

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

49

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO CITOGÉNÉTICO DE PLAGUICIDAS CARBÁMICOS  
EN *Vicia faba* Y LINFOCITOS HUMANOS.  
TRATAMIENTOS DIRECTOS  
Y A TRAVÉS DE LOS METABOLISMOS  
VEGETAL Y ANIMAL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)  
PRESENTA

***Pedro Rafael Valencia Quintana***

REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE LA  
**DRA. SANDRA GÓMEZ ARROYO**

EN EL LABORATORIO DE CITOGÉNÉTICA DEL  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA DE LA  
UNAM Y EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
GENÉTICA Y AMBIENTE

2000

2544



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EFFECTO CITOGÉNICO DE PLAGUICIDAS CARBÁMICOS  
EN *VICIA FABA* Y LINFOCITOS HUMANOS.  
TRATAMIENTOS DIRECTOS  
Y A TRAVÉS DE LOS METABOLISMOS  
VEGETAL Y ANIMAL**

De la noche que me cubre,  
con densa oscuridad de polo a polo,  
A los dioses doy las gracias  
por mi alma inconquistable.  
Por crueles circunstancias abrumado,  
no me he alejado ni he dudado.  
Bajo el martirio de esas aflicciones  
dañado he sido, mas no vencido...  
No importa si es estrecha la entrada  
ni que haya castigos al final del camino;  
yo soy el solo capitán de mi alma,  
soy arquitecto de mi propio destino"

*William Ernest Henley*

*A mi esposa*

***Juana Sánchez Alarcón***

*A mis hijos...*

***Rafael Alexander***

***Arianne Giselle***

***Angell Bryan***

***Jean Marie Ailinne Nahomi***

...

*A mis padres...*

**Margarita Quintana Martínez**  
**Pedro Valencia Domínguez**

*A mis hermanos*

**Ma. del Carmen**  
**Marco Antonio**  
**Norma Guadalupe**  
**Fernando**  
**German**

AGRADEZCO A MIS SINODALES  
POR SUS SUGERENCIAS Y POR LA  
REVISIÓN DE ESTE TRABAJO

*Dr. Rafael Villalobos Pietrini*  
*Dra. Judith J. Guzmán Rincón*  
*Dr. Luis Felipe Jiménez García*  
*Dr. Stefan Marian Waliszewski Cúbica*  
*Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano*  
*María Elena Calderón Segura*

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A:

***Biol. Juana Sánchez Alarcón***  
***Biol. Agrop. Libertad Juárez Santacruz***  
***Dr. José Luis Gómez Olivares***

POR SU COLABORACIÓN EN EL DESARROLLO  
DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN



# Indice

Contenido	Pag
Resumen	1
<b>1. Introducción</b>	5
1.1 El Problema	5
1.2 Los plaguicidas	6
1.3 El papel de los pesticidas en la agricultura	9
1.4 El peligro	10
1.5 Clasificación de los insecticidas	12
1.6 Formulación de pesticidas	13
1.7 Los insecticidas, moluscicidas y nematocidas carbámicos	13
1.8 Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas carbámicos	15
1.9 Diversidad estructural de los insecticidas carbámicos	16
1.10 Usos prácticos de los carbamatos	17
1.11 Modo de acción de los derivados carbámicos	18
1.12 Fuentes, transporte y distribución ambiental	19
1.13 Niveles ambientales y exposición	19
1.14 Efectos sobre organismos en el ambiente	20
1.15 Efectos sobre animales experimentales y en sistemas de prueba <i>in vitro</i>	21
1.16 Entrada a la cadena alimenticia	23
1.17 Metabolismo de los plaguicidas carbámicos	23
1.18 Metabolismo en plantas	30
1.19 Efectos para el hombre	31
1.20 Propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas de los insecticidas carbámicos	34
1.21 El propósito	37
1.22 Lannate-90	37
1.23 Pirimor-50	42
1.24 Actividad genotóxica del metomilo y del pirimicarb	43
1.25 Los sistemas de prueba	45
1.26 Objetivo	61

<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>63</b>
2.1 Tratamientos directos	63
2.2 Tratamientos con activación metabólica vegetal	69
2.3 Tratamientos con activación metabólica animal	72
2.4 Testigo con disolvente	74
2.5 Determinación del contenido de proteína en las fracciones microsómicas	74
<b>3. Resultados</b>	<b>75</b>
3.1 Tratamientos directos	75
3.2 Tratamientos con activación metabólica	78
<b>4. Discusión y Conclusiones</b>	<b>83</b>
<b>5</b> <b>Referencias</b>	<b>109</b>
<b>Tablas</b>	<b>139</b>
Efectos sobre <i>Vicia faba</i>	143
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos directos	147
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos con activación metabólica vegetal <i>in vivo</i>	153
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos con activación metabólica <i>In vitro</i>	159
<b>Figuras</b>	<b>165</b>
Efectos sobre <i>Vicia faba</i>	189
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos directos	193
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos con activación metabólica vegetal <i>in vivo</i>	199
Efectos sobre linfocitos humanos. Tratamientos con activación metabólica <i>In vitro</i>	205
<b>Anexos</b>	<b>219</b>

## RESUMEN

Diferentes compuestos carbámicos han sido introducidos para reemplazar a los pesticidas clorados. Aunque éstos son considerados biodegradables, algunos de ellos son muy tóxicos y sus residuos han sido encontrados en el ambiente.

Se ha demostrado que muchos agentes químicos no son mutagénicos por si mismos sino que requieren de los metabolismos animal o vegetal para provocar daño en el ADN, es decir, un promutágeno o mutágeno indirecto puede ser convertido en mutágeno por activación metabólica.

Por ello es importante conocer la influencia que sobre los plaguicidas carbámicos pirimor-50 y lannate-90 tienen ambos metabolismos, usando el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) como criterio de daño genético tanto en células meristemáticas de las raíces de *Vicia faba*, como en los linfocitos humanos en cultivo, con tratamientos directos y

exposiciones donde se agregaron las fracciones microsómicas animal y vegetal.

Los resultados mostraron que ambos insecticidas fueron capaces de inducir ICH en los cromosomas de las células meristemáticas de la Raíz de *Vicia faba*. Pirimor 50 resultó más efectivo ya que produjo incrementos significativos desde 10 ppm encontrándose una relación concentración efecto hasta 25 ppm; en 50, 75 y 100 ppm las frecuencias de ICH disminuyeron pero fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con el testigo. Con Iannate-90 se obtuvo un aumento significativo desde 500 ppm y las frecuencias se elevaron conforme a la concentración.

Con tratamientos directos de dos horas a linfocitos humanos en cultivo, ninguno de los dos compuestos provocó ICH, mientras que cuando la exposición fue de 48 horas hubo incrementos significativos con pirimor-50 a partir de 1000 ppm y con Iannate-90 desde 250 ppm, notándose que a medida que subió la concentración aumentaron los ICH hasta 2000 ppm con el primero y 750 ppm con el último. Desde 500 ppm el pirimor-50 indujo retraso en la cinética de proliferación celular (CPC) evidenciado por la disminución del índice de replicación y a 2500 ppm no se encontraron metafases de segunda división. Iannate-90 no causó retraso en la CPC aunque a 1000 ppm provocó la muerte celular.

Por otra parte, para reconocer el efecto de los metabolitos animal y vegetal sobre la capacidad genotóxica de estos plaguicidas se emplearon las fracciones microsómicas S9 de hígado de rata y S10 de las raíces de *Vicia faba* respectivamente y se evidenció que únicamente el Iannate-90 fue activado por la fracción S-9 desde 1000 ppm presentándose una relación concentración-respuesta hasta la concentración mayor probada (2500 ppm).

Con base en estos resultados fue posible establecer que estos insecticidas presentaron diferentes tipos de acción y son metabolizados de manera distinta, ya que en forma directa, el pirimor-50 fue más efectivo en

*Vicia faba* y lannate-90 en linfocitos humanos para la inducción de ICH. La fracción metabólica animal solo fue capaz de activar al lannate-90 mientras que esta no tuvo efecto sobre la actividad del pirimor-50. Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos en forma directa en *Vicia faba* con pirimor-50, se esperaría que la fracción S10 vegetal activará la capacidad mutagénica de este pesticida, lo cual no se presentó tal vez por falta de tiempo para que la fracción microsómica metabolizara el insecticida.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El problema

El siglo XX ha permitido a la mayoría de los países industrializados adquirir su desarrollo actual. Sin embargo, ese avance industrial y económico, ha sido ignorante de la problemática ambiental.

El aumento de la población, la transformación de la agricultura, el crecimiento de la industria, el incremento en la demanda de recursos y el cada vez mayor aislamiento con la naturaleza, son problemas que están ocurriendo en nuestro país, los cuales tienen tremendas repercusiones ambientales, haciendo que la contaminación sea cada vez más frecuente.

En términos generales la gente vive mejor, hay un aumento del confort y del bienestar humano, pero hay un precio que pagar, el deterioro ambiental, lo que paradójicamente ha aumentado los riesgos para la salud de los seres vivos. Esto último se debe especialmente a la inclusión en el ambiente de agentes físicos y químicos que son mutagénicos.

Independientemente del desarrollo y de la aplicación de otras estrategias para el combate de las plagas, el control químico es el que más se utiliza debido a lo rápido de su acción, por ello se considera a los plaguicidas como uno de los factores principales del rendimiento agrícola y de la calidad de la cosecha.

Anualmente las malas hierbas, los insectos, las bacterias, los hongos, los virus, las aves, los roedores y algunas otras plagas consumen o destruyen casi el 48 % de la producción mundial de alimentos (esto incluye pérdidas pre- y post-cosecha). La tasa de destrucción más alta se encuentra en los trópicos y subtrópicos, donde casi tres cultivos crecen en el mismo campo cada año. La destrucción por las plagas es alta aún en países desarrollados, a pesar de campañas de control sofisticadas con un costo de muchos miles de millones de dólares al año. En los Estados Unidos de Norteamérica, por ejemplo, las pérdidas precosecha se estima que representan casi el 37 % y en la post-cosecha alcanzan el 9 % de lo que queda. Sumándolas, casi dos quintas partes de la producción anual se pierden por causa de diferentes plagas. Estadísticas similares son reportadas para otros países (Chiras 1991).

## 1.2 Los plaguicidas

De acuerdo con la FAO y la OMS, un plaguicida se define como: "cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de origen natural o sintético, destinadas a prevenir o controlar toda especie de plantas o animales indeseables" (García 1994).

### 1.2.1 Una revisión histórica

Desde tiempos muy remotos los agricultores se dedicaron a investigar los métodos por medio de los cuales pudieran incrementar sus cosechas, controlando en el campo los insectos, las malas hierbas y las enfermedades, factores que influían en sus pérdidas. Así que fueron

elaborando mejores recursos técnicos así como agentes químicos (Waliszewski 1990).

El origen de los insecticidas tiene sus raíces en la antigüedad (García 1994). En China casi 3000 años atrás, los agricultores controlaban la langosta quemando los campos infestados. En el antiguo Medio Oriente, la apertura de zanjas se usó para atrapar a langostas inmaduras (Chiras 1991). En la Grecia y Roma clásicas, Homero menciona el valor fumigante de la combustión de azufre y Plinio el Viejo aboga por el uso como insecticida del arsénico y menciona el empleo del aceite de oliva para el tratamiento de semillas de leguminosas, 70 años después de Cristo (Hassall 1990)

Las primeras citas sobre aplicación de plaguicidas como instrumentos para el control de plagas datan del año 900 a. C. y hacen referencia a la utilización del azufre en tratamientos contra insectos. Los chinos emplearon cantidades moderadas de compuestos arsenicales como insecticidas alrededor del siglo dieciséis y no mucho tiempo después la nicotina (Chiras 1991, García 1994).

En el siglo XVII, aparece en el mercado el primer insecticida natural, la nicotina, obtenida de las hojas del tabaco y en 1850 la rotenona y el piretro, extraídos de la planta derris y de las cabezuelas del crisantemo, respectivamente (García 1994).

La mitad del siglo diecinueve marca el comienzo de los primeros estudios científicos sistemáticos para el empleo de agentes químicos para la protección de las cosechas. Diversos trabajos sobre compuestos de arsénico llevan a la introducción en 1867 del verde París, un arsenito de cobre impuro. Éste fue usado en los Estados Unidos de Norteamérica para prevenir la diseminación del escarabajo colorado y para 1900 su empleo estaba tan extendido que esto llevó a la introducción de lo que sería probablemente la primera legislación de pesticidas en el mundo. El caldo Bordolés estuvo en venta en 1885 para controlar el moho blando de la vid y para el final del siglo, el azufre de lima fue utilizado tanto en Europa como



en California como un fungicida contra enfermedades de árboles frutales (Hassall 1990).

En 1896 un francés cultivador de uvas, aplicó caldo Bordolés a sus vides, notando que las hojas de "charlock" amarillo que crecía cerca se ennegrecieron. Esta oportuna observación demostró la posibilidad del control químico de las malas hierbas y poco después se descubrió que el sulfato de hierro, cuando se asperjaba sobre cultivos de cereal plagado de malas hierbas, mataba a estas últimas sin dañar al cultivo. Otro punto importante antes de la Primera Guerra Mundial fue la Introducción en 1913 en Alemania del primer compuesto organomercúrico para proteger semillas. Previo a esto, los compuestos organomercúricos habían sido usados médicamente para combatir la sífilis.

El uso generalizado de los plaguicidas sintéticos comienza después de la II Guerra Mundial. Los ingredientes de muchos plaguicidas de hoy en día fueron, en realidad, creados como armas de guerra (Regenstein 1982)

### 1.2.2 Desarrollo de los plaguicidas químicos

En años recientes los pesticidas químicos (biocidas) han llegado a convertirse en la piedra angular del manejo de las plagas. Los primeros de ellos, conocidos como la primera generación de plaguicidas, fueron preparaciones simples hechas de cenizas, azufre, compuestos de arsénico, molindas de tabaco y cianuro de hidrógeno. Los compuestos de plomo, zinc y mercurio también se usaron. Hoy en día pocos continúan empleándose, ya que son tóxicos y relativamente inefectivos. Además muchos de éstos persisten en el suelo por más de 50 años (Chiras 1991).

Justo antes de la II Guerra Mundial la deficiencia de los llamados insecticidas naturales, principalmente de la nicotina y de la piretrina, obliga a varios países a sintetizar compuestos para reemplazarlos. La substitución fue el origen de los insecticidas organoclorados.

El compuesto clorado hexaclorociclohexano, cuyo nombre comercial es lindano o gammexan, fue el primer sintetizado en 1825. Sin embargo sus propiedades insecticidas fueron reconocidas hasta 1935.

Como punto de partida de una nueva era de los plaguicidas de síntesis orgánica se encuentra el DDT (diclorodifenil-tricloroetano), sintetizado por Zeidler hace más de un siglo. En 1939, el químico Suizo Paul Müller descubre sus propiedades insecticidas. Este fue el primero de una larga línea de plaguicidas de la segunda generación. Durante los 25 años después de su desarrollo, el DDT fue visto por muchos como el salvador de la humanidad, ya que rápidamente eliminaba los insectos o incrementaba la productividad de los cultivos. Siendo relativamente barata su fabricación, se expande a todos los rincones del mundo (Chiras 1991, García 1994).

Con este descubrimiento se inaugura una nueva etapa en el campo del control de plagas en general y de las de incidencia en salud pública en particular, caracterizada por la síntesis y comercialización de una amplia gama de compuestos de diferente naturaleza físico-química (Tabla I) y capacidad de acción frente a los distintos tipos de parásitos, como los organofosforados y los carbamatos (García 1994).

En la década entre los 50 y 60 aparece la segunda generación de insecticidas organofosforados, que fueron más selectivos y relativamente menos tóxicos para los animales superiores que los primeros compuestos de este tipo. Pronto se complementaron con piretroides sintéticos introducidos por trabajadores en Inglaterra y Japón. A diferencia de los compuestos naturales, son estables en la luz y, más recientemente, han sido vendidos para su uso en el suelo (ICI Agrochemicals 1986).

### 1.3 El papel de los pesticidas en la agricultura

La situación mundial en cuanto a alimentos ha sido transformada en los últimos 40 años. A pesar de las grandes dificultades, el éxito en algunas áreas, ha permitido el exceso en la producción de algunos cultivos, especialmente granos. No existe ahora alguna razón científica, en cualquier

parte del mundo, para carecer de alimentos. En la práctica, por supuesto, esto no es tan simple, ya que otro tipo de problemas son frecuentemente superpuestos (Hassall 1990).

Desafortunadamente, el éxito de la agricultura intensiva ha tenido su precio. No están muy lejos los días eufóricos cuando los expertos en plaguicidas estuvieron cerca de creer que había ya muy poco por hacer para ellos. En el lado negativo de la ecuación, existe un número de complicaciones, algunas potencialmente peligrosas. Plaguicidas de diferentes tipos han llevado al desarrollo de resistencia en los organismos blanco, algunas veces a un punto en donde el producto ha tenido que ser retirado o reformulado. Los insecticidas algunas veces son tan peligrosos para los depredadores y los competidores naturales de los insectos fitófagos, como lo son contra las especies plaga. Existen también consecuencias ecológicas, algunas veces conocidas y otras temidas, de la liberación de los pesticidas al ambiente y los peligros potenciales para consumidores de cultivos comestibles donde pudieran estar presentes residuos (Hassall 1990).

Desde 1980 el mismo éxito de los métodos de agricultura moderna en muchos países industrializados ha introducido una nueva perspectiva en el papel de los plaguicidas en la protección de las cosechas. Hoy en día, aumentar la producción no es la única meta, en lugar de esto, el énfasis ha comenzado a moverse hacia el uso de plaguicidas que sean necesarios en cantidades mucho menores que aquellas utilizadas hasta ahora, el empleo de pesticidas más selectivos y que sean biodegradables y así ecológicamente menos perjudiciales (Hassall 1990).

## 1.4 El peligro

### 1.4.1 Consideraciones toxicológicas

Los agentes químicos pueden provocar efectos tóxicos agudos o crónicos. El primero, es más fácilmente comprensible para el hombre común y normalmente ocurre poco después del contacto con una dosis única del

veneno. La magnitud de daño depende de la toxicidad innata de compuesto y de su método de aplicación. Así, una pequeña cantidad de óxido de arsénico como una dosis elevada de cloruro de sodio pueden producir síntomas tóxicos en la mayoría de las especies animales y una gota de ácido sulfúrico es menos peligrosa sobre la piel que lo que es para el ojo. La toxicidad aguda muy frecuentemente resulta de la interrupción de un sistema bioquímico o fisiológico evidente y, en consecuencia, las respuestas son con frecuencia identificables fácilmente.

Un efecto crónico, por otro lado, ocurre cuando un organismo está expuesto a pequeñas dosis, no letales y repetidas, de una sustancia potencialmente peligrosa. Respuestas crónicas bien conocidas a diferentes compuestos incluyen silicosis, cáncer pulmonar, daño cerebral y necrosis del hígado y riñones (Hassall 1990).

#### 1.4.2 Riesgos para la salud y el ambiente

Como se ha mencionado anteriormente, los plaguicidas son biocidas, es decir, son tóxicos para los seres vivos. Aun cuando la mayoría presenta propiedades selectivas en su modo de acción, otras especies, inclusive el hombre, que tienen patrones biológicos y bioquímicos análogos a los de las especies que se pretende combatir, pueden verse afectadas de forma secundaria al ser susceptibles a la acción tóxica de estos compuestos.

Además de los peligros ambientales hay que considerar los riesgos para la salud humana, a corto plazo, en forma de intoxicaciones agudas, cuando se ha absorbido suficiente cantidad del agente tóxico en un corto tiempo y a mediano o largo plazo, al desencadenar patologías de carácter crónico si se asimilan pequeñas cantidades de éste en un período largo de tiempo.

El plaguicida ideal es aquel que posee una gran toxicidad contra las plagas a las cuales es dirigido y una mínima capacidad de acción contra los otros organismos incluyendo al hombre y no altere el ambiente, si bien esta situación es idílica y muy alejada de la realidad. En definitiva, si no se

utilizan adecuadamente pueden generarse más daños que los que se intentan prevenir con su utilización.

Con los años, miles de nuevos compuestos han sido sintetizados y probados. Actualmente 1500 sustancias diferentes son usadas en casi 33000 formulaciones comerciales de herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas y rodenticidas, con el propósito de reducir las plagas a niveles tolerables. Algunos plaguicidas como el DDT, son biocidas de amplio espectro, que atacan gran variedad de organismos, otros son pesticidas con un espectro reducido, dirigidos en contra de pocas plagas.

Aproximadamente 2.5 millones de toneladas métricas de plaguicidas son empleados anualmente en todo el mundo, el 34 % en Norteamérica y casi el 45 % en Europa y en otros países desarrollados. El 21 % restante es usado principalmente en países en desarrollo. De acuerdo con Metcalf et al. (1966), los agricultores emplean más de dos veces la cantidad de plaguicidas que es necesaria. Sumándose a la innecesaria contaminación ambiental está un grupo de amas de casa que aplican casi una quinta parte de todos los plaguicidas sobre jardines y árboles en cantidades superiores a las que lo hacen los agricultores. Debido a que éstos son liberados al ambiente en grandes concentraciones y tienen el potencial de alterar el equilibrio de los ecosistemas y de amenazar la salud humana, su empleo ha creado una amplia y acalorada controversia.

