



**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES EN  
ANFÍPODOS *Hyaella curvispina* COMO  
HERRAMIENTAS POTENCIALES PARA EL  
BIOMONITOREO DE AGUAS  
CONTAMINADAS**

Natacha Carrasco

Directora: Mg. Olga Liliana Anguiano

Co-Directora: Dra. Ana Ferrari

PROBIEN, CONICET-UNCo

Facultad de Ingeniería

Octubre, 2024

# AGRADECIMIENTO

*Quiero agradecer a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta tesis.*

*En primer lugar, agradezco a Dios por darme la perseverancia y fortaleza necesarias para finalizar mi carrera universitaria.*

*A mi esposo y a mi familia, por su apoyo incondicional y comprensión a lo largo de este camino. Sus palabras de aliento y su constante motivación fueron esenciales para superar los desafíos y seguir adelante.*

*A mi directora de tesis, Liliana Anguiano, le estoy inmensamente agradecida por su dedicación, paciencia y valiosa orientación. Su tiempo, esfuerzo y conocimientos fueron cruciales para el desarrollo y culminación de este trabajo. Sin su ayuda, este logro no hubiera sido posible.*

*A mi codirectora, Ana Ferrari, gracias por su valiosa colaboración en este trabajo. Su aporte fue esencial para la culminación exitosa de esta tesis.*

*A mis amigas de toda la vida, gracias por su aliento y por estar siempre a mi lado, brindándome su apoyo y compañía incondicional.*

*A mis compañeros de facultad, con quienes compartí innumerables horas de estudio, alegrías e incluso tristezas que pudimos superar juntos y gracias a ello se convirtieron en nuevos amigos.*

*A todos ellos ¡Muchas gracias!*

# ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Insecticidas neonicotinoides	1
1.1.1 Distribución en el ambiente de los insecticidas NEO	4
1.1.2 Modo de acción de los insecticidas NEO	5
1.2 METABOLISMO DE PLAGUICIDAS	7
1.2.1 Carboxilesterasas (CE)	9
1.2.2 Glutación S-transferasas (GST)	9
1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO	10
1.4 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	12
1.4.1 Catalasa (CAT)	12
1.4.2 Glutación reducido (GSH)	13
1.5 BIOINDICADORES Y BIOMARCADORES	14
1.5.1 <i>Hyalella curvispina</i>	14
1.5.2 Tiacloprid en la Patagonia Norte	16
1.6 OBJETIVOS	16
1.6.1 Objetivo general	16
1.6.2 Objetivos específicos	16
2 MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 MATERIAL QUÍMICO	18
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO	19
2.3 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS	20
2.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	21
2.4.1 Obtención de la fuente enzimática	21
2.4.2 Carboxilesterasa	21
2.4.3 Catalasa	21
2.4.4 Glutación S-transferasa	22
2.4.5 Contenido de glutación reducido	22
2.4.6 Cuantificación de proteínas	22
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1	LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN AGUA PARA CONSUMO HUMANO	24
3.2	RESIDUOS DE INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES EN AGUAS SUBTERRÁNEAS Y SUPERFICIALES EN DIFERENTES SITIOS DE MUESTREO	28
3.3	EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A TIACLOPRID EN ANFÍPODOS <i>H. curvispina</i>	33
3.3.1	Efectos sobre la movilidad	33
3.3.2	Carboxilesterasa	35
3.3.3	Catalasa	37
3.3.4	Glutación S-transferasa	39
3.3.5	Nivel de glutación reducido	41
4	CONCLUSIONES	43
5	REFERENCIAS	44
6	PRESENTACIÓN A CONGRESO	55

## RESUMEN

La actividad frutihortícola en la región de la Patagonia Norte implica el uso intensivo de plaguicidas para combatir las plagas de los cultivos. En la actualidad, uno de los insecticidas más utilizados para controlar a la principal plaga de manzanos y perales, *Cydia pomonella*, es el neonicotinoide tiacloprid. Debido a su persistencia, moderada solubilidad en agua y movilidad ha sido detectado en aguas superficiales y subterráneas cercanas a zonas agrícolas, lo cual constituye un riesgo potencial para las especies de agua dulce que habitan estos ecosistemas.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar biomarcadores de exposición/efecto en dos poblaciones de anfípodos adultos *Hyalella curvispina* como herramientas potenciales para el biomonitoreo de aguas contaminadas con plaguicidas. Esta especie perteneciente al género *Hyalella*, es comúnmente encontrada en los ambientes de agua dulce de Argentina y a lo largo del continente sudamericano como componente numéricamente importante del bento. Estos organismos son considerados buenos indicadores de la contaminación del agua y se los utiliza en bioensayos debido a su sensibilidad a diferentes contaminantes como insecticidas y metales pesados. Los anfípodos adultos fueron recolectados de dos sitios en la Patagonia Norte, Argentina: (1) del lago Los Barreales (LB), lugar de referencia, alejado de la zona de producción agrícola y (2) de un canal de riego secundario en Fernández Oro (FO), localizado en el corazón del área frutihortícola. Se evaluó el efecto de la exposición al insecticida tiacloprid (formulación comercial Calypso®) sobre la inmovilidad y los parámetros bioquímicos enzimáticos carboxilesterasa, catalasa y glutatión S-transferasa y no enzimático glutatión reducido, en ambas poblaciones de anfípodos.

La inmovilidad fue un efecto observado en ambas poblaciones de anfípodos tempranamente luego de la exposición a tiacloprid y se mantuvo hasta el final del ensayo. Las concentraciones efectivas cincuenta ( $CE_{50}$ ) determinadas luego de 96 h de exposición fueron: 0,135 mg/L y 0,137 mg/L de tiacloprid para los anfípodos de LB y FO, respectivamente. La actividad carboxilesterasa de los anfípodos de ambas poblaciones se alteró de manera diferente y dependiente del tiempo por la exposición al insecticida. En los anfípodos de FO la carboxilesterasa se incrementó a las 48 h de exposición al neonicotinoide tiacloprid, cumpliendo un papel más relevante en la detoxificación del insecticida que se relacionaría con la tolerancia descrita previamente para

esta población. La actividad catalasa de los anfípodos del lago LB no se alteró por la exposición al insecticida en los tiempos ensayados. Mientras que, en los anfípodos de FO la exposición a 0,2 mg/L de tiacloprid durante 48 h inhibió significativamente (26%) la actividad catalasa, respecto al valor control. La exposición al insecticida no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima glutatión S-transferasa de los anfípodos del lago LB. Sin embargo, la actividad enzimática de los anfípodos de FO se incrementó significativamente por la exposición a diferentes concentraciones de tiacloprid durante el tratamiento. El incremento de catalasa y glutatión S-transferasa en anfípodos de FO constituiría una respuesta protectora frente al estrés inducido por el insecticida. En ambas poblaciones el contenido de glutatión endógeno no cambió por la exposición al insecticida. Estudios adicionales son necesarios para comprender los mecanismos del estrés oxidativo inducido por tiacloprid en *H. curvispina* y determinar que marcadores del sistema antioxidante podrían emplearse en el biomonitoreo. Por otra parte, la actividad carboxilesterasa podría considerarse como marcador de exposición al tiacloprid en estos anfípodos. Más aún, los resultados obtenidos destacan la importancia de la inmovilidad como un biomarcador de exposición, así como también de efecto del tiacloprid en anfípodos *H. curvispina*.

**Palabras clave:** biomarcadores, crustáceos, neonicotinoide, tiacloprid, inmovilidad, carboxilesterasa, catalasa, glutatión S-transferasa, glutatión reducido.

# ABSTRACT

The horticultural fruit production in the North Patagonia region involves the intensive use of pesticides to manage crop pests. Currently, one of the most commonly used insecticides for controlling the primary pest of apple and pear trees, *Cydia pomonella*, is the neonicotinoid tiacloprid. Due to its persistence, moderate water solubility, and mobility, tiacloprid has been detected in both surface and groundwater near agricultural areas, posing a potential risk to freshwater species inhabiting these ecosystems.

This study aims to evaluate exposure/effect biomarkers in two populations of adult *Hyalella curvispina* amphipods as potential tools for biomonitoring pesticide-contaminated waters. This species, belonging to the genus *Hyalella*, is commonly found in freshwater environments in Argentina and throughout South America, where it constitutes a numerically significant component of the benthos. These organisms are considered effective indicators of water contamination and are utilized in bioassays due to their sensitivity to various contaminants such as insecticides and heavy metals. Adult amphipods were collected from two sites in Northern Patagonia, Argentina: (1) Lake Los Barreales (LB), a reference site distant from agricultural production areas, and (2) a secondary irrigation canal in Fernández Oro (FO), located in the heart of the fruit and vegetable production area. The effects of exposure to the insecticide tiacloprid (commercial formulation Calypso®) on immobility and biochemical parameters, including carboxylesterase, catalase, and glutathione S-transferase enzymes, as well as non-enzymatic reduced glutathione, were assessed in both amphipod populations.

Immobility was observed in both amphipod populations early after exposure to tiacloprid and persisted until the end of the assay. The determined fifty/median effective concentrations (EC50) after 96 hours of exposure were 0.135 mg/L and 0.137 mg/L of tiacloprid for LB and FO amphipods, respectively. Carboxylesterase activity in amphipods from both populations was altered differently and in a time-dependent manner due to exposure to the insecticide. In FO amphipods, carboxylesterase activity increased at 48 hours of exposure to the neonicotinoid insecticide, indicating a more significant role in detoxification, which may be associated with the previously described tolerance in this population. Catalase activity in LB amphipods was not

altered by insecticide exposure at the tested times. Whereas in FO amphipods, exposure to 0.2 mg/L of tiacloprid for 48 hours significantly (26%) inhibited catalase activity compared to the control value. Exposure to the insecticide had no effect on glutathione S-transferase activity in LB amphipods. However, enzymatic activity in FO amphipods significantly increased after exposure to various concentrations of tiacloprid during the treatment. The increase in catalase and glutathione S-transferase activity in FO amphipods could represent a protective response to the stress induced by the insecticide. In both populations, endogenous glutathione content did not change due to insecticide exposure. Further studies are needed to understand the mechanisms of oxidative stress induced by tiacloprid in *H. curvispina* and to determine which antioxidant system markers could be utilized in biomonitoring. Additionally, carboxylesterase activity could be considered a marker of exposure to tiacloprid in these amphipods. The results underscore the importance of immobility as a biomarker of both exposure and effect of tiacloprid in *H. curvispina* amphipods.

**Keywords:** biomarkers, crustaceans, neonicotinoid, tiacloprid, immobility, carboxylesterase, catalase, glutathione S-transferase, reduced glutathione.





# 1 INTRODUCCIÓN

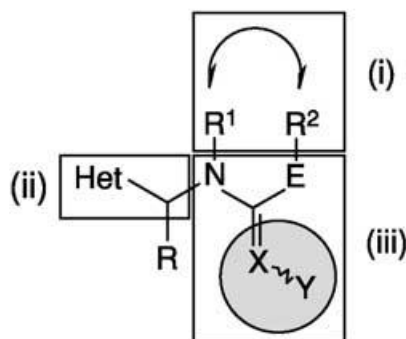
## 1.1 Insecticidas neonicotinoides

Desde su descubrimiento a fines de la década de 1980, los neonicotinoides (NEO) se han convertido en la clase de insecticidas más utilizada en todo el mundo. Estos compuestos son muy efectivos para el control de especies plaga de hemípteros como áfidos, mosca doméstica, trips, chicharrita, saltamontes, algunos micro lepidópteros y ciertas especies plaga de coleópteros y se aplican en una amplia variedad de cultivos. También, se utilizan como ectoparasiticidas para controlar piojos, pulgas y moscas en animales domésticos (gatos y perros) y como biocidas para el control de plagas de invertebrados en la piscicultura. Estos insecticidas se aplican en áreas urbanas para controlar termitas, hormigas, avispas, plagas del césped y cucarachas (Elbert et al., 2008; Jeschke et al., 2011). Los NEO son potentes insecticidas de amplio espectro que actúan por contacto o ingestión y tienen propiedades sistémicas. Sus características fisicoquímicas, principalmente determinadas en función del coeficiente de partición octanol/agua y de la constante de disociación (pKa), permiten el ingreso de estos compuestos en los tejidos de la planta y el transporte a todas sus partes (Bonnatin et al., 2015). Sin embargo, los insecticidas NEO no forman un grupo químico uniforme, varios subgrupos pueden diferenciarse basados en las estructuras moleculares. Estas diferencias químicas se ven reflejadas en la posibilidad de descomposición en el suelo, en el metabolismo de los insectos y en los efectos adversos en abejas y en otros insectos polinizadores. Los compuestos ciano sustituidos son menos tóxicos para abejas que los otros NEO. Mientras que, para insectos acuáticos estos insecticidas son tan tóxicos como los NEO nitroguanidinas (Morrissey et al., 2015).

En general, todos los compuestos desarrollados o comercializados pueden ser clasificados en NEO de cadena abierta y NEO con sistemas de anillos de 5 o 6 miembros que difieren en sus características moleculares. En la estructura de ambos grupos de NEO se pueden distinguir los siguientes segmentos: (i) el fragmento puente ( $R^1-R^2$ ;  $R^1-Z-R^2$ ;  $Z = O, NMe$ ) para los de sistemas de anillos y para los compuestos no cíclicos, los sustituyentes separados ( $R^1, R^2$ ); (ii) el grupo heterocíclico [Het] y la cadena puente ( $-CHR-$ ; si  $R = H$ ; por ej. CPM- $CH_2-$ , CTM y TFM) y (iii) el



grupo funcional (=X-Y) como parte del farmacóforo<sup>1</sup> [-N-C(E)=X-Y] (Fig. 1, Tabla 1) (Jeschke & Nauen, 2005; Jeschke et al., 2011).



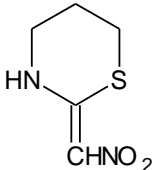
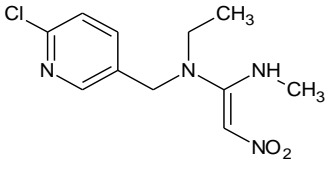
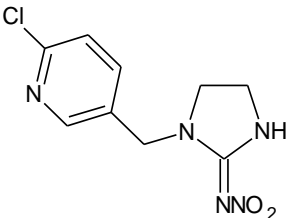
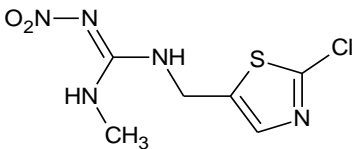
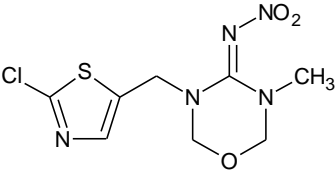
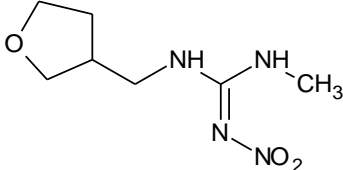
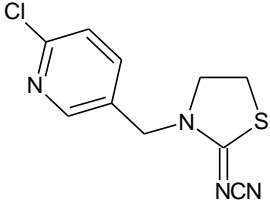
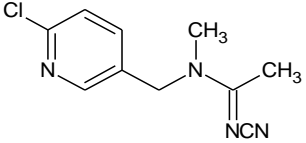
<i>Estructura del Het-CHR-</i>	<i>Nombre químico de esta fracción</i>	<i>Abreviatura</i>
	6-cloro-piridil-3-metil-	CPM
	2-cloro-1,3-tiazolil-5-metil-	CTM
	(+)-6-tetrahidro-furil-3-metil-	TFM

**Fig. 1.** Segmentos estructurales para los insecticidas neonicotinoides (extraída y modificada de Jeschke & Nauen, 2005).

<sup>1</sup> Farmacóforo: es “un conjunto de características estéricas y electrónicas en una molécula que es necesario para asegurar la óptima interacción supramolecular con un blanco biológico específico y para activar (o bloquear) su respuesta biológica” (Wermuth et al., 1998).

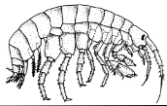


**TABLA 1.** Estructuras químicas de la nitiazina (considerada como la primera generación de los insecticidas NEO) y de compuestos comercializados con distintos farmacóforos.

FARMACÓFOROS [-N-C(E)=X-Y]	TIPOS DE ESTRUCTURAS	
	SISTEMA DE ANILLOS (R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> , R <sup>1</sup> -Z-R <sup>2</sup> )	ESTRUCTURAS NO CÍCLICAS (R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> )
Nitrometilenos (E = S, N) [-N-C(E)=CH-NO <sub>2</sub> ]	 Nitiazina	 Nitenpiram
Nitroguanidinas (E = N) [-N-C(N)=N-NO <sub>2</sub> ]	 Imidacloprid	 Clotianidina
	 Tiametoxam	 (+)-Dinotefuran
Cianominidinas (E = S, Me) [-N-C(E)=N-CN]	 Tiacloprid	 Acetamiprid

Según las estructuras químicas, las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos son:

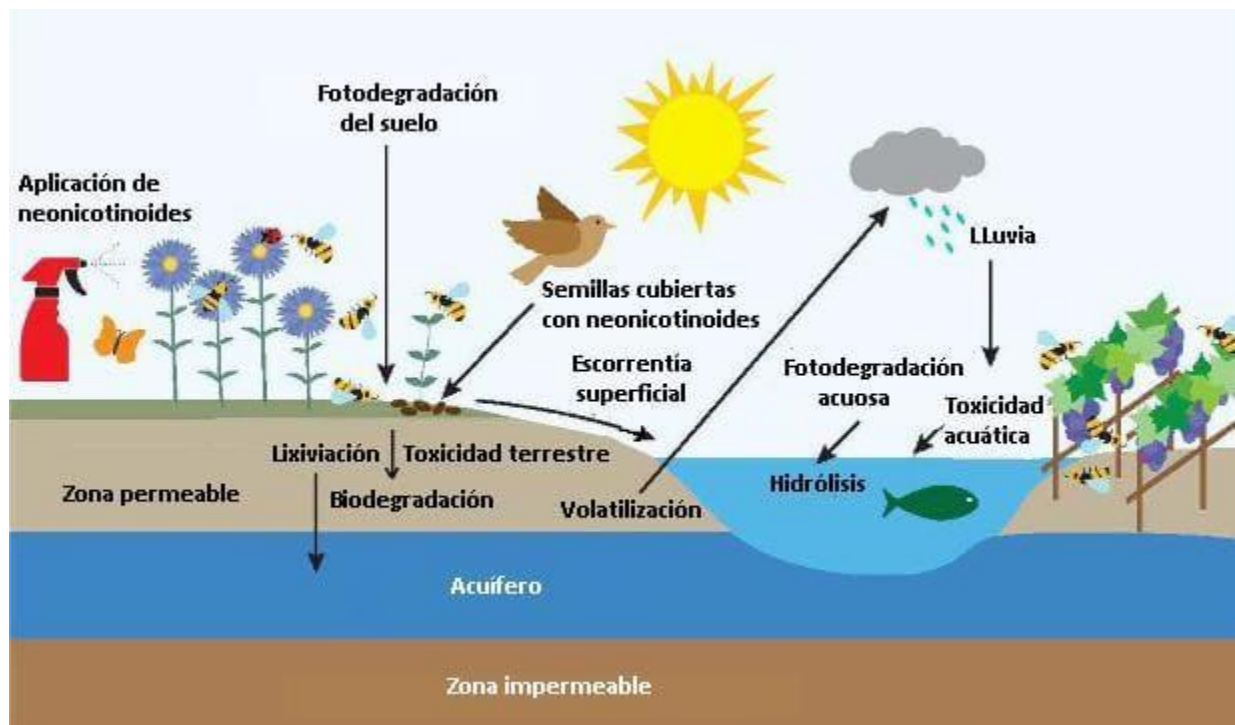
- (a) Los NEO no cíclicos son menos lipofílicos que los correspondientes sistemas de anillos de cinco o seis miembros.



