

## Evasión y daño oxidativo inducido por clorpirifós al LMR sobre *Eisenia foetida*

Díaz Pineda K.<sup>1</sup>, Paéz Yaruro M.<sup>1</sup>, Marrugo Padilla A.<sup>1</sup>, Márquez Lázaro J.<sup>1</sup>, Méndez Cuadro D.<sup>1</sup>, Rodríguez Cavallo E.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Química Analítica y Biomedicina – Universidad de Cartagena, Sede Zaragocilla, Antiguo Edificio CREAD – Laboratorio 103. Cartagena de Indias - Colombia  
Correo: [erodriguezc1@unicartagena.edu.co](mailto:erodriguezc1@unicartagena.edu.co)

**Palabras Clave:** Inocuidad alimentaria, Dot-blot, Daño oxidativo, Carbonilación

### Introducción

En la ganadería de doble propósito, y bajo el modelo de cría intensiva, los antimicrobianos y plaguicidas se consideran sustancias esenciales para el aseguramiento del bienestar animal. Los primeros suelen emplearse en la prevención y tratamiento de enfermedades, e incluso, en la promoción del crecimiento. En tanto que los segundos son ampliamente usados para el control de plagas, aplicándolos directamente al animal, en el sitio de cría o en las zonas de procesamiento de la leche, promoviendo así la contaminación de los derivados alimentarios, ya sea por absorción dérmica en el animal debido a la elevada liposolubilidad de estos, o por contaminación cruzada [1].

La presencia de estos contaminantes en alimentos esenciales como la carne bovina y la leche, representa una problemática alarmante, debido a la alta demanda de los derivados bovinos, y en particular por la vulnerabilidad de poblaciones altamente sensibles a su consumo, tal como la infantil, tercera edad y madres en gestación. Estas sustancias se han asociado con cansancio, problemas de concentración, neuropatías, tendinopatías, disrupción endocrina y alteraciones neurológicas en sistemas biológicos, entre otros [2, 3].

Por ello, con el fin de evaluar la inocuidad de concentraciones de clorpirifós en torno al LMR establecido en músculo bovino, se evaluó su efecto oxidativo sobre proteínas del músculo, empleando un modelo *in vivo* basado en el anélido *Eisenia foetida*, y utilizando el índice de carbonilo como marcador del daño oxidativo [4].

### Metodología

Siguiendo las directrices indicadas en la guía de la OECD, se estandarizó el ciclo de vida del modelo biológico en el laboratorio, bajo condiciones controladas de sustrato y alimentación. Parámetros físico-químicos como pH, humedad, contenido de carbono y capacidad de retención de agua (n=3), importantes de acuerdo con la guía 207 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico para establecer la idoneidad como sustrato [5-7], fueron evaluados en distintas tierras libres de exposición a las sustancias de interés.

Una vez seleccionado el sustrato, se realizaron experimentos de evasión o migración de lombrices: Este ensayo es una prueba aguda que se desarrolló en 48 horas. Se basó en la evaluación del efecto subletal caracterizado por el comportamiento de evasión de las lombrices; para lo que se midió el número de lombrices que se desplazaron desde un sustrato contaminado a 100 µg.Kg<sup>-1</sup> en clorpirifós (LMR para músculo bovino), y que evaden la exposición migrando al sustrato control (no contaminado). Esta prueba permitió evaluar la funcionalidad del hábitat para la lombriz [8]. El ensayo se llevó a cabo en recipientes plásticos de un litro de capacidad, los cuales se dividieron en dos secciones con una hoja extraíble. En una sección se colocaron 300 g de sustrato contaminado al LMR de clorpirifós y en la otra 300 g de sustrato control. Los suelos fueron humedecidos antes de la realización de los bioensayos, empleándose 3 réplicas con diez lombrices cada una. Estas presentaban el mismo tamaño y madurez sexual. Para iniciar el bioensayo, se extrajo la lámina de plástico y diez lombrices de *E. foetida* se colocaron en la línea media que separaba las dos secciones. Luego de 48 h de exposición, se contó el número de lombrices en cada sección, con un régimen de 16 h luz/8 h oscuridad, temperatura ambiental de 23 ± 2 °C. Para evitar que las lombrices se escapasen de los contenedores, se cubrieron con tapas de plástico transparente con agujeros para permitir el intercambio de gases y paso de la luz.

Asimismo, se evaluó el efecto de la exposición de *E. foetida* a tres concentraciones en torno al LMR de clorpirifós en músculo bovino ( $50, 100$  y  $150 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ). Para ello, 5 lombrices se depositaron en camas que contenían 250g de sustrato no contaminado (control) o sustrato contaminado al 0.5, 1 o 1.5 veces el LMR de clorpirifós. Se ensayaron 3 réplicas por cada experimento, monitorizándose los efectos de la exposición durante 28 días.

Al finalizar los ensayos, se determinó el daño oxidativo causado en las proteínas del músculo de la lombriz. Para ello, se extrajeron las proteínas totales del músculo, cuantificándolas por el método de Bradford, y posteriormente se realizó una electroforesis SDS PAGE al 15% con el fin de verificar la integridad del perfil electroforético, al confrontarla frente a muestras de proteínas no expuestas. El daño oxidativo proteico causado por clorpirifós se midió en términos de carbonilación, empleando el inmunoensayo Dot-blot, y expresando el índice de carbonilos (IC) como nanomoles de carbonilo/mg de proteína. Los perfiles electroforéticos obtenidos se digitalizaron en un fotodocumentador ChemiDoc.