### 1.5 Clasificación de los insecticidas

Los plaguicidas pueden clasificarse en ocho grandes grupos, destacando especialmente por su amplia difusión: los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides. Se considera por tanto, de interés abordar las familias de mayor uso actual, mencionando los problemas que han ido apareciendo a lo largo de su empleo y que, en ocasiones condicionan su utilización.

## 1.6 Formulación de pesticidas

Existe una amplia variedad de formulaciones para los plaguicidas aplicados en la agricultura. Cada una contiene el ingrediente activo además de varios "ingredientes inertes". Estos últimos son usados para mejorar la actividad del plaguicida, influyendo en características como manejo, persistencia sobre el follaje, seguridad, facilidad de aplicación y capacidad para mezclarse con el agua. Algunas de las formulaciones más comunes se presentan en el anexo I.

## 1.7 Los insecticidas, moluscicidas y nematocidas carbámicos

La historia de los insecticidas carbámicos puede ser referida a la leguminosa *Physostigma venenosum*, planta usada en el Oeste de África, a mediados del siglo 19, en ritos de brujería para "el juicio de Dios". Al acusado se le hacía beber una suspensión de semillas maceradas en agua. La sobrevivencia del acusado puede ser atribuida más a su habilidad para vomitar que a su grado de culpabilidad, si no la vomitaba, la fisostigmina entraba en su cuerpo inhibiendo la acetil colinesterasa (ACE), así que moría por un exceso de su propia acetilcolina (Hassall 1990).

Esta planta fue llevada a Escocia y algunos laboratorios europeos tuvieron éxito extrayendo de ésta dos alcaloides potentes: la eserina y la fisostigmina, que son aún usados en medicina. Las fórmulas de estos dos alcaloides fueron establecidas en la primera parte de este siglo y sus propiedades tóxicas minuciosamente investigadas.

La fisostigmina es uno de los muchos carbamatos importantes desde el punto de vista médico, lo que incitó a los químicos a sintetizar nuevas moléculas, todas caracterizadas por la presencia del ácido carbámico. El descubrimiento de la actividad anticolinesterasa de estas drogas sugiere toxicidad para insectos, sin embargo, no presentaban ninguna propiedad insecticida, aunque *in vitro* son poderosos inhibidores de la colinesterasa de insectos (Hassall 1990). Su baja toxicidad *in vivo* es

una consecuencia de su alto grado de ionización a pH 7 y debido a la presencia de un grupo amino cuaternario en sus moléculas que impide la penetración de la cutícula del insecto y así alcanzar el sistema nervioso del mismo.

Fue entonces necesario sintetizar moléculas liposolubles sobre el modelo de la fisostigmina. Los insecticidas carbámicos se originan de intentos por retener la parte N-metilcarbamato de la molécula, supuestamente tóxica, pero unida a un grupo más lipofílico. Esto, se argumentó, permitiría a la molécula penetrar a su sitio de acción y, en casos apropiados, daría el nivel conveniente de estabilidad química, permitiéndole aún a la molécula retener una afinidad adecuada por la enzima. Probablemente algunos miles de carbamatos han sido evaluados para determinar su potencia insecticida, pero menos de 20 están actualmente en el mercado en cantidades comercialmente significativas (Hassall 1990). Algunos de estos se enlistan en la Tabla II junto con su solubilidad en agua y otras propiedades.

En 1940 aparece el dimetán, el primer carbamato con propiedades insecticidas contra la mosca doméstica. En 1953, un nuevo carbamato fue sintetizado y parecía ser uno de los insecticidas más prometedores; éste fue llamado sevin y después carbarilo. Así para cada grupo de insecticidas, pasa un largo período de tiempo, entre el descubrimiento de su procedimiento de síntesis, el hallazgo de su actividad insecticida, la investigación de sus propiedades tóxicas y su liberación en el mercado.

Dentro de este grupo también se encuentran el dimetilán, el pirimicarb, el carbofurán, el propoxur, el carbosulfán, el benfuracarb, el oxamilo, el aldicarb, el bendiócarb y el metomilo. Los carbamatos, son ampliamente utilizados como insecticidas, herbicidas y fungicidas. Como grupo, son también menos persistentes que los hidrocarburos clorados, permaneciendo de unos cuantos días a dos semanas después de la aplicación, aunque existen excepciones. Pero al igual que los organoclorados y „organofosforados éstos son venenos del sistema nervioso que son capaces de causar alteraciones, defectos en el nacimiento y daño genético

(Hassall 1990).

## 1.8 Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas carbámicos

### 1.8.1 Identidad

El esqueleto de los carbamatos es el ácido carbámico del dióxido de carbono (Fig. 1). Este no existe en forma libre ya que es altamente inestable y se descompone rápidamente en dióxido de carbono y en amoníaco. Se estabiliza por la adición de un grupo alquilo (Barberá 1976, Moutschen-Dahmen *et al.* 1984). El reemplazamiento de uno de los protones asociados con el nitrógeno por un grupo metilo, resulta en la formación de ácidos monoacetil carbámicos (Ecobichon y Joy 1982). Su fórmula general y especialmente la de los empleados en este trabajo se presenta en las figuras 2 y 3.

Estos compuestos pueden ser obtenidos como sólidos cristalinos puros, lo que facilita las investigaciones químicas y biológicas, son ligeramente solubles en agua, pero pueden ser diluidos en gran variedad de disolventes orgánicos. La mayoría de ellos son sensibles a la luz, al calor y a la oxidación, por ello no representan mucho riesgo para el ambiente (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984). La química, bioquímica y toxicología de los carbamatos han sido revisadas desde hace más de dos décadas.

### 1.8.2 Propiedades

En general, los ésteres simples o derivados N-sustituídos del ácido carbámico son compuestos inestables. Especialmente bajo condiciones alcalinas, la descomposición tiene lugar y son formados, alcohol, fenol, amoníaco, amina progenitora y dióxido de carbono (Environmental Health Criteria 1986).

Las sales y ésteres del ácido carbámico sustituido son más estables que el ácido carbámico, lo cual es la base de la síntesis de muchos derivados que son plaguicidas biológicamente activos (Environmental Health



Criteria 1986).

Los ésteres carbámicos son sólidos cristalinos de baja presión de vapor con variable, solubilidad en agua pero usualmente baja. Son moderadamente solubles en disolventes tales como benceno, tolueno, xileno, cloroformo, diclorometano y 1,2,dicloroetano. En general, son pobremente solubles en disolventes orgánicos no polares tales como hidrocarburos, pero muy solubles en disolventes orgánicos polares tales como metanol, etanol, acetona, dimetilformamida, etc.

Los derivados carbámicos con propiedades herbicidas (como el pirolán y el dimetilán) son mucho más estables a la hidrólisis alcalina que los derivados metilcarbámicos (carbarilo y propoxur), que tienen una acción insecticida. Por ejemplo, la vida media del carbarilo es de 15 min a pH 10 comparada con 10 días a pH 7. Sin embargo, pirolán y dimetilán no se hidrolizan en el rango de pH de 4 a 10 (Aly y El-Dib 1972).

### 1.9 Diversidad estructural de los insecticidas carbámicos

Los carbamatos con propiedades insecticidas (y relacionadas), poseen la estructura general mostrada en la figura 2.

Existen tres subgrupos principales:

1. Comprende los ésteres aril *N*-metilcarbamatos de fenoles, que son compuestos con un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo fenilo o naftilo. En la Tabla II tres miembros del subgrupo son enlistados y la fórmula del carbarilo, como ejemplo tipo es dada en la figura 4.

Las fórmulas de tres miembros importantes de esta familia de carbamatos (aril-metilcarbamatos) son presentadas en la figura 5. Todos ellos poseen uno o más anillos carboxílicos aromáticos y todos son monometilcarbamatos.

2. Comprende ésteres *N*-metil y *N*-dimetil carbamatos de fenoles

heterocíclicos y el carbofurán (Fig. 6) es un ejemplo.

Los dos miembros mejor conocidos de este subgrupo (monometil y dimetilcarbamatos heterocíclicos) son el carbofurán y el pirimicarb (Fig. 6). La similitud entre las estructuras de estos insecticidas ya ha sido notada y una segunda característica de interés es que el pirimicarb es uno de los pocos ejemplos de insecticidas N-dimetilcarbamato.

3. Contiene derivados oxima de aldehídos (p.e. aldicarb, Fig. 4) y los estrechamente relacionados tiohidroximidatos. En las oximas, el grupo OH ha sido carbamilado.

Los tres miembros más importantes de este grupo (N-metilcarbamatos derivados de oximas) son aldicarb, metomilo y oxamilo. Todos ellos son muy tóxicos para los animales superiores (Tabla II). Sus estructuras son presentadas en la figura 7.

Los compuestos del subgrupo 3 ilustran más claramente la forma en la cual los carbamatos fueron diseñados específicamente para semejar a la acetilcolina y aún retener suficiente lipofilicidad para penetrar hasta su sitio de acción en insectos. Esta similitud estructural con la acetilcolina puede explicar la toxicidad muy elevada del aldicarb tanto para mamíferos como para insectos (Hassall 1990). Mientras que la estructura de los compuestos en los subgrupos 1 y 2 no es semejante a la acetilcolina. En la práctica, las estructuras en anillos confieren a las moléculas un balance de propiedades compatibles con la acción insecticida. Estas incluyen: (1) suficiente penetración de la cutícula, (2) transporte en la hemolinfa sin que sean degradados con rapidez, (3) un buen acoplamiento con la colinesterasa que permite la formación de un complejo enzima-carbamato con bajas concentraciones del carbamato y (4) la carbamilación de la enzima en una velocidad adecuada (Hassall 1990).

#### 1.10 Usos prácticos de los carbamatos

Son utilizados en la industria y en otras aplicaciones comerciales

así como en el hogar y para el control de vectores en salud pública (Environmental Health Criteria 1988). Considerando su acción se dividen en: insecticidas, nematocidas, moluscicidas, fungicidas y herbicidas.

Los insecticidas carbámicos son frecuentemente empleados para controlar insectos que no responden rápidamente a los compuestos organofosforados, pero ya que la mayoría de ellos son más caros que éstos últimos, se les considera generalmente como insecticidas para "trabajos difíciles", para ser utilizados en situaciones especiales o cuando otros pesticidas fallan. Sin embargo, su producción está en constante aumento y esto podría disminuir la diferencia de precios (Hassall 1990).

Existen dos circunstancias en las que el empleo de carbamatos puede ser apropiado. La primera, es para controlar insectos fuertes o recalcitrantes. La segunda es para controlar ácaros y otras plagas que han desarrollado resistencia a los insecticidas organofosforados, a este respecto, se ha descrito que a pesar de su similar forma de acción, la resistencia cruzada a compuestos de estos dos grupos no ocurre necesariamente (Hassall 1990).

Algunos usos comunes en la agricultura para los carbamatos son presentados en la tabla III.

### 1.11 Modo de acción de los derivados carbámicos

Existe mucha similitud entre el modo de acción de los compuestos organofosforados y los carbámicos en todas las clases de animales. La toxicidad es debida a la inhibición de la ACE en el sistema nervioso central, lo que produce parálisis. A diferencia de los primeros, los carbamatos no requieren de conversión metabólica para manifestar efectos tóxicos. Además la supresión puede ser reversible y la actividad enzimática algunas veces regenerada. La cinética de bloqueo ha sido cuidadosamente estudiada e involucra la carbamilación de la enzima (unión covalente de los grupos electrofílicos carbamoil) en sitios estéricos de las enzimas. Los carbamatos transfieren un grupo ácido a este sitio formando un complejo

enzimático acetilado (Moutschen-Dahmen *et al.*1984).

Sin embargo, hay que resaltar que mientras los compuestos organofosforados parecen actuar fosforilando la enzima, se ha visto experimentalmente que los carbamatos, compiten con la acetilcolina por el sitio activo.

Como ya se menciona anteriormente, la carbamilación de la enzima es inestable y la regeneración de la ACE es relativamente rápida comparada con la de una enzima fosforilada. Así, los plaguicidas carbámicos son menos peligrosos que los organofosforados. La proporción entre las dosis requeridas para producir la muerte y provocar síntomas menores de intoxicación, es substancialmente más grande para los primeros que para estos últimos (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1.12 Fuentes, transporte y distribución ambiental

La síntesis y comercialización de los plaguicidas carbámicos ha estado en progreso desde los 1950s.

Debido a que los diferentes carbamatos tienen propiedades distintas, es claro que cada uno debe ser evaluado por sus propios méritos y no se puede hacer una extrapolación de los resultados de uno a otro. Un carbamato puede ser rápidamente degradado mientras que otro puede ser fuertemente adsorbido en el suelo. Algunos lixivian fácilmente y logran alcanzar las aguas subterráneas. En los procesos, el tipo de suelo y su solubilidad en agua son de gran importancia. Además, debe ser reconocido que esto no sólo concierne al compuesto original sino también a sus productos de degradación o metabolitos (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1.13 Niveles ambientales y exposición

De los datos disponibles, parece que la bioacumulación en las distintas especies y diferentes cadenas alimenticias tiene lugar sólo en

pequeñas cantidades. Ciertos carbamatos pueden alcanzar las aguas subterráneas y como consecuencia llegar a fuentes de agua potable. Los pocos estudios disponibles indican que la exposición de la población general es baja. Sin embargo éstos deben ser confirmados (Environmental Health Criteria 1986.)

#### 1.14 Efectos sobre organismos en el ambiente

##### 1.14.1 Microorganismos

Los microorganismos del suelo son capaces de hidrolizar los carbamatos. Parece que éstos pueden fácilmente adaptarse para metabolizar los diversos tipos de carbamatos (Aly y El-Dib 1972), Sin embargo, los carbamatos y sus metabolitos pueden afectar la microflora y causar cambios que posiblemente tengan impacto importante en el mantenimiento de la productividad del suelo (Filip 1974).

##### 1.14.2 Organismos acuáticos

En general los carbamatos no son muy estables bajo condiciones acuáticas. La solubilidad en agua difiere considerablemente para los distintos carbamatos, una revisión al respecto se ha realizado (ver anexo I en Environmental Health Criteria 1986). Además de la fotodegradación los microorganismos son capaces de degradarlos. Mediante estos procesos los carbamatos son transformados (oxidación, hidrólisis) a otros compuestos. Algunos serán menos tóxicos, mientras que otros lo serán más que los compuestos originales.

Para la mayoría de ellos, parece poco probable, su persistencia en el ambiente, pero hay excepciones, tales como el dimetilán y el carbendazim (Environmental Health Criteria 1986).

Existen muchos datos sobre su toxicidad aguda en distintos peces de agua dulce y marina, así como en otros organismos (ver tablas 4 y 5 en Environmental Health Criteria 1986). Cuando éstos son deliberadamente

adicionados a los sistemas acuáticos, es necesario tomar precauciones ya que, con concentraciones altas, diferentes especies están en riesgo (Environmental Health Criteria 1986).

### 1.14.3 Otros organismos

Algunos carbamatos son altamente tóxicos para invertebrados y peces. En ciertos casos, el uso de éstos puede causar una reducción significativa en organismos no-blanco. Son tóxicos para gusanos y otros organismos que viven en el suelo. Aunque puede ocurrir una gran disminución en el número de gusanos de tierra cuando se aplican carbamatos al suelo, la población rápidamente se recupera, debido a la velocidad de degradación de estos compuestos (Environmental Health Criteria 1986).

En general la toxicidad para los animales silvestres es baja, pero existen excepciones. Esto significa que, con el propósito de juzgar el impacto de los carbamatos sobre los organismos en el ambiente, se debe referir a la información de cada carbamato en forma individual. Como una regla, los pájaros no son muy sensibles mientras que las abejas lo son extremadamente (Environmental Health Criteria 1986).

Debido a la importancia agrícola y ecológica de las abejas, han sido llevados a cabo extensos estudios comparativos sobre toxicidad con un gran número de compuestos con el propósito de identificar aquellos con un margen más amplio de seguridad (Atkins et al 1973).

## 1.15 Efectos sobre animales experimentales y en sistemas de prueba *in vitro*

### 1.15.1 Exposición única

#### 1.15.1.1 Oral

Se han llevado a cabo estudios de toxicidad con carbamatos por un periodo de 20-40 años. Es claro que la producción de estos compuestos ha

mejorado durante este tiempo y, consecuentemente, los principios activos puros han llegado a estar disponibles. El uso de compuestos impuros en los primeros estudios de toxicidad puede explicar los resultados contradictorios entre éstos y los más reciente (Environmental Health Criteria 1986).

La toxicidad aguda de los diferentes carbamatos varía desde muy tóxicos hasta potencialmente no-tóxicos. Las dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ) para las ratas van de menos de 1 mg/kg a más de 5000 mg/kg de peso corporal. Para ciertos metilcarbamatos,  $LD_{50}$  es 20 veces ó más la dosis efecto 50 ( $ED_{50}$ ) correspondiente. Esto permite en general, obtener una indicación temprana de envenenamiento antes de que una dosis letal sea absorbida (Environmental Health Criteria 1986)

Existe una relación de dosis-efecto entre la concentración, la severidad de los síntomas y el grado de inhibición de la colinesterasa. Hay también una correlación entre la duración de los síntomas y la persistencia *in vivo* del compuesto (Environmental Health Criteria 1986).

Debido a que la mayoría de los carbamatos tienen baja volatilidad, las investigaciones de inhalación son realizadas utilizando polvos o nubes. En estos trabajos, la toxicidad depende del tamaño de las partículas o de las gotas y es difícil de evaluar (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1.15.1.2 Dérmica

La toxicidad dérmica aguda de los carbamatos es por lo general de baja a moderada; una excepción es el aldicarb, que es muy tóxico. Para la mayoría de ellos los valores están por arriba de 500 mg/kg de peso corporal. Debe hacerse notar que existen datos sólo para una cantidad limitada de compuestos.

Los carbamatos producen irritación de ligera a moderada en piel y ojos, dependiendo del vehículo usado, de la duración del contacto y de cuando se aplica a la piel intacta o a la lesionada.

### 1.15.2 Exposiciones a corto y largo plazo

De estos estudios es evidente que, aparte de la actividad anticolinesterasa, se pueden encontrar los siguientes cambios: una influencia sobre el sistema hematopoyético, sobre la función (o en dosis elevadas, degeneración) del hígado y de los riñones y la degeneración de los testículos. Estas anormalidades en los distintos sistemas de órganos dependen de la raza del animal y de la estructura química del compuesto. Se ha observado una clara influencia sobre el sistema nervioso, tanto funcional como histológica, particularmente en animales que no son de laboratorio, tales como los cerdos (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1.15.2.1 Oral

Pruebas a corto plazo en ratas o perros expuestos a dosis orales repetidas de insecticidas o fungicidas carbámicos tales como carbarilo, propoxur, formetanate, carbofurán y benomilo), revelan inhibición de colinesterasa plasmática (sérica), eritrocítica y cerebral (Ivanova Cheminshanska y Antov 1976, Krechniak y Foss 1982).

### 1.16 Entrada a la cadena alimenticia

Los carbamatos son metabolizados o degradados en el suelo, o por microorganismos, plantas y animales. La cuestión del impacto ambiental y la importancia de los metabolitos con respecto a la persistencia y a la bioacumulación en ciertas especies así como en la cadena alimenticia, no se conoce todavía. Por el momento, parece que la mayoría, si no es que todos, los metabolitos de los carbamatos conocidos son biodegradados rápidamente y son, en términos generales, menos tóxicos para el ambiente que las moléculas originales (Still y Herret 1975).

### 1.17 Metabolismo de los plaguicidas carbámicos

Dada la importancia que ha ido adquiriendo esta clase de



substancias, no sólo es relevante conocer sus efectos, sino también investigar su metabolismo. Las determinaciones de los residuos son importantes únicamente si incluyen posibles productos secundarios tóxicos en adición al compuesto original. Ya que se trata cada vez más de evitar los compuestos persistentes en la protección de plantas y se tiene que asegurar que no se formen metabolitos estables (Schlagbauer y Schlagbauer 1972).

### 1.17.1 Metabolismo y modo de acción

La mayoría de los carbamatos son inhibidores activos de la ACE y no requieren de la activación metabólica. Los productos de su metabolismo son generalmente menos tóxicos que los compuestos originales, aunque existen algunas excepciones. La transformación de los carbamatos es básicamente la misma en mamíferos, insectos y plantas, así como los efectos tóxicos son similares en insectos y en mamíferos. No se acumulan en el cuerpo de los mamíferos ya que son rápidamente excretados, principalmente por vía urinaria (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1.17.1.1 Descomposición de los carbamatos en la inhibición de la ACE

Se asume que el efecto de los insecticidas carbámicos está basado en la carbamitación de la ACE.