- (b) El grupo funcional (=X-Y) en el farmacóforo [-N-C(E)=X-Y] influye en la solubilidad en agua del NEO y aumenta en el siguiente orden: (=N-NO<sub>2</sub>) < (=N-CN) < (=CH-NO<sub>2</sub>).
- (c) Con respecto a E, la lipofilicidad de la molécula aumenta en el orden NH < O < C < S (Jeschke et al., 2011).

### 1.1.1 Distribución en el ambiente de los insecticidas NEO

Grandes cantidades de NEO se aplican en los cultivos en todo el mundo y una gran proporción de las sustancias aplicadas permanece en el suelo y contamina potencialmente todos los compartimentos del ambiente (Fig. 2) (Kurwadkar & Evans, 2016; Mörtl et al., 2020).



**Fig. 2.** Representación gráfica del destino ambiental y de las vías de exposición a los insecticidas NEO, luego de la aplicación (extraída y modificada de Kurwadkar & Evans, 2016).

En la actualidad, y debido al uso intensivo de los insecticidas NEO, existe una gran preocupación en todo el mundo por los efectos adversos en organismos no blanco terrestres y acuáticos. Numerosos trabajos han demostrado efectos nocivos de estos plaguicidas en diversos organismos invertebrados (Bartlett et al., 2019; Dondero et al., 2010; Krupke et al., 2012; Main et



al., 2021; Qi et al., 2018; Raby et al., 2018a; Sandrock et al., 2014; Stara et al., 2020a) y vertebrados terrestres y acuáticos (Babeová et al., 2017; Gibbons et al., 2015; Kimura-Kuroda et al., 2012). Más aún, la exposición crónica a NEO, a través de la cadena alimentaria, también puede causar efectos adversos en la salud humana (Han et al., 2017; Pan et al., 2022; Wang et al., 2020; Zhang & Lu, 2022).

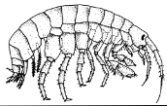
La mayoría de los NEO y sus metabolitos presentan alta solubilidad en agua, son altamente persistentes en suelo y en sedimentos acuáticos se acumulan después de numerosas aplicaciones (Anadón et al., 2020). La retención y la persistencia de estos compuestos en el suelo dependen ampliamente de varios factores que incluyen: contenido de materia orgánica, textura del suelo, pH, temperatura, luz solar, porosidad, tipos y cantidad de insecticidas aplicados, etc. (Bonmatin et al., 2015; Moschet et al., 2014; Xing et al., 2013; Zhou et al., 2021). Tienen vida media larga en suelo y en agua, donde son resistentes a la hidrólisis a pH neutro o ácido en condiciones anaeróbicas; no obstante, pueden ser rápidamente fotodegradados bajo condiciones favorables como, por ejemplo, en aguas poco profundas con suficiente penetración de luz solar. Sin embargo, un aumento en la turbidez del agua puede reducir su fotodegradación (Guzsvány et al., 2006; Morrissey et al., 2015). Debido a su alta solubilidad en agua, estos compuestos son detectados frecuentemente en aguas superficiales y subterráneas en áreas cercanas a zonas de producción agrícola (Van Dijk et al., 2013; Vijver & van den Brink, 2014; Hladik & Kolpin, 2016; Xiong et al., 2019; Zhang et al., 2020; Thompson et al., 2021). La contaminación del agua puede ocurrir a través de múltiples vías y mecanismos, que incluyen aplicaciones de estos compuestos de manera reiterada, deriva, propagación de polvos de semillas tratadas, escorrentía superficial, lixiviación en las aguas subterráneas, descarga en humedales, etc. (De Perre et al., 2015; Schaafsma et al., 2015).

### **1.1.2 Modo de acción de los insecticidas NEO**

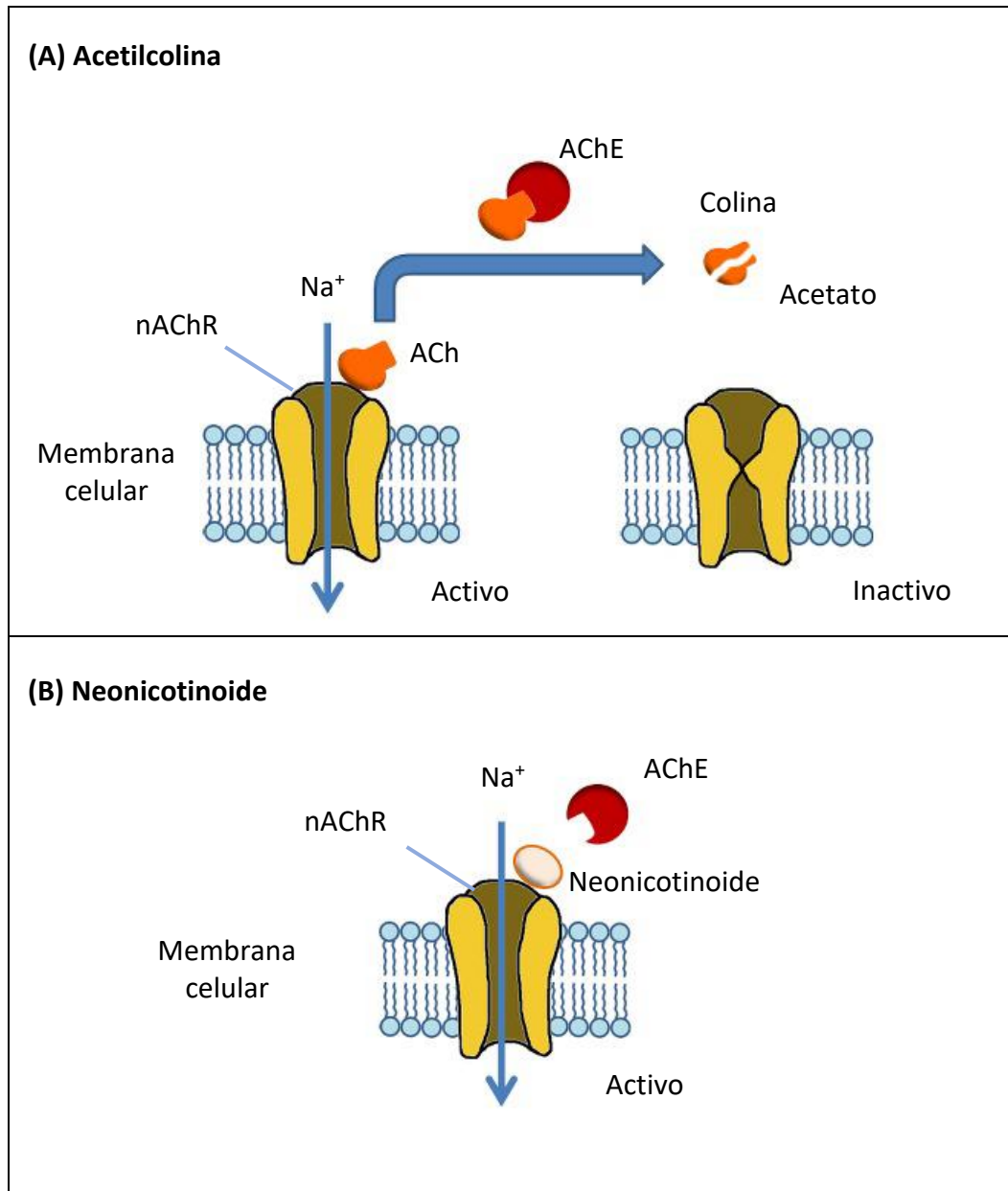
Todos los insecticidas NEO tienen estructuras similares a la nicotina, compuesto alcaloide de origen vegetal tóxico para el humano. Tanto la nicotina como los NEO actúan como agonistas<sup>2</sup> de

---

<sup>2</sup> Agonistas: son compuestos con estructuras similares a los ligandos naturales de los receptores que pueden unirse a éstos y originar una respuesta biológica similar a la que producen los ligandos.



los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en insectos, los cuales cumplen un rol crucial en la transmisión sináptica en el sistema nervioso de estos invertebrados (Fig. 3) (Nauen & Bretschneider, 2002; Kimura-Kuroda et al., 2012; Casida & Durkin, 2013).



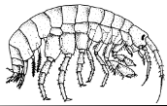
**Fig. 3.** Representación gráfica de la regulación del receptor nicotínico de acetilcolina por la presencia del neurotransmisor acetilcolina **(A)** o de un insecticida neonicotinoide **(B)** (extraída y modificada de Chang, Daugherty, & Mitchell, 2013).



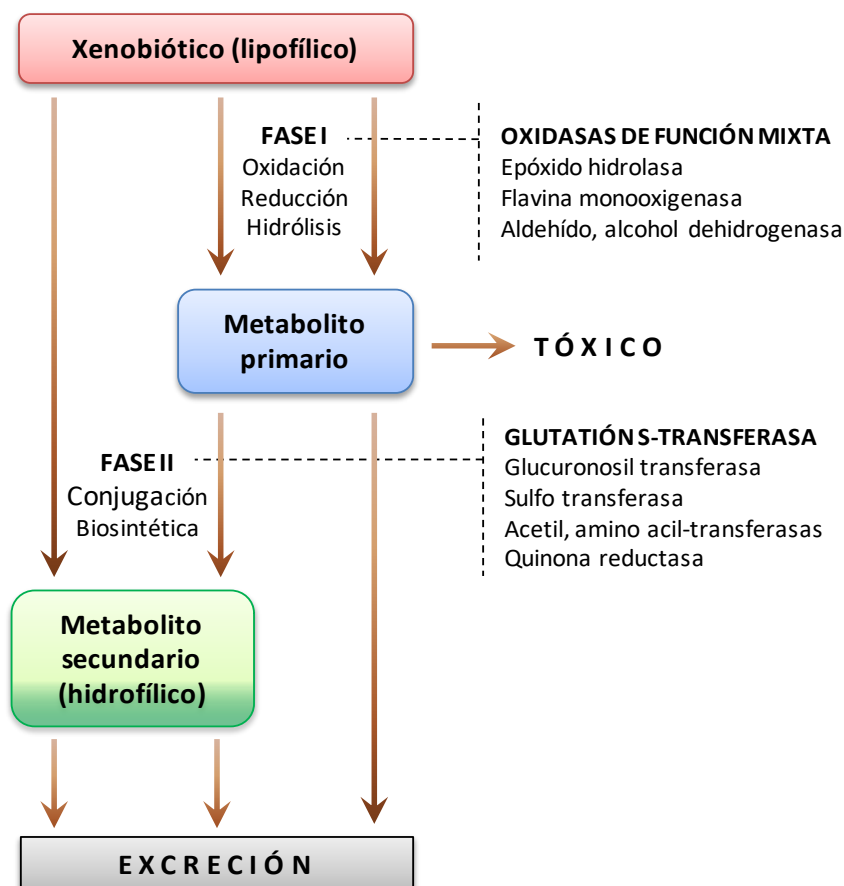
Normalmente, los nAChR, canales iónicos regulados por ligandos, son activados por la unión del neurotransmisor conocido como acetilcolina (ACh). La unión de la ACh induce un cambio conformacional del receptor que produce la apertura del canal y el ingreso de  $\text{Na}^+$  extracelular. La desactivación se produce cuando las moléculas de ACh se disocian de su receptor y son hidrolizadas por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el espacio sináptico. Una vez que su ligando se libera, el nAChR vuelve a su estado inicial de reposo (Fig. 3A). De manera similar a la ACh, los NEO pueden enlazarse y activar a los nAChR pero, lo hacen de manera persistente dado que estos compuestos no pueden ser degradados por la enzima AChE (Fig. 3B). Esta activación persistente causa la sobreestimulación del sistema nervioso que resulta en hiperexcitación, convulsiones, parálisis y, eventualmente, la muerte del insecto (Chang, Daugherty, & Mitchell, 2013). La mayoría de los NEO presentan actividad neurotóxica en los organismos de insectos indeseables y se enlazan mucho más fuertemente a los neuroreceptores de los insectos que a los de los mamíferos (Kimura-Kuroda et al., 2012; Chang, Daugherty, & Mitchell, 2013). En los mamíferos, estos receptores están localizados en los sistemas nerviosos central y periférico, mientras que, en los insectos están localizados en el sistema nervioso central. Las diferencias en las propiedades y estructuras de las subunidades de los nAChR entre insectos y mamíferos explican, en parte, la alta selectividad de estos insecticidas para los artrópodos y la baja toxicidad para vertebrados. A diferencia de la nicotina y de otros nicotinoideos, que están mayoritariamente protonados a pH fisiológico, los NEO no están protonados, pero tienen un grupo funcional nitro o ciano electronegativo. El reconocimiento del agonista por parte del receptor nicotínico en mamíferos implica la interacción catión- $\pi$  para la nicotina y otros nicotinoideos y, posiblemente, un subsitio catiónico para la interacción con el sustituyente nitro o ciano de los NEO en insectos (Tomizawa & Casida, 2005).

## 1.2 METABOLISMO DE PLAGUICIDAS

Un compuesto extraño o xenobiótico es **detoxificado** cuando después de penetrar en un organismo vivo puede ser metabolizado para dar productos menos tóxicos, más solubles en agua y, por lo tanto, fácilmente excretables. Por el contrario, cuando es transformado en sustancias más tóxicas que el compuesto original, el proceso se conoce como **bioactivación** (Anguiano,



2002). Algunos compuestos poseen grupos funcionales adecuados para ser metabolizados directamente por los sistemas enzimáticos de conjugación o de **Fase II**, mientras que otros son metabolizados por un proceso integrado que involucra la acción *a priori* de las enzimas llamadas de **Fase I** (Fig. 4). La primera etapa del metabolismo, desenmascarando o agregando grupos funcionales reactivos, involucra reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis (proceso no sintético) y la segunda fase produce conjugados solubles en agua (proceso sintético) (Matsumura, 1985; George, 1994).



**Fig. 4.** Metabolismo de xenobióticos vía Fase I y Fase II (adaptado de George, 1994).

Las principales enzimas de Fase I que participan en el metabolismo de xenobióticos son las oxidasas de función mixta, hidrolasas y reductasas. La Fase II involucra la conjugación de los





grupos funcionales reactivos con una sustancia endógena, como el ácido glucurónico, el glutatión reducido (GSH), el sulfonato y los aminoácidos, a través de las enzimas correspondientes. Las glutatión S-transferasas (GST) constituyen uno de los grupos enzimáticos de Fase II más importantes. Las Fases I y II actúan a menudo coordinadas, donde el producto de la primera es el sustrato de la segunda (Montagna, 2011).

### **1.2.1 Carboxilesterasas (CE)**

Dentro de las enzimas de Fase I, las hidrolasas cumplen un papel importante en la detoxificación de xenobióticos. Las enzimas CE, hidrolasas como la AChE, hidrolizan un amplio rango de compuestos endógenos y exógenos incluidos plaguicidas (Galloway et al., 2002) y se encuentran en muchos tejidos como hígado, pulmón, intestino delgado, corazón, riñón, músculo, cerebro, tejido adiposo, entre otros. Las CE consisten en múltiples isoenzimas y la expresión y la actividad de estas enzimas depende del organismo y del tejido en el que se expresan (Satoh, 2005; Satoh & Hosokawa, 2006; Wheelock et al., 2008; Wheelock & Nakagawa, 2010; Hatfield et al., 2016;). Además, este sistema de detoxificación es muy eficiente dado que en diferentes especies de invertebrados la sobreexpresión de estas enzimas ha estado asociada a la resistencia desarrollada a plaguicidas (Sogorb & Vilanova, 2002; Wheelock et al., 2008; Wheelock & Nakagawa, 2010; Cui et al., 2015).

### **1.2.2 Glutatión S-transferasas (GST)**

Las GST, principales enzimas de Fase II, son un grupo ampliamente distribuido que catalizan la conjugación de moléculas orgánicas con el grupo tiol del GSH. Como resultado de esta reacción, generalmente, una molécula lipofílica reactiva es convertida en otra soluble en agua mediante un conjugado no reactivo, el cual puede ser fácilmente excretable (Hayes et al., 2005). Las GST, existen en múltiples formas y cumplen un papel esencial en la detoxificación tanto de compuestos endógenos como de xenobióticos reactivos (Hayes et al., 2005) y en la protección de los organismos del daño peroxidativo (Singhal et al., 2015). Estas enzimas actúan de manera coordinada con los sistemas antioxidantes para metabolizar los electrófilos y xenobióticos; algunas de las moléculas involucradas en estos dos principales mecanismos de defensa son



inducidas simultáneamente en respuesta a la exposición a xenobióticos. Tal inducción génica coordinada de algunos componentes del sistema metabolizante de drogas y del sistema de defensa antioxidante ocurre a través de una región regulatoria común denominada “elemento de respuesta antioxidante”, ARE: antioxidant response element (Higgins & Hayes, 2011).

### 1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Todos los organismos aerobios necesitan oxígeno para la producción eficiente de energía, proceso que ocurre en la mitocondria a través de la cadena respiratoria. Esta necesidad enmascara el hecho de que el oxígeno es un gas tóxico mutagénico. Estos organismos sobreviven debido a que han evolucionado sus defensas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2007).

