DDE, p,p'-	0,005	0,01
Carbaryl	0,005	0,01	HCH, delta-	0,005	0,01	DDT, o,p'-	0,005	0,01
Carbendazim	0,005	0,01	Heptachlor	0,005	0,01	Deltamethrin	0,005	0,01
Carbendazim	0,005	0,01	Heptachlor Epoxide	0,005	0,01	Diazinon	0,005	0,01
Carbofuran	0,005	0,01	Hexachlorobenzene	0,005	0,01	Dichlorvos	0,005	0,01
Carbosulfan	0,005	0,01	Malathion	0,005	0,01	Dieldrin	0,005	0,01

	LD (mg/lt)	LC (mg/lt)		LD (mg/lt)	LC (mg/lt)
alpha-endosulfan	0,005	0,01	Methidathion	0,005	0,01
beta-Endosulfan	0,005	0,01	Methomyl	0,005	0,01
Endosulfan sulphate	0,005	0,01	Oxamyl	0,005	0,01
Endrin	0,005	0,01	Penconazole	0,005	0,01
Esfenvalerate	0,005	0,01	irimiphos-ethyl	0,005	0,01
Ethion	0,005	0,01	irimiphos-methyl	0,005	0,01
Ethoprophos	0,005	0,01	Pyraclostrobin	0,005	0,01
Famoxadone	0,005	0,01	Tebuconazole	0,005	0,01
Fenazaquin	0,005	0,01	Thiabendazole	0,005	0,01
Fenitrothion	0,005	0,01	Thiacloprid	0,005	0,01
Fenitrothion	0,005	0,01	Acephate	0,005	0,01
Fenoxycarb	0,005	0,01	Fenpyroximate	0,005	0,01
Fipronil	0,005	0,01	lyphosate+AMF	0,003	0,01
Fludioxonil	0,005	0,01	Hexythiazox	0,005	0,01
Imazalil	0,005	0,01	Paraquat	0,005	0,01
Imidacloprid	0,005	0,01	Propargite	0,005	0,01
Kresoxim-methyl	0,005	0,01	Thiamethoxam	0,005	0,01
Linuron	0,005	0,01	Thiodicarb	0,005	0,01
Lufenuron	0,005	0,01	Triadimenol	0,005	0,01
Metaxyl	0,005	0,01			

Glifosato + AMPA: LC= &lt;0,6µg/l y LD= &lt;0,2µg/l

LD: Limite de detección LC: Limite de cuantificación ND: El resultado es menor al límite de detección. MLC: El resultado se encuentra entre el límite de detección y límite de cuantificación.