Los carbamatos son insecticidas efectivos en virtud de su capacidad para inhibir la ACE en el sistema nervioso. ACE cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) a colina y ácido acético. Lo que resulta en un decremento de la concentración de ACh y el cese de la contracción muscular.

La ACh es el mediador sináptico de los impulsos nerviosos en el sistema nervioso de mamíferos e insectos:

- a) Como un neurotransmisor en el cerebro de mamíferos y en el sistema nervioso central de insectos;
- b) Como un neurotransmisor pre-ganglionar en el sistema nervioso

autónomo de mamíferos;

c) En las terminales nerviosas post-ganglionares del sistema nervioso autónomo;

d) En las uniones neuromusculares del músculo esquelético.

Cuando la ACE es inhibida por un éster carbámico, ésta no puede seguir hidrolizando la ACo. Así la concentración de ACo permanece elevada dando origen a una estimulación continua del músculo lo cual, en determinado tiempo, lleva a la fatiga y tetania (Environmental Health Criteria 1986).

Los carbamatos al igual que los organofosforados, pueden inhibir las esterasas que tienen serina en sus centros catalíticos activos; éstas son llamadas serin N-esterasas o beta-esterasas (Environmental Health Criteria 1986).

Así, la inhibición de la ACE por ésteres carbámicos, causa efectos tóxicos en animales y seres humanos que resultan en una variedad de síntomas de envenenamiento y eventualmente culminan en fallas respiratorias y en la muerte.

El mecanismo de inhibición de la ACE por ésteres carbámicos (la carbamitación) se describe en la figura 8.

El sitio de carbamitación de la enzima corresponde a la parte hidroxilo del aminoácido serina. La velocidad de regeneración de la enzima carbamitada a ACE es relativamente rápida comparada con aquella de una enzima que ha sido inhibida (fosforilada) por un pesticida organofosforado (Reiner 1971). Así, como se menciona anteriormente, las exposiciones humanas a pesticidas carbámicos son menos peligrosas que a organofosforados, ya que la proporción entre las dosis requeridas para producir mortalidad y para causar síntomas mínimos de envenenamiento es, en general, substancialmente más grande para compuestos carbámicos que para organofosforados (Vandekar et al. 1971).

Para comprender el mecanismo de toxicidad, es necesario examinar los eventos que tienen lugar en la unión neuromuscular. Cuando un músculo está inervado, como se presenta en la figura 9, un impulso nervioso que baja por la neurona alcanza el extremo del nervio donde la ACo, que esta almacenada en vesículas en las terminales nerviosas es liberada entre las uniones. Dentro de 2-3 ms, la ACo repercute sobre el receptor del lado del músculo (Environmental Health Criteria 1986).

### 1.17.2 Metabolismo

Las rutas metabólicas de los carbamatos son básicamente las mismas en plantas, insectos y mamíferos.

Los carbamatos con excepciones pueden penetrar fácilmente la piel, las mucosas, los tractos respiratorio y gastrointestinal. Generalmente, los metabolitos son menos tóxicos que los compuestos originales. Sin embargo, en ciertos casos, son tan tóxicos o más que sus progenitores.

#### 1.17.2.1 Absorción

Estudios *in vivo* han demostrado que los carbamatos son casi totalmente absorbidos durante el tránsito normal a través del tracto gastrointestinal,

Estudios de absorción dérmica en ratas han mostrado que para el benomilo marcado radioactivamente, ésta es lenta. Después de su incorporación rápidamente tiene lugar el metabolismo y la eliminación por la orina. Después de 1 h, cantidades pequeñas de los principales metabolitos del benomilo, el 5-hidroxi-2-benzimidazol carbamato (5-HBC) y el metil 2-benzimidazol carbamato (MBC), pueden ser detectadas en la orina, confirmando su rápido metabolismo. Después de 24 h de la aplicación no se registra radioactividad en ninguna muestra de tejido (FAO/WHO 1985),

### 1.17.2.2 Distribución

Ahdaya *et al.* (1981) al investigar la absorción y distribución de los carbamatos, encuentran que en ratones, todos son diseminados rápidamente a los diferentes tejidos y órganos. Los valores medios de penetración van desde 8 a 17 min por carbamato.

### 1.17.3 Transformaciones metabólicas. Mecanismos de biotransformación

Al ser comparadas las diversas rutas de degradación para los carbamatos se nota que ocurren reacciones similares con las distintas formulaciones.

Los pesticidas carbámicos son biotransformados metabólicamente por una variedad de reacciones químicas a moléculas más polares y con mayor solubilidad en agua. La etapa inicial, usualmente de naturaleza oxidante, introduce un grupo funcional hidroxilo que sirve como sitio para una reacción secundaria de conjugación que produce compuestos que pueden ser excretados vía la orina o las heces. En algunos casos, los metabolitos oxigenados, tales como el 5-hidroxiopropoxur o el 5-hidroxicarbarilo, son tóxicos y poseen actividad anticolinesterasa (Fig. 10) (Black *et al.* 1973). Esto indudablemente contribuye al incremento de la toxicidad del compuesto original.

#### 1.17.3.1 Oxidación

La ruta principal del metabolismo de los ésteres carbámicos es oxidante y está generalmente asociada con las oxigenasas de función múltiple (MFO), que se localizan en diferentes tejidos. En la figura 11 se presentan ejemplos de los sitios de un ataque por oxidación en un metil carbamato hipotético.

No se sabe si las hidroxilasas son estereoespecíficas. El ataque

sobre una molécula carbámica por hidroxilasas puede ocurrir en tres lugares: 1) en el grupo N-metilo o en los dos grupos N-metilo, 2) en el anillo y/o 3) en las cadenas laterales.

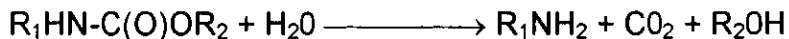
Dependiendo de los grupos funcionales pueden ocurrir una variedad de reacciones en la molécula (Fukuto 1972), como se presenta en la figura 12, las reacciones típicas de oxidación incluyen: (a) hidroxilación de anillos aromáticos (b) O-desalquilación, (c) N-metil hidroxilación, (d) N-desalquilación, (e) hidroxilación y subsecuentemente oxidación de cadenas laterales alifáticas y (f) oxidación de tioésteres a sulfóxidos y sulfonas.

Debido a la diversidad de grupos presentes en los insecticidas carbámicos, el metabolismo de estos compuestos es frecuentemente complejo. El carbarilo, por ejemplo, es un compuesto relativamente simple que es metabolizado en al menos 15 compuestos diferentes en mamíferos a través de una variedad de reacciones oxidantes e hidrolíticas (Leeling y Casida 1966).

### 1.17.3.2 Hidrólisis

Ocurre con casi todos los carbamatos investigados, aunque se piensa que su contribución al metabolismo total cambia ampliamente.

Los carbamatos son hidrolizados tanto espontáneamente como por esterazas (Aldridge y Reiner 1972), teniendo como productos finales, una amina, dióxido de carbono y un alcohol o fenol:



Los mecanismos de hidrólisis son distintos para los N-metil y para los N-dimetilcarbamatos.

En general, las tasas de hidrólisis de las esterazas son más rápidas

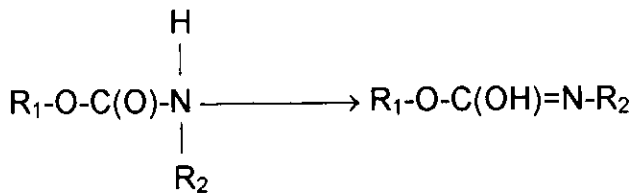
en mamíferos que en plantas e insectos, aunque hay excepciones. Las diferencias en las velocidades de hidrólisis enzimáticas dependen de la estructura de los carbamatos y de la esterasa en particular.

La hidrólisis es catalizada por un grupo de enzimas conocidas como A-esterasas o arilesterasas. Ha sido establecido que la hidrólisis enzimática ocurre tanto *in vivo* como *in vitro*, pero hasta ahora, no se ha establecido en que proporción la hidrólisis *in vivo*, contribuye a la desintoxicación del compuesto (Environmental Health Criteria 1986).

### 1.17.3.3 Conjugación

Este término describe reacciones de desintoxicación de xenobióticos con sustancias propias del organismo. No se sabe, en el caso de los carbamatos, si el daño es causado por el consumo exagerado de sustancias corporales como sucede en la desintoxicación de los bromobencenos por la disminución de cisteína. Generalmente sólo están involucradas cantidades pequeñas de estas moléculas; algunas veces existe la sustancia en abundancia o no es afectada en su funcionamiento (p.e. la inserción dentro de la lignina o de la grasa corporal). Se pueden clasificar las reacciones de conjugación en cuatro grupos: 1) formación de glucosa, 2) acoplamiento con aminoácidos, 3) reacciones con compuestos de azufre y 4) acilación.

Para que los xenobióticos sean capaces de formar conjugados deben presentar ciertos grupos tales como -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH y -OH o adquiridos durante el proceso de su metabolismo. Estos grupos ocurren muy raramente en los carbamatos; sin embargo, los compuestos monosustituidos, pueden ser enolizados



También se forman *N*-conjugados sin una transformación previa. Los carbamatos *N*-disustituidos tienden a ser hidrolizados o hidroxilados de antemano.

La desintoxicación por la formación de conjugados está basada en el carácter fuertemente polar de las moléculas creadas. Éstas no pueden penetrar la cubierta lipídica de las células nerviosas. Esto fue demostrado por Metcalf *et al.* (1966) con compuestos hidroxilo. Así, 4-hidroxi y 5-hidro-carbarilo son, *in vitro*, fuertes inhibidores de la CoE, pero no en organismos vivos, lo que parece probar que la sustancia no alcanza las colinesterasas nerviosas.

Mientras que en las plantas no ocurre la secreción de sustancias líquidas, la selección de los compuestos por los túbulos renales en los animales juega un papel importante. Se ha demostrado en pollos que los electrolitos fuertes y especialmente ácidos, tienen mayor capacidad para penetrar las paredes de los túbulos que los más débiles. Los ácidos glucorónicos, arilsulfúricos, arilfosfóricos y mercaptúricos, por mencionar sólo unos cuantos ejemplos de productos del metabolismo de carbamatos, son en cualquier caso electrolitos más fuertes que los carbamatos.

Los conjugados son diferentes en varios organismos. En resumen la conjugación de los compuestos hidroxilados producida por sistemas enzimáticos que metabolizan xenobióticos es una reacción importante que lleva a la formación de compuestos solubles en agua tales como los *O*- y *N*-glucorónidos, los sulfatos y el ácido mercaptúrico en mamíferos, que pueden ser eliminados vía la orina o las heces. Los glucósidos y los fosfatos son los productos de conjugación más comunes en plantas.

### 1.18 Metabolismo en plantas

La primera etapa en la degradación metabólica de los carbamatos en el suelo es la hidrólisis. Los productos de esta hidrólisis pueden seguir siendo degradados en los sistemas suelo/planta.

Las plantas pueden metabolizar carbamatos, en éstas, la arilhidroxilación y la conjugación, o el rompimiento hidrolítico son las principales rutas de desintoxicación. Los resultados de ciertos trabajos sugieren que los carbamatos son distribuidos exclusivamente vía el sistema apoplástico en las plantas.

Los estudios sobre el metabolismo y las rutas de los pesticidas carbámicos en plantas son de gran importancia para evaluar los riesgos que para los seres humanos implica el consumo de frutas y vegetales que contienen residuos de los pesticidas aplicados y de sus metabolitos.

Generalmente, el metabolismo en las plantas sigue otra ruta de desintoxicación. Éstos son enzimáticamente degradados y conjugados ya sea con aminoácidos (p.e. cisteína) o con glucósidos o fosfatos, que son almacenados como metabolitos terminales (Still y Rusness 1977, Aldridge y Magos 1978).

Las propiedades toxicológicas de los conjugados vegetales en mamíferos u otros animales no son generalmente conocidas. Los insecticidas metilcarbámicos son vulnerables al rompimiento hidrolítico, que resulta en productos de desintoxicación. La desintoxicación de los ésteres carbámicos en plantas por hidrólisis ocurre en menor proporción que la desintoxicación por metabolismo oxidante. Sin embargo, el rompimiento hidrolítico de la parte éster, es un mecanismo de desintoxicación significativamente importante (Environmental Health Criteria 1986).

### 1.19 Efectos para el hombre

Existen diferentes condiciones por las cuales los insecticidas pueden representar un riesgo. Primero hay un peligro ocupacional para dos grupos de trabajadores, aquellos de las plantas productoras y los ocupados en las áreas agrícolas y secundariamente, la posibilidad de accidentes, incluyendo suicidios, que llevan a intoxicaciones agudas. Finalmente, para la población en general hay una exposición menor a través



de las cadenas tróficas.

Los riesgos para la salud del hombre ocurren de una exposición ocupacional resultando en una intoxicación caracterizada por los síntomas colinérgicos causados por la inhibición de la enzima ACE. Varios casos de intoxicación han sido descritos. La mayoría de ellos fueron personas que aplicaban insecticidas dentro de casas en los trópicos para controlar vectores de la malaria o sobre cultivos. Las principales rutas de exposición fueron por inhalación y a través de la piel.

De estudios controlados en humanos, es claro que los síntomas de la intoxicación son observados pocos minutos después de la exposición y pueden durar unas cuantas horas. Después de esto, la recuperación se inicia y dentro de lapsos cortos, los síntomas desaparecen y la actividad ACE en eritrocitos y plasma retorna a la normalidad, ya que los carbamatos son rápidamente metabolizados y los productos excretados. Su aparición en la orina puede ser usada para el monitoreo biológico. Aparte de los síntomas indicadores de la intoxicación de la ACE, otros signos y síntomas inducidos por ciertos carbamatos han sido descritos, tales como irritación de la piel y de los ojos, hiperpigmentación e influencia en la función de los testículos (ligero incremento de anomalías espermáticas). Éstos fueron encontrados en pocos estudios y deben ser confirmados antes de adjudicarse su inducción a los carbamatos.

Las intoxicaciones severas con carbamatos provocan síntomas similares a aquellos mencionados para los compuestos organofosforados (anexo 2). Éstos incluyen constricción de las pupilas de los ojos, fatiga muscular o espasmos musculares, falla respiratoria, baja presión sanguínea y paro cardíaco. Las convulsiones pueden ser tónicas produciendo extremidades rígidas o clónicas, lo que produce movimientos rápidos incontrolados (Hassall 1990).

Con una dosis subletal, los humanos sufren dolores de cabeza, vómito y diarrea. Una intoxicación leve con carbamatos, al igual que con insecticidas fosforados, puede afectar los patrones de comportamiento,

reduciendo la concentración mental y disminuyendo la capacidad de aprendizaje (Hassal 1990).

La evidencia de que existen efectos tóxicos crónicos provocados por los carbamatos ha sido revisada por Ecobichon (1982). En esencia, se ha notado que son necesarios dosis bastante grandes para producir efectos tales como la alteración en el ciclo estral o el deterioro de la fertilidad. Usando *Puntius*, un pez hindú de agua dulce, Pant y Singh (1983) encuentran que 0.3 ppm de carbarilo en el agua causa el abatimiento de glucógeno en el cerebro e hígado, pero los niveles de colesterol en el último se incrementan.

#### 1.19.1 Estudios epidemiológicos

No se hallaron investigaciones en personas ocupacionalmente expuestas (o al menos inicialmente) a pesticidas carbámicos. Tales estudios son necesarios para que los efectos a largo plazo de esta clase de plaguicidas sobre los seres humanos puedan ser evaluados adecuadamente (Environmental Health Criteria 1986).

#### 1. 19.2 Signos y síntomas de intoxicación aguda por carbamatos

El cuadro clínico de la intoxicación por carbamatos, resulta de la acumulación de ACo en las terminales nerviosas. Las señales y síntomas pueden ser categorizados dentro de los siguientes tres grupos:

##### 1 Manifestaciones muscarínicas

- A. • Aumento de la secreción bronquial, sudoración excesiva, salivación y lacrimación
- B. • Contracción de las pupilas, broncoconstricción, calambres abdominales (vómito y diarrea)
- C. Bradicardia

## 2 Manifestaciones nicotínicas

- A. Fasciculación de los músculos finos (en casos severos, los músculos respiratorios y del diafragma también son involucrados)
- B. Taquicardia

## 3 Manifestaciones en el sistema nervioso central

- A. Dolor de cabeza, disnea, ansiedad, confusión mental y coma
- B. Depresión del centro respiratorio

Todos estos signos y síntomas pueden ocurrir en diferentes combinaciones en su orden y secuencia, dependiendo del compuesto, la dosis y ruta de exposición. La duración de los síntomas es usualmente más corta que la observada en intoxicaciones con organofosforados. Las intoxicaciones ligeras pueden incluir efectos muscarínicos y nicotínicos únicamente. Casos severos también presentan participación del sistema nervioso central, el cuadro clínico es la falla respiratoria que algunas veces provoca edemas pulmonares debido a la combinación de los síntomas mencionados anteriormente (Environmental Health Criteria 1986).

### 1.20 Propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas de los insecticidas carbámicos

Se ha descrito que los plaguicidas tienen actividades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas lo que justifica un intenso estudio genético (Yin-Tak 1983, Moutschen-Dahmen *et al.* 1984, Badr e Ibrahim 1987).

Desde 1931 se ha reportado que ciertos plaguicidas causan alteraciones cromosómicas, así como otras anomalías citológicas tales como: fallas en la división de la pared celular, acción antimitótica, hinchamiento del núcleo, cromosomas difusos, cromosomas agrupados, cromosomas pegajosos, contracción cromosómica, desespiralización de cromosomas, aberraciones subcromatídicas, cromatídicas y cromosómicas,

rearreglos cromosómicos, citomixis, acción C-mitótica, endopoliploidías, células bi- o multi-nucleadas y micronúcleos (Grant 1973).

Existe poca evidencia, si es que hay alguna, que sugiera que los compuestos metil carbámicos sean mutagénicos. Resultados negativos se han encontrado con carbarilo, metomilo, propoxur, carbofurán y pirimicarb, usando una variedad de microorganismos como indicadores, incluyendo cepas de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* (Environmental Health Criteria 1986).

Los carbamatos más conocidos han sido evaluados para determinar su actividad mutagénica en diferentes sistemas de prueba. Algunos inducen efectos, otros son negativos. En general, los metil carbamatos son negativos en pruebas con mamíferos, mientras que compuestos tales como carbendazim, benomilo y los derivados del 2 tiofanato presentan efectos positivos con niveles de dosis muy altos, en ciertos sistemas. El radical benzimidazol puede actuar como un análogo de base para el ADN y como un veneno para la formación del huso acromático. Todos estos son agentes antimitóticos y pueden causar la inhibición de la división celular, retraso mitótico y una baja incidencia de daño cromosómico. Algunas veces los resultados son contradictorios o no pueden ser reproducidos, pero resultados positivos para mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas están bien documentados. Los derivados del benzimidazol pueden ser considerados como compuestos ligeramente mutagénicos (Environmental Health Criteria 1986).

Por otra parte, el carbamato de etilo (uretano), es un bien conocido carcinógeno y parece que su estructura química es óptima para tales efectos. Cualquier cambio en la molécula parece disminuir su potencia mutagénica, particularmente cuando el grupo etilo es reemplazado por cadenas laterales largas. Los grupos alquilo sobre el nitrógeno también reducen su actividad (Environmental Health Criteria 1986).

No han sido encontradas indicaciones claras de efectos carcinogénicos en los estudios a largo plazo con diferentes carbamatos.

Sin embargo no puede excluirse la posibilidad de que estos compuestos puedan tener propiedades carcinogénicas o promotores.

Los pesticidas carbámicos pueden ser convertidos a compuestos N-nitroso. Esto se demuestra con animales en diversos estudios de nitrosación *in vivo* en los cuales fueron administrados niveles elevados de carbamatos en combinación con dosis altas de nitritos. Estos compuestos N-nitroso han sido considerados como mutagénicos o carcinogénicos. Sin embargo, la cantidad de compuestos nitroso que pueden ser esperados como resultados de la ingesta en la dieta de residuos de pesticidas carbámicos es despreciable en comparación con los precursores nitroso que ocurren naturalmente en la comida y el agua (Environmental Health Criteria 1986).

Sin entrar en detalle, se sabe que una gran cantidad de derivados N-nitroso de metilcarbámicos son potentes mutágenos. Los derivados nitroso del aldicarb, propoxur, carbofurán, trimetocarb y metomilo, causan rompimientos de una sola hebra en células normales de piel de humanos. Los datos sugieren que el ADN celular humano *in vivo* fue alterado irreversiblemente, resultando en numerosos enlaces álcali-sensibles (Blevins et al 1977b).

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre daños reproductores y teratogénicos con diferentes carbamatos en varias especies animales (Environmental Health Criteria 1986). Distintos tipos de anomalías fueron encontrados, p.e. incrementos en mortalidad, desórdenes en el sistema endocrino y efectos sobre la hipófisis y su función gonadotrópica, principalmente a dosis elevadas. Generalmente, los efectos fetales incluyen incrementos en la mortalidad, decrementos en la ganancia de peso durante las primeras semanas después del nacimiento e inducción de muerte temprana del embrión. Todas estas alteraciones pueden ser resumidas como efectos embriotóxicos. Ciertos carbamatos también inducen daños teratogénicos, principalmente a dosis elevadas aplicadas por entubación. Cuando los mismos niveles de dosis son administrados con la dieta, no se observan cambios.