En la cadena respiratoria mitocondrial ocurre una serie de reacciones químicas que posibilitan finalmente la síntesis de adenosina trifosfato (ATP), molécula con enlaces fosfato de alta energía. La etapa final de la cadena es la reducción de una molécula de oxígeno a agua por la cesión de cuatro electrones. La transferencia de electrones al oxígeno molecular se produce en pasos sucesivos de un electrón por vez dando como resultado la generación de algunas **especies reactivas de oxígeno (ERO)** (Fig. 5), sustancias tóxicas con acción deletérea sobre moléculas constituyentes de las células (Scandalios, 2005).

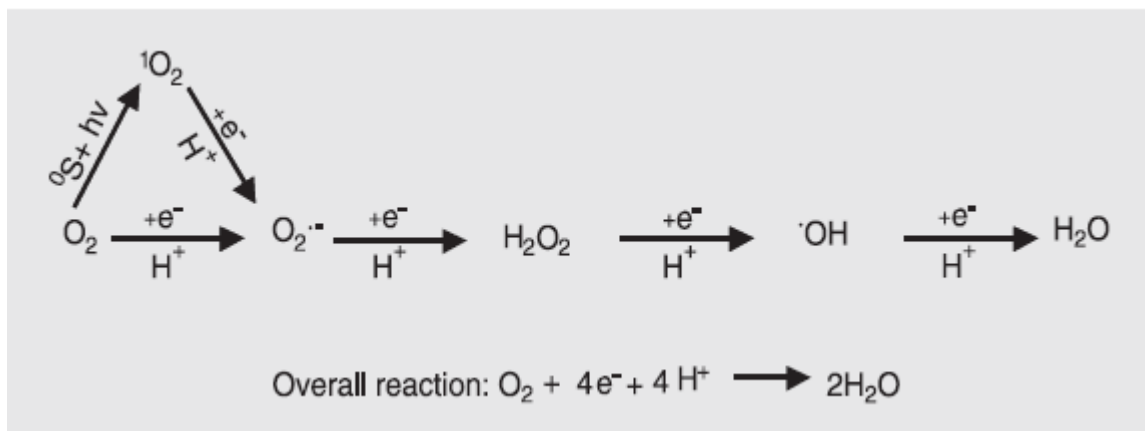
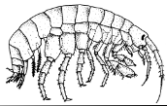


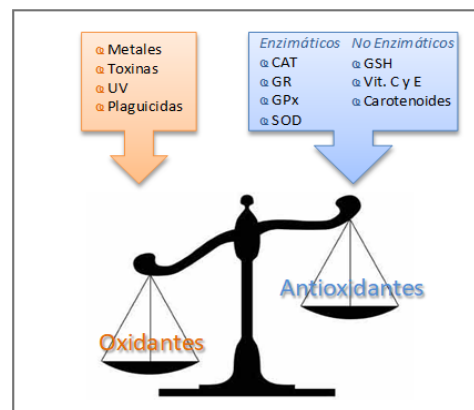
Fig. 5. Formación de ERO durante la reducción de oxígeno a agua (extraído de Scandalios, 2005).

Las ERO comprenden una serie de diversas especies químicas que incluyen tanto a radicales de oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), como a ciertas especies no



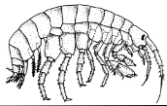
radicales que son agentes oxidantes y/o se convierten en radicales como el ácido hipocloroso (HOCl), el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entre otros. Algunos de estos intermediarios producidos, como el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  o el  $\text{OH}^{\cdot}$ , son extremadamente inestables; mientras que otros, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tienen vida relativamente más larga y difunden fácilmente (Halliwell, 2007; Scandalios, 2005).

Las ERO pueden desempeñar diferentes funciones, incluso opuestas, durante los procesos celulares. Por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas normales, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede tener un papel importante en la transducción de señales y en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa\text{B}$ , entre otros (Sies & Jones, 2020), pero en condiciones de estrés oxidativo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede conducir a la apoptosis -muerte celular programada- o a la necrosis celular. Los niveles de ERO pueden verse incrementados por la presencia de una amplia gama de estímulos ambientales como citoquinas, radiación ultravioleta (UV), agentes quimioterapéuticos, hipertermia, factores de crecimiento y por otros xenobióticos, como plaguicidas, metales pesados, etc. (Scandalios, 2005). Normalmente, las ERO existen en todas las células aeróbicas en equilibrio con antioxidantes bioquímicos. El **estrés oxidativo** ocurre cuando este equilibrio crítico es perturbado por un exceso de ERO, por un agotamiento de antioxidantes o ambos (Sies, 2015) (Fig. 6).



**Fig. 6.** La relación entre la concentración de especies oxidantes y la de antioxidantes determina la probabilidad de que ocurra el estrés oxidativo (extraído y modificado de Reiter, 1998).

Cuando el estrés oxidativo es severo la supervivencia depende de la capacidad de la célula para adaptarse o resistir al mismo y reparar o desplazar las moléculas dañadas. Los cambios asociados



con el daño oxidativo y con el restablecimiento de la homeostasis con frecuencia conducen a la activación o al silenciamiento de genes que codifican factores de transcripción regulatorios, enzimas de defensa antioxidante y proteínas estructurales (Reiter, 1998; Scandalios, 2005).

Diversos trabajos informan la capacidad de los insecticidas NEO de causar estrés oxidativo en organismos acuáticos (Ge et al., 2015; Hong et al., 2020; Malev et al., 2012; Vieira et al., 2018; Wang et al., 2020).

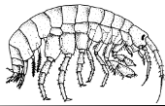
#### **1.4 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Dado que las ERO son sustancias químicas muy reactivas que pueden reaccionar y dañar cualquier componente celular de manera no específica, los organismos aerobios desarrollaron un **sistema de defensa antioxidante** para protegerse. Este sistema mantiene en equilibrio los niveles de ERO, permitiéndoles desempeñar sus funciones biológicas sin producir daños mayores (Circu & Aw, 2010; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los antioxidantes pueden ser de naturaleza endógena o exógena, los endógenos a su vez pueden ser clasificados como enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas antioxidantes incluyen a: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la GST. Los antioxidantes no enzimáticos se clasifican en antioxidantes de origen metabólico y antioxidantes provenientes de los nutrientes. Los antioxidantes metabólicos pertenecen al grupo de los endógenos, los cuales son producidos por el metabolismo en el cuerpo e incluyen al ácido lipoico, el GSH, la L-arginina, la coenzima Q10, las proteínas quelantes de metales, etc. Mientras que los antioxidantes de los nutrientes pertenecen a los exógenos; son compuestos que no pueden ser producidos por el cuerpo y deben ser provistos a través de los alimentos o suplementos alimentarios como por ejemplo las vitaminas E y C, carotenoides, elementos traza (selenio, manganeso, cinc), flavonoides, etc. (Pham-Huy et al., 2008; Shinde et al., 2012).

##### **1.4.1 Catalasa (CAT)**

La primera enzima antioxidante en ser caracterizada fue la CAT, una oxidoreductasa que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta enzima es ubicua y está presente en procariotas y eucariotas (Bravo et al., 1999; Klotz et al., 1997). La CAT se encuentra principalmente en los peroxisomas, pequeñas organelas que, además de CAT, contienen SOD, la cual cataliza la transformación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

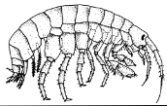


La acción coordinada de las enzimas CAT y SOD impide la formación del radical  $\text{OH}^{\bullet}$ , por lo cual protegen a las células de los subproductos tóxicos generados en la reducción del  $\text{O}_2$  (Halliwell, 2006).

#### 1.4.2 Glutati3n reducido (GSH)

El tripéptido glutati3n ( $\gamma$ -glutamyl-cisteína-glicina) es el compuesto tiolado de baja masa molecular más abundante en células eucariotas que participa en numerosas funciones celulares, como en la detoxificación de xenobi3ticos electrofílicos y de las ERO (Minatel et al., 2018; Ventura-Lima, Bogo, & Monserrat, 2011). Esta biomolécula mantiene un entorno redox intracelular óptimo para el correcto funcionamiento de las proteínas celulares (Circu & Aw, 2010). El GSH reacciona no enzimáticamente de forma rápida con las ERO y participa en reacciones catalizadas por enzimas dependientes de GSH (GSH peroxidasas, glutati3n reductasa y GST). El GSH reducido es la forma biológica activa que es oxidado a disulfuro de glutati3n (GSSG) durante el estrés oxidativo, y la relación GSH/GSSG resulta una medida simple y conveniente del estrés oxidativo celular. Aproximadamente, el 90% del total del GSH celular se mantiene en la forma reducida (Circu & Aw, 2010).

Una disminuci3n significativa del 20 al 30% en el contenido end3geno de GSH puede afectar la capacidad de defensa celular contra la acci3n t3xica de los oxidantes y deja expuesta a la célula a la peroxidaci3n lipídica (Jokanović, 2001). Las biomembranas y organelas subcelulares son particularmente sensibles al ataque oxidativo debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en sus fosfolípidos de membrana.



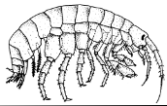
## 1.5 BIOINDICADORES Y BIOMARCADORES

Actividades productivas como la explotación hidrocarburífera, la minería, la agricultura sumadas al acelerado desarrollo de la industria, han aumentado la cantidad de desechos y compuestos tóxicos que se liberan al ambiente. El biomonitoreo es el uso sistemático de organismos para evaluar los cambios causados en un ecosistema por contaminación ambiental. El biomonitoreo aborda tanto la exposición a contaminantes como las respuestas biológicas a ellos; por tanto, puede utilizar especies *bioindicadoras* así como *biomarcadores* (Nikinmaa, 2014). Los *bioindicadores* son organismos vivos como plantas, plancton, animales vertebrados e invertebrados, que se utilizan para evaluar los efectos adversos de la contaminación de los ecosistemas (Nikinmaa, 2014; Parmar, Rawtani & Agrawal, 2016). Los *biomarcadores* son parámetros bioquímicos, celulares, fisiológicos o conductuales que pueden ser medidos en tejidos o en muestras de fluidos del organismo entero y proveen evidencias de la exposición (biomarcadores de exposición) y/o de efectos (biomarcadores de efecto) a uno o más químicos tóxicos (Barbieri & Zigiotta, 2018; Domingues et al., 2010).

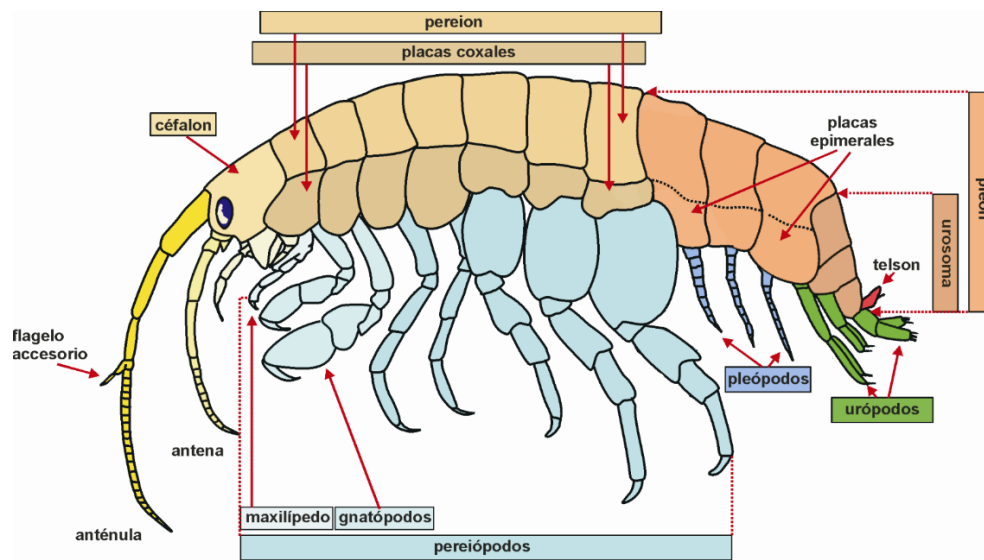
### 1.5.1 *Hyaella curvispina*

Un organismo empleado para realizar biomonitoreo de ambientes acuáticos, es el crustáceo anfípodo *Hyaella curvispina*, perteneciente al género *Hyaella*, especie encontrada comúnmente en los ambientes de agua dulce de la Argentina como componente numéricamente importante del bentos. Esta especie autóctona se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país y en el continente sudamericano (De los Ríos-Escalante et al., 2012; Peralta, 2001). Los anfípodos son fáciles de coleccionar, manipular y mantener bajo condiciones de laboratorio razón por la cual son muy utilizados en estudios de fisiología y comportamiento. Estos organismos son detritívoros, carnívoros y herbívoros que viven sobre rocas, algas y otros vegetales de arroyos, ríos, lagunas y lagos de la Patagonia Norte y de manera similar a otras especies de *Hyaella*, cumplen un rol importante en los ecosistemas dulceacuícolas al facilitar la transferencia de energía a través de la cadena alimentaria (Anguiano et al., 2014, 2017; Colla & César, 2019).

Los anfípodos, en su mayoría pequeños (2,5 a 20 mm de longitud sin considerar las antenas), carecen de caparazón, poseen ojos compuestos sésiles, las primeras y segundas antenas están

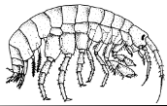


bien desarrolladas. De los siete pares de patas que poseen estos anfípodos (Fig. 7), los tres pares anteriores son pleópodos y se usan para la natación y ventilación (Barnes, 1991; González & Watling, 2003; Grosso & Peralta, 1999). Generalmente, intercalan la natación con la reptación y la excavación; al abandonar el sustrato, el impulso natatorio inicial depende de un movimiento abdominal hacia atrás. La propulsión natatoria es el resultado de la actividad de los pleópodos y, en varios grupos, de los urópodos. La locomoción reptante depende de las patas, pero si el animal necesita desplazarse con rapidez sobre el fondo también usa los pleópodos e inclina su cuerpo hacia un lado (Barnes, 1991).



**Fig. 7.** Morfología de un anfípodo gamárido (extraído de Mazé, 2015).

Los anfípodos, y en particular las especies del género *Hyalella*, son empleados en estudios toxicológicos y considerados útiles para evaluar la contaminación en sedimentos y en agua (Braghirolli, Oliveira, & Oliveira, 2016; Javidmehr et al., 2015; Zubrod et al., 2019). Varios trabajos han informado sobre los efectos toxicológicos de plaguicidas en anfípodos *H. curvispina* (Anguiano et al., 2014, 2017; Jergentz et al., 2004; Mugni et al., 2016; Sansiñena et al., 2018).



### 1.5.2 Tiacloprid en la Patagonia Norte

En la región de la Patagonia Norte, la actividad frutihortícola conlleva al uso de plaguicidas para combatir las plagas de los cultivos. Residuos de éstos han sido detectados frecuentemente en aguas superficiales y subterráneas de la región. Más aún, se han detectado plaguicidas que no se usaron a campo, pero sí en tratamientos poscosecha en la industria (Loewy et al., 2006, 2011; Macchi et al., 2018).

En la actualidad, uno de los insecticidas NEO utilizados en la región de la Patagonia Norte, para combatir a la principal plaga de frutas de pepita (*Cydia pomonella*), es el neonicotinoide tiacloprid. Debido a su persistencia, solubilidad moderada en agua y movilidad ha sido detectado en aguas superficiales y subterráneas en diferentes lugares del mundo, lo cual constituye un riesgo potencial para las especies de agua dulce que habitan estos ecosistemas (Borsuah et al., 2020; Pietrzak et al., 2019; Zhang et al., 2020). En este sentido, estudios recientes han informado efectos de estos insecticidas sobre biomarcadores en organismos acuáticos (Mörtl et al., 2020; Piner Benli & Çelik, 2021; Stara et al., 2021; Vehovszky et al., 2015; Velisek & Stara, 2015). Por lo tanto, es importante evaluar los efectos de la exposición a tiacloprid en parámetros bioquímicos de especies acuáticas autóctonas como los anfípodos *H. curvispina*, a fin de seleccionar los más relevantes para ser utilizados como biomarcadores en estudios de biomonitoreo ambiental.

## 1.6 OBJETIVOS

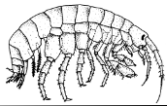
### 1.6.1 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es evaluar biomarcadores de exposición/efecto en dos poblaciones de anfípodos de la especie *H. curvispina* como herramientas potenciales de biomonitoreo de aguas contaminadas con plaguicidas.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Recolectar y aclimatar anfípodos *H. curvispina* provenientes del Lago los Barreales (zona de referencia) y de un canal de riego de Fernández Oro, localizado en una zona de aplicación de plaguicidas.





- Realizar bioensayos para evaluar el efecto de la exposición al insecticida tiacloprid (formulación comercial Calypso®) sobre la inmovilidad y los biomarcadores enzimáticos carboxilesterasa, catalasa y glutatión S-transferasa y no enzimático glutatión reducido en ambas poblaciones de anfípodos adultos *H. curvispina*.
- Investigar en bibliografía datos de contaminación por insecticidas NEO de aguas superficiales y subterráneas en el mundo.
- Analizar la legislación Provincial, Nacional e Internacional vigente respecto a las concentraciones máximas permitidas de residuos de insecticidas NEO en agua para consumo humano.
- Adquirir habilidades en el manejo de técnicas de laboratorio y en el uso del equipamiento disponible.



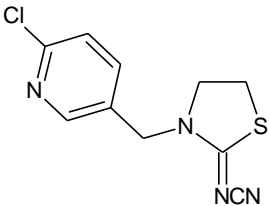
## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL QUÍMICO

El DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico-), la albúmina de suero bovino (ASB), el glutatión reducido (GSH), el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), el ioduro de acetilcolina (ACh) y el *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NFB) se compraron al laboratorio SIGMA Chemical Company, St Louis, USA, y los fosfatos en MERCK, Darmstadt, Alemania. La solución Follin Ciocalteu, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) en Anedra.

El formulado comercial de tiacloprid (Calipso<sup>®</sup>, Bayer) se compró en una agroquímica de la Patagonia Norte. Este insecticida es utilizado para el control de un amplio espectro de plagas tales como: pulgón verde y gusano del duraznero, pulgón rojo, carpocapsa, chicharrita, pulgón del algodón, pulgón del nogal, entre otras. Las propiedades físicas y químicas del tiacloprid se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas del insecticida tiacloprid<sup>a</sup>.

Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S
Estructura química	
Nombre según IUPAC	[3-([6-cloro-3-piridinil]metil)-2-tiazolidinildeno]cianamida
Masa molar	252,72 g/mol
Coefficiente Kow (20 °C)	1,26
Solubilidad en agua (20 °C)	185 mg/L
TD <sub>50</sub> en suelo (condiciones aeróbicas)	0,3 a 3, 8 días
TD <sub>50</sub> en campo	2,4 a 27,4 días
TD <sub>50</sub> en agua (condiciones aeróbicas)	10 a 63 días
TD <sub>50</sub> en agua en condiciones anaeróbicas	365 días

<sup>a</sup> Las características químicas y los tiempos de degradación/disipación (TD<sub>50</sub>) se obtuvieron de PubChem y USEPA, 2003.