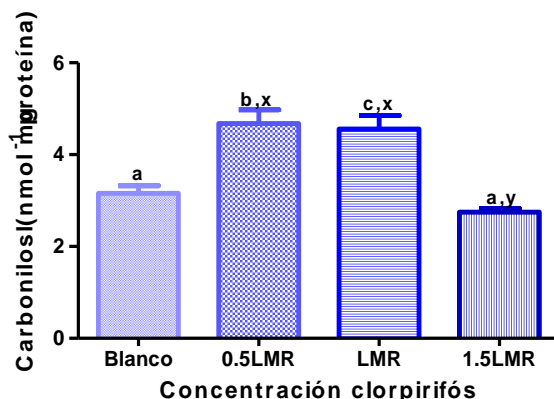
Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. Para la comparación de las medias entre el blanco y los tratamientos se empleó ANOVA de una vía con post-test de Tukey's. El paquete estadístico usado fue GraphPad Prism versión 5.01.

## Resultados

Los resultados obtenidos del ensayo de evasión de sustrato contaminado a  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de clorpirifós (1LMR), mostraron que dicha concentración resultó ser tóxica para el anélido *Eisenia foetida*, dado que el 80% de las lombrices expuestas evitaron el sustrato contaminado, migrando al sustrato control. Por tanto, se estableció que un suelo contaminado al valor del LMR en clorpirifós resulta una concentración no viable para el desarrollo funcional de la lombriz de tierra.

Asimismo, se observó que tras la exposición del modelo animal a sustrato contaminado a distintos niveles de clorpirifós, se observó daño oxidativo en las proteínas musculares de *E. foetida* a todas las concentraciones ensayadas. La cuantificación del índice de carbonilos reveló diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las lombrices expuestas al 0.5 y 1 LMR en clorpirifós y el blanco, siendo éstas 1.5 y 1.4 veces mayores que el blanco, respectivamente (Figura 1).

Asimismo, se estableció que el daño inducido por esos niveles fue significativamente mayor que lo observado tras la exposición a 1.5 LMR, nivel al que tampoco se apreció diferencia estadísticamente significativa con respecto al blanco.



**Figura 1.** Contenido de carbonilo inducido por tres concentraciones de clorpirifós sobre proteínas totales del músculo de la lombriz de *Eisenia foetida*. Se muestran los valores medios ( $n=3$ ) con sus SD. a-b indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido de carbonilo del blanco y los niveles de exposición a contaminantes. x-y indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Estos hallazgos permiten establecer que concentraciones consideradas como inocuas (0.5 y 1.0 LMR) por organismos regulatorios para la presencia de clorpirifós en músculo bovino, inducen daños oxidativos irreversibles sobre macromoléculas fundamentales como las proteínas. Este daño podría comprometer las características nutricionales del alimento y funcionales de las proteínas afectadas, aspectos que disminuirían la valoración del alimento en el mercado y en la cadena alimentaria.

### Conclusiones

La carbonilación promovida por concentraciones 0.5 y 1.0 LMR de clorpirifós sobre proteínas totales del músculo de *Eisenia foetida* fueron significativamente superiores a las obtenidas en el blanco.

Los niveles 0.5 y 1.0 LMR de clorpirifós afectaron la integridad de las proteínas del músculo.

El 80% de las lombrices evitaron el suelo contaminado con CPF al valor del LMR.

El nivel 0.5 LMR indujo la mayor carbonilación ( $p > 0.05$ ), siendo 1.5 veces mayor que el blanco.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias y la Universidad de Cartagena por el apoyo financiero a los proyectos 1107-711-50102 y Actas de Compromiso 088-2018, 120-2018. Johana Márquez-Lázaro y Albeiro Marrugo-Padilla agradecen a Colciencias por las Becas Doctorales 647-2014 y 706-2015, respectivamente.

### Referencias

1. Machado, S., De Queiroz, M., Neves, A., & De Queiroz, J. (2008). Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*. **75**: 1320–1323.
2. Radwan, M., Jurewicz, J., Wielgomas, B., Piskunowicz, M., Sobala, W., Radwan, P., Jakubowski, L., Hawuła, W & Hanke, W. (2015). The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. *Chemosphere* **128**: 42–48.
3. Krzysztof Michalak, Aleksandra Sobolewska-Włodarczyk, Marcin Włodarczyk, Justyna Sobolewska, Piotr Woźniak, and Bogusław Sobolewski. (2017). Treatment of the Fluoroquinolone-Associated Disability: The Pathobiochemical Implications. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**: 8023935.
4. Dasong L., Qixing Z., Yingming X., Chun C. and Ye L., (2012). Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination, *Environmental Pollution* **171**: 46-51.
5. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing of chemicals N° 207 (adoptado en abril de 1984). OCDE, París, 9 pp
6. Gelman, F., Binstock, R., & Halicz, L. (2012). Application of the Walkley-Black titration for the organic carbon quantification in organic rich sedimentary rocks. *Fuel*, 96: 608–610. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.053>
7. OECD. (2015). Guideline for the testing of chemicals-207, (June). Disponible en: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG%20412%20Revised%2016-OCT-2015.pdf>. Último acceso: 15 de abril de 2019.
8. Hund, R.K., Achazi, R., Rômbke, J., Warnecke, D. (2003). Avoidance test with *Eisenia fétida* as indicator for the habitat function of soil. *Journal of Soils and Sediments*. **3**: 7-12.