## 1.21 El propósito

Estos compuestos han sido ampliamente usados debido, como ya se mencionó, a su baja toxicidad para los mamíferos y a su degradación relativamente rápida en el suelo (Dulout et al. 1982).

Algunos carbamatos han sido detectados en cantidades residuales en verduras y frutas durante o poco después de la cosecha. La mayoría de estos plaguicidas se espera que se degraden en los siguientes días o semanas y probablemente sólo las fracciones solubles en agua de los residuos en alimentos están biodisponibles (Yin-Tak 1983)..

El hecho de que los carbámicos se hayan desarrollado más recientemente, hace que las investigaciones acerca de su acción, selectividad, metabolismo y relaciones entre estos factores, aún no alcancen la importancia que se observa para los insecticidas fosforados. Es así importante precisar la existencia de efectos deletéreos, no atribuibles a alteraciones en el sistema colinérgico.

En general, existen muy pocos estudios sobre el grupo de los carbámicos con excepción del carbarilo. Durante los últimos años las propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas de algunos plaguicidas carbámicos han sido descritas. La mayoría de los resultados han sido contradictorios, pero al mismo tiempo importantes, ya que indican claramente que el uso excesivo de este tipo de compuestos puede modificar la estructura genética de una manera impredecible (Moutschen-Dahmen et al. 1984).

Los ingredientes activos de los insecticidas carbámicos aprobados en México son: aldicarb, carbarilo, carbofurán, metomilo, oxamilo, pirimicarb, propoxur y tiodicarb.

## 1.22 Lannate-90

El lannate-90 es un insecticida carbámico a base de metomilo (Fig.

13) al 90%, ha sido usado para el control de plagas de tabaco, algodón y gran variedad de frutas y vegetales (Hemavathy y Krishnamurthy 1987a,b, Du Pont 1999a, ver anexo 2 en Valencia-Quintana 1992). También se utiliza en el tratamiento de suelos.

El metomilo es un insecticida sistémico y de contacto que es aplicado frecuentemente sobre el follaje. Por vía oral es menos tóxico que el aldicarb y su DL50 dérmica es inesperadamente alta (500 mg/kg para conejos). Sin embargo para sustancias con una toxicidad oral tan alta como la del metomilo, es esencial establecer un cuidado constante.

El producto se utiliza para controlar un amplio espectro de insectos que atacan al follaje y a los frutos de las plantas cultivadas; tiene un magnífico poder ovicida en ciertos lepidópteros y actúa también contra una amplia variedad de nemátodos y ácaros. Éste se puede utilizar en las etapas cercanas a la cosecha sin interferir con los depredadores y los parásitos naturales de la plaga.

Sus propiedades físicas y químicas se presentan en el anexo 3.

#### 1.22.1 Modo de acción

El lannale-90 es tóxico por contacto y por vía estomacal, además tiene un marcado poder sistémico. El efecto de contacto de este producto es sumamente rápido; posee muy buena penetración en los tejidos vegetales, por lo que proporciona a éstos una magnífica protección contra el ataque de insectos; su capacidad sistémica se hace evidente al comprobarse que se mueve dentro de los tejidos de las hojas en forma transversal (del haz hacia el envés y viceversa) y distalmente (del punto de penetración a los extremos de la hoja); aplicado al suelo presenta acción sistémica y se mueve de la raíz al follaje; sin embargo este método de control es poco recomendable por la gran cantidad de producto que es necesario utilizar (Du Pont 1999a).

Agentes humectantes como los esparcidores adherentes y los

surfactantes, ayudan a que tenga mejor distribución y mayor recubrimiento en la superficie de la planta, permitiendo la penetración del insecticida tanto en los tejidos de la planta como en la superficie cerosa de muchas larvas de lepidópteros en sus estados tardíos.

Actúa por contacto directo sobre el insecto o por la ingestión de partes tratadas de las plantas. Además tiene poder ovicida sobre algunos lepidópteros. Ha demostrado ser un arma excelente del agricultor mexicano en la batalla contra el gusano cogollero, la celama y la mosca Midge (Du Pont 1999a,b).

Es considerado "altamente riesgoso". Pertenece a la clase toxicológica 'Categoría 1b' (producto muy tóxico), en la guía de clasificación presentada por la OMS (WHO 1984-1985).

En México, el lannate se presenta en las formas granulada al 90% de ingrediente activo y líquida al 24%.

#### 1.22.2 Toxicidad (anexo 4)

Los efectos tóxicos a largo plazo del metomilo han sido estudiados en diferentes sistemas de prueba. Aparte de los efectos sobre la actividad ACE, han sido descritos daños en el hígado, riñones, tiroides y testículos y también sobre las actividades de otras enzimas tales como la ATPasa, Gi-6-asa, LDH, GPT, Alk-Pasa, etc. (Ivanova-Chemishanska y Antov 1976, FAO/WHO 1985).

##### 1.22.2.1 Dérmica

El metomilo aplicado a la piel intacta de conejos a una tasa repetida de 200 mg/kg por día causa ligeras señales de intoxicación tales como escurrimiento nasal, jadeo y diarrea transitoria. Todos los animales sobreviven a las 15 aplicaciones. Sin embargo cuando se administra sobre la piel lesionada, son evidenciadas señales sistémicas mucho más serias, tales como, escurrimientos nasales, salivación, calambres, falta de



coordinación e hipertensión abdominal, algunos animales murieron (Kaplan y Sherman 1977).

#### 1.22.2.2 Reproductora

Al llevarse a cabo un estudio de reproducción, en donde se administran dosis de 0, 50 y 100 mg/kg de metomilo en la dieta durante 3 meses, no existe evidencia de cambios en los índices de reproducción, lactancia o ganancia de peso, que sugieran que el metomilo los afecte, en las camadas de tres generaciones.

#### 1.22.2.3 Embriotoxicidad y teratogenicidad

Cuando son alimentados conejos con niveles de 0, 50 y 100 mg de metomilo/kg entre los días 8 y 16 de gestación, no se observan anomalías esqueléticas o viscerales en los fetos (Kaplan y Sherman 1977).

#### 1.22.3 Metabolismo

Los estudios a nivel mundial han demostrado que el metomilo, ingrediente activo del Iannate-90, se degrada en compuestos que se encuentran comúnmente en la naturaleza, por lo que sus residuos no afectan al ambiente (Du Pont 1999a)

Una vez que ha sido aplicado al follaje, su degradación ocurre después de 48 horas, el metomilo se descompone en amoníaco, gas carbónico y agua; con respecto al que penetra a la planta, este empieza a metabolizarse de las 48 a las 72 horas; en este caso, parte del producto se convierte en gas carbónico y acetonitrilos, por otra parte, es asimilado por la planta en forma de lípidos (palmitatos, estearatos, etc.), de ésteres de los ácidos tartárico, glicólico y otros ácidos orgánicos naturales. No se acumula en la carne, la grasa o la leche, por lo que se puede usar pocos días antes de la cosecha (anexo 5). Cuando el Iannate se asperja en el suelo, sufre una pérdida del 50 al 75% del metomilo en un lapso de 30 días, a los

90 solo quedan vestigios (Du Pont 1999a).

Junto con el aldicarb que tiene una aplicación muy versátil, el metomilo también es contado entre las oximas. El metomilo difiere del aldicarb sólo por la ausencia de un grupo metilo sobre el átomo de carbono terciario. El metabolismo de ambos puede ser muy similar.

En todos los organismos la ruta principal de degradación lleva primero al sulfóxido por la vía de la oxidación del átomo de azufre y posteriormente a la sulfona y con la hidrólisis a la oxima-sulfona tiene lugar. La oxidación al sulfóxido procede muy rápidamente. La máxima cantidad del sulfóxido en la leche de vaca se alcanza después de tres horas (Dorough et al. 1970) en larvas de insectos esto fue obtenido luego de dos horas (Bull et al. 1967) en plantas de algodón después de tres días (Coppedge et al. 1967).

El sulfóxido es inestable. Se ha encontrado en la orina de la rata sólo en los primeros días después de la aplicación oral (Knaak et al. 1966) La vida media de éste en las plantas de algodón es de 4 días (Metcalf et al. 1966)

El metabolismo del metomilo parece ser cuantitativamente diferente al del aldicarb en que ni el sulfóxido ni la sulfona se acumulan en los animales ni en las plantas hasta ahora investigados. En lugar de eso, al formarse son rápidamente degradados para dar origen a compuestos volátiles y solubles en agua; los primeros incluyen dióxido de carbono (exhalado por los animales) y metilcianuro, mientras que la mayoría de los compuestos solubles en agua no han sido identificados.

Harvey y Pease (1973), encuentran que, bajo condiciones de campo en Delawere, Florida y Carolina del Norte, el metomilo se degrada casi completamente en un mes, la mayor parte de éste se pierde del suelo por volatilización, presumiblemente como dióxido de carbono. Pequeñas cantidades extraídas del suelo consisten de metomilo, S-metil N-hidroxitioacetamido y algunos compuestos polares.

El metabolismo del aldicarb en plantas es el mismo que en mamíferos. En algodón, la parte tioéter es rápidamente oxidada al sulfóxido y este último es lentamente transformado a sulfona. El sulfóxido es más estable y puede estar presente en las plantas de algodón aún dos meses después del tratamiento. Debido a su persistencia en plantas y a su elevada actividad anticolinesterasa comparada con el aldicarb mismo, el sulfóxido y la sulfona pueden ser tomados en cuenta cuando son consideradas las tolerancias residuales.

En un estudio de Harvey y Raiser (1973) se menciona que el metomilo rápidamente se degrada a dióxido de carbono y acetonitrilo, que se volatiliza de los tejidos vegetales, la vida media del metomilo es del orden de 3 a 6 días. El resto del compuesto es reincorporado dentro de los componentes naturales de la planta.

### 1.23 Pirimor-50

Acerca de este insecticida, existe relativamente menos información, comparada con la del metomilo. Su ingrediente activo es el pirimicarb (Fig.14), que se encuentra al 50 % y actualmente es fabricado por Zeneca.

Este es recomendado para diferentes cultivos como son alfalfa, gran variedad de frutales, cereales, ornamentales, vegetales y tabaco, contra distintas plagas. Las dosis dependen del tipo de cultivo y la plaga a la cual va a ser dirigido (anexo 6).

Algunas de sus propiedades físicas y químicas así como otras características se encuentran en el anexo 7.

#### 1.23.1 Modo de acción

El pirimicarb trabaja por contacto y presenta acción sistémica. Es específico para áfidos y se usa en programas integrados de control.

Es un aficida selectivo, de acción fumigante y de contacto, controla rápida y eficientemente las plagas de áfidos, tiene poco efecto sobre otras formas de vida y en particular no mata muchos parásitos y depredadores naturales, los cuales proveen algún grado de control biológico natural de plagas de insectos. Además de esto, no afecta la vida silvestre (ICI Agrochemicals 1989).

Cuando se asperja sobre el follaje hay un movimiento translaminar rápido, pero la acción sistémica es sólo alcanzada por la absorción a través de las raíces de la planta después de su aplicación en el suelo.

### 1.23.2 Toxicidad

El pirimicarb es pobremente absorbido a través de la piel, por lo que su toxicidad dérmica es baja. Tiene moderada toxicidad oral y baja toxicidad para mamíferos.

#### 1.23.2.1 Dérmica

Aplicaciones cutáneas diarias de 500 mg de pirimicarb por kg de peso corporal a la piel de conejos durante 24 horas por 14 días no producen señal de intoxicación (FAO/WHO 1977).

### 1.24 Actividad genotóxica del metomilo y del pirimicarb

En el caso de los insecticidas metomilo y pirimicarb existe poca información acerca de su posible genotoxicidad. Los escasos o nulos reportes sobre los efectos genéticos de dichos compuestos revelan la necesidad de realizar mayor investigación en estos aspectos. Aunque estos pesticidas son desdoblados rápidamente y sus residuos son de bajo nivel de riesgo, la exposición a largo plazo por parte del hombre a estos agentes en los sitios de producción y de uso, demanda un cuidadoso monitoreo (Hemavathy y Krishnamurthy 1987a,b).

#### 1.24.1 Lannate o metomilo

Con relación a la acción mutagénica del metomilo se ha descrito que en *Salmonella* con la prueba de Ames da resultados negativos (Blevins et al. 1977a, Quinto et al. 1981). Blevins et al. (1977a), encuentran que sólo su derivado nitroso (N-Nitroso metomilo) incrementa la frecuencia de revertantes.

La genotoxicidad del lannate 20, ha sido evaluada en las células germinales de ratones, mediante el ensayo de morfología del espermatozoides y preparaciones cromosómicas en meiosis. Se obtienen resultados positivos con tres concentraciones subletales de 20, 40 y 60 mg/kg, indicando su mutagenicidad (Hemavathy y Krishnamurthy 1987a).

No se observan rupturas de una sola hebra del ADN de células humanas después del tratamiento con metomilo ( $10^{-5}$  M), pero su derivado nitroso en la misma concentración produce numerosos rompimientos (Blevins et al. 1977b). El metomilo que sin activación metabólica no aumenta la frecuencia de ICH, si lo hace significativamente en presencia de la mezcla S9 en linfocitos humanos *in vitro* (Debuyst y Larebeke 1983).

El lannate 20 incrementa significativamente la frecuencia de letales recesivos en *Drosophila melanogaster*, sin embargo, no produce translocaciones (Hemavathy y Krishnamurthy 1987b).

Cuando ratas hembra son alimentadas con niveles de dieta de 400 ppm de metomilo, durante 22 meses, provoca un decremento en los niveles de hemoglobina.

#### 1.24.2 Pirimor o pirimicarb

Son escasos los reportes acerca del potencial genotóxico de este plaguicida, por lo que es necesario realizar investigaciones acerca de su actividad genética.

Estudios a largo plazo y de dos años en ratas, perros y ratones dándoles pirimicarb no muestran potencial carcinogénico. Los niveles de dosis probados son 175 mg/kg en la dieta de ratas y de 1.8 mg/kg de peso corporal en perros (FAO/WHO 1977). Con base en una variedad de protocolos de prueba, este plaguicida no presenta riesgo carcinogénico.

### 1.25 Los sistemas de prueba

En vista de que es difícil realizar experimentación directa sobre el hombre, se han implementado una serie de sistemas de evaluación de daño genético que forman parte de una batería de pruebas que permiten detectar el riesgo que representan para el ser humano. Éstos abarcan gran variedad de organismos tanto animales como vegetales, para ser usados como indicadores del daño genético inducido por mutágenos físicos y químicos, con el fin de obtener un panorama general.

Muchos sistemas de prueba han sido empleados para determinar el daño inducido al ADN por agentes mutagénicos (Ashby et al. 1985). No obstante, el nivel de organización y los sistemas metabólicos de los modelos utilizados difieren de los del hombre y esto ha constituido una fuente de error en la toma de decisiones, ya que se ha comprobado que una sustancia que puede provocar daño mutagénico en un sistema bacteriano, no necesariamente lo produce en células humanas (Ashby 1988). Pero cuando un agente dado induce alteraciones en diferentes organismos, incluyendo mamíferos, debe considerarse la posibilidad de un riesgo potencial.

Los bioensayos de pesticidas a largo plazo con animales son considerados como los procedimientos más satisfactorios para valorar la genotoxicidad (de Kergommeaux et al. 1983), sin embargo estos son caros, por ello se han implementado otros ensayos en vegetales y en cultivos celulares, que aportan buena información a corto plazo y son más económicos.

### 1.25.1 Plantas superiores

Los ensayos con plantas superiores para la detección de mutágenos se han desarrollado por muchos años y son ahora sistemas bien establecidos para la evaluación y monitoreo de compuestos ambientales mediante la inducción de aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (Nilan y Vig 1976, Nilan 1978, Shelby 1980, Constantin 1982, Constantin y Owens 1982, Grant 1993, 1994). Desde los 70s éstos han sido recomendados para su uso en el rastreo o monitoreo, en 1973 por la Academia Real de Ciencias Sueca, en 1975 por el 17° Comité de la Sociedad de Mutagénesis Ambiental y más recientemente por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1985). Los ensayos de genotoxicidad con plantas constituyen sistemas de prueba sensibles que ya han provisto de datos cuantitativos de mutagénesis útiles. Diferentes plantas tienen las características para ser usadas en pruebas de mutagenicidad. Éstas han jugado papeles importantes en la detección de nuevos mutágenos y en el desarrollo de técnicas que han sido más tarde aplicadas en otras pruebas para el conocimiento avanzado de la mutagénesis.

Dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta, un mutágeno ambiental puede causar mutaciones que lleven a la transformación de células somáticas, que induzcan mutaciones que afecten las células germinales o ejerzan efectos mutagénicos. Para los ensayos de genotoxicidad en plantas superiores, diversos marcadores de daño pueden ser usados en la evaluación y monitoreo de alteraciones que van desde mutaciones puntuales hasta aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas en células individuales y en órganos tales como raíces, hojas, polen y endospermo.

#### 1.25.1.1 Sistemas de prueba para genotoxicidad con plantas superiores

Algunas de las especies vegetales más frecuentemente utilizadas incluyen *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capilaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Pisum*

*sativum*, *Tradescantia*, *Vicia faba* y *Zea mays*. Para evaluar el daño cromosómico, la planta usada más frecuentemente es *Vicia faba*, que tiene grandes cromosomas, adecuados para el estudio de las aberraciones cromosómicas en células somáticas: (1) durante las divisiones mitóticas (Ma 1982, deKergommeaux et al. 1983, Kihlman y Andersson 1984) y (2) como micronúcleos en células en interfase (Degrassi y Rizzoni 1982, De Marco et al. 1990). De acuerdo con Read (1959) *Vicia faba* fue usada en experimentos con radiación desde 1913.

1.2b.1.2 Rango de compuestos ambientales detectados como mutágenos con sistemas vegetales superiores.

Los ensayos de genotoxicidad con plantas han sido usados para evaluar un amplio rango de compuestos tales como agentes antimutagénicos (Gichner et al. 1985), plaguicidas (Grant 1982), disolventes (Gómez-Arroyo et al. 1986), lodos residuales (Hopke et al. 1982), agua potable (Ma et al. 1985), agua residual (Ruíz et al. 1992), efluentes (Grant et al. 1992, Villalobos-Pietrini et al. 1994), contaminantes del suelo (Gill y Sandhu 1992), contaminantes en la vecindad de una refinería de petróleo y de un complejo petroquímico (Lower et al. 1983a) y en la vecindad de una fundidora de plomo (Lower et al. 1983b), así como los humos de una fábrica (Ma et al. 1983).

La detección de los contaminantes del aire y del agua cae en dos categorías generales: (1) técnicas en laboratorio o fuera del lugar y (2) métodos *in situ* o en el lugar. La naturaleza del problema determinará si debe hacerse el monitoreo en el laboratorio o *in situ*. Si los compuestos en cuestión son sedimentos entonces los estudios en el laboratorio pueden ser los únicos métodos de análisis. Actualmente, no se conoce un sistema animal que pueda ser usado eficientemente para el monitoreo *in situ* del aire que aporte datos cuantitativos confiables. Los ensayos genéticos con plantas son los únicos sistemas actualmente en uso como monitores *in situ* de mutágenos ambientales (Fiskesjö 1985, Cebulska-Wasilewska 1988, 1992, Ma 1990, Grant et al. 1992, Ruíz et al. 1992, Villalobos-Pietrini et al. 1994).



### 1.25.2 *Vicia faba*

Como material citogenético, *Vicia faba* tiene la ventaja de presentar seis pares de cromosomas relativamente grandes que son excelentes para la evaluación de las aberraciones cromosómicas. El material está disponible durante todo el año, su crecimiento y manejo son fáciles, es relativamente barato y además no se requiere de equipo sofisticado, ni de condiciones estériles (Kihlman 1975), lo cual lo hace adecuado para su uso en todo el mundo. Además, tienen gran número de células en división, las células de las puntas de las raíces son directamente expuestas al compuesto en cuestión y pueden ser analizados los efectos de concentraciones conocidas (Kihlman 1971, 1975, Gómez-Arroyo et al. 1988).

Las cualidades de esta planta son percibidas mucho tiempo antes, por radiobiólogos quienes investigaban los mecanismos de formación de las aberraciones cromosómicas por radiaciones ionizantes (Read 1959). El haba, *Vicia faba*, ha sido ampliamente utilizada desde los 50s para el estudio de las aberraciones cromosómicas inducidas por agentes químicos (Kihlman 1966, Ma 1982) y durante los últimos 20 años también para la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (Kihlman y Kronborg 1976, Kihlman y Andersson 1984). Recientemente, el material ha sido utilizado para medir la efectividad del ensayo de las aberraciones cromosómicas en *Vicia faba* en la evaluación de la calidad del agua en condiciones *in situ* (Grant et al. 1992).