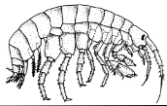
## 2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Anfípodos adultos de la especie *H. curvispina* se recolectaron de dos sitios diferentes, localizados en la Patagonia Norte, Argentina. El primer sitio de recolección es el lago Los Barreales (LB), localizado a 120 km de la zona más cercana de producción frutícola en el valle de Río Negro y Neuquén (sitio de referencia, 38°30'43.9"S, 68°57'42.8"W). El segundo sitio es un canal secundario de riego de Fernández Oro (FO), ciudad ubicada en una zona de intensa producción frutícola en el valle de Río Negro y Neuquén (área de aplicación de plaguicidas, 38°58'19.8"S, 67°56'54.5"W) (Fig. 8).



**Fig. 8.** Imágenes satelitales de las dos regiones de recolección de los anfípodos *H. curvispina*. **A.** Lago Los Barreales (LB, sitio de referencia, 38°30'43.9"S, 68°57'42.8"W). **B.** Canal secundario de irrigación de Fernández Oro (FO, área agrícola, 38°58'19.8"S, 67°56'54.5"W).

Los anfípodos se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante 2 semanas antes de comenzar los ensayos (Anguiano et al., 2017; USEPA, 1996). Cada población se colocó en peceras aireadas con agua del sitio de recolección. Periódicamente se reemplazó parcialmente el agua de las peceras por agua filtrada y declorinada. Para su alimentación se utilizó alimento para peces (TetraMin) y una planta vascular, que además le sirve como sustrato (Fig. 9).

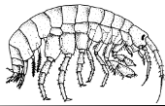


**Fig. 9.** Anfípodos *H. curvispina* provenientes de FO alimentándose con elodea en el laboratorio de acuáticos (foto cedida por la Dra. María Emilia Rodríguez Araujo).

### 2.3 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

La toxicidad del formulado comercial tiacloprid se evaluó en ambas poblaciones de *H. curvispina* siguiendo el protocolo de toxicidad aguda para gamáridos establecido por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 1996). Los ensayos se llevaron a cabo durante 48 y 96 h en condiciones estáticas a una temperatura constante de  $20 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12:12 h de luz/oscuridad y aireación constante en cada una de las fuentes experimentales con dosificadores individuales para satisfacer los requerimientos de oxígeno (Anguiano et al., 2017). Grupos de 20 anfípodos se colocaron en 1 L de agua declorinada con o sin tiacloprid en fuentes de vidrio de 19 cm de diámetro.

Estudios previos realizados por Anguiano et al. (2008, 2014, 2017) encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad y en la respuesta bioquímica a insecticidas entre las poblaciones de anfípodos *H. curvispina* del LB y de FO, con una población del área agrícola altamente tolerante a aquellos xenobióticos. Por lo tanto, los anfípodos provenientes de los dos sitios de recolección se expusieron a diferentes concentraciones del insecticida (LB: 0; 0,02; 0,07; 0,2; 2,0; y 20 mg/L y FO: 0; 0,02; 0,2; 2,0; 20,0; y 100 mg/L de tiacloprid). Los ensayos se realizaron tres veces en diferentes días y todas las concentraciones y los controles se hicieron por duplicado en cada ensayo.



La supervivencia y la inmovilidad se monitorearon diariamente y se informaron y descartaron los organismos muertos cada día. El criterio de mortalidad utilizado fue la ausencia de movimiento de pleópodos durante 20 segundos, observada bajo lupa estereoscópica (Anguiano et al., 2008; 2017).

## 2.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

### 2.4.1 Obtención de la fuente enzimática

Luego de los ensayos de toxicidad aguda, todos los anfípodos sobrevivientes a los tratamientos realizados se almacenaron en freezer hasta la realización de las determinaciones bioquímicas. Por cada concentración realizada se tomaron al menos 3 muestras de dos anfípodos cada una a las 48 y 96 h de exposición. Se homogenizaron dos anfípodos adultos en 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 143 mM, pH 7,4 más 6,3 mM EDTA con un homogeneizador Biogen PRO-200. El homogenado se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 min, y el sobrenadante posmitocondrial se usó como fuente enzimática (Anguiano et al., 2014; Kirilovsky et al., 2022).

### 2.4.2 Carboxilesterasa

La actividad de la enzima CE se determinó siguiendo la técnica de Caballero de Castro et al. (1991), con modificaciones. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de Na 100 mM, pH 8,0, acetona 5%, 1 mM de *p*-NFB y 60  $\mu\text{L}$  de la preparación enzimática. La actividad se monitoreó continuamente a 400 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. La actividad enzimática se expresó como actividad específica, definida como la miliunidad internacional de actividad enzimática por miligramo de proteína (mUI/mg prot), y se usó el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol (18,6  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

### 2.4.3 Catalasa

La actividad de la enzima CAT se midió de manera cinética mediante el método de Beers y Sizer (1952). El método se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la enzima presente en el homogenado. La reacción se realizó en 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de 50 mM, pH 7 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  35 mM. Se controló la estabilidad de la absorbancia de la línea de base y se agregaron 40  $\mu\text{L}$  del



sobrenadante a 10.000 x g para iniciar la reacción enzimática. Se registró de manera continua la disminución en la absorbancia a 240 nm. La actividad enzimática se expresó como actividad específica y para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar de  $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **2.4.4 Glutación S-transferasa**

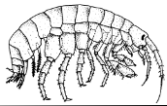
La habilidad de la enzima GST para catalizar la conjugación con CDNB se determinó usando el procedimiento de ensayo descrito por Habig et al. (1974) y modificado por Anguiano et al. (2014). La actividad GST se determinó en un volumen final de 600  $\mu\text{L}$  buffer fosfato 0,1 M, pH 6,5, CDNB 0,5 mM disuelto en acetonitrilo y GSH 2,5 mM como sustratos y entre 20 a 30  $\mu\text{L}$  del sobrenadante como fuente enzimática. El aumento en la absorbancia se registró continuamente a 340 nm y se corrigió por la reacción espontánea. Cada muestra se midió por triplicado. La actividad GST específica se expresó como mUI/mg prot. Los moles de CDNB conjugados se calcularon usando el coeficiente de extinción molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **2.4.5 Contenido de glutación reducido**

Para determinar el contenido de GSH reducido se homogenizaron dos anfípodos adultos a 4 °C en 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 143 mM, pH 7,4 y EDTA 6,3 mM. El homogenado crudo se mezcló con ácido tricloroacético al 10% en una relación 1:1 (v/v) y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. El GSH se midió inmediatamente como tioles solubles en ácido, (modificado de Ellman, 1959 por Anguiano et al., 2014; Ferrari et al., 2009), en 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante más 100  $\mu\text{L}$  de DTNB 1,5 mM en 0,25 M de buffer fosfato de potasio pH 8. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y se midió la absorbancia a 412 nm. Los tioles solubles en ácido se cuantificaron utilizando una curva de calibración con GSH puro como estándar y el contenido de GSH se expresó como nmoles/mg prot.

#### **2.4.6 Cuantificación de proteínas**

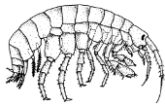
El contenido total de proteínas en cada muestra se determinó de acuerdo con el método de Lowry et al. (1951). Se midió la absorbancia a 750 nm y el contenido de proteínas se determinó mediante una curva estándar de albúmina bovina sérica.



## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon los promedios  $\pm$  error estándar de los parámetros bioquímicos analizados. Los datos de las actividades enzimáticas y del contenido de GSH después de 48 y 96 h de exposición a tiacloprid se analizaron por ANOVA factorial considerando el tiempo de exposición y la concentración de los tóxicos como factores independientes. Se analizó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se usó el test a posteriori de la mínima diferencia de Fisher (LSD) para evaluar las diferencias estadísticas entre los anfípodos control y expuestos en cada una de las poblaciones y para valorar las diferencias estadísticas en los valores controles entre ambas poblaciones (Anguiano et al., 2017).

Las concentraciones efectivas cincuenta ( $CE_{50}$ ) para el parámetro inmovilidad, y sus correspondientes intervalos de confianza, se calcularon aplicando análisis probit mediante el uso del programa PriProbit desarrollado por el Dr. Sakuma en la Universidad de Kioto, Japón (Sakuma 1998).



## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN AGUA PARA CONSUMO HUMANO

En 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho humano al abastecimiento de agua y a su saneamiento. Todas las personas tienen derecho a disponer de forma continua de cantidades suficientes de agua salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable para el uso personal y doméstico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), como autoridad internacional en salud pública y calidad del agua, lidera los esfuerzos mundiales para prevenir las enfermedades transmitidas por el agua y asesora a los gobiernos sobre el establecimiento de metas y reglamentos basados en la salud. La OMS elabora una serie de directrices sobre la calidad del agua, en particular para consumo humano, el uso sin riesgos de las aguas residuales y la calidad del agua para fines recreativos. Además, la OMS publica las directrices para la calidad del agua, basadas en la gestión de riesgos y, desde 2004, las Guías para la calidad del agua de consumo humano, que establecen un marco para el uso del agua potable (Truque, 2005).

Las normas mínimas de calidad del agua para consumo humano incluyen características físicas (turbidez, olor, color y sabor), características químicas clasificadas en compuestos inorgánicos (As,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , alcalinidad total,  $\text{Cl}^-$ , Cd, Pb, pH, etc.) y compuestos orgánicos (benceno, tolueno,  $\text{CCl}_4$ , cloruro de vinilo, plaguicidas, etc.) y características microbiológicas (bacterias coliformes, *Escherichia coli*, etc.). En este trabajo solamente se analizarán las regulaciones de plaguicidas en agua para consumo y se compararán entre la OMS versus países de América (Tabla 3). En general, los plaguicidas legislados son en su mayoría herbicidas, fungicidas e insecticidas organoclorados, fosforados y carbamatos; en la actualidad, ninguno de los países citados ni la OMS, presentan límites permitidos de insecticidas NEO.





**Tabla 3.** Comparación de límites máximos permitidos de plaguicidas ( $\mu\text{g/L}$ ) en agua para consumo en países de América versus la OMS.

PLAGUICIDAS	OMS <sup>b</sup>	PAÍSES DE AMÉRICA <sup>a</sup>										
		Argentina	Brasil	Canadá	Chile	Costa Rica	Ecuador	El Salvador	Estados Unidos (USEPA)	Honduras	Perú	
Alacloro	20	---	20	---	---	20	---	2	2	20	20	
Aldicarb	10	---	10	---	---	10	---	3	---	10	10	
Aldrin	0,03	0,03	0,03	---	---	0,03	0,03	0,03	---	0,03	0,03	
Dieldrin	---	---	---	---	0,03	0,03	---	---	---	---	---	
Atrazina y metabolitos cloro-s-atrazina	100	---	2	5	---	2	---	2	3	2	2	
Carbofurán	7	---	7	---	---	7	---	5	40	5	7	
Clordano	0,2	0,3	0,2	---	---	0,2	0,03	0,2	2	0,2	---	
Clorpirifos	30	---	30	90	---	---	---	21	---	---	30	
2,4-D	30	100	---	100	30	30	100	300	70	30	30	
DDT + metabolitos	1	1	1	---	2	2	1	0,1	---	2	1	
Diclorprop	100	---	---	---	---	100	---	100	---	100	100	
Dimetoato	6	---	---	20	---	---	---	5	---	---	6	
Dinoseb	---	---	---	---	---	---	---	---	7	---	---	
Endrin	0,6	---	0,6	---	---	---	0,2	---	2	---	0,6	
Fenoprop	9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	9	
Glifosato	---	---	500	280	---	---	---	700	700	---	---	
Hidroxiatrazina	200	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Heptacloro	---	0,1	---	---	0,03	---	---	0,4	0,4	0,03	0,03	



Heptacloro epóxido	---	---	---	0,1	0,2	0,2	0,03	---		
Isoproturon	9	---	---	---	9	---	---	9		
Lindano	2	3	2	3	0,2	0,2	2	2		
Malatión	---	35	---	---	140	---	---	---		
Mecroprop	10	---	---	---	10	---	10	10		
Metolaclo	10	---	10	---	10	---	10	10		
Metoxicloro	20	30	---	30	20	40	20	20		
Metil paratión	---	7	---	7	100	---	---	---		
Oxamil	---	---	---	---	200	200	---	---		
Paratión	---	35	---	35	---	---	---	---		
Picloram	---	---	---	---	500	500	---	---		
Simazina	2	---	---	---	2	4	2	---		
2,4,5-T	9	---	---	2	9	---	---	9		
Terbutilazina	7	---	---	---	---	---	---	7		
Toxafeno	---	---	---	5	---	3	---	---		
Trifluralina	20	---	20	---	5	---	20	20		
Referencias	OMS	Artículo 982 CAA (2021)	Portaria 2914 (2011)	Health Canada (2022)	Decreto 735 Chile (2010)	Decreto 38924-S (2015)	CPE INEN 005-9-1 (1992)	NSO 13.07.01:97 El Salvador (1998)	Acuerdo N°084 (1995)	DIGESA (2010)

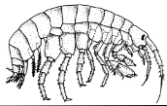
<sup>a</sup>Límites máximos permitidos o de residuo: la máxima concentración de residuo legalmente permitida de un plaguicida o mezcla de plaguicidas.

<sup>b</sup>Valores guía: representa la concentración de un contaminante que no causa daño significativo para la salud durante toda la vida.



Como ya se mencionó anteriormente, los NEO son una clase de insecticidas, relativamente nuevos, de uso intensivo en varias regiones agrícolas del mundo por su eficacia para el control de un amplio espectro de insectos chupadores y algunos insectos masticadores. Debido a su modo de acción, a su presencia ubicua y a su alta persistencia en el ambiente estos insecticidas poseen un alto riesgo para el ecosistema, la vida silvestre y la salud humana (Thompson et al., 2020). En particular, su uso ha generado una creciente preocupación debido a los efectos negativos que tienen sobre los polinizadores, especialmente las abejas, y sobre los ecosistemas acuáticos. En este sentido, la Unión Europea en el año 2018 prohibió todos los usos al aire libre de los insecticidas NEO clotianidina, imidacloprid y tiametoxam por sus efectos adversos en abejas melíferas (EFSA, 2018). Además, la Unión Europea en 2020 no renovó la aprobación del tiacloprid, debido al riesgo potencial que presenta como disruptor endócrino (EU, 2020). En este contexto, la regulación de estos compuestos debería ser un tema crítico en el mundo.

Al analizar la Tabla 3, se observa que los países del continente americano tienen estándares comparables de residuos de plaguicidas en agua para consumo, de acuerdo con los estándares establecidos a través de las Guías para la Calidad del Agua Potable de la OMS. Sin embargo, se demuestra que existen diferencias substanciales entre los países ya que los niveles y parámetros permitidos para el agua potable varían en los reglamentos, estándares y su aplicación en cada país. Por ejemplo, sólo Estados Unidos regula al dinoseb, fungicida de amplio espectro, mientras que la OMS no lo incluye en las regulaciones debido a que es poco probable que se encuentre en agua potable. Otro contaminante que puede encontrarse es el glifosato, un herbicida ampliamente utilizado en el mundo y en particular en la Argentina. Dado que la OMS considera que los niveles de glifosato presentes en el agua potable son muy inferiores a los que implican un riesgo para la salud, no establece un valor guía. Sin embargo, Estados Unidos y El Salvador establecen un nivel máximo de 700 µg/L, Brasil 500 µg/L y Canadá 280 µg/L de glifosato, el cual resulta ser el valor más estricto; mientras que, la Argentina no lo regula. Para atrazina y/o sus metabolitos la OMS establece un máximo de 100 µg/L, mientras que, Brasil, El Salvador, Honduras y Perú 2 µg/L y Canadá 5 µg/L, valores mucho más bajos que el establecido por la OMS y que reflejan una gran preocupación en estos países por los efectos de este herbicida. Otro insecticida que está regulado en la mayoría de los países informados en la tabla 3 es el metoxicloro, usado



en vegetales, frutas, árboles, forraje, así como también en animales de granja. Chile, El Salvador, Honduras y Perú toman el valor establecido por la OMS (20 µg/L), Argentina y Ecuador 30 µg/L y Estados Unidos 40 µg/L, el mayor valor establecido que implica una menor restricción regulatoria para este contaminante. Solamente tres países de los listados regulan al insecticida malatión que son: Argentina (35 µg/L), El Salvador (140 µg/L) y Canadá (200 µg/L), es decir, la Argentina tiene un límite mucho más estricto lo cual refleja una mayor preocupación por los efectos de este insecticida organofosforado en la salud. En resumen, El Salvador es el país con más plaguicidas regulados y, en general, sus límites son más pequeños que los de la OMS; mientras que, Canadá solo presenta los límites de plaguicidas que se han encontrado en los suministros de agua potable, en niveles que podrían presentar un riesgo para la salud humana. Para concluir, es necesario generar legislación sobre los nuevos plaguicidas, así como también la revisión y la actualización periódica de los límites máximos permitidos basados en nuevas investigaciones científicas y en datos de toxicidad. Además, es urgente la regulación del uso de los NEO en Argentina y en el mundo a fin de mitigar los efectos ambientales adversos de estos insecticidas, principalmente el efecto sobre polinizadores. Es esencial que los organismos reguladores continúen con el monitoreo y con la evaluación de la evidencia científica disponible a fin de desarrollar políticas públicas que protejan tanto la salud humana como el medio ambiente.

### **3.2 RESIDUOS DE INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES EN AGUAS SUBTERRÁNEAS Y SUPERFICIALES EN DIFERENTES SITIOS DE MUESTREO**

Los plaguicidas juegan un papel muy importante en la agricultura moderna, pero su uso no está libre de riesgos para organismos no blanco. Estos compuestos ingresan en los ecosistemas acuáticos desde zonas agrícolas a través de diferentes procesos como: la deriva de la pulverización, la escorrentía terrestre, la deposición atmosférica y la erosión del suelo (Wang et al., 2023). Desde la introducción en el mercado de los insecticidas NEO se ha incrementado su uso en todo el mundo y debido a sus propiedades fisicoquímicas, que favorecen la persistencia de estos compuestos en condiciones ambientales, y a su alta toxicidad para un amplio rango de invertebrados acuáticos surge la necesidad de monitorear regularmente sus residuos en aguas superficiales y subterráneas de áreas cultivadas. Recientemente se ha encontrado un trabajo de



Argentina con datos de residuos de NEO en un ecosistema acuático, en el Valle de Uco, Mendoza (Iturburu et al., 2024). También, existen numerosos trabajos que informan la presencia de estos insecticidas en cuerpos de agua, de otras regiones del mundo, en cantidades que a veces exceden los valores de referencia<sup>3</sup> lo que implica un riesgo potencial para los organismos que habitan esos ecosistemas acuáticos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentraciones máximas (ng/L) de varios insecticidas NEO detectadas en aguas de diferentes países.