### 1.25.3 Cultivo de linfocitos humanos

Los organismos más utilizados en pruebas de mutagenicidad de corta duración son células bacterianas, levaduras o cultivos de diferentes tejidos. Sin embargo, la respuesta de diferentes especies a los mutágenos es variable (Beaune et al. 1985). Se ha descrito que existen variaciones respecto a la mutagenicidad en el ámbito celular dependiendo, por ejemplo, de la capacidad de reparación del ADN, del estado metabólico. En tanto no se conozca el mecanismo exacto de acción del agente químico que se desea

probar, resulta ventajoso usar células humanas para este fin.

El cultivo de células humanas y en especial de linfocitos periféricos, tiene ventajas que lo hace adecuado para este tipo de estudios, debido a que se puede obtener fácilmente una población celular numerosa (Evans y O'Riordan 1975) y por medio de mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA), inducirlos a dividirse *in vitro* (Crossen y Morgan 1977), lográndose una cantidad considerable de linfocitos en metafase (Jasinka et al. 1977).

Se han desarrollado metodologías estandarizadas para el cultivo de sangre periférica completa de humanos, que permiten determinar la sensibilidad de los linfocitos a alteraciones citogenéticas. Estos dan resultados reproducibles con índices mitóticos elevados y frecuencias básicas de eventos de daño estables (Kligerman et al. 1984).

Los linfocitos circulantes están normalmente en  $G_0$ , y para estimular su división *in vitro* se han empleado extractos vegetales que tienen propiedades mitogénicas y de aglutinar células; esto se debe a la presencia de ciertas proteínas llamadas lectinas como la concavalina A (Con A) y la fitohemaglutinina (PHA) (Crossen y Morgan 1977). Otras sustancias derivadas de bacterias como el filtrado de estreptococos y estafilococos, así como también la tuberculina, tienen la cualidad de inducir la división celular (Ling y Kay 1975); la más común es la PHA, una glicoproteína extraída de *Phaseolus vulgaris*. Se considera que la PHA induce la división celular en linfocitos T de humanos y de otras especies de mamíferos (Roit et al. 1989).

El empleo de la PHA tiene la ventaja de que al ser un mitógeno no específico, puede activar clones múltiples de linfocitos.

#### 1.25.4 Los intercambios de cromátidas hermanas

Un criterio adecuado para determinar el efecto provocado por los contaminantes ambientales lo constituye el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) debido a que es un método versátil y aplicable para

estudios tanto en células animales como vegetales, así como en exposiciones *in vivo* e *in vitro* a los compuestos en investigación (Krishna *et al.* 1986, Gómez-Arroyo *et al.* 1988, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995).

El análisis de ICH es uno de los procedimientos citológicos más rápidos y sensibles para determinar el daño al ADN inducido por distintos agentes. Las dosis de compuesto que incrementan la frecuencia de ICH son generalmente mucho más bajas que aquellas requeridas para aumentar las aberraciones cromosómicas (Tice y Hollaender 1984). Además por muchos años este sistema ha sido aceptado para monitorear mutágenos y carcinógenos ambientales (Zhang *et al.* 1991). Actualmente existen evidencias de que para muchos compuestos, el análisis de ICH proporciona el índice más sensible para detectar el daño genético, debido a que se ha encontrado correlación entre la frecuencia de éstos y la concentración del mutágeno (Takehisa *et al.* 1982).

Las células de mamífero han sido más usadas que las vegetales en dichos ensayos (Schvartzman 1987), por lo que puede hacerse una comparación de la prueba de ICH en plantas con respecto a animales con relación a su capacidad para elucidar mutágenos, así como para proveer un método más barato y sencillo para la detección de la capacidad mutagénica de las sustancias.

#### 1.2b.4.1 Bases genéticas de los ICH

La existencia de los ICH fue primero sospechada por McClintock (1938), basada en el comportamiento de los anillos cromosómicos en el maíz. Los ICH se sabe ahora que ocurren como un evento normal en la división celular en tejidos de mamíferos (Tice *et al.* 1976, Tucker *et al.* 1986). Los ICH han jugado un papel importante como indicadores sensibles de genotoxicidad desde que Latt (1974) observa un incremento en la frecuencia seguida del tratamiento con mitomicina C.

Los ICH que representan el intercambio de los productos de la

replicación del ADN en loci homólogos. El proceso de intercambio presumiblemente involucra rompimiento y reunión del ADN (Latt et al. 1981). Aunque los ICH son fácilmente observados experimentalmente, se desconocen todavía los mecanismos exactos de su formación. Parece que los ICH son producidos en o cerca de las horquillas de replicación.

Cualquiera que sea el mecanismo exacto involucrado en su formación, el hecho es que los ICH han sido ampliamente utilizados como indicadores de actividad genotóxica. La elucidación del o de los mecanismos de formación será una fase importante hacia la comprensión del significado biológico de exposiciones adversas.

#### 1.25.4.1.1 Algunos modelos para la formación de los ICH

La hipótesis descrita por Painter (1980) considera que existe reducción en la velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación del ADN, lo cual genera 4 extremos libres (dos nacientes y dos progenitoras de un racimo de replicones completamente duplicados y opuestos a los extremos libres progenitoras), del replicón adyacente que se encuentra parcialmente duplicado. Esto conduce a la conexión entre los grupos de replicones en los cuales un segmento duplicado se encuentra al lado de un segmento no duplicado (Fig. 15) (como es normal durante el período S en las uniones de la eucromatina y la heterocromatina), lo que sugiere que los rompimientos de la molécula de ADN de doble banda en estas conexiones, son formados y reunidos de manera espontánea y el sellado quizás es catalizado por la topoisomerasa II, que ha sido localizada en diferentes eucariontes. Ocasionalmente en lugar de que ocurra una reunión normal, el rompimiento se sella por unión de las hebras hijas de una molécula replicada a la molécula no replicada. Una vez que esto ocurre, el ICH es iniciado cuando, las hebras hijas nacientes de un grupo se combinan con las hebras progenitoras de un grupo parcialmente replicado y sólo cuando estos terminan de duplicarse se genera totalmente el ICH. Este intercambio requiere de un sólo evento, el rompimiento es de doble hebra, el cual es consistente con los datos que muestran que el ICH es producido en función lineal a la dosis de un agente.

#### 1.25.4.2 La metodología con bromodesoxiuridina (BrdU) para la detección de ICH

La detección de los ICH en cromosomas que no se encuentran en forma de anillo, requiere algún medio de marcaje diferencial de las cromátidas hermanas. Esto fue inicialmente alcanzado con el uso de timidina tritiada (Taylor *et al.* 1957), aunque estudios más recientes utilizan nucleósidos halogenados.

El nucleósido halogenado BrdU ha desplazado totalmente a la [ $^3\text{H}$ ]timidina, para lograr la tinción diferencial de las cromátidas hermanas (Fig. 16). Cuando se incorpora al ADN o a la cromatina, la BrdU puede apagar la fluorescencia de los colorantes unidos al ADN, tales como el Hoechst 33258 (Latt, 1973, 1976), el naranja de acridina (Perry y Wolff 1974, Latt 1976), entre otros. Los métodos de fluorescencia para la detección de ICH no proveen de preparaciones permanentes y el decaimiento rápido de las laminillas hace difícil el análisis al microscopio. Los métodos con Giemsa (Perry y Wolff 1974), han reemplazado las técnicas con fluorescencia para el análisis de rutina de los ICH.

#### 1.25.4.3 Los ICH como indicadores de carcinógenos mutagénicos

Los ICH han demostrado ser indicadores sensibles de los efectos provocados por mutágenos y carcinógenos químicos.

Uno de los primeros estudios se llevó a cabo en cromosomas de linfocitos humanos con el agente alquilante bifuncional mitomicina C que forma enlaces cruzados en el ADN (Latt 1974). Una gran frecuencia de ICH es observada en concentraciones muy bajas incapaces de causar el incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Sugiriendo que la sensibilidad de la prueba es tal que tiene gran utilidad como sistema de prueba para evidenciar los efectos de mutágenos sobre los cromosomas. Debido a la facilidad en su registro y a los efectos dramáticos, pronto fueron llevados a cabo trabajos con otros sistemas celulares y otros

compuestos.

#### 1.25.4.4 Análisis *in vitro* de ICH

En teoría, el análisis de ICH puede realizarse en cualquier línea celular de eucariontes o cepas celulares que repliquen normalmente, o capaces de ser inducidas a replicar en cultivo. Tales líneas celulares abarcan el espectro filogenético desde *Drosophila* hasta células humanas. El único requerimiento absoluto es que la célula incorpore un nucleótido análogo, más comúnmente la BrdU, por al menos un ciclo de replicación y entonces complete un segundo ciclo, ya sea en presencia o en ausencia del análogo.

Las líneas celulares más frecuentemente utilizadas incluyen los fibroblastos CHO, V79 y DON de criceto chino; células humanas tales como HeLa; o derivados de la piel o de pulmón fetal y cultivos de linfocitos, así como de otras especies como ratas, ratones y conejos de laboratorio.

La mayor desventaja de las líneas celulares para estudiar la formación de los ICH es su limitada capacidad de activación metabólica endógena. Estas necesitan el uso de fuentes exógenas de mezclas microsómicas S9 derivados de hígado.

Debido a que las muestras de sangre periférica humana son fáciles de obtener y a la relevancia del tipo celular, este es un sistema que puede ser usado tanto para estudios *in vitro* como para monitoreo *in vivo* de la exposición humana a agentes químicos.

#### 1.25.4.5 Análisis *in vivo* de ICH

Una variedad de especies eucarióticas, desde plantas hasta insectos, peces y mamíferos han sido usados en experimentos para evaluar la capacidad de los agentes físicos y químicos para inducir ICH *in vivo*.

Cualquier población celular que bajo condiciones normales o por

virtud del estímulo del crecimiento celular provea suficientes células en metafase para análisis citogenéticos puede ser empleada en la evaluación del ICH *in vivo*.

En cualquier tipo celular dado o tejido, el número exacto de ICH inducido por un tratamiento químico con un agente que daña al ADN depende de: (1) la cinética de distribución y metabolismo del compuesto, (2) la naturaleza de la(s) lesión(es) pertinente(s), (3) la eficiencia de los sistemas de reparación apropiados para remover la o las lesiones, (4) la relación temporal entre la formación del primer daño al ADN y el inicio de la síntesis programada de ADN en presencia de un marcador adecuado como la BrdU, (5) el grado de modificación de la sensibilidad del ADN al compuesto examinado, causado por la incorporación del marcador. (6) la extensión de la letalidad celular asociado con el tratamiento. La compleja interacción de estos factores determina el tiempo de la máxima respuesta de ICH (Tucker *et al.* 1993).

- Aunque algunos investigadores han encontrado que los tiempos de tratamiento más efectivos son frecuentemente dependientes del compuesto (Takehisa y Conner 1985, Tice *et al.* 1987), la conclusión general es que para la mayoría de los agentes, el tratamiento único al momento de administrar la BrdU ofrece las máximas oportunidades para detectar la respuesta significativa de ICH.

#### 1.25.4.6 Su empleo

- El análisis de ICH ha sido usado satisfactoriamente para monitorear la exposición humana a agentes potencialmente genotóxicos. Más frecuentemente, los estudios de monitoreo son llevados a cabo con linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina (PHA).

A pesar de la incertidumbre de sus mecanismos moleculares, el análisis de la formación de ICH en sistemas citológicos ha provisto de información sobre la estructura cromosómica y ha sido utilizada empíricamente para detectar los efectos de mutágenos y para diferenciar

entre enfermedades de fragilidad cromosómica.

La fuerza de los diferentes sistemas se basa en su sensibilidad para detectar la exposición a los agentes químicos, a la relativa facilidad para realizar la prueba en una amplia variedad de líneas celulares y tejidos y a la capacidad inherente para producir datos fácilmente cuantificables. Por otra parte, la única desventaja de los ICH es el desconocimiento de su significado biológico, el cual no será comprendido hasta que sus mecanismos de formación sean elucidados. Sin embargo, los sistemas de ICH *in vivo* e *in vitro* continúan siendo usados para evaluar genotoxicidad y probablemente continuarán siendo empleados con este propósito para el futuro previsible (Tucker *et al.* 1993).

#### 1.25.4.7 El auge de los ICH

En la ciencia la adquisición de un nuevo conocimiento en un campo en particular no es un proceso continuo y progresivo. Por el contrario, usualmente ocurre como una serie de brotes causados por el desarrollo repentino de nuevas técnicas específicas y frecuentemente simples. Esto es precisamente el caso con los análisis de ICH. Mientras que la cantidad total de publicaciones sobre ICH desde su descubrimiento en 1938 hasta 1973 fueron por mucho menos de 100, al menos 2872 artículos fueron publicados en este campo en particular entre 1974 y 1986 (Schvartzman 1987).

¿Cuál fue la causa de este auge de los ICH?. Como se menciona anteriormente, la respuesta a esta pregunta es relativamente simple: en 1973-74 fue desarrollada una técnica que permite la tinción diferencial de las cromátidas hermanas de cromosomas en metafase con gran exactitud (Latt 1973, Perry y Wolff 1974). Este método involucra la incorporación de la BrdU dentro del ADN y la subsecuente tinción diferencial de las cromátidas o regiones cromosómicas que contienen distintas cantidades de este análogo de la timina. La diferenciación de las cromátidas hermanas, que es esencial para vislumbrar los ICH es primeramente alcanzada usando [<sup>3</sup>H]timidina, para marcar el ADN y autorradiografías para detectar las



cromátidas marcadas (Taylor *et al.* 1957). Sin embargo, la resolución alcanzada con la autorradiografía es muy pobre y los ICH son particularmente difíciles de registrar. Por el contrario, el método con BrdU, es relativamente simple y la resolución es significativamente mejor (Wolff y Perry 1974). Pero hay aún otra razón más para explicar el éxito de los ICH: son el método citológico más sensible para detectar agentes potencialmente mutagénicos y clastogénicos (Perry y Evans 1975). Esta observación lleva en la actualidad a la utilización de esta prueba en muchas evaluaciones realizadas en el campo de la toxicología citogenética.

Con ciertas modificaciones estas técnicas pueden también ser usadas para cromosomas de plantas, insectos y aves.

#### 1.25.4.8 La citogenética vegetal y el auge de los ICH

Aunque los ICH fueron primero descubiertos por McClintock en 1938 y visualizados por Taylor *et al.*, en 1957 en plantas superiores, la cantidad de publicaciones sobre ICH en plantas sólo representa el 3% del número total de artículos publicados en este campo. A pesar de esto, los citogenetistas vegetales han contribuido significativamente al incremento del conocimiento acerca de los ICH. Como se ha planteado previamente, los experimentos han llevado a 3 descubrimientos básicos hechos en este campo antes del desarrollo del método con BrdU, a decir: (1) la primera proposición de Bárbara McClintock de los que ella llama "entrecruzamientos de cromátidas hermanas" (McClintock 1938) (2) la demostración citológica de que las subunidades de las cromátidas se segregan semi-conservadoramente (Taylor *et al.* 1957) y (3) la observación de que los ICH son formados por rompimientos y reuniones de las cuatro cadenas de polinucleótidos involucradas (Taylor 1958). Todos ellos fueron alcanzados trabajando con *Zea mays*, *Vicia faba* y *Bellevalia romana*, respectivamente.

El primer reporte científico sobre ICH en plantas superiores basado en el uso del método con BrdU ocurre en 1975 (Kihlman y Kronborg 1975). A través de los años, se observa que *Allium cepa* y *Vicia faba* son por mucho los materiales preferidos, representando el 80% de todas las publicaciones

con sistemas vegetales.

### 1.25.5 La cinética de proliferación celular y el índice de replicación

Se llama ciclo celular a los diferentes estados subsecuentes de una célula eucariótica en división, e involucra dos aspectos fundamentales: la interfase y la mitosis. Esta última produce dos células hijas idénticas a partir de una célula precursora. La interfase comprende:  $G_1$ , S y  $G_2$ . En la fase  $G_1$ , la célula se prepara para la síntesis del ADN. Las enzimas y proteínas que se requieren para iniciar y efectuar la replicación del ADN, se sintetizan al final de  $G_1$  y al inicio de S. La fase S es el período de síntesis del ADN, durante el cual se genera una segunda copia del genoma. En la fase  $G_2$ , la célula se prepara para la división, sintetizando moléculas que se requieren para la mitosis. El tiempo que transcurre entre una mitosis y otra se denomina interfase. Existe además otra fase denominada  $G_0$ , la cual se considera como un estado de "reposo" de las células que no se encuentran en proliferación. En esta etapa, el metabolismo principal de la célula está disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos, como la transcripción y la síntesis de proteínas (Draetta 1990, Graña y Reddy 1995).

En paralelo con otras técnicas, para el análisis de ICH y de aberraciones cromosómicas, el rango de estímulo por mitógenos en la cinética de proliferación celular (CPC) se utiliza principalmente para evaluar la genotoxicidad a concentraciones citotóxicas de agentes químicos. La CPC puede ser afectada por varios factores fisiológicos como son la edad del donador (Wen y Liew 1983, Malaragno y Smith 1990), el estado de salud (Dutrillaux y Fose 1976, Mutchinick *et al.* 1979, Kierszenbaum *et al.* 1990, Sztain *et al.* 1990) y las condiciones del cultivo (Obe *et al.* 1975, Mutchinick *et al.* 1980, Wolff *et al.* 1984, Speit *et al.* 1986, Gonsebatt y Mutchinick, 1990).

El ADN de todas las células, aún de las que no están en crecimiento, se encuentra sujeto a daño físico o químico. Los cambios incorrectos en las bases del ADN de las células que no están en crecimiento podrían generar

la producción de proteínas defectuosas o una cantidad inaceptable de ellos. Una mutación puede hacer que una célula de apariencia normal, no reciba correctamente los mensajes externos y altere sus procesos de división. Si bien es cierto, que la célula tiene sistemas que detectan y llegan a reparar mutaciones, algunos daños pasan inadvertidos. La acumulación de alteraciones genéticas puede transformar a la célula en tumorigénica, que a diferencia de una célula normal ya no responde a las señales inhibitorias que controlan su crecimiento, cambia su morfología y adquiere la propiedad de replicarse sin medida. Finalmente, las células cancerosas invaden los tejidos sanos en cualquier zona corporal, se trata entonces de metástasis (Naemlyth 1990, Kirschner 1992, Murray 1992).

Se han descrito evidencias acerca de alteraciones sobre CPC por pesticidas en su mayoría organofosforados como metil paratión, malatión, metilazinfos y en menor grado los carbámicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sobti et al. 1982).

#### 1.25.6 La activación metabólica

A pesar de que se cuenta con diferentes sistemas de evaluación para detectar agentes genotóxicos, muchos compuestos no son mutagénicos por si mismos sino que dan origen a mutágenos durante su metabolismo en el cuerpo y de la misma forma sustancias que son mutagénicas en algunos organismos pueden ser inactivadas.

Numerosos plaguicidas son biotransformados por el sistema enzimático animal o vegetal a productos que son altamente mutagénicos en varios sistemas de prueba (Plewa et al. 1988).

Con el propósito de hacer de estos sistemas una herramienta más útil se ha incorporado en ellos una fase de activación metabólica que mimetiza la biotransformación que puede ocurrir en los animales y los vegetales cuando los compuestos son asimilados (Rasquinha et al. 1988). Esta activación de promutágenos es un evento crítico en la mutagénesis ambiental y los experimentos frecuentemente incluyen una fracción

metabólicamente activa para explicar este hecho.

Se ha desarrollado un método para simular la activación metabólica realizada por mamíferos (Ames et al. 1975) y más recientemente se ha hecho lo mismo para vegetales (Plewa y Gentile 1982), con el propósito de evaluar la actividad mutagénica de numerosos plaguicidas promutagénicos.

La mayoría de los xenobióticos no son solubles en agua, por lo que las enzimas celulares los convierten en compuestos hidrofílicos que pueden ser fácilmente eliminados del cuerpo. Esto generalmente ocurre como se describe anteriormente por las reacciones de Fase I o de funcionalización y de fase II o de derivación o conjugación. Las primeras, eventualmente conducen a la formación de metabolitos reactivos que logran unirse covalentemente a macromoléculas de varios tejidos causando mutaciones génicas y muerte celular. No obstante en caso inverso también puede presentarse, que un compuesto biológicamente activo sea transformado en una sustancia menos tóxica que el original.

#### 1.25.6.1 La fracción S9

El hígado es el sitio principal en donde ocurre el metabolismo de xenobióticos, aunque existen otros tejidos como el intestino, el pulmón, el riñón y la piel que también son importantes. En un tejido en particular, las enzimas pueden concentrarse en células específicas (p.e. los hepatocitos en el hígado, las células epiteliales tipo II en el pulmón). En éstas, las enzimas están asociadas a distintos organelos subcelulares o compartimientos intracelulares. Las enzimas pertenecientes a los citocromos P-450 se localizan en el retículo endoplásmico, mientras que las de conjugación (metabolismo de fase II, como glutatión transferasas y sulfurotransferasas son predominantemente citosólicas. Se considera que la oxidación dependiente del citocromo P-450 es normalmente una ruta de activación y la de conjugación una ruta de desintoxicación (Snell y Mullock 1987)

El sistema metabolizador usado en la mayoría de los estudios in

*in vitro* con linfocitos es la fracción metabólica S9. Esta mezcla formada por enzimas microsómicas se obtiene de homogeneizados de hígado de rata y es útil para la activación de tales promutágenos ya que semeja el metabolismo realizado *in vivo* (Ames et al. 1975).

Las pruebas de activación metabólica con la fracción S9 se llevan a cabo incorporando esta mezcla, junto con el compuesto a ensayar, en el medio de cultivo con linfocitos, analizando la frecuencia de ICH inducidos, para establecer la capacidad mutagénica de los metabolitos.

Los ensayos con células de mamífero *in vitro* algunas veces revelan clastogenicidad sólo después de la activación por la fracción microsómica S9 de hígado de rata, aunque algunas veces estas mismas fracciones rápidamente inactivan a otros insecticidas. Puede ponerse en evidencia que en tales pruebas *in vitro*, las células están directamente en contacto con el insecticida, los cuales a su vez son disueltos en disolventes fuertemente citotóxicos como el DMSO. Así, este modelo no mimetiza adecuadamente las condiciones *in vivo*.

En este tipo de pruebas, generalmente se emplea como testigo positivo a la ciclofosfamida. Esta es un mutágeno indirecto que ejerce su acción sobre el ADN después de que ha sido metabolizado. La exposición de linfocitos humanos a este compuesto en presencia de la fracción microsómica S9, incrementa la producción de ICH con respecto a su aplicación directa (White y Hesketh 1980, Hartmann et al. 1995).

#### 1.25.6.2 La fracción S10

Por otra parte, también han sido usados extractos vegetales en lugar de la fracción S9 de hígado de rata para la activación de los agentes químicos no mutagénicos con la prueba de ICH (Darroundi y Natarajan 1987). Se ha encontrado que extractos de raíces de *Vicia faba* tratadas con etanol, inducen ICH en células ováricas de criceto Chino (CHO)

(Takehisa y Kanaya 1983) y en cultivo de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

Es particularmente importante el papel que el metabolismo vegetal puede tener en la mutagénesis ambiental, porque muchas cosechas agrícolas son tratadas con pesticidas previamente a ser consumidas por el hombre. Además se ha indicado que para algunos pesticidas los productos metabólicos difieren entre plantas y animales (Menn 1978).

Los ensayos de activación vegetal se pueden realizar administrando a una planta viva intacta la sustancia que se prueba, semejando las condiciones encontradas en los campos agrícolas (Plewa y Gentile 1982). Después de esto, el extracto debe ser rápidamente aplicado a algún sistema de prueba para determinar su efecto mutagénico, como el cultivo de linfocitos humanos, evaluando así las propiedades genotóxicas de los metabolitos (Plewa *et al.* 1984).

En estudios de metabolismo vegetal se ha demostrado que ciertos compuestos como las triazinas, la hidrácida málica y la fenil urea, entre otros, pueden ser activados por los sistemas enzimáticos de las plantas a compuestos mutagénicos específicos (Plewa *et al.* 1988).

### 1.27 Objetivo

Los agentes agroquímicos son extensamente empleados para el control de plagas y justificadamente existe el interés sobre el riesgo que implica la ingestión de estos compuestos por el hombre y es esencial tener un conocimiento adecuado de su mutagenicidad. Una de las principales consideraciones debe ser el peligro que representa no sólo el compuesto original, sino también cualquier derivado de su metabolismo.

Está bien documentado que tanto en sistemas animales (Ames *et al.* 1975), como en vegetales (Plewa y Gentile 1982), la biotransformación puede convertir a promutágenos en mutágenos.

El hecho de que las plantas realicen transformaciones enzimáticas, hace necesario profundizar los estudios a este respecto, ya que los plaguicidas son tomados por el hombre no sólo directamente al ser aplicados sobre los vegetales sino también a través de sus metabolitos, los cuales son almacenados en diversas estructuras y tal vez puedan resultar más peligrosos.

En vista de que numerosos pesticidas pueden ser activados ya sea por las plantas o por los animales y actuar como mutágenos en sistemas animales, incluyendo al hombre y considerando como antecedente que en nuestro país, los insecticidas carbámicos son ampliamente usados en la agricultura, lo cual representa una fuerte amenaza para la salud de la población y teniendo como referencia que son escasos los estudios citogenéticos sobre el lannate-90 y el pirimor-50, en este trabajo se evalúa su potencial mutagénico; tanto en forma directa como indirecta previa activación metabólica vegetal, así como en presencia de las fracciones metabólicas S10 (vegetal) y S9 (animal) sobre el ADN de las células meristemáticas de *Vicia faba* y en linfocitos humanos en cultivo que han demostrado ser sumamente sensibles al efecto de plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1988, 1992a,b, 1995, 1997, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995, Calderón Segura 1999) además de ser metabólicamente activa, ya que posee la fracción enzimática S10 (Takehisa *et al.* 1982, 1988, Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa 1986, Kanaya *et al.* 1992, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999), utilizando como prueba de daño citogenético los intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Asimismo, se determina su influencia sobre la cinética de proliferación celular y el índice de replicación en los cultivos de linfocitos.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Tratamientos directos

Con el propósito de verificar el posible efecto directo del lannate-90 (Du Pont) y del pirimor-50 (Zeneca) en un sistema vegetal y en un sistema animal, se analizó la frecuencia de ICH en los cromosomas de *Vicia faba* en el primer caso y de linfocitos humanos en cultivo para el segundo.

#### 2.1.1 En *Vicia faba*

##### 2.1.1.1 Germinación de las semillas

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) son lavadas en agua corriente durante 2 h. Posteriormente se embeben en agua de la llave durante 24 horas, después se ponen a germinar entre dos capas de algodón humedecido.



Cuando aparece la radícula, se remueve la testa y al medir la raíz principal de 2 a 3 cm, previamente a los tratamientos, se eliminó la cofia.

### 2.1.1.2 Tratamiento

Las plántulas cuyas raíces principales han alcanzado las medidas mencionadas son colocadas en una solución de análogos que contiene 100  $\mu\text{M}$  de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), 0.1  $\mu\text{M}$  de 5-fluorodesoxiuridina (FdU) y 5  $\mu\text{M}$  de uridina (U) por un ciclo de replicación (20 h). Después de esto son enjuagadas y se formaron lotes de 10 plántulas para ser tratadas con los pesticidas por 2 h a diferentes concentraciones.

Las concentraciones empleadas para el caso del lannate-90 son, 0, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm de ingrediente activo (i.a.). El pirimor-50 resulta ser más tóxico para *Vicia faba* por lo que las concentraciones evaluadas para determinar sus efectos genéticos son 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 ppm de i.a. Ambos disueltos en agua destilada.

Transcurrido el tiempo de tratamiento las raíces se lavaron con agua de la llave y con agua destilada y posteriormente se introdujeron en una solución fresca de análogos, con las mismas concentraciones, para un segundo ciclo de replicación (20 h). Los ensayos son llevados a cabo en la oscuridad a 19 °C. Los testigos son expuestos a agua destilada y sometidos al mismo procedimiento. Se llevaron a cabo dos experimentos para cada concentración.

### 2.1.1.3 Tinción y montaje

Después del tratamiento los meristemas son cortados (2 mm de las puntas) y sometidos a colchicina (0.05%) por 3 h, después son teñidos usando la técnica de tinción diferencial de Feulgen descrita por Tempelaar et al. (1982) y modificada como sigue: los cortes son fijados en ácido acético glacial por 1 h en la oscuridad, después se colocan en etanol-ácido acético (3:1) por 2 días a -20 °C, posteriormente se ponen en etanol al 70%

por 15 min e hidrolizan en HCl 5N por 80 min a 28 °C en baño María. Entonces se lavan 3 veces con agua bidestilada, para quitar el exceso de ácido y se tiñen con el reactivo de Schiff (tinción de Feulgen) por 15 min en la oscuridad. Los cortes son entonces tratados con pectinasa al 2% disuelta en amortiguador de citratos 0.01 M (pH 4.7) por 120 min a 28 °C y después se colocan en ácido acético al 45 % durante 10 min, para transferirlos en última instancia a etanol frío al 70 % por 30 min. (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995). El aplastamiento del tejido para obtener una monocapa se realiza usando ácido acético al 45%, las laminillas se hacen permanentes por la técnica del hielo seco de Conger y Fairchild (1953), se deshidratan por medio de dos cambios de butanol absoluto y se montan en bálsamo de Canadá (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995).

#### 2.1.1.4 Análisis microscópico

El registro de los ICH se hace en 25 células en metafase para cada experimento y su réplica. Debido a que los cromosomas se dispersan (Fig. 17), los registros son hechos en 250 cromosomas subacrocéntricos y en 50 cromosomas metacéntricos. Los ICH terminales (Fig. 18) se registraron como un evento y los intersticiales (Fig. 19) como dos eventos. Las laminillas siempre son observadas con clave, para evitar prejuicios.

#### 2.1.1.5 Pruebas estadísticas

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) para contrastar los grupos, si se obtienen valores de F significativos ( $P < 0.001$ ), entonces se aplica la prueba de comparaciones múltiples de Newman Keuls entre cada concentración y los testigos ( $P < 0.001$ ).

#### 2.1.2 En linfocitos humanos

Se prepararon soluciones patrón de Iannate-90 (Du Pont) y pirimor-50 (Zeneca), que fueron disueltas en agua destilada y DMSO, respectivamente e inmediatamente aplicadas a los cultivos de linfocitos. La concentración final de DMSO en los tubos de cultivo no fue mayor de 0.5 %

(v/v).

### 2.1.2.1 Cultivo

En tubos de cultivo estériles se colocaron 3 ml de medio RPMI 1640 (Sigma) complementado con PHA (2.5 ml/100 ml de medio) (Gibco). Con una jeringa heparinizada se extraen 10 ml de sangre periférica por punción venosa de un donador sano y se adicionan 8 gotas de sangre, para posteriormente incubarse a 37 °C.

### 2.1.2.2 Tratamiento

Después de 24 h de iniciado el cultivo se agregan 100 µl de BrdU (0.4 mg/ml) y los insecticidas a diferentes concentraciones.

Para el Iannate-90 se probaron 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm de i.a. y en el caso del pirimor-50 las concentraciones evaluadas fueron 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm de i.a.

Después de cumplir 70 horas desde el inicio del cultivo (46 horas en presencia de los plaguicidas), entonces se agregaron 100 µl de colchicina (0.02%), permaneciendo 2 horas más a 37 °C, para completar el tiempo de incubación y a continuación se realiza la cosecha.

### 2.1.2.3 Cosecha

Se centrifugan los cultivos a 2000 rpm durante 10 min, se desecha el sobrenadante e inmediatamente se resuspende el botón suavemente en una solución hipotónica de KCl (0.075 M) a 37 °C durante 20 min.

Transcurrido este tiempo se centrifugan a 2000 rpm durante otros 10 min, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el botón rápidamente en fijador metanol-ácido acético (3:1), manteniéndose en refrigeración por 20 min.

Nuevamente se centrifugan en las mismas condiciones, se retira el sobrenadante y se lava el botón con fijador, repitiéndose este paso hasta que estén totalmente limpios.

Al final el botón se resuspende en 0.50 ml de fijador. A partir de esta suspensión se efectúan las preparaciones por goteo, realizando por lo menos 2 laminillas por frasco de cultivo, dejándose secar al aire.

#### 2.1.2.4 Tinción

Las laminillas fueron teñidas de acuerdo con la técnica de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff 1974). Se colocan en el colorante fluorocromado Hoescht 33258 (0.001 µg/ml) en cajas de Koplín, durante 40 min en la oscuridad, después se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire en posición vertical.

Posteriormente se irradian con luz negra (20 watts) a 2 cm de distancia durante una hora, cuidando de mantenerlas húmedas durante este tiempo con una solución de citrato de sodio salino, al término de este tiempo, se enjuagan y se dejan secar.

Se tiñen con Giemsa (solución acuosa 1:10) durante 5 min, se enjuagan y dejan secar, en las mismas condiciones.

#### 2.1.2.5 Análisis de ICH

Con el fin de evitar prejuicios en el observador para el registro de los ICH, se reetiquetan todas las preparaciones con clave, de tal manera que éste no tiene conocimiento de cual tratamiento analiza hasta que finaliza el registro.

En cada concentración de los experimentos con ambos insecticidas se analizan 50 metafases de segunda división (25 por cada réplica), para la identificación y el conteo de los ICH, registrándose los intercambios intersticiales como dos eventos y los terminales como uno (Fig. 20)

### 2.1.2.6 Índice de Replicación (IR)

Para el análisis de la cinética de proliferación celular (CPC) se determina el IR, registrándose 100 metafases consecutivas, se anotan las cantidades de metafases de primera, segunda y tercera divisiones y se emplea la fórmula propuesta Krishna *et al.* (1985):

$$IR = [1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3)] / 100$$

Donde  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ , representan los porcentajes de metafases de 1ª, 2ª y 3ª divisiones celulares. Se consideran en  $M_1$  aquellas células cuyo ADN se replica sólo una vez después de la adición de la BrdU y todos los cromosomas tiñen oscuro, en  $M_2$ , a las células cuyo ADN se duplica dos veces en presencia de este análogo de base y cuyas cromátidas están uni y bifilarmente substituidas por ésta y muestran tinción diferencial; y en  $M_3$  aquellas que tiñen algunos cromosomas con ambas cromátidas bifilarmente incorporadas y otros con una unifilar y otra bifilarmente sustituida, observándose la mayoría de los cromosomas teñidos claros y pocos con tinción diferencial ya que estuvieron tres ciclos en contacto con este compuesto (Figs. 21, 22 y 23).

### 2.1.2.7 Análisis estadístico

A los resultados obtenidos, en el caso de los ICH, se les aplica un análisis de varianza (ANOVA) para contrastar los grupos, si se obtienen valores de F significativos ( $P < 0.001$ ), entonces se realiza la prueba de comparaciones múltiples de Newman Keuls entre cada concentración y los testigos, Para el caso de los IR, se emplea la prueba de  $\chi^2$  por tablas de contingencia 2 X 3. Como se menciona, se realizan 2 experimentos para cada concentración, los promedios de los cuales se comparan entre sí, en grupos de dos y al no ser estadísticamente diferentes, se fusionan ambos.

## 2.2 Tratamientos con activación metabólica vegetal

### 2.2.1 Activación metabólica vegetal *in vivo*

#### 2.2.1.1 Preparación de los extractos de las raíces de *Vicia faba*, tratadas con lannate-90 y pirimor-50

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) son lavadas en agua corriente durante 2 h. Posteriormente se embeben en agua de la llave durante 24 horas, después se ponen a germinar entre dos capas de algodón humedecido.

Al aparecer la radícula, se remueve la testa y cuando las raíces principales alcanzan entre 4 y 6 cm, (siete días). Previamente a los tratamientos, se elimina la cofia.

Cuando las raíces tienen tales longitudes se forman lotes de 50 plántulas y se exponen a los insecticidas a diferentes concentraciones durante 4 horas en la oscuridad a temperatura ambiente,

Para este caso las concentraciones fueron 0, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm, en solución acuosa para ambos compuestos.

Con el propósito de verificar la capacidad metabólica de *Vicia faba*, se emplea etanol ( $1 \times 10^{-1}$  M) como testigo positivo, el cual ha demostrado ser promutágeno activado por el metabolismo vegetal, tanto *in vivo* como *in vitro* Takehisa *et al.* 1982, Calderón-Segura 1999, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

El testigo negativo se trata sólo con agua destilada, éste al igual que el testigo positivo, se mantiene bajo las mismas condiciones experimentales.

Transcurrido este lapso, se lavan las plántulas con agua de la llave

tres veces y dos ocasiones con agua destilada y se cortan 2 cm de la punta de la raíz principal y se pesan para obtener el peso fresco.

Posteriormente se maceran con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.4, a temperatura entre 0-4 °C, se homogeneizan en un macerador de tejidos vegetales de 1 a 2 min. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) con el peso fresco de los cortes de la raíz (g) es de 1:1 (Takehisa et al. 1982).

El homogeneizado se ultracentrifuga durante 15 min a 10000 X g y a 4 °C. El sobrenadante, en el cual se encuentran los metabolitos de las transformaciones del lannate-90, del pirimor-50 y del etanol, así como la fracción enzimática S10 (testigo negativo) se esterilizan por filtración miliporo (0.45 µm) e inmediatamente se usan para los tratamientos de los linfocitos en cultivo.

#### 2.2.1.2 Tratamientos

A cultivos de linfocitos preparados como se describe en el apartado 2.1.2.1, se les añaden, a las 24 horas de iniciados, 100 µl de los extractos de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones de insecticidas, etanol o agua destilada.

Además del testigo negativo con extracto se agrega un testigo más al cual no se le incorporó ningún extracto.

Al igual que en los tratamientos directos, al mismo tiempo de la adición de los extractos se incorpora la BrdU.

Como en el de los tratamientos directos la exposición es por 48 h, después de las cuales se prosigue con la cosecha, tinción y análisis de ICH, IR y pruebas estadísticas como se describen en la sección 2.1.2.

## 2.2.2 Activación metabólica vegetal *in vitro*

### 2.2.2.1 Obtención de la fracción microsómica S10 de raíces de *Vicia faba*

Semillas de *Vicia faba* (var. minor) se preparan para su germinación como se describe en la sección 2.1.1.1.

A 40-50 raíces con longitudes entre 4 y 6 cm, se les cortan 2 cm de la punta para obtener un peso aproximado de 2 g, éstas se maceran con amortiguador de fosfatos de sodio (0.1 M) pH 7.4, más manitol 1 mM (Baker) y EDTA 1 mM (Sigma), a temperatura entre 0 y 4 °C. Al igual que con los extractos para la activación *in vivo*, se homogeneizan en un macerador de tejidos vegetales durante 2 min. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1 (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa et al. 1988).

El homogeneizado se ultracentrifuga por 15 min a 10000 X g a 4 °C. El sobrenadante (fracción microsómica S10) (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa et al. 1988), se esteriliza por filtración miliporo (0.45 µm) e inmediatamente se usa para la activación *in vitro* de los plaguicidas carbámicos evaluados.

### 2.2.2.2 Preparación de la mezcla S10

La mezcla S10 se elabora con la fracción microsómica S10 de *Vicia faba* en una proporción 1:9 (volumen/volumen) en una solución con:  $8 \times 10^{-4}$  M MgCl (Baker),  $3.3 \times 10^{-3}$  M KCl (Baker),  $5 \times 10^{-3}$  M Glucosa-6 fosfato (Sigma),  $4 \times 10^{-3}$  M NADP (Sigma) y NAD (Sigma) y  $10^{-1}$  M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker) (pH 7.4).

### 2.2.2.3 Tratamientos

Se preparan cultivos de linfocitos humanos como se describe



anteriormente (Sección 2.1.2.1).

A las 24 h de iniciados, se les agrega la BrdU y 24 horas más tarde (48 desde su inicio), se les da el tratamiento con los insecticidas a diferentes concentraciones junto con 500  $\mu$ l de la mezcla S10, durante 2 h.

Para este caso las concentraciones a evaluar son: 0, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm.

El testigo positivo fue nuevamente el etanol ( $1 \times 10^{-4}$  M). Los testigos negativos son: (1) un cultivo de sangre periférica más BrdU; (2) un cultivo de sangre periférica más BrdU y 500  $\mu$ l de la mezcla S10 y (3) un cultivo de sangre periférica más BrdU más S10.

Después de las dos horas de tratamiento, a 37 °C, todos los cultivos se centrifugan a 2000 rpm durante 10 min para eliminar el sobrenadante (en el cual se encuentran los productos de las transformaciones del Iannate-90, del pirimor-50 y del etanol, así como la fracción enzimática S10). Se lavan dos veces con suero fisiológico de NaCl (0.9%) estéril y después se les da nuevamente medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) complementado con PHA, más 100  $\mu$ l de BrdU, como se describe en la sección 2.1.2.1.

Al cumplir las 72 horas de cultivo se procede a la cosecha, tinción, etc. como se describe en esa misma sección

## 2.3 Tratamientos con activación metabólica animal

### 2.3.1 Activación metabólica animal *in vitro*

#### 2.3.1.1 Obtención de la fracción microsómica S9 de hígado de rata

La fracción microsómica animal se adquirió liofilizada (MolTox), lista para ser resuspendida en una solución de MgCl  $8 \times 10^{-3}$  M (Baker) y empleada en estudios de activación metabólica animal *in vitro*.

### 2.3.1.2 Preparación de la mezcla S9

Como se menciona anteriormente en el caso de la activación animal *in vitro* se emplea la fracción S9 de hígado de rata en su forma comercial liofilizada (MolTox), preparada de acuerdo con Ames *et al.* (1975) y Frantz y Malling (1975). El liofilizado es reconstituido con una solución de MgCl 0.15 M estéril.