SITIOS DE MUESTREO	ACET	CLO	IMI	TIAC	TIAM	REFERENCIAS
Aguas superficiales de áreas hortícolas (Suecia).	410	-----	15.000	trazas	160	Kreuger et al., 2010.
Ríos y afluentes cercanos a la ciudad de Osaka (Japón).	-----	12	7	-----	3,2	Yamamoto et al., 2012.
Aguas superficiales del Río Guadalquivir (España).	-----	-----	19,2	-----	-----	Masía et al., 2013.
Old Mans Creek, cercano a la ciudad de IOWA (USA).	-----	257	42,7	-----	185	Hladik & Kolpin, 2016.
Humedales de áreas cultivadas con canola (Canadá).	54,4	3.110	67,9	-----	1.490	Main et al., 2014.
Arroyo del Este (alrededores de Sydney).	190	110	320	400	170	Sánchez-Bayo & Hyne, 2014.
Aguas superficiales cercanas a campos de maíz, Ontario (Canadá).	-----	43,6	-----	-----	16,5	Schaafsma et al., 2015.
Aguas para beber del medio oeste agrícola de USA.	ND	57,3	39,5	ND	4,15	Klarich et al., 2017.

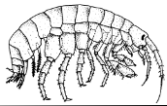
<sup>3</sup> Valor de referencia o valor guía: especifica la concentración más alta de un producto químico en aguas superficiales a la cual no se esperan efectos negativos.



Río Sydenham (Canadá).	1,52	182	39,1	-----	79,8	Struger et al., 2017.
Aguas superficiales del Río Maumee (USA).	-----	225,6	102,8	-----	74,8	Hladik et al., 2018.
Aguas superficiales cercanas a Ontario (Canadá).	100	970	11.000	2	2.700	Raby et al., 2018a.
Aguas superficiales de áreas cultivadas en Belize.	4	ND	14	3	ND	Bonmatin et al., 2019.
Aguas superficiales del río Yangtze, China.	2,50 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	4,37 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	Mahai et al., 2019.
Aguas superficiales cercanas a Guangzhou (China).	157	47,6	249	ND	52,4	Xiong et al., 2019.
Aguas superficiales del río Pearl, China.	36 <sup>a</sup>	25,3 <sup>a</sup>	78,3 <sup>a</sup>	1,17 <sup>a</sup>	50,2 <sup>a</sup>	Yi et al., 2019.
Aguas superficiales del río Elkhorn, USA.	ND	49	81	ND	ND	Borsuah et al., 2020.
Aguas superficiales de la ciudad de Hangzhou, China.	34,4	29,5	31,7	ND	29,6	Lu et al., 2020.
Aguas superficiales del Río Beijiang (China).	67,6	67,2	180	12,4	102	Zhang et al., 2020.
Aguas de humedales del centro y sur de Nebraska (USA).	ND	8	3	ND	ND	Schepker et al., 2020.
Aguas residuales de Atenas, Grecia.	ND	ND	ND	ND	401	Rousis et al., 2021.
Agua de bebida de China.	0,47	0,73	1,76	ND	1,2	Zhang et al., 2021.
Concentraciones promedio de NEO de 10 países con intensa actividad agrícola.	23,36	222,32	119,54	11,49	59,75	Wang et al., 2023.
Río San Carlos, Valle de Uco (Mendoza, Argentina).	0,722	-----	191,63	-----	ND	Iturburu et al., 2024.

Abreviaturas: ACE: acetamiprid, CLO: clotianidina, IMI: imidacloprid, TIAC: tiacloprid, TIAM: tiametoxam y ND: no detectado.

<sup>a</sup>Concentración promedio.



En la República Argentina, la Resolución 934/2010 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)<sup>4</sup> establece los requisitos que deben cumplir los productos y subproductos agropecuarios para consumo interno. En la misma se establece el Límite Máximo de Residuo o Tolerancia (LMR) definido como la máxima concentración de residuo legalmente permitida de un plaguicida, en los alimentos y piensos (tanto en el interior como en la superficie) cuando los plaguicidas se aplican correctamente conforme a las buenas prácticas agrícolas. Acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam son los insecticidas NEO cuyos LMR están determinados. No obstante, no se encontró legislación de valores de referencia de calidad de agua para consumo humano y para la protección de la vida acuática.

La USEPA y otras jurisdicciones han establecido valores de referencia de imidacloprid y otros NEO para la vida acuática. Considerando invertebrados acuáticos, el valor USEPA de referencia de toxicidad aguda para imidacloprid es 0,385 µg/L y el de toxicidad crónica es 0,01 µg/L. Canadá tiene un único valor guía de calidad de agua para este insecticida y es 0,23 µg/L. Los valores de referencia para exposiciones aguda y crónica de la Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia son 0,2 y 0,067 µg/L de imidacloprid, respectivamente. Para el Consejo de Ministros del Medioambiente de Canadá (CCME) el valor guía de la calidad de agua dulce, para la protección de la vida acuática, es 230 ng/L de imidacloprid (CCME, 2007). Mientras que, la Legislación Nacional Holandesa establece un valor de la concentración promedio anual de imidacloprid en agua dulce de 8,3 ng/L (Smit, 2014). Si bien todavía hay incertidumbre, investigaciones independientes y evaluaciones regulatorias de otros países sugieren que los valores de referencia de la USEPA para el imidacloprid y otros NEO en aguas superficiales pueden ser sustancialmente altos, dado que las concentraciones máximas sugeridas podrían causar daño a los invertebrados acuáticos y a sus hábitats. Es importante considerar que estos organismos son esenciales para los ecosistemas de agua dulce dado que son presas de peces, pájaros y otras especies; trituran, retienen nutrientes, mantienen la biodiversidad, etc. Por lo tanto, los efectos sobre estos organismos acuáticos podrían causar daños indirectos a especies de peces y aves, incluidas especies protegidas (Hoyle & Code, 2016; Roodt, Schaufelberger & Schulz, 2023).

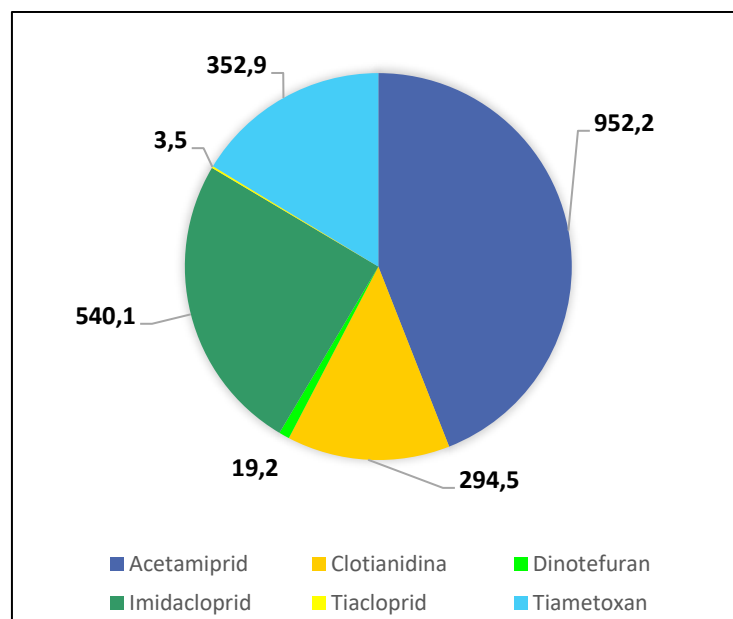
---

<sup>4</sup> <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-934-2010-177593/texto>



Al analizar la Tabla 4 se observa que el insecticida imidacloprid es el NEO más frecuentemente detectado en aguas superficiales, de áreas cercanas a zonas de intensa actividad agrícola, y en concentraciones mayores al valor USEPA de referencia de exposición crónica (10 ng/L). Más aún, en la mayoría de los lugares estudiados se han determinado concentraciones superiores al valor de referencia más conservador (8,3 ng/L) de la Legislación Holandesa. Otro de los insecticidas que ha sido detectado comúnmente en agua es la clotianidina, y en numerosas ocasiones las concentraciones determinadas superaron ampliamente el valor USEPA de exposición crónica (50 ng/L, USEPA, 2021). Main et al. (2014) y Raby et al. (2018b) determinaron concentraciones potencialmente dañinas de tiametoxam, que superaron ampliamente el valor de referencia de toxicidad crónica (740 ng/L, USEPA, 2021).

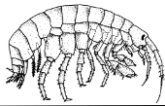
La aplicación de insecticidas NEO está aumentando en el mundo, en particular, la Argentina importó 2.162,4 tn de NEO durante el año 2023 (Fig. 10) (SENASA, 2024)<sup>5</sup>. Por lo tanto, se requiere el urgente monitoreo de residuos de estos compuestos en cuerpos de agua dado que su presencia podría causar efectos adversos en poblaciones de invertebrados acuáticos.



**Fig. 10.** Importaciones de insecticidas NEO de Argentina, expresadas en toneladas, durante el año 2023.

<sup>5</sup> [importaciones terapicos 2023 - senasa.xls](#)

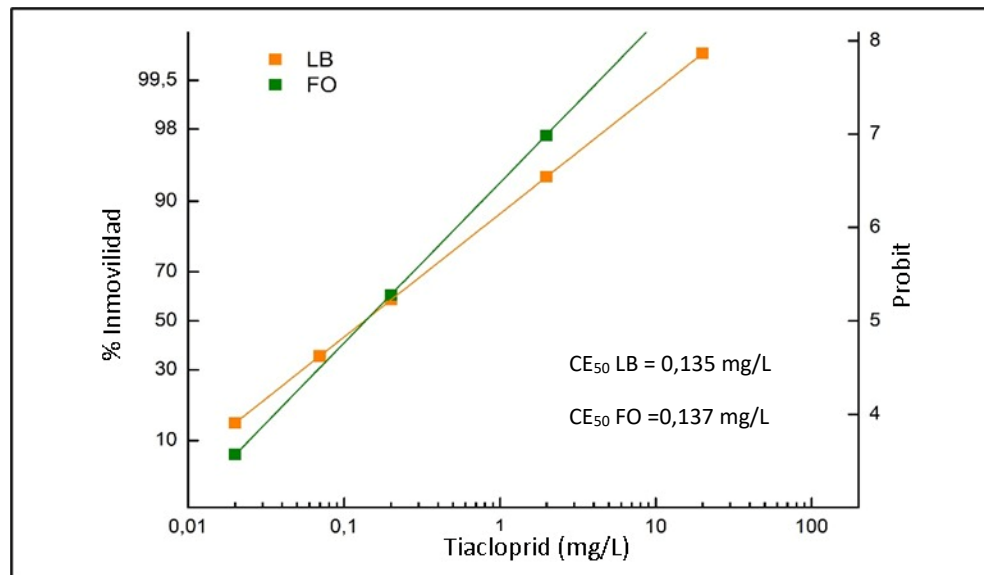




### 3.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A TIACLOPRID EN ANFÍPODOS *H. curvispina*

#### 3.3.1 Efecto sobre la movilidad

El efecto del tiacloprid sobre la movilidad de anfípodos adultos de *H. curvispina* se evaluó en los ensayos de exposición aguda en laboratorio. En la Fig. 11 se presentan los datos de las regresiones probit para el parámetro inmovilidad determinado en los anfípodos *H. curvispina* del lago LB y de FO expuestos a concentraciones crecientes del insecticida tiacloprid.



**Fig. 11.** Regresión probit para la inmovilidad de anfípodos *H. curvispina* del lago Los Barreales (LB) y de un canal de riego secundario de Fernández Oro (FO) expuestos a tiacloprid durante 96 h.

Ambas poblaciones presentaron una respuesta similar en la inmovilidad y las concentraciones efectivas cincuenta ( $CE_{50}$ ) determinadas fueron 0,135 (0,726 - 2,297) mg/L y 0,137 (0,642 - 2,601) mg/L de tiacloprid para los anfípodos del lago LB y de FO, respectivamente (Fig. 11). Los intervalos de confianza del 95% para las  $CE_{50}$  se determinaron por regresión probit.

La inmovilidad se observó a concentraciones más bajas que aquellas a las que presentaron mortalidad, como se aclara cuando comparamos las concentraciones letales cincuenta ( $CL_{50}$ ) con las  $CE_{50}$ . Las  $CL_{50}$  96 h determinadas por Kirilovsky et al. (2021) para los anfípodos *H. curvispina* del lago LB y de FO fueron 0,424 y 44,2 mg/L de tiacloprid, respectivamente. La población de FO, área agrícola, mostró un valor de  $CL_{50}$  que resultó ser 2 órdenes de magnitud mayor que el de LB,



área de referencia. Por lo tanto, los anfípodos de FO resultaron ser más tolerantes al tiacloprid. Sin embargo, al evaluar el parámetro inmovilidad no se observaron diferencias en la respuesta entre las dos poblaciones examinadas. De manera similar, Raby et al. (2018b) determinaron que las  $CL_{50}$  fueron significativamente mayores a las  $CE_{50}$  (inmovilidad) en insectos de los órdenes eferomópteros y dípteros expuestos a tiacloprid durante 96 h.

En la Tabla 4 se presentan valores de  $CE_{50}$  para el tiacloprid en invertebrados acuáticos. Al analizar los datos presentados se pueden observar diferencias entre y dentro de las especies en el efecto inmovilidad causado por la exposición al insecticida. En general, se observa variabilidad en las concentraciones que causan el 50% de inmovilidad en diferentes especies de insectos y de crustáceos anfípodos. Las  $CE_{50}$  determinadas en este trabajo para anfípodos *H. curvispina* resultaron ser aproximadamente 5 veces mayores que la establecida para *Hyalella azteca*. Mientras que, el valor informado de la  $CE_{50}$  de larvas de insectos *Stenelmis sp* resultó similar al obtenido para ambas poblaciones de *H. curvispina* y la  $CE_{50}$  de larvas del insecto *Chironomus dilutus* resultó ser 4 órdenes de magnitud menor.

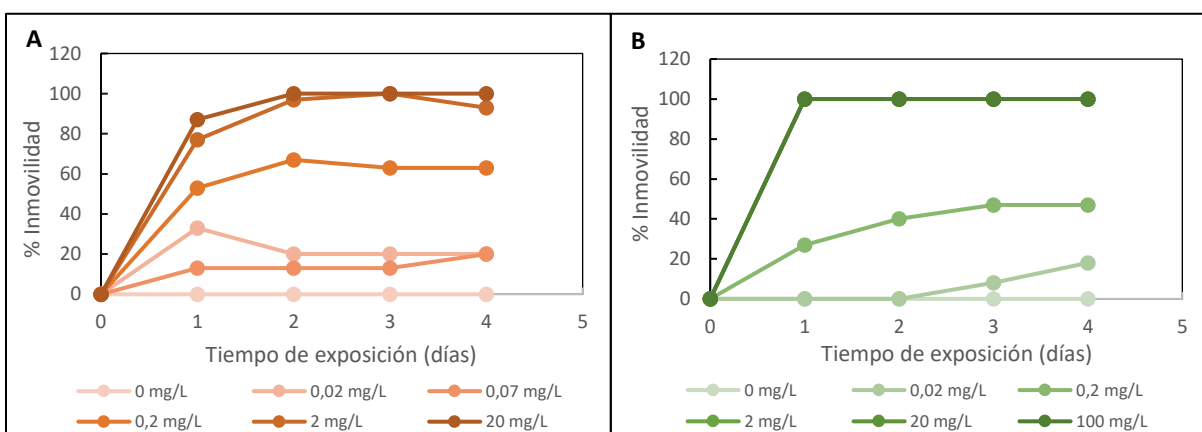
**Tabla 4.** Comparación de  $CE_{50}$  de invertebrados acuáticos expuestos al NEO tiacloprid.

ESPECIE	$CE_{50}$ (mg/L)	REFERENCIAS
Anfípodos		
<i>Hyalella azteca</i>	0,027 (0,02 - 0,03)	Raby et al. (2018b).
<i>Hyalella curvispina LB</i>	0,135 (0,07 - 0,23)	Este trabajo.
<i>Hyalella curvispina FO</i>	0,137 (0,06 – 0,26)	Este trabajo.
Insectos		
<i>Chironomus dilutus</i>	$8 \times 10^{-4}$ ( $7 \times 10^{-4}$ – $9 \times 10^{-4}$ )	Raby et al. (2018b).
<i>Isonychia bicolor</i>	0,006 (0,005– 0,007)	Camp & Buchwalter (2016).
<i>Stenelmis sp</i>	0,129 (0,09 – 0,17)	Raby et al. (2018b).
Oligoqueto		
<i>Lumbriculus variegatus</i>	0,012 (0,008 – 0,016)	Raby et al. (2018b).

Los NEO son altamente tóxicos para los macroinvertebrados acuáticos; generalmente, los insectos son más sensibles a estos insecticidas que los crustáceos (Morrisey et al., 2015). En este



trabajo, se observaron espasmos musculares e inmovilidad inmediatamente después de la exposición a tiacloprid en anfípodos de ambas poblaciones. La inmovilidad, dependiente de la concentración, se mantuvo durante todo el tiempo de exposición (Fig. 12). Resultados similares se observaron en larvas del insecto *Isonychia bicolor* expuestas durante 96 h al NEO imidacloprid (Camp & Buchwalter, 2016). También, se observó inmovilidad en ninfas de efímeras expuestas durante 96 h a 0,1 y 0,2  $\mu\text{g/L}$  de imidacloprid (Roessink et al., 2013).