La mezcla S9 se prepara con la fracción microsómica S9, en una proporción 1:9 (volumen/volumen) en una solución con:  $8 \times 10^{-3}$  M MgCl (Baker),  $3.3 \times 10^{-3}$  M KCl (Baker),  $5 \times 10^{-3}$  M Glucosa-6 fosfato (Sigma),  $4 \times 10^{-4}$  M NADP (Sigma) y NAD (Sigma) y  $10^{-1}$  M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker) (pH 7.4). Como es el caso para la S10 de *Vicia faba*.

### 2.3.1.3 Tratamientos

Se realizan los cultivos de linfocitos humanos como se describe anteriormente (Sección 2.1.2.1). A las 24 h se les agrega la BrdU y 24 horas más tarde (48 desde su inicio), se les da el tratamiento con los insecticidas a diferentes concentraciones junto con 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S9, durante 2 h, en la oscuridad.

Para este caso, al igual que para la activación vegetal *in vitro*, las concentraciones que se evalúan son: 0, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm.

A diferencia de la activación vegetal, el testigo positivo es la ciclofosfamida, un promutágeno que ha demostrado ser activado por el metabolismo animal. Los testigos negativos fueron los mismos que para el caso anterior, con el cambio de la S9 por la S10: (1) un cultivo de sangre periférica más BrdU; (2) un cultivo de sangre periférica más BrdU y 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S9; y (3) un cultivo de sangre periférica más BrdU más S9. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  ( $4 \times 10^{-3}$  M) de CP, sin y con la mezcla S9.

Después de las dos horas de tratamiento, a 37 °C, todos los cultivos se centrifugan a 2000 rpm durante 10 min para eliminar el sobrenadante (en el cual se encuentran los productos de las transformaciones de lannate-90, del pirimor-50 y del etanol, así como la fracción enzimática S10). Se lavaron dos veces con suero fisiológico de NaCl (0.9%) estéril y después de estas dos lavadas se les adiciona nuevamente medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) complementado con PHA, más 100 µl de BrdU, como se describe en la sección 2.1.2.1, para ser reincubados por 24 horas más.

A las 70 h de iniciado el cultivo se les agregan 100 µl de colchicina (0.02%) y al cumplir las 72 h, se procede a la cosecha, tinción, etc. como se describe en esa misma sección (2.1.2.1).

#### 2.4 Testigo con disolvente

En el caso del pirimor-50 para los tratamientos con linfocitos, éste fue disuelto en DMSO, por lo que un testigo con este disolvente, en donde corresponde, se somete a los mismos procesamientos descritos anteriormente, ya sea directo o con activación metabólica vegetal o animal.

#### 2.5 Determinación del contenido de proteína en las fracciones microsómicas

##### 2.5.1 Fracción microsómica vegetal

El contenido de proteína se determina de acuerdo con el método de Bradford (1976), actualmente conocido como "Bio-Rad protein assay", realizando una curva patrón con albúmina sérica de bovino.

##### 2.5.2 Fracción microsómica animal

Esta fracción fue comprada y las especificaciones al respecto son proporcionadas por el proveedor (Moltox).

### 3. RESULTADOS

Para todos los tratamientos (directos o con activación metabólica vegetal o animal), los valores obtenidos en cada experimento y su réplica con los dos insecticidas no reflejaron diferencias significativas al compararse entre sí, por tal razón se promediaron agrupando los datos y estos son presentados en las tablas IV-XVII y Figs. 24-45).

#### 3.1 Tratamientos directos

##### 3.1.1 En *Vicia faba*

Al exponer directamente las raíces de *Vicia faba* al lannate-90 y al pirimor-50, se observa que estos son capaces de incrementar las frecuencias de ICH, aunque de una forma diferente para cada caso (Tablas IV-V y Figs. 24-25).

### 3.1.1.1 Efectos del lannate-90

Cuando la prueba estadística correspondiente fue aplicada, ésta confirma que los tratamientos con lannate-90 en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*, incrementan significativamente la frecuencia de ICH en una relación concentración efecto (Tabla IV y Fig. 24). En todas las concentraciones el aumento es significativo y en las más altas (2000 y 2500 ppm), los valores fueron más de dos veces las frecuencias del testigo.

### 3.1.1.2 Efectos del pirimor-50

En la tabla V y figura 25, se presentan las frecuencias inducidas por el pirimor-50 en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*.

En la mayoría de los casos y con el propósito de hacer el análisis comparativo entre los dos insecticidas evaluados se emplearon las mismas concentraciones en las diferentes pruebas llevadas a cabo en este estudio, sin embargo, en este caso, al aplicar las mismas concentraciones que con lannate-90 (Tabla IV y Fig. 24), no se reunieron las metafases necesarias para el análisis de ICH, aunque se observaron células en interfase normales, no se encontraron cromosomas en metafase. Entonces se bajaron las concentraciones para el pirimor-50 a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 ppm (Tabla V y Fig. 25). Inicialmente se dieron tratamientos con 0, 25, 50, 75 y 100 ppm, en donde se encontraron incrementos estadísticamente significativos (prueba de Newman Keuls) en las frecuencias de ICH, cuyos valores disminuyen con respecto al aumento de la concentración del insecticida. Al probarse concentraciones más bajas (entre 5 y 25 ppm), se detecta nuevamente una respuesta positiva en todos los puntos con una relación concentración-efecto.

A 25, 50 y 75 ppm las frecuencias de ICH inducidas, duplican la frecuencia encontrada en el testigo, aunque como se menciona antes, en este rango no hay una relación concentración-efecto.

### 3.1.2 En linfocitos humanos (tratamientos directos de 48 h)

#### 3.1.2.1 Lannate-90

Para el lannate-90 se probaron 0, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm de i.a. En esta última concentración, aunque se observaron células interfásicas, no se encontraron metafases para poder analizar la inducción de ICH (Tabla VI y Fig. 26)

A partir de 250 ppm y hasta 750 ppm, la concentración probada más alta en donde se encontraron metafases de segunda división que permiten el registro de los ICH inducidos, los incrementos en las frecuencias de éstos son estadísticamente significativos ( $P < 0.001$ ).

La tabla VII y figura 27, muestran los efectos que el lannate-90 tiene sobre la CPC a las concentraciones probadas, observándose que con excepción de la concentración más alta de 1000 ppm, en donde no hubo metafases las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) al aplicar la prueba de  $\chi^2$  por tablas de contingencia de  $2 \times 3$ .

#### 3.1.2.2 Pirimor-50

En el caso del pirimor-50 los datos de 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm de i.a. sobre la frecuencia de ICH se presentan en la tabla VIII y figura 28.

Como puede observarse en este caso a diferencia del lannate-90 pudieron ser analizadas concentraciones de 1000, 1500 y 2000 ppm y es hasta 2500 ppm en donde no se encontraron metafases de segunda división que pudieran ser analizadas.

Desde la concentración más baja se observa un incremento en la frecuencia de ICH, pero entre 50 y 750 ppm, además de que no son estadísticamente significativos se encuentra un comportamiento inexacto.

Entre 1000 y 2000 ppm se presenta un nuevo incremento que tiene el mismo comportamiento asintótico anterior, aunque estos si son significativos ( $P < 0.001$ ) (Tabla VIII y Fig. 28).

La tabla IX y figura 29, muestran los efectos del pirimor-50 sobre la CPC. Hasta 250 ppm las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). A partir de 500 ppm se observa un retraso en la cinética que se manifiesta por el incremento de la frecuencia de metafases de 1ª división, en términos generales, a casi el doble de la encontrada en el testigo y en las concentraciones más bajas (50-250 ppm), con la subsecuente disminución en el número de metafases de 3ª división.

En la concentración mas alta (2500 ppm) sólo se encontraron metafases de primera división. Las diferencias en las frecuencias inducidas de ICH a partir de 500 ppm son significativas estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

Como el pirimor-50 fue disuelto en DMSO, se incluyó el testigo correspondiente, observándose en este caso que no tiene efecto sobre la frecuencia de ICH (Tabla VIII, Fig. 28), ni sobre la CPC (Tabla IX y Fig. 29).

### 3.2 Tratamientos con activación metabólica

#### 3.2.1 Activación metabólica vegetal *in vivo*

##### 3.2.1.1 Lannate-90

Las tablas X-XI y figuras 30-31, manifiestan los resultados de la activación vegetal *in vivo* del plaguicida carbámico lannate-90 sobre su capacidad genotóxica en linfocitos humanos, con respecto a la inducción de ICH y a los efectos sobre la CPC a través del IR, respectivamente.

Los tratamientos de 48 horas con 100 µl de extractos de *Vicia faba*, tratados con diferentes concentraciones de este plaguicida provocan incrementos significativos ( $P < 0.001$ ) en todas las concentraciones evaluadas que van desde 500 hasta 2500 ppm (Tabla X y Fig. 30). La

respuesta observada muestra una relación concentración-efecto que es más evidente a 2000 y 2500 ppm.

La evidencia de la funcionalidad de la activación *in vivo* fue proporcionada por los extractos de las raíces tratadas con etanol (promutágeno vegetal), que casi duplican la frecuencia encontrada en el testigo con un incremento estadísticamente significativo ( $P < 0.001$ ).

Por otra parte no se manifestó efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la CPC con estos tratamientos, al aplicar la prueba correspondiente (Tabla XI y Fig. 31).

### 3.2.1.2 Pirimor-50

Los efectos genotóxicos de los productos del metabolismo vegetal *in vivo* del pirimor-50, presentes en los extractos de *Vicia faba* tratados con diferentes concentraciones son mostrados en las tablas XII-XIII y las figuras 32-33.

Se observan ligeros incrementos en la frecuencia de ICH desde la concentración más baja probada (500 ppm), pero éstos son estadísticamente significativos sólo en las dos concentraciones más altas (2000 y 2500 ppm) (Tabla XII y Fig. 32).

Al igual que en el caso anterior con lannate-90, los extractos productos de la activación *in vivo* del pirimor-50, no alteran la CPC de manera estadísticamente significativa ( $P < 0.5$ ) (Tabla XIII y Fig. 33).

Con el fin de observar si la fracción S10 tiene efecto sobre los marcadores registrados, se lleva a cabo un cultivo testigo sin extractos y así se prueba que el extracto de *Vicia faba* no incrementa, en forma estadísticamente significativa, la frecuencia de ICH con respecto a la frecuencia obtenida sin extracto.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



### 3.2.2 Activación metabólica *in vitro*

Con el propósito de hacer una tabla para comparar los efectos del metabolismo *in vitro*, sobre la actividad genotóxica, de los insecticidas lannate-90 y pirimor-50, tanto por parte de la fracción microsómica S10 de las raíces de *Vicia faba* (metabolismo vegetal) como por la fracción microsómica S9 de hígado de rata (metabolismo animal), los resultados se presentan en una misma tabla, junto con datos de los tratamientos en ausencia de alguna de las fracciones metabólicas en las mismas condiciones (Tabla XIV y XVI, Figs. 34-36 y 40-42).

La viabilidad de las fracciones microsómicas para metabolizar los xenobióticos fue evidenciada por la activación del etanol por la fracción S10 y por la activación de la ciclofosfamida por la fracción S9.

La posible influencia del DMSO en los resultados obtenidos fue descartada al incluir cultivos sólo con este disolvente en ausencia y en presencia de alguna de las dos fracciones microsómicas. En el caso del tratamiento en ausencia de las fracciones, las diferencias en la frecuencia de ICH al compararse con los testigos no son estadísticamente significativas. En presencia de las fracciones microsómicas la inocuidad del DMSO es más evidente (Tablas XIV y XVI, Figs. 34-36, 40-42).

Lo mismo se realizó para la CPC, los resultados obtenidos en la ausencia o en presencia de las fracciones metabólicas animal o vegetal para cada insecticida se presentan en las tablas XV y XVII, así como en las figuras 37-39 y 43-45.

Ninguna influencia sobre este marcador de daño es ejercida por el DMSO, en ausencia o en presencia de alguna fracción microsómica ya que las diferencias entre las frecuencias de ICH inducidas por éste y el testigo negativo, no son estadísticamente significativas.

### 3.2.2.1 Lannate-90

En la tabla XIV y figuras 34-36 es evidente que el lannate-90 es activado en estas condiciones experimentales, solo por la fracción microsómica animal. Tanto la fracción microsómica vegetal S10 como los tratamientos directos fueron incapaces de inducir efecto sobre la frecuencia de ICH con una sola excepción, ya que en los tratamientos directos la concentración más alta probada fue capaz de incrementar significativamente la frecuencia de ICH.

En el caso de la CPC, se observa en la tabla XV y figuras 37-39 que este marcador de daño no fue alterado bajo estas condiciones experimentales, inclusive para el caso de la fracción microsómica animal S9 que lo activa mutagénicamente.

### 3.2.2.2 Pirimor-50

Para el pirimor-50 los datos para la frecuencia de ICH son presentados en la tabla XVI así como en las figuras 40-42. En términos generales fue encontrada una respuesta negativa con una sola excepción.

En ausencia de alguna de las fracciones microsómicas con la concentración más alta se encuentra un incremento, pero cerca del umbral de significancia ( $P < 0.001$ ).

Los efectos de estos tratamientos sobre la CPC se muestran en la tabla XVII y figuras 43-45. En ésta se observa que aunque ninguno de los metabolismos es capaz de activar mutagénicamente al pirimor-50, el metabolismo animal lo transformó en algún producto que es capaz de provocar un retraso estadísticamente significativo en la CPC ( $P < 0.05$ ), en todas las concentraciones de plaguicida probadas, evidenciada por el incremento en el número de metafases de 1ª división y una marcada disminución de las metafases de 3ª división.

### 3.2.2.3 Determinación del contenido total de proteína

El contenido total de proteínas en los diferentes extractos obtenidos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con distintas concentraciones de los insecticidas, no varió con respecto al valor del testigo. El contenido de proteína para ambos insecticidas fue casi constante, con valores entre 5.00 y 5.9 mg/ml para el lannate-90 y de 4.20 a 5.16 mg/ml para el pirimor-50.

#### 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los seres humanos están constantemente expuestos a medicamentos y xenobióticos en alimentos y más importantemente en el ambiente. Está bien establecido que diferentes compuestos afectan adversamente la salud humana. La mayoría de los cánceres se deben a la exposición a agentes encontrados en el tabaco, en los alimentos, así como en el aire y el agua. Por ello se ha llevado a cabo una investigación activa con el propósito de determinar el grado de exposición del hombre a compuestos extraños (González y Gelboin 1993).

Los pesticidas constituyen un grupo importante y están entre los compuestos más ampliamente utilizados en la agricultura (Rao et al. 1988). Su uso ha resultado en un incremento en la disponibilidad, el mejoramiento de la calidad y precios más bajos de gran cantidad de productos agrícolas. Sin pesticidas la producción agrícola podría caer entre el 30 y el 50% (Baker y Wilkinson 1990, Zilberman et al. 1991). Sin embargo, su uso debe ser considerado a la luz del conocimiento acerca de la

degradación ambiental, de la seguridad laboral y de salud pública (Dennis y Weisenburger 1993).

El uso de agentes agroquímicos puede causar efectos deletéreos no intencionales sobre el ambiente. La ocurrencia de sus residuos en las cadenas alimenticias demanda un monitoreo cuidadoso ya que pueden representar un riesgo para las generaciones presentes y futuras (Hemavathy y Krishnamurthy 1987a). Las posibles propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas de algunos agentes agroquímicos han sido establecidas.

En los resultados obtenidos en el presente estudio (Tablas IV-XVII y Figs. 24-45), se presenta que los plaguicidas pueden inducir en algunos casos incrementos de ICH y efectos sobre la CPC en ausencia o en presencia de alguna fracción microsómica vegetal (S10) o animal (S9).

Pocos aspectos de la agricultura han avanzado tan rápidamente o generado tanta controversia como lo ha hecho el uso de agentes químicos para la protección de los cultivos. En sus primeros días el tema de plaguicidas involucraba poco más de la enumeración de los compuestos tóxicos usados en la agricultura, con listas de sus propiedades químicas y sus usos prácticos. Tal ha sido el progreso en esta materia que hoy en día es evidente que una comprensión del metabolismo, de la persistencia y del modo de acción es esencial para el empleo seguro y eficiente de los pesticidas, como ésta lo es para los venenos y drogas de importancia en toxicología médica.

Existen diversos estudios sobre los efectos citogenéticos del trabajo con formulaciones de plaguicidas. La mayoría de ellos reportan incrementos en las frecuencias de aberraciones cromosómicas y/o ICH entre los trabajadores expuestos. Los biomarcadores tendrán un mayor impacto en el estudio de los factores ambientales de riesgo. El objetivo primordial de los científicos que exploran estos temas es determinar la naturaleza y consecuencias del cambio genético o variación, con el propósito de predecir o prevenir enfermedades (Anwar 1997).

Los pesticidas son un buen ejemplo de como las moléculas pueden ser diseñadas para cumplir objetivos predeterminados (farmacología bioquímica y molecular) y de los problemas que se originan del uso extensivo de compuestos tóxicos (contaminación química y contaminación ambiental).

Las sustancias usadas para la protección de los cultivos varían año con año, pero los principios que gobiernan su selección, uso y metabolismo evolucionan más lentamente.

Se aprecia cada vez más en toda la sociedad un gran interés por el ambiente. Así, la utilización preeminente de métodos químicos en el control de plagas, entre otros y específicamente de plaguicidas potencialmente tóxicos, hace necesario que se manejen y apliquen correctamente, minimizando, por tanto, los riesgos para el ambiente y la salud pública. En este sentido básico, además, es importante conocer la toxicidad de los plaguicidas utilizados y conseguir que se cumplan las normas vigentes que especifican las medidas de seguridad apropiadas y que necesariamente han de adoptar los técnicos y los trabajadores que aplican los métodos químicos.

No obstante el avance científico y técnico experimentado, la aplicación de métodos especialmente químicos, produce buenos resultados en las primeras fases de control, pero a la larga, debido a la variabilidad genética de este tipo de poblaciones, dan lugar a la aparición de resistencias a una sustancia determinada, que se transmiten a generaciones sucesivas; el uso indiscriminado de plaguicidas de alta persistencia, ha generado efectos secundarios de contaminación del medio y por lo tanto problemas ecológicos; adicionalmente, estos compuestos pueden resultar extremadamente peligrosos para la salud humana, debido a los efectos nocivos que desencadenan en los sistemas biológicos, dando lugar a intoxicaciones que pueden resultar incluso letales.

Cientos de ingredientes activos están en uso, la mayoría de los cuales son formulados y vendidos bajo diferentes nombres comerciales. El ingrediente activo del plaguicida no se comercializa en forma pura, sino combinada con otras sustancias que favorecen su acción y le confieren propiedades determinadas a la mezcla o preparado. La toxicidad del producto, por tanto, no se referirá exclusivamente a la toxicidad del compuesto puro por sí mismo sino que vendrá determinada por las propiedades de la fórmula comercial, en la que juega un papel primordial la presencia de disolventes y surfactantes, que facilitan la penetración del plaguicida, al disolver la capa lipídica de la piel o alterar la permeabilidad de la membrana celular, entre otras vías.

Por tal motivo, en este estudio más que analizar los efectos de los principios activos, del metomilo y del pirimor-50, se decide evaluar las fórmulas comerciales, es decir al Iannate-90 y al pirimor-50, respectivamente, ya que son en realidad las mezclas a las que están expuestos los cultivos y los seres humanos.

Ayudando lo anteriormente mencionado existen diversos reportes que demuestran que los compuestos que se dicen inocuos, presentes en las formulaciones de plaguicidas, en algunos casos no lo son. Tal es el caso de los efectos de la deltametrina, un insecticida sintético dibromopiretroide, sobre algunas de las actividades enzimáticas hepáticas de fase I y II que fueron estudiadas en el hígado de rata. Los animales fueron tratados con dosis diarias de 5 y 10 mg/kg de insecticida puro, así como de su fórmula comercial (decís), administrada intraperitonealmente en aceite de maíz durante 7 días. Se estudiaron las siguientes actividades enzimáticas: NADPH-citocromo P-450 reductasa, aril-hidrocarbano hidroxilasa, aminopireno N-desmetilasa, glutamil cisteina sintetasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, peroxisoma acyl-CoA oxidasa, catalasa y urato oxidasa. Tanto el delmatrín como su formulación comercial fueron efectivos en modificar las actividades de varias de estas enzimas hepáticas metabolizadoras de xenobióticos. Sin embargo, algunas diferencias en las modificaciones enzimáticas fueron observadas entre los tratamientos con la deltametrina pura y la fórmula comercial, siendo esta

última más activa. Este efecto puede ser atribuido a los aditivos, disolventes y compuestos intermediarios presentes en la formulación "decis". Estos resultados sugieren que la exposición a esta formulación comercial de deltametrina podría ser más peligrosa que la exposición a deltametrina sola, en términos de su hepatotoxicidad y/o alteraciones en la biotransformación hepática de otros xenobióticos ocupacionales/ambientales (Villarini et al. 1995)

Recientemente, existe un gran interés en los mecanismos de biodegradación de los compuestos carbámicos y organofosforados ya que: (1) la mineralización eficiente de los pesticidas usados para el control de insectos podría eliminar los problemas de contaminación ambiental, (2) el balance entre la degradación y la eficacia de los plaguicidas posiblemente resultan en aplicaciones más seguras y control efectivo de los insectos, por último (3) el conocimiento de los mecanismos de biodegradación puede ayudar a enfrentar las situaciones que llevan a la generación de metabolitos tóxicos y a la biorremediación de ambientes contaminados (Chapalamadugu y Chaundry 1992).