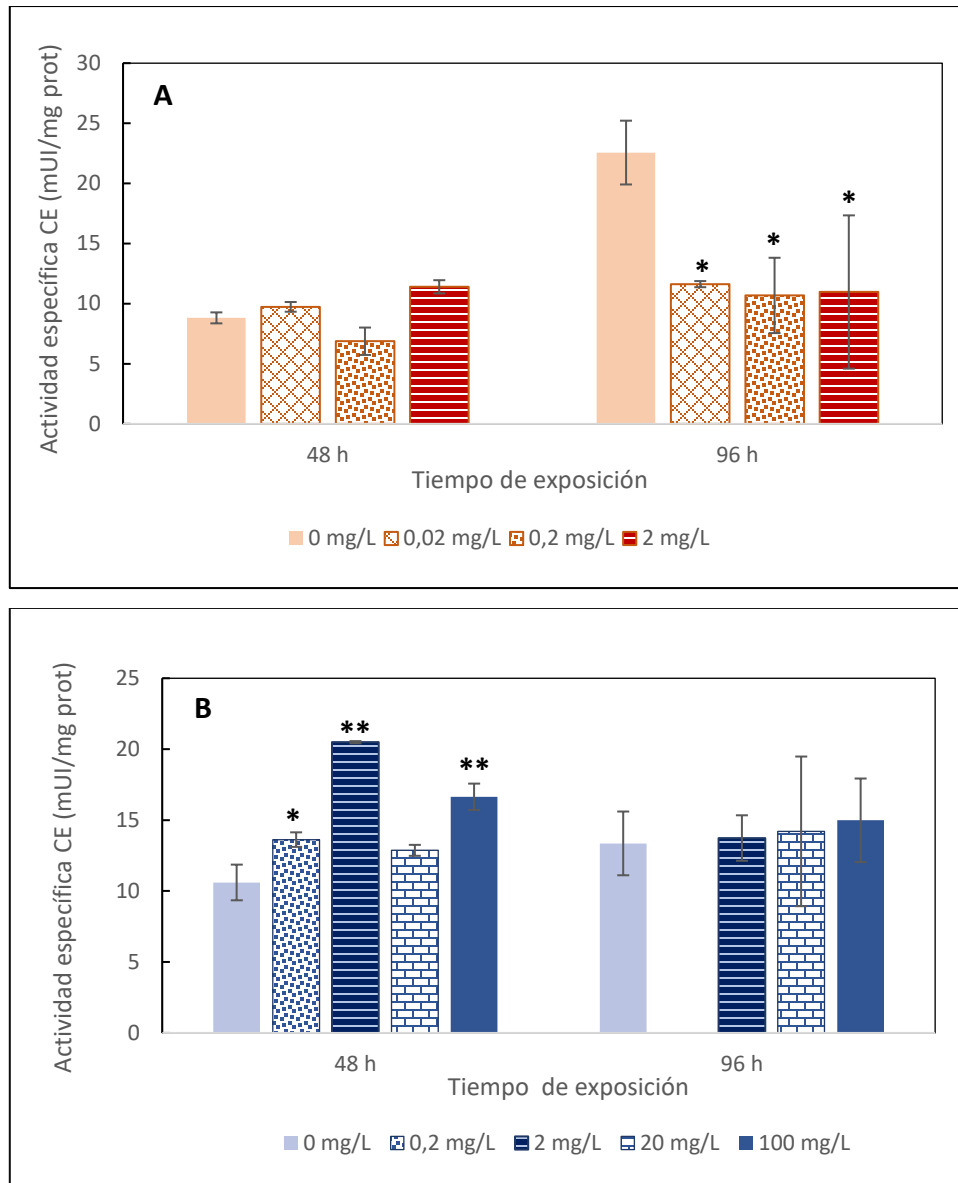
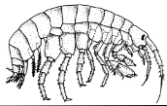


**Fig. 12.** Porcentaje de inmovilidad en función del tiempo de exposición a diferentes concentraciones de tiacloprid en anfípodos del lago LB (A) y de FO (B).

Sin duda, esta disminución marcada de la movilidad causada por el insecticida podría tener efectos nocivos en los procesos básicos de supervivencia de estos organismos en sus ambientes naturales como, por ejemplo, en la búsqueda de alimentación, refugio o pareja, en la capacidad de huir de depredadores, etc. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo destacan la importancia de la inmovilidad como un biomarcador de efecto del tiacloprid en anfípodos *H. curvispina*.

### 3.3.2 Carboxilesterasa

Las CE son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en diferentes grupos de seres vivos que cumplen un papel importante en la hidrólisis de compuestos endógenos y exógenos. Estas enzimas frecuentemente están implicadas en la detoxificación de plaguicidas (Cui et al., 2015; Wheelock & Nakagawa, 2010).



**Fig. 13.** Actividad específica de CE de anfípodos del lago LB **(A)** y de FO **(B)** expuestos al NEO tiacloprid. Anfípodos adultos de *H. curvispina* se expusieron durante 48 y 96 h a concentraciones crecientes del insecticida. Los datos representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar de al menos 3 replicados. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores controles determinados por ANOVA y el test de Fisher's LSD: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

En la Fig. 13 se muestra el efecto de la exposición a tiacloprid sobre la actividad CE de anfípodos de ambas poblaciones. A las 48 h no se observaron cambios en la actividad enzimática de los anfípodos del lago LB expuestos respecto a la de los controles. Mientras que, la CE fue significativamente inhibida por el NEO ( $p < 0,05$ ) a las 96 h de exposición. Todas las



concentraciones ensayadas causaron porcentajes similares de inhibición de la enzima, entre 48 y 53%. A las 96 h se observó un aumento significativo en la actividad de los controles respecto a la de los controles a 48 h, 23 mUI/mg prot y 9 mUI/mg prot, respectivamente (Fig. 13A).

Por otra parte, la actividad CE de anfípodos de FO se incrementó significativamente a las 48 h de exposición al NEO; a las 96 h no se observaron cambios en las actividades de los organismos expuestos comparada con la de los controles (Fig. 13B).

Wang et al. (2020) informaron que la exposición de embriones de pez cebra durante 96 h a tiacloprid causó un aumento en la actividad de la enzima CE a las concentraciones más altas ensayadas. Mientras que, Feng et al. (2015) observaron una inhibición significativa en la actividad CE de lombrices *Eisenia fétida* expuestas durante 7 días a tiacloprid.

En el presente trabajo, se observó que la exposición al insecticida alteró la actividad CE de los anfípodos *H. curvispina* de ambas poblaciones de manera diferente y dependiente del tiempo de exposición. El aumento de la actividad CE observado en los anfípodos de FO a las 48 h de exposición constituye una respuesta adaptativa y señala que puede cumplir un papel de detoxificación a las 48 h de exposición al NEO. Esto podría relacionarse además con la tolerancia que presenta la población de FO al insecticida, observada en estudios previos (Kirilovsky et al., 2021). Por otra parte, la disminución de la actividad CE en la población de LB, más susceptible, indica su potencial como marcador de exposición al tiacloprid.

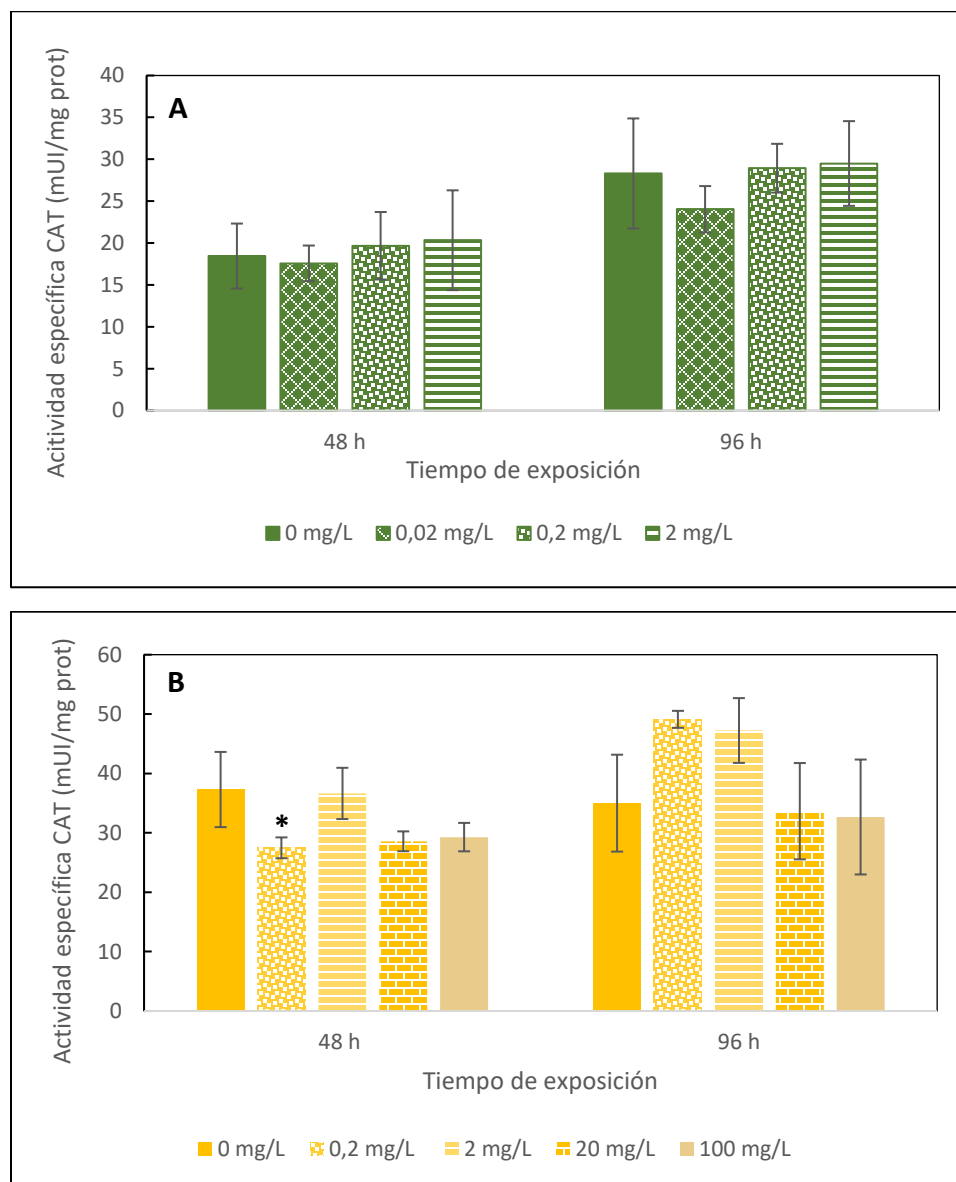
### 3.3.3 Catalasa

La CAT es una enzima antioxidante importante que neutraliza efectivamente los efectos nocivos del  $H_2O_2$  (Sepasi Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018). Dependiendo de la cantidad de ERO producidas, la actividad CAT puede o aumentar debido a la inducción de la enzima o disminuir a través de un efecto inhibitorio directo sobre el grupo hemo del centro activo (Kono & Fridovich, 1982).

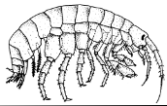
El efecto sobre la actividad CAT de ambas poblaciones de anfípodos *H. curvispina* expuestas al insecticida tiacloprid se muestran en la Fig. 14. No se observaron cambios en la actividad enzimática de los anfípodos del lago LB en ambos tiempos ensayados, respecto a la actividad control (Fig. 14A). La actividad CAT en anfípodos de FO se redujo significativamente (26% con



respecto al valor control) por la exposición durante 48 h a 0,2 mg/L de tiacloprid. Mientras que, a las 96 h de tratamiento, si bien se observa una tendencia a aumentar la actividad CAT con las menores concentraciones de tiacloprid ensayadas, no se produjeron cambios estadísticamente significativos en la actividad enzimática de estos organismos (Fig. 14B).



**Fig. 14.** Actividad específica de CAT de anfípodos del lago LB **(A)** y de FO **(B)** expuestos al NEO tiacloprid. Anfípodos adultos de *H. curvispina* se expusieron durante 48 y 96 h a concentraciones crecientes del insecticida. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 3 replicados. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores controles determinados por ANOVA y el test de Fisher's LSD: \* $p < 0,05$ .



Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con los observados en otros estudios. Wang et al. (2020) mostraron que la exposición a tiacloprid durante 96 h de embriones de pez cebra no afectó significativamente la actividad CAT. Asimismo, Stara et al, (2020a y b) informaron que la exposición crónica al formulado comercial Calypso 480 SC del mejillón *Mytilus galloprovincialis* no tuvo efectos sobre la actividad CAT de glándula digestiva. Mientras que, la exposición a 100 mg/L de tiacloprid durante 3 días causó una disminución significativa de la actividad enzimática de CAT en glándula digestiva del mejillón. En branquias la disminución se observó a los 7 días de exposición en todas las concentraciones ensayadas del insecticida (Stara et al., 2020a). Estudios adicionales son necesarios para establecer si la actividad de CAT de *H. curvispina* puede resultar útil, en conjunto con otros marcadores, para estudios de monitoreo ambiental de tiacloprid o de otros NEO.

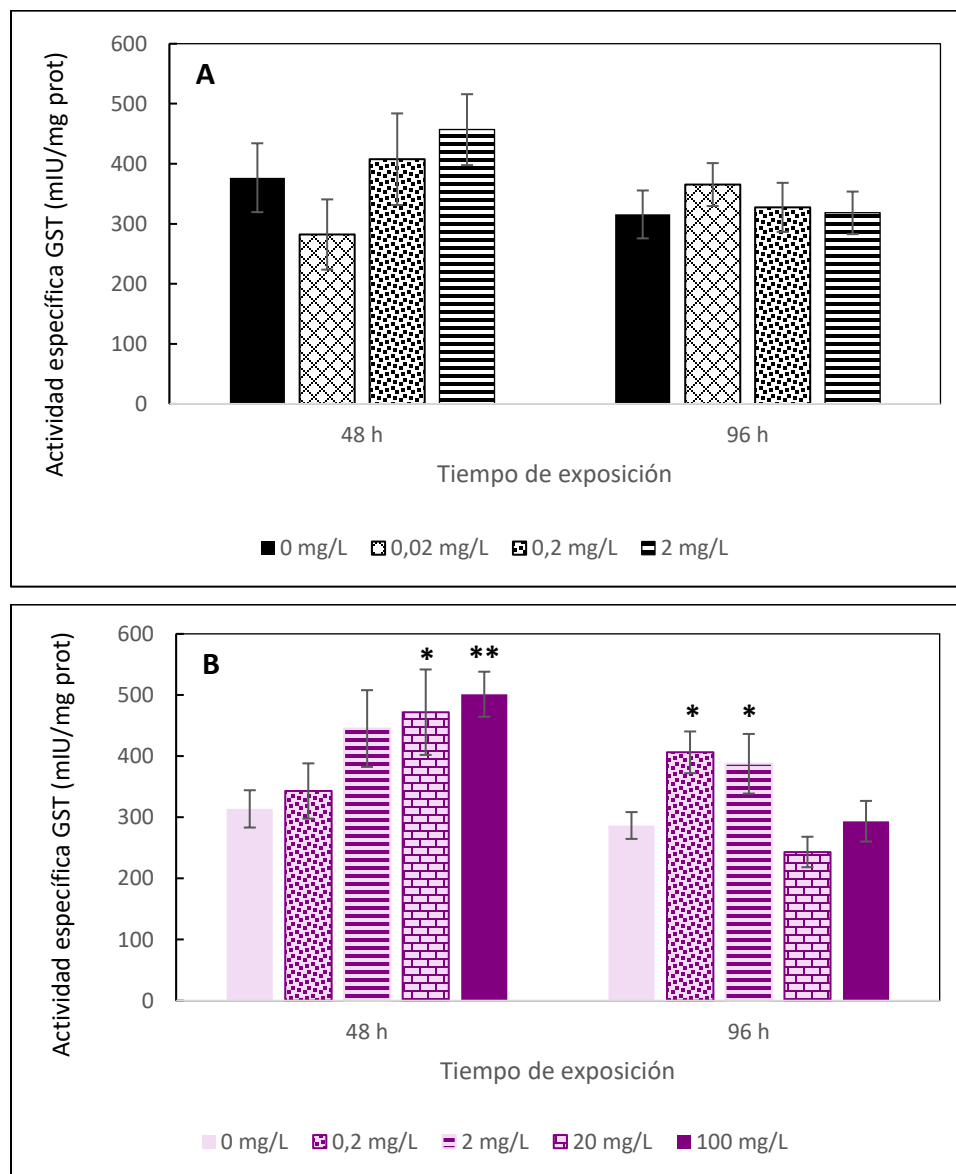
#### 3.3.4 Glutación S-transferasa

Las GST son un grupo de enzimas de Fase II que cumplen un papel muy importante en la detoxificación de xenobióticos, incluidos plaguicidas (Sheehan et al, 2001) y presentan además funciones de protección antioxidante (Singhal et al., 2015). En el presente estudio, la exposición a tiacloprid de anfípodos del lago LB no tuvo efectos estadísticamente significativos sobre la actividad específica GST (Fig. 15A). En los anfípodos de FO, la actividad GST aumentó significativamente después de 48 h de tratamiento con 20 mg/L (50%) y 100 mg/L de tiacloprid (60%), comparada con la actividad control. Al final del tratamiento (96 h) se observó un aumento de la actividad con 0,2 mg/L (42%) y 2 mg/L de insecticida (35%) (Fig. 15B). El incremento en la actividad GST en los anfípodos de FO, que varía con la concentración y el tiempo de exposición, se relacionaría con la tolerancia que presentan frente al insecticida tiacloprid.

Otros autores informaron que no observaron cambios en la actividad GST por la exposición al NEO tiacloprid de embriones y larvas de la carpa común *Cyprinus carpio* ni en embriones de pez cebra (Velisek & Stara, 2018; Wang et al. 2020). Mientras que, Stara et al. (2019) mostraron una disminución significativa en la GST en hepatopáncreas de cangrejos expuestos durante 96 h al formulado comercial Calypso 480 SC. Además, la actividad GST de glándula digestiva del mejillón *Mytilus galloprovincialis* disminuyó significativamente a los 10 y 20 días de exposición a tiacloprid

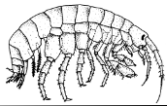


(Stara et al., 2021). También, la exposición al NEO imidacloprid durante 96 h causó una disminución significativa de la actividad GST de hepatopáncreas de cangrejos *Eriocheir sinensis* (Hong et al., 2020). Por el contrario, Shan et al. (2019) informaron que la actividad GST de branquias y glándula digestiva de almejas *Corbicula fluminea* aumentó significativamente por el tratamiento con otro NEO, el imidacloprid.



**Fig. 15.** Actividad específica de GST de anfípodos del lago LB **(A)** y de FO **(B)** expuestos durante 48 y 96 h al NEO tiacloprid. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 3 replicados. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores controles determinados por ANOVA y el test de Fisher's LSD: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .





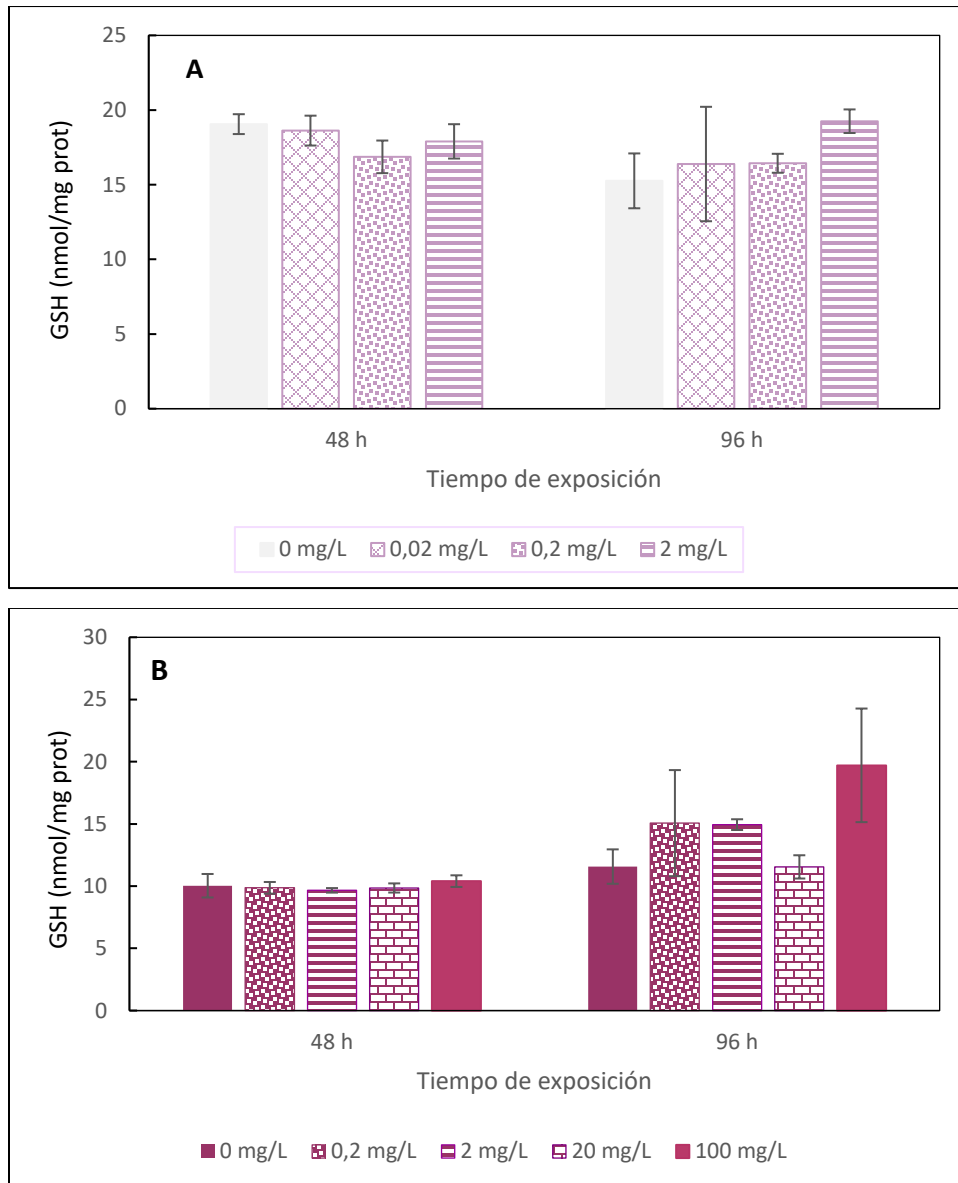
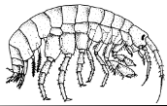
### 3.3.5 Nivel de glutatión reducido

El GSH es una importante biomolécula antioxidante que previene el daño producido por las ERO, colabora con la desintoxicación al conjugarse con químicos y también actúa como un cofactor esencial para enzimas antioxidantes que incluyen a la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la GST (Piner Benli & Çelik, 2021). Por esto, el contenido de GSH endógeno se evalúa en diversos estudios toxicológicos como marcador del estado redox celular y se considera un biomarcador relevante en estudios a campo (Hernández-Moreno et al., 2010).

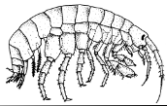
En el presente estudio, la exposición al insecticida tiacloprid no causó cambios significativos en el contenido de GSH en la población del lago LB ni en la de FO, comparado con los valores controles (Fig. 16).

Resultados similares se han informado en otras especies acuáticas por la exposición a NEO. Stara et al. (2019) informaron que el tratamiento con el formulado comercial Calypso 480 SC durante 96 h no modificó el nivel de GSH en hepatopáncreas, músculo y branquias del cangrejo *Cherax destructor*. Asimismo, el nivel de GSH en glándula digestiva de mejillones no cambió durante el tratamiento con tiacloprid (Stara et al., 2021). No se observaron alteraciones en los niveles de GSH en hígado, branquias, riñón y músculo de juveniles del pez *Prochilodus lineatus* expuestos a concentraciones crecientes del NEO imidacloprid (Vieira et al., 2018).

Los resultados obtenidos indican que el contenido de GSH en *H. curvispina* no sería adecuado como marcador de exposición aguda al tiacloprid. Estudios de exposición subcrónica o crónica a este insecticida NEO son necesarios para analizar si este parámetro bioquímico se modifica en exposiciones prolongadas.



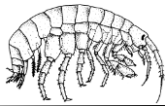
**Fig. 16.** Contenido de GSH de anfípodos del lago LB **(A)** y de FO **(B)** expuestos al NEO tiacloprid. Anfípodos adultos de *H. curvispina* se expusieron durante 48 y 96 h a concentraciones crecientes del insecticida Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 3 replicados.



## 4 CONCLUSIONES

En este trabajo se presentan los efectos de la exposición al NEO tiacloprid en *H. curvispina*, un anfípodo autóctono de América del Sur. Las dos poblaciones de anfípodos muestran la misma respuesta de inmovilidad, a concentraciones significativamente más bajas que las  $CL_{50}$ , lo que reduciría las posibilidades de supervivencia de estos organismos en entornos naturales bajo la presión de aplicación de NEO. Estos resultados destacan la relevancia de la inmovilidad como biomarcador de efecto por exposición a tiacloprid. Los anfípodos del lago LB resultaron ser mucho más susceptibles al insecticida que los anfípodos de FO como se observa al comparar las  $CL_{50}$ . La actividad CAT de los anfípodos controles de FO fue significativamente mayor, comparada con la actividad enzimática de los organismos no expuestos del lago LB. Altos niveles de actividad CAT podrían indicar una mejor protección frente a una situación de estrés oxidativo. Además, la respuesta de las enzimas metabolizantes GST y CE al tiacloprid fueron diferentes entre ambas poblaciones. Los resultados indican un aumento en la actividad GST, dependiente tanto del tiempo como de la concentración del tóxico, en anfípodos de FO que podría considerarse una respuesta adaptativa. De manera similar, se puede considerar el aumento temprano evidenciado en la actividad CE en anfípodos de FO. Por el contrario, los anfípodos del sitio de referencia, LB, mostraron una disminución de la actividad CE al final del tratamiento. Esta respuesta diferente observada entre las dos poblaciones estaría relacionada con la historia de exposición a plaguicidas en sus ambientes naturales.

En resumen, y dado que se espera que en los próximos años aumente significativamente el uso de insecticidas NEO alrededor del mundo y en la zona productiva frutihortícola de la Patagonia Norte, es necesario investigar más sobre su toxicidad en organismos no blanco para una caracterización más completa de sus potenciales efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, a fin de fijar niveles guía y también de seleccionar marcadores adecuados para ser aplicados en el monitoreo. Por último, y avalado por suficiente información científica que indica efectos adversos en la salud humana, se sugiere la necesidad de establecer límites máximos permitidos de NEO en agua potable en el mundo.



## 5 REFERENCIAS

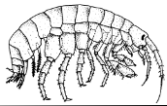
- Anadón, A., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M-A. (2020). Neurotoxicity of neonicotinoids. En Aschmer, M., & Costa, L. G. (Ed), *Advances in Neurotoxicology*, 4, (pp: 167-207). Elsevier.
- Anguiano, O. L. (2002). Inducción por plaguicidas de enzimas detoxificantes de la fase II durante el desarrollo embrionario de anfibios. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.
- Anguiano, O. L., Ferrari, A., Soleño, I. J., Martínez, M. C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A. M., et al. (2008). Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 2117-2123.
- Anguiano, O. L., Castro, C., Venturino, A., & Ferrari, A. (2014). Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyalella curvispina*. *Environmental Toxicology*, 29, 1043-53.
- Anguiano, O. L., Vacca, M., Rodriguez Araujo, M. E., Montagna, M., Venturino, A., & Ferrari, A. (2017). Acute toxicity and esterase response to carbaryl exposure in two different populations of amphipods *Hyalella curvispina*. *Aquatic Toxicology*, 188, 72-79.
- Babelová, J., Šefčíková, Z., Čikoš, S., Špirková, A., Kovaříková, V., Koppel, J., et al. (2017). Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology*, 392, 71-80.
- Barbieri, E., & Zigiotta, A. (2018). Use of Biomarkers for Studying the Effects of Pesticides on Freshwater Organisms. In B. Maestroni, & A. Cannavan (Eds). *Integrated Analytical Approaches for Pesticide Management* (pp. 107-119). Academic Press.
- Barnes, R. D. (1991). Los Crustáceos. In *Zoología de los invertebrados* (pp. 599-718). Ed. Interamericana Mac Graw – Hill. Quinta edición.
- Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., et al. (2019). Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 215-223.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-140.
- Bonmatin, J-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., et al. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 35-67.
- Bonmatin, J-M., Noome, D. A., Moreno, H., Mitchell, E. A. D., Glauser, G., Soumana, O.S., Bijleveld van Lexmond, M., & Sánchez-Bayo, F. (2019). A survey and risk assessment of neonicotinoids in water, soil and sediments of Belize. *Environmental Pollution*, 249, 949-958.
- Borsuah, J. F., Messer, T. L., Snow, D. D., Comfort, S. D., & Mittelstet, A. R. (2020). Literature Review: Global Neonicotinoid Insecticide Occurrence in Aquatic Environments. *Water*, 12, 3388; doi:10.3390/w12123388.
- Bravo, J., Mate, M. J., Schneider, T., Switala, J., Wilson K., Loewen P.C., & Fita, I. (1999). Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 34, 155-166.



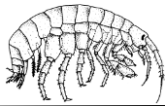
- Braghirolli, F. M., Oliveira, M. R., & Oliveira, G. T. (2016). Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyalella kaingang* (Crustacea, Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 177-84.
- Caballero de Castro, A., Rosenbaum, E. A., & Pechén de D'Angelo, A. M. (1991). Effect of malathion on *Bufo arenarum* Hensel development—I. Esterase inhibition and recovery. *Biochemical Pharmacology*, 41, 491-495.
- Camp, A., Buchwalter, D. B. (2016). Can't take the heat: Temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. *Aquatic Toxicology*, 178, 49-57.
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Reviews of Entomology*, 58, 99-117.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, CCME (2007). Canadian Water Quality Guidelines: Imidacloprid. Scientific Supporting Document (pp. 51).
- Chang, B., Daugherty, L., & Mitchell, A. (2013). Bee afraid, bee very afraid-neonicotinoids and the nAChRs family. *InterPro Protein Focus* 25 Sep:1-8.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biological and Medicine*, 48(6), 749-762.
- Colla, M. F., & César, I. I. (2019). Ecological aspects of natural populations of *Hyalella pampeana* (Crustacea, amphipoda, hyalellidae) from the natural reserve island of Martín García (Río de La Plata, Argentina). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91, 1-21.
- Cui, F., Li, M. X., Chang, H. J., Mao, Y., Zhang, H. Y., Lu, L. X., et al. (2015). Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 88-96.
- De los Ríos-Escalante, P., Morrone, J. J., & Rivera, R. (2012). Distributional patterns of the South American species of *Hyalella* (Amphipoda: Hyalellidae). *Gayana (Concepción)*, 76, 153-161.
- De Perre, C., Murphy, T. M., & Lydy, M. J. (2015). Fate and effects of clothianidin in fields using conservation practices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(2), 258-265.
- DIGESA (2010) [http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/Reglamento\\_Calidad\\_Agua.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/Reglamento_Calidad_Agua.pdf)
- Domingues, I., Agra, A. R., Monaghan, K., Soares, A. M. V. M., & Nogueira, A. J. A. (2010). Cholinesterase and glutathione-s-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 5-18.
- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F., & Viarengo, A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Science of the Total Environment*, 408, 3775-3786.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Mini-review. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64, 1099-1105.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Feng, L., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, P., & Jiang, H. (2015). Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 9475-9482.



- Ferrari, A., Lascano, C. I., Anguiano, O. L., D'Angelo, A. M., & Venturino, A. (2009). Antioxidant responses to azin phos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquatic Toxicology*, *93*, 37-44.
- Fukami, J. I. (1984). Metabolism of several insecticides by glutathione S-transferase. In F. Matsumura (Ed) *Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics* (pp. 223-261). Pergamon Press Oxford, England.
- Galloway, T. S., Millward, N., Browne, M. A., & Depledge, M. H. (2002). Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, *61*, 169-180.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(6), 1856-1862.
- George, S. G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In D. C. Malins & G. K. Ostrander (Eds). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* (pp. 37-85). Lewis Publisher, CRC Press.
- Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science Pollution and Research*, *22*, 103-118.
- González, E. R., & Watling, L. (2003). A new species of *Hyaella* from the Patagonia, Chile with redescription of *H. simplex* Schellenberg, 1943 (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Natural History*, *37*(17), 2077-2094.
- Grosso, L. E., & Peralta, M. (1999). Anfípodos de agua dulce sudamericanos. Revisión del género *Hyaella* Smith. I. Fundación Miguel Lillo. San Miguel de Tucumán. *Acta Zoológica Lilloana*, *45*(1), 79-98.
- Guzsvány, V., Csanádi J., & Gaál, F. (2006). NMR study of the influence of pH on the persistence of some neonicotinoids in water. *Acta Chimica Slovenica*, *53*, 52-57.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, *249*, 7130-7139.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, *97*(6), 1634-1658.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, *35*(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Ed, Clarendon Press, Oxford.
- Han, W., Tian, Y., & Xiaoming, S. (2017). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: an overview. *Chemosphere*, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.149.
- Hatfield, M. J., Umans, R. A., Hyatt, J. L., Edwards, C. C., Wierdl, M., Tsurkan, L., Taylor, M. R., & Potter, P. M. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, *259*, 327-331.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51-88.
- Health Canada (2022). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality—Summary Tables. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario.

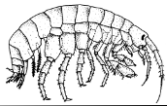


- Hernández-Moreno, D., Soler, F., Míguez, M. P., & Pérez-López, M. (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of The Total Environment*, 408(21), 4976-4983.
- Higgins, L. G., & Hayes, J. D. (2011). Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 92-137.
- Hladik, M. L., & Kolpin, D. W. (2016). First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. *Environmental Chemistry*, 13(1), 12-20.
- Hladik, M. L., Corsi, S. R., Kolpin, D. W., Baldwin, A. K., Blackwell, B. R., & Cavallin, J. E. (2018). Year-round presence of neonicotinoid insecticides in tributaries to the Great Lakes, USA. *Environmental Pollution*, 235, 1022-1029.
- Hong, Y., Huang, Y., Wuc, S., Yang, Y., Dong, Y., Xu, D., et al. (2020). Effects of imidacloprid on the oxidative stress, detoxification and gut microbiota of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Science of the Total Environment*, 729, 138276.
- Hoyle, S. & Code, A. (2016). Neonicotinoids in California's Surface Waters: A Preliminary Review of Potential Risk to Aquatic Invertebrates. *The Xerces Society for Invertebrate Conservation*, pp. 17.
- Iturburu, F. G., Bertrand, L., Soursou, V., Scheibler, E. E., Calderon, G., Altamirano, J. C., et al. (2024). Pesticides and PPCPs in aquatic ecosystems of the andean central region: Occurrence and ecological risk assessment in the Uco valley. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133274.
- Javidmehr, A., Kass, P. H., Deanovic, L. A., Connon, R. E., & Werner, I. (2015). 10-Day survival of *Hyalella azteca* as a function of water quality parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 250-56.
- Jergentz, S., Pesacq, P., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R. (2004). Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 133-141.
- Jeschke, P., Nauen, R. (2005). Neonicotinoid insecticides. In L. I. Gilbert, L. Iatrou, & S. S. Gill (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 53-105). Elsevier: Oxford, U.K.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 59, 2897-2908.
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166, 139-160.
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE* 7(2), e32432.
- Kirilovsky, E. R., Anguiano, O. L., Bongiovanni, G. A., & Ferrari, A. (2022). Effects of acute arsenic exposure in two different populations of *Hyalella curvispina* amphipods from North Patagonia Argentina. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85(2), 71-88.
- Kirilovsky, E. R., Anguiano, O. L., Bongiovanni, G., Ferrari, A. (2021). Mortality, Immobility and Biochemical Acute Effects of Thiacloprid on two Populations of *Hyalella curvispina* Amphipods from North Patagonia Argentina. SETAC Latin America 14th Biennial Meeting. Valdivia Chile (virtual), 26-29 Sept.

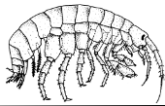


- Klarich, K. L., Pflug, N. C., DeWald, E. M., Hladik, M. L., Kolpin, D. W., Cwiertny, D. M., et al. (2017). Occurrence of Neonicotinoid Insecticides in Finished Drinking Water and Fate during Drinking Water Treatment. *Environmental Science & Technology Letters*, 4(5), 168–173.
- Klotz, M. G., Klassen, G. R., & Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among Prokaryotic and Eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 51-58.
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 5751-5754.
- Kreuger, J., Graaf, S., Johan Patring, J., & Adielsson, S. (2010). Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. *Ekohydrologi*, 117, pp. 46.
- Krupke, C. H., Hun, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- Kurwadkar, S., & Evans, A. (2016). Neonicotinoids: Systemic insecticides and systematic failure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(6), 745-748.
- Loewy, R. M., Carvajal, L. G., Novelli, M., & Pechen de D'Angelo, A. M. (2006). Azinphos methyl residues in shallow groundwater from the fruit production region of northern Patagonia, Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41, 869-881.
- Loewy, R. M., Monza, L. B., Kirs, V. E., & Savini, M. C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46, 662-670.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lu, C., Lu, Z., Lin, S., Dai, W., & Zhang, Q. (2020). Neonicotinoid insecticides in the drinking water system – Fate, transportation, and their contributions to the overall dietary risks. *Environmental Pollution*, 258, 113722. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113722>.
- Macchi, P., Loewy, R. M., Lares B., Latini, L., Monza, L. N. Guiñazú, N., et al. (2018). The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 10668-10678.
- Mahai, G., Wan, Y., Xia, W., Yang, S., He, Z., & Xu, S. (2019). Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China. *Chemosphere*, 229, 452-460.
- Main, A. R., Headley, J. V., Peru, K. M., Michel, N. L., Cessna, A. J., & Morrissey, C. A. (2014). Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS ONE*, 9(3), e92821. doi:10.1371/journal.pone.0092821.
- Main, A. R., Webb, E. B., Goyne, K. W., Abney, R., & Mengel, D. (2021). Impacts of neonicotinoid seed treatments on the wild bee community in agricultural field margins. *Science of the Total Environment*, 786, 147299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147299>
- Malev, O., Klobučar Malev, R. S., Fabbretti, E., & Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemical and Physiology*, 104, 178-186.

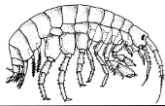




- Masía, A., Campo, J., Vazquez-Roig, P., Blasco, C. & Pico, Y. (2013). Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 263, 95-104.
- Matsumura, F. (1985). Metabolism of insecticides by animals and plants. In *Toxicology of Insecticides* (pp. 203-298). Second Edition. Plenum Press, New York & London.
- Mazé, R. A. (2015). Clase Malacostraca. Orden Amphipoda. *Revista IDE@ - SEA*, 82, 1-10.
- Minatel, B. C., Sage, A. P., Anderson, C., Hubaux, R., Marshall, E. A., & Lam, W. L. (2018). Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environmental International*, 112, 183-197.
- Montagna, C. M. (2011). Principios básicos de toxicología. In O. L. Anguiano & C. M. Montagna (Eds.) *Clasificación y toxicología de plaguicidas* (pp. 15-60). Educo, Editorial de la Universidad Nacional del Comahue. ISBN: 978-987-604-154-6.
- Mörtl, M., Vehovszky, A., Klátyik, S., Takács, E., Györi, J., & Székács, A. (2020). Neonicotinoids: spreading, translocation and aquatic toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 24, 2006-2030.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C. et al. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291-303.
- Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., et al. (2014). How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environmental Science & Technology*, 48, 5423e5432.
- Mugni, H., Paracampo, A., Demetrio, P., Pardi, M., Bulus, G., Ronco, A., & Bonetto, C. (2016). Toxicity persistence of chlorpyrifos in runoff from experimental soybean plots to the non-target amphipod *Hyaella curvispina*: Effect of crop management. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 257-264.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 115224, Thiachloprid. PubChem. Obtenido en Junio 12, 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiachloprid>
- Nauen, R. (2005). Neonicotinoid insecticides. *Science*, 5, 53-105.
- Nauen, R., & Bretschneider, T. (2002). New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*, 241-245.
- Nikinmaa, M. (2014). Bioindicators and Biomarkers. In: *An introduction to Aquatic Toxicology* (pp: 147 - 155). Academic Press. Elsevier, Amsterdam - Boston - Heidelberg - London - New York - Oxford - Paris - San Diego - San Francisco - Singapore - Sydney - Tokyo.
- Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 13.07.01 :97. (1998). AGUA. AGUA POTABLE. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/els14859.pdf>
- OMS (World Health Organization). (2022). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva.
- Pan, Ch., Yu, J., Yao, Q., Lin, N., Lu, Z., Zhang, Y., et al. (2022). Prenatal neonicotinoid insecticides Exposure, oxidative Stress, and birth outcomes. *Environment International*, 163, 107180. doi.org/10.1016/j.envint.2022.107180.



- Parmar, T. K., Deepak Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110-118.
- Peralta, M. A. (2001). Crustacea Eumalacostraca. In *Guía para la determinación de los artrópodos bentónicos sudamericanos* (pp: 257-283). Serie: Investigaciones de la UNT. Subserie: Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Tucumán.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Piner Benli, P., & Çelik M. (2021). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to neonicotinoid insecticide sulfoxaflor induced oxidative damage in zebrafish in vivo. *Science Progress*, 104(2), 1-16.
- Pietrzak, D., Kania, J., Malina, G., Kmiecik, E., & Wątor, K. (2019). Pesticides from the EU First and Second Watch Lists in the Water Environment. *Clean – Soil, Air, Water*, 47, 1800376.
- Portaria 2914 (2011) [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)
- Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, Ch., Xue, X., et al. (2018). Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 352-358.
- Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., & Sibley, P. K. (2018b). Acute Toxicity of 6 Neonicotinoid Insecticides to Freshwater Invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 1430-1445.
- Raby, M., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., Paul K., & Sibley, P. K. (2018a). Chronic effects of an environmentally-relevant, short-term neonicotinoid insecticide pulse on four aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*, 639, 1543-1552.
- Reiter, R. J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56, 359-384.
- Roessink, I., Merga, L. B., Zweers, H. J., & Van den Brink, P. J. (2013). The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 1096-1100.
- Roodt, A. P., Schaufelberger, S., & Schulz, R. (2023). Aquatic-Terrestrial Insecticide Fluxes: Midges as Neonicotinoid Vectors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(1), 60-70.
- Rousis, N. I., Denardou, M., Alygizakis, N., Galani, A., Bletsou, A. A., Damalas, D. E., et al. (2021). Assessment of Environmental Pollution and Human Exposure to Pesticides by Wastewater Analysis in a Seven-Year Study in Athens, Greece. *Toxics*, 9, 260. <https://doi.org/10.3390/toxics9100260>.
- Sakuma, M. (1998). Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*, 33, 339-347. doi:10.1271/bbb.60.1899.
- Sánchez-Bayo, F., & Hyne, R. V. (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*, 99, 143-151.
- Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L.G., Fauser-Misslin, A., Potts, S. G., & Neumann, P. (2014). Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Superseding. *PLoS ONE* 9(8): e103592. doi:10.1371/journal.pone.0103592.
- Sansiñena, J. A., Peluso, L., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., et al. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyalella curvispina*



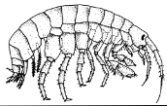
- (Crustacea: Amphipoda) and *Boana pulchella* (Amphibia: Anura), as potential environmental indicators. *Ecological Indicators*, 93, 100-110.
- Satoh, T. (2005). Toxicological implications of esterases-from molecular structures to function. Review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 811-818.
- Satoh, T., & Hosokawa, M. (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 162, 195-211.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., & Xue, Y. (2015). Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. *PLoS ONE*, 10(2), e0118139.
- Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5-12.
- Shan, Y., Yan, S., Hong, X., Zha, J., Qin, J. (2019). Effect of imidacloprid on the behavior, antioxidant system, multixenobiotic resistance, and histopathology of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, 218, 105333.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360, 1-16.
- Schepker, T. J., Webb, E. B., Tillitt, D., & LaGrange, T. (2020). Neonicotinoid insecticide concentrations in agricultural wetlands and associations with aquatic invertebrate communities. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 287, 106678.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180-183. Elsevier B.V.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383.
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P., 2012. Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental & Allied Sciences*, 1(2), 63-66.
- Singhal, S. S., Singh, S. P., Singhal, P., Horne, D., Singhal, J., & Awasthi, S. (2015). Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289, 361-370.
- Smit, C. E. (2014). Water quality standards for imidacloprid. Proposal for an update according to the Water Framework Directive. RIVM Letter report 270006001. *National Institute for Public Health and the Environment*, pp. 92.
- Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128, 215-228.
- Stara, A., Bellinva, R., Velisek, J., Strouhova, A., Kouba, A., & Faggio, C. (2019). Acute exposure of common yabby (*Cherax destructor*) to the neonicotinoid pesticide. *Science of the Total Environment*, 665, 718-723.



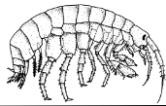
- Stara, A., Pagano, M., Albano, M., Savoca, S., Di Bella, G., Albergamo, A., et al. (2021). Effects of long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to thiacloprid: A multibiomarker approach. *Environmental Pollution* 289, 117892.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandoval, M., Albano, M., et al. (2020a). Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation calypso 480 SC. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110980.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandoval, M., Vazzana, I., et al. (2020b). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 700, 134914.
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Sverko, E., McGoldrick, D., & Marvin, C. H., (2017). Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada. *Chemosphere*, 169, 516-523.
- Suchail, S., Guez, D., & Belsunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1901-1905.
- Tapia González, J. M., Macías, J. O., Tapia Rivera, J. C., Nuñez Maciel, O., & Rodríguez López, E. (2019). Pesticidas: insecticidas neonicotinoides y el futuro de las abejas y otros insectos polinizadores. *Revista Latinoamericana del Ambiente y las Ciencias*, 10(23), 165-174.
- Thompson, D. A., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Barnes, K. K., Vargo, J. D., & Field, R. W. (2021). Prevalence of neonicotinoids and sulfoxaflopr in alluvial aquifers in a high corn and soybean producing region of the Midwestern United States. *Science of the Total Environment*, 782, 146762.
- Thompson, D. A., Lehmler, H-J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K.E., et al. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(6), 1315-1346.
- Tomizawa, T., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology. Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268.
- Truque, P. (2005). Armonización de los Estándares de Agua Potable en las Américas. Departamento de Desarrollo Sostenible, OEA. Obtenido en Abril 19, 2024 de <http://www.oas.org/dsd/publications/classifications/Armoniz.EstandaresAguaPotable.pdf>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1996). Ecological effects test Guidelines: OPPTS 850.1020 Gammarid acute toxicity test. EPA/712/C-96/130. Public Draft. Washington, DC.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2003). Thiacloprid. Obtenido en Junio 12, 2023 de [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-014019\\_26-Sep-03.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-014019_26-Sep-03.pdf).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2021). Aquatic life benchmarks for pesticide regulation. US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Products, Washington, DC USA. Obtenido en Octubre 18, 2023 de <https://www.epa.gov/pesticide-scienceand-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk>.
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., & Van der Sluijs, J. P. (2013). Disminución de macroinvertebrados en aguas superficiales contaminadas con imidacloprid. *PLoS ONE*, 8(5), e62374.



- Velisek, J. & Stara, A. (2018). Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*) *Chemosphere*, 194, 481-487.
- Ventura-Lima, J., Bogo, M. R., & Monserrat, J. M. (2011). Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 211-218.
- Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D., Montagner, C. C., Martinez, C. B. R. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- Vijver, M. G., & van den Brink, P. J. (2014). Macro-Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid: A Rebuttal and Some New Analyses. *PLoS ONE*, 9(2), e89837. doi:10.1371/journal.pone.0089837.
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., et al. (2018). Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 471-507.
- Wang, Y., Li, X., Yang, G., Weng, H., Wang, X., Wang, Q. (2020). Changes of enzyme activity and gene expression in embryonic zebrafish co-exposed to beta-cypermethrin and thiacloprid. *Environmental Pollution*, 256, 113437.
- Wang, H., Yang, D., Fang, H., Han, M., Tang, Ch., Wu, J., et al. (2020). Predictors, sources, and health risk of exposure to neonicotinoids in Chinese school children: A biomonitoring-bases study. *Environment International*, 143, 105918.
- Wang, J., Yin, R., Liu, Y., Wang, B., Wang, N., Xiao, P., et al. (2023). Meta-analysis of neonicotinoid insecticides in global surface waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 1039-1047.
- Vehovszky, Á., Farkas, A., Ács, A., Stoliar, O., Székács, A., Mörtl, M. et al. (2015). Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquatic Toxicology*, 167, 172-179.
- Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry. *Pure Applied Chemistry*, 70(5), 1129-1143.
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J.L., Miller, M. J., & Hammock, B. D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 195, 117-178.
- Wheelock, C. E., & Nakagawa, Y. (2010). Carboxylesterases – from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure–activity relationship, and use in environmental field monitoring. *Journal of Pesticide Science*, 35(3), 215-217.
- Xing, Z., Chow, L., Rees, H., Meng, F., Li, S., & Ernst, B. (2013). Influences of sampling methodologies on pesticide-residue detection in stream water. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 208-218.
- Xiong, J., Wang, Z., Ma, X., Li, H., & You, J. (2019). Occurrence and risk of neonicotinoid insecticides in surface water in a rapidly developing region: Application of polar organic chemical integrative samplers. *Science of the Total Environment*, 648, 1305-1312.
- Yamamoto, A., Terao, T., Hisatomi, H., Kawasaki, H., & Arakawa, R. (2012). Evaluation of river pollution of neonicotinoids in Osaka City (Japan) by LC/MS with dopant-assisted photoionization. *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 2189-2194.



- Yi, X., Zhang, C., Liu, H., Wu, R., Tian, D., Ruan, J., et al. (2019). Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China. *Environmental Pollution*, 251, 892-900.
- Zhang, C., Yi, X., Chen, Ch., Tian, D., Liu, H., Xie, L., et al. (2020). Contamination of neonicotinoid insecticides in soil-water-sediment systems of the urban and rural areas in a rapidly developing region: Guangzhou, South China. *Environment International*, 139, 105719.
- Zhang, C., Yi, X., Xie, L., Liu, H., Tian, D., Yan, B., et al. (2021). Contamination of drinking water by neonicotinoid insecticides in China: Human exposure potential through drinking water consumption and percutaneous penetration. *Environment International*, 156, 106650.
- Zhang, D., & Lu, S. (2022). Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review. *Environment International*, 163, 107201.
- Zhou, Y., Lu, X., Yu, B., Wang, D., Zhao, Ch., Yang, Q., et al. (2021). Comparison of neonicotinoid residues in soils of different land use types. *Science of the Total Environment*, 782, 146803.
- Zubrod, J. P., Englert, D., Feckler, A., Rosenfeldt, R. R., Pasternack, H., Hollert, H. et al. (2019). Is *Hyalella azteca* a suitable model leaf-shredding benthic crustacean for testing the toxicity of sediment-associated metals in Europe? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102, 303-09.



# 6 PRESENTACIÓN A CONGRESO

## Mortality, Immobility and Biochemical Acute Effects of Thiocloprid on two Populations of *Hyalella curvispina* Amphipods From North Patagonia Argentina

E. R. Kintofsky<sup>1</sup>, N. Carrasco<sup>2</sup>, G.A. Bolognesi<sup>3</sup>, O.L. Arguino<sup>3</sup>, A. Ferrari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Oceanográficas de Bahía Comodoro Rivadavia, Bioquímica y Biología Molecular (PROBIO) (CONICET - UNCR)   
<sup>2</sup>Instituto de Oceanografía, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.

### Introduction

Thiocloprid (TCP) is a nonselective insecticide applied in the Valley of Rio Negro River in several areas in fruit production. Nonselective insecticides cause their toxic action by acting as exposure of the sensitive acetylcholinesterase receptor in invertebrates. The aim of this study was to evaluate TCP acute effects in two different populations of the autochthonous amphipod *Hyalella curvispina*, from a reference site (LB) and an agricultural site (EO) located in North Patagonia Argentina. Both populations have shown significant differences in susceptibility to xenobiotic insecticides in previous studies<sup>1</sup>.

### Materials and methods

Amphipods from LB and EO were acutely exposed, used or control of lab conditions<sup>2</sup>, to 10 concentrations (0-100 µg/L) of TCP (Calypso® B, Bayer). Mortality and immobility were measured every 24 h for four days and 06 h-EC50 and EC50 values were determined. Additional tests were performed with TCP (LB: 0.001-100 µg/L, EO: 0.01-100 µg/L) to evaluate the response of biochemical parameters. Controls were run in parallel. Enzymatic activity of glutathione S-transferase (GST) and carboxylesterase (CE), and reduced glutathione (GSH) levels were measured spectrophotometrically in surviving individuals at 48 and 96 h of assay.

**Fig. 2.** Effect of thiocloprid on mortality (A) and immobility (B) of *H. curvispina* from La Balsa (LB) and El Estero (EO) in response to TCP. Data represent the mean ± SE of 10 individuals. Asterisks indicate significant differences between TCP for LB vs EO.

**Fig. 3.** Percentage of mortality across time of exposure to different concentrations of TCP in amphipods from LB (A) and EO (B).

**Fig. 4.** Glutathione S-transferase (GST) enzymatic activity (U) exposed to TCP for 48 and 96 h in LB and EO. Data represent mean ± SE of 10 individuals. Asterisks indicate significant differences between TCP for LB vs EO.

**Fig. 5.** Carboxylesterase (CE) enzymatic activity (U) exposed to TCP for 48 and 96 h in LB and EO. Data represent mean ± SE of 10 individuals. Asterisks indicate significant differences between TCP for LB vs EO.

**Fig. 6.** Reduced glutathione (GSH) content in amphipods from LB (A) and EO (B) exposed to TCP for 48 and 96 h. Data represent mean ± SE of 10 individuals. Asterisks indicate significant differences between TCP for LB vs EO.

### Discussion and Conclusions

A higher 06 h-EC50 value (104-fold) in EO *H. curvispina* amphipods compared to LB could be a sign of resistance to TCP, related to its history of use in agriculture in this agricultural site. Conversely, both populations showed the same mortality response, with no significant differences between EC50 values, which would probably be due to the absence of survival in natural conditions in use or presence of a nonselective application. This highlights the relevance of insensitivity as a bioindicator of TCP effect in *H. curvispina*.

Biochemical responses to TCP of both identifying enzymes, GST and CE, were also different between populations. An increase in GST activity, which varies with both time and concentration, was observed in exposed EO amphipods and could be considered a protective response. A similar protective response was indicated by an early increase in CE activity in EO amphipods. In contrast, amphipods from the reference site, LB, displayed a decrease of CE activity at the end of the assay. This differential response between the two populations could partly explain the differences observed in susceptibility to TCP and could be associated with the different history of exposure to pesticides in their natural environments.

### Results

1. Arguino et al. 2002. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1117-1128. (doi: 10.1002/etc.11)

2. Arguino et al. 2017. *Aquatic Toxicol.* 188:101-110. (doi: 10.1016/j.aquatox.2017.04.013)



## SETAC Latin America 14<sup>th</sup> Biennial Meeting

26-29 SEPTEMBER 2021 • VIRTUAL

October 12, 2021

This letter is to verify that Natacha Carrasco attended and participated at the SETAC Latin America 14th Biennial Meeting in online, online on 26-29 September 2021

The following presentation was presented:

**Date: September 26, 2021**

**Presentation Type: Poster**

**Presentation Title: Mortality, Immobility and Biochemical Acute Effects of Thiacloprid on Two Populations of Hyalella Curvispina Amphipods From North Patagonia Argentina**

Bart Bosveld  
SETAC Executive Director

SETAC Latin America and SETAC North America

P.O. Box 12804, Pensacola, FL 32591 | T +1 850-469 1500 | E [setac@setac.org](mailto:setac@setac.org) | W [www.setac.org](http://www.setac.org)