Los insecticidas carbámicos son principalmente aplicados directamente sobre las plantas y pueden alcanzar el suelo, mientras que los nematocidas y herbicidas carbámicos lo son directamente el suelo. Diversos factores influyen en su biodegradación en el suelo, tales como la volatilidad, el tipo de suelo, la humedad, la adsorción, el pH, la temperatura y la fotodescomposición. Ya que los diferentes carbamatos tienen distintas propiedades, está claro que cada uno debe ser evaluado por sus propios méritos y la extrapolación de resultados no debe hacerse de un carbamato a otro.

Lo anteriormente expuesto, es evidenciado por los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde fueron encontradas respuestas diferenciales dependiendo del organismo empleado (*Vicia faba* o linfocitos humanos en cultivo) o de la ausencia o presencia de alguna fracción microsómica que mimetice el metabolismo vegetal (S10 de raíces de *Vicia faba*) o animal (S9 de hígado de rata) (Tablas IV-XVII y Figs. 24-4b).



Un carbamato puede ser fácilmente degradado, mientras que otro puede adsorberse fuertemente al suelo. Algunos pueden lixiviar fácilmente y alcanzar los mantos freáticos. En estos procesos, el tipo de suelo y la solubilidad en agua son de gran importancia. Además debe reconocerse que esto no sólo concierne al compuesto original sino también a los productos de su degradación o metabolitos.

Estudios de toxicidad a corto y largo plazo han sido llevados a cabo. De estos, es evidente que, aparte de la actividad anticolinesterasa, pueden encontrarse los siguientes cambios: una influencia sobre el sistema hematopoyético, efectos en el funcionamiento (y en altas dosis, degeneración) del hígado y de los riñones, así como la degeneración de los testículos. Estas anomalías en los diferentes órganos y sistemas dependen del animal y de la estructura química del carbamato. Clara influencia funcional así como histológica sobre el sistema nervioso, fue encontrada, particularmente en animales que no son de laboratorio tales como el cerdo (Environmental Health Criteria 1986).

Por muchos años, han sido evaluados por la Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR) de la FAO/WHO, datos de toxicidad a largo plazo y se han establecido un número de ADIs (Acceptable Daily Intakes) para los carbamatos. En los Anexos II y III presentados por Environmental Health Criteria (1986), se resumen los niveles de efectos adversos no observados y los ADIs.

Los resultados encontrados en el presente estudio y otros revisados por Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini (1995), demuestran que los ICH en *Vicia faba* son un sistema adecuado para la detección de agentes que pudieran implicar un riesgo genético potencial. Su fácil manejo y su costo relativamente bajo, lo hacen un sistema de prueba biológico valioso para evaluar el daño genético.

La frecuencia de ICH parece estar relacionada con el número de ciclos de síntesis de ADN al cual las células son expuestas a la base

análoga BrdU (Schvartzman et al. 1979). Sin embargo Kihlman y Andersson (1984), han propuesto que los cromosomas que han sido expuestos a BrdU por dos ciclos de replicación (TB-BB), muestran frecuencias más altas de ICH (29 por metafase) que aquellos que permanecen sólo por un ciclo de replicación (TT-TB) (19 por metafase). Estas frecuencias están de acuerdo con los resultados registrados en este trabajo que fueron de 26.90 y 28.40 ICH por célula (Tablas IV-V y Figs. 24-25), para cromosomas que estuvieron dos ciclos en presencia de BrdU.

La frecuencia de ICH está también relacionada con el contenido de ADN. Para Geard y Peacock (1969), la cantidad promedio de ICH en los cromosomas subacrocentricos de *Vicia faba* es de  $1.64 + 0.04$ , mientras que en los cromosomas metacéntricos es de  $4.05 \pm 0.16$  (tomando en cuenta que el contenido de ADN es de 44 picogramos por célula) (Boetcke et al. 1967). Las frecuencias basales encontradas en este trabajo concuerdan con éstos, al registrar un promedio de  $1.85 + 0.09$  y de  $3.6 + 0.34$ , respectivamente (Tablas IV-V y Figs. 24-25).

La actividad mutagénica de cinco insecticidas metilcarbámicos (carbarilo, baygón, BUXTen, landrín y metomilo) y de sus derivados nitrosos se ha investigado usando las cepas TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1539 de *Salmonella typhimurium* LT<sub>2</sub>. Los insecticidas metilcarbámicos no causan incremento significativo en la cantidad de colonias revertantes en ninguna de las cepas usadas por Blevins et al. (1977a), por el contrario, los derivados nitrosos de los plaguicidas carbámicos incrementan grandemente la frecuencia de colonias de las placas inoculadas con las cepas TA100 y TA1535. Ellos concluyen que los derivados nitrosos de los insecticidas metil carbámicos probados son potentes mutágenos mientras que los compuestos originales no lo son.

Los insecticidas carbámicos benfuracarb, carbosulfán y furatiocarb, son investigados en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón para establecer si éstos presentan actividad citogenética *in vivo*. Dos dosis de cada compuesto fueron administradas intraperitonealmente a ratones NMRI. Los tres insecticidas dan una respuesta positiva en la inducción de

micronúcleos en eritrocitos policromáticos en diferentes tiempos. Mientras que furatiocarb y carbosulfán muestran patrones similares en la dependencia del tiempo para la formación de micronúcleos con valores máximos después de 72 horas, el benfuracarb exhibe un comportamiento distinto con un máximo incremento dentro de las 24 horas después de la aplicación (Stehrer-Schmid y Wolff 1995). Con las cepas D7 y D61.M de *Saccharomyces cerevisiae* se trata de evaluar la conversión génica y la inducción de aneuploidías. Ninguno de los tres insecticidas tiene influencia sobre estos marcadores genéticos en la cepa D7 con y sin activación metabólica. Sin embargo con la cepa S61.M el benfuracarb y el furatiocarb llevan a un incremento en la pérdida de cromosomas en la presencia del sistema metabolizador S9 (Stehrer-Schmid y Wolff 1995).

La evaluación de la actividad citogenética del insecticida carbofurán y de sus tres principales metabolitos formados en los mamíferos y en el ambiente, indica que el compuesto original y dos productos intermediarios de su biotransformación (3-hidroxicarbofuran y 3-ceto-carbofuran) inducen una acción clastogénica en linfocitos humanos en cultivo. El último metabolito (3-ceto-7-fenol), no tiene efecto mutagénico *in vitro*. Los datos obtenidos dan evidencia de la desaparición de la mutagenicidad del carbofurán en el curso de su biotransformación en los mamíferos (Pilinkaia y Stepanova 1984).

Como se ha mencionado anteriormente, diferentes compuestos carbámicos y organofosforados son usados para controlar una amplia variedad de insectos plaga, malas hierbas y organismos vectores de enfermedades. Estos productos fueron introducidos para reemplazar a los recalcitrantes y peligrosos pesticidas clorados. Aunque los plaguicidas recientemente lanzados son considerados biodegradables, algunos de ellos son altamente tóxicos y sus residuos son encontrados en ciertos ambientes. Además la degradación de algunos carbamatos y organofosforados, genera metabolitos que son también tóxicos. En general la hidrólisis de estos compuestos produce metabolitos menos tóxicos comparados con aquellos obtenidos por oxidación (Chapalamadugu y Chaudhry 1992). Aunque han sido aislados microorganismos capaces de

degradar estos compuestos, el conocimiento sobre sus rutas metabólicas y de los genes involucrados en la degradación es escaso.

El lannate-90 es un insecticida en polvo a base de metomilo cuya genotoxicidad ha sido evaluada por medio de diferentes sistemas de prueba (Valencia-Quintana et al. 1998). Resultados negativos han sido obtenidos en la mayoría de éstos, particularmente con aquellos que detectan mutaciones génicas o daño al ADN (Guerzoni et al. 1976, Simmon et al. 1976, 1977, Blevins et al. 1977a,b, Gopalan y Njagi 1981, Valencia 1982, Wojciechowski et al. 1982, Moriya et al. 1983, Sandhu et al. 1985, Hemavathy y Krishnamurthy 1987a).

Por otro lado, el lannate-90 ha sido reportado como un inductor eficiente de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en plantas (Nijagi y Gopalan 1981, Valencia-Quintana et al. 1993) y en sistemas animales (Debuyst y Van Larebeke 1983, Hemavathy y Krishnamurthy 1987a,b, Bolognesi et al. 1994, Bonati et al. 1994). No tiene actividad carcinogénica en ratas (Kaplan y Sherman 1977) ni en perros (Baron 1991). Tampoco han sido observados efectos teratogénicos en ratas o conejas preñadas (Baron 1991).

El lannate 20 fue evaluado para determinar su mutagenicidad en *Drosophila melanogaster* por las pruebas de letales recesivos ligados al sexo y translocaciones cromosómicas II-III, mediante alimentación continua a larvas. Las tres dosis subletales de 0.2, 0.4 y 0.6  $\mu$ l de lannate por 100 ml de medio nutritivo inducen un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) en el número de letales recesivos ligados al sexo, sobre los testigos. Sin embargo, no se registraron translocaciones ni en los tratados ni en los testigos (Hemavathy y Krishnamurthy 1987b).

En estudios previos en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* con metomilo no se encontraron aberraciones de tipo cromosómico, sólo se registraron alteraciones de tipo cromatídico (fragmentos y puentes sencillos). El incremento de las frecuencias estuvo relacionado con la concentración. También se presentó inhibición de la división celular,

encontrando un decremento estadísticamente significativo del IM, a medida que aumenta la concentración, lo que sugiere una acción mitodepresiva de este compuesto (Valencia-Quintana *et al.* 1993).

Las observaciones realizadas en este trabajo con tratamientos directos en *Vicia faba* como sistema de prueba, sugieren que este plaguicida efectivamente interrumpe la integridad cromosómica de este organismo.

En el presente estudio se confirma que los tratamientos con lannate-90 en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* incrementan significativamente ( $P < 0.001$ ) la frecuencia de ICH. Observándose una relación concentración-efecto (Tabla IV y Fig. 24). Este es el primer trabajo que se realiza con este insecticida para la prueba de ICH.

Se considera que por su comportamiento y por el tipo de aberraciones producidas en otra investigación (Valencia-Quintana *et al.* 1993), el metomilo podría ser, o presentar en su molécula, alguna porción alquilante, susceptible de actuar como agente S-dependiente y de producir efectos clastogénicos.

Al igual que el lannate-90, el pirimor-50 fue también capaz de alterar el material genético de *Vicia faba*, incluso con mayor eficacia que el anterior (Tabla V y Fig. 25).

En términos generales, con el pirimor-50 se registran incrementos en la frecuencia de ICH al aumentar la concentración desde 5 y hasta 25 ppm. Mientras que a partir de 50 y hasta 100 ppm se observa decremento en la frecuencia de ICH, aunque todavía con diferencias significativas con el testigo (Tabla V y Fig. 25).

Los resultados obtenidos pueden deberse a una mezcla de efectos citotóxicos junto con los mutagénicos, ya que en estudios preliminares en donde se prueban concentraciones mayores, similares a las ensayadas con lannate-90, no se detectan células en metafase, por lo que más que la

disminución de su capacidad genotóxica, el descenso es el resultado de la muerte de las células más dañadas o de la inhibición de la división celular.

Por otra parte, la actividad alquilante de los pesticidas carbámicos no sólo puede estar afectando el ADN, sino también a grupos proteicos, de tal manera que no es fácil encontrar solamente daños a nivel genético, evidenciados a través de la inducción de ICH, sino también otro tipo de alteraciones biológicas como serían los efectos sobre la cinética de proliferación celular, tal y como ocurre en tratamientos preliminares con *Vicia faba* en donde la cantidad de metafases desciende conforme aumenta la concentración.

Existen evidencias suficientes de un requerimiento de proteínas para la replicación del ADN. Se sabe que en células animales y vegetales la progresión celular constante hacia la mitosis demanda una síntesis continua de proteínas (Walters y Petersen 1968).

Se ha demostrado que si se impide la síntesis de ADN no hay división celular. Dentro de los agentes que afectan al ADN y su metabolismo, se encuentran los inhibidores de la síntesis y de los precursores del ADN así como aquellos compuestos que modifican su estructura (Kihlman 1966).

Por otra parte, se ha descrito que al bloquearse las síntesis de ARN y de proteínas, la subsecuente síntesis de ADN y la mitosis se reprimen totalmente.

Esto puede ser la causa de que en las concentraciones evaluadas a partir de 50 ppm la frecuencia de ICH sea más bajo que la que se encontró a 25 ppm (Tabla V y Fig. 25), debido a que en estas concentraciones se están mezclando los efectos genotóxicos con efectos citotóxicos que causan la muerte celular,

Con relación a los tratamientos directos con linfocitos humanos fueron dos protocolos diferentes los que se aplicaron uno con 48 h

continuas de exposición a los plaguicidas (Tablas VI-IX y Figs. 26-29) y otro con dos horas (Tablas XIV-XVII y Figs. 34-45). Este último corresponde al testigo de los tratamientos en presencia de las fracciones microsómicas que simulan la activación metabólica vegetal (S10) y animal (S9).

En este trabajo se demuestra que el lannate-90 es un eficiente inductor de ICH, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Debuyst y Larebeke (1983), quienes describen que el metomilo causa incremento en la frecuencia de ICH pero sólo en presencia de la mezcla S9. Por el contrario, Bonatti *et al.* (1994) encuentran que los ICH no se incrementaron significativamente. Las diferencias pueden ser debidas al diverso tipo de formulaciones empleadas en cada caso. En el presente estudio, fue evaluado el lannate-90, mientras que en el segundo, se aplicó metomilo sin especificar su pureza y en el último fue usado lannate-25, en el cual no es utilizada la fracción metabólica.

Los dos distintos resultados obtenidos con las tres formulaciones del insecticida, sugieren que es necesaria la activación metabólica para que el daño se presente. Este hecho queda demostrado en este estudio con los tratamientos en presencia de las fracciones microsómicas en donde se observa que la S9 de hígado de rata fue capaz de activar mutagénicamente al lannate-90, ya que ni la fracción S10 de las raíces de *Vicia faba* ni el tratamiento directo de dos horas incrementan las frecuencias de ICH por arriba de los valores del testigo (Tabla XIV y Figs. 34-36).

El daño celular observado a 1000 ppm en la tabla VI y figura 26 puede ser debido al tiempo de exposición, ya que con un tratamiento de dos horas fue posible probar concentraciones de hasta 2500 ppm, en la cual se nota incremento significativo en la frecuencia de ICH en forma directa (Tabla XIV y Fig. 34).

Se ha establecido, que en soluciones acuosas los carbamatos son inestables e incluso pueden ser degradados de una forma no enzimática, esto puede explicar los resultados encontrados con 48 h de exposición (Tabla IV y Fig. 24), es decir éste está siendo degradado en el medio y de

esta forma produciendo los efectos observados en este ensayo. Dicha degradación no enzimática se conjunta con la degradación provocada por la fracción microsómica S9 de hígado de rata y de ahí los incrementos encontrados con sólo dos horas de exposición con concentraciones que van desde 1000 hasta 2500 ppm (Tabla XIV Y Fig. 35).

En el caso de la transformación metabólica vegetal se encuentran diferencias entre el ensayo *in vivo* con respecto al *in vitro*. Nuevamente el tiempo de tratamiento puede ser un factor esencial en estas variaciones ya que con la activación *in vivo* los linfocitos están expuestos a los extractos de *Vicia faba* que contienen los productos del metabolismo del lannate-90, durante 48 h (Tablas X-XIII y Figs. 30-33) y en el caso de la activación *in vitro* sólo estuvieron en contacto con los linfocitos por 2 horas (Tablas XIV-XVII y Figs. 34-45).

Ha sido demostrado que algunas actividades enzimáticas sensibles, son perdidas por los mecanismos de extracción para obtener la fracción S10 (ó S9 en su caso) (Calderón-Segura *et al.* 1999). Por otra parte, puede ser que los procesos de activación vegetal para este plaguicida en particular, sean más lentos y que dos horas fueron insuficientes para que estos puedan llevarse a cabo. Ha sido mencionado que en plantas el metabolismo del lannate-90 comienza después de 4 horas desde el momento de su incorporación a la planta, lo que puede apoyar este argumento (Du Pont 1999a).

No obstante, para tener la certeza de la capacidad metabólica de las raíces de *Vicia faba in vivo* o de la fracción microsómica S10 *in vitro*, fue usado el etanol como testigo positivo. Como se presenta en las tablas X, XII, XIV y XVI y figuras respectivas (Figs. 30, 32, 34-36, 40-42), la presencia de etanol duplica la frecuencia de ICH encontrada en los testigos. Los datos están de acuerdo con aquellos obtenidos por Takehisa *et al.* (1988) en células ováricas de criceto chino y en linfocitos humanos por Gómez-Arroyo *et al.* (1995) también con el metabolismo de *Vicia faba*. El etanol es transformado a acetaldehído por la acción de la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), dependiente del NAD y en ácido acético por la



aldehído deshidrogenasa (ALDH) también dependiente del NAD. Estas reacciones ocurren principalmente en las mitocondrias y el citoplasma. El acetaldehído es el principal inductor de ICH en linfocitos humanos *in vitro* en la presencia de ADH y NAD (Obe y Ristow 1977, 1979, Obe et al. 1979, 1986).

Por otro lado, Bonatti et al. (1994) sugieren que el perfil genotóxico del metomilo es similar a los efectos descritos para un promotor de tumor de piel en ratones, el acetato de forbol12-miristate (PMA), que aunque no es mutagénico, puede inducir aberraciones cromosómicas y daño al ADN actuando en forma indirecta, p.e. formando especies oxígeno-activas. El PMA es capaz de inducir aberraciones cromosómicas estructurales, pero es un inductor débil de ICH (Emerit y Cerutti 1981).

El metomilo no fue mutagénico en dos sistemas bacterianos, sin embargo, este induce aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en plantas, animales y linfocitos humanos *in vitro* y al menos en formulación técnica, causa daño al ADN de tipo oxidante (Bonatti et al. 1994). Estos resultados sugieren una acción mutagénica indirecta de este plaguicida carbámico.

La inducción de  $\text{OH}^\bullet$  dG por el metomilo, implica que el daño oxidante del ADN puede explicar la formación de rompimientos de una sola hebra (Bolognesi et al. 1994). Así un modo indirecto de acción de este plaguicida carbámico, a través de la formación de radicales hidroxilo, se considera un factor relevante para el daño al ADN y potenciales efectos genotóxicos evidenciados por rompimientos de las hebras de ADN y bases oxidadas (Fraga et al. 1990).

Además, la posibilidad de daño oxidante como un factor causal de la genotoxicidad del metomilo ha sido apoyada con base en evidencia experimental de la capacidad inhibidora de enzimas por diferentes pesticidas metilcarbámicos (Bolognesi et al. 1994). Hemavathy y Krishnamurthy (1987a) proponen un mecanismo similar con respecto al metomilo que puede estar operando bajo las condiciones de este estudio, provocando la inhibición de algunas enzimas, lo que causa daño oxidante al

ADN y los eventos genéticos observados en el presente trabajo (Tablas IV, VI, VII, X, XI, XIV, XV y Figs. 24, 26-27, 30-31, 34-39). Algunas enzimas involucradas en la defensa contra especies oxidantes peligrosas, tales como la superóxido desmutasa, la catalasa y la glutatión transferasa, son inhibidas por estos pesticidas (Rannug y Rannug 1984).

Los carbamatos inhiben a las proteínas uniéndose a éstas (Rannug y Rannug 1984). Es probable que el mismo mecanismo esté ocurriendo con estos plaguicidas causando bloqueo de algunas enzimas lo que lleva al daño del ADN y así a los eventos clastogénicos y fisiológicos observados (Valencia-Quintana *et al.* 1993, 1998).

En el caso del pirimor-50, aunque efectivo en la capacidad para inducir ICH, se presentan algunas diferencias con el patrón observado para lannate-90.

Con este plaguicida se pudieron probar concentraciones mayores, hasta 2500 ppm, en donde ya no se encuentran metafases de 2ª división (Tablas VIII-IX y Figs. 28-29).

El comportamiento mutagénico presenta dos mesetas, la primera a partir de la concentración más baja probada de 50 ppm y hasta 750 ppm que aunque estadísticamente no significativo, se observa un incremento con respecto al testigo de 4.8 a más ó menos 7 ICH/célula en promedio. La segunda meseta, ya estadísticamente significativa está de 1000 a 2000 ppm con un valor aproximado de 9.5 ICH/célula (Tabla VIII y Fig. 28).

Los tratamientos con las fracciones microsómicas S10 y S9 no producen activación y los tratamientos directos de dos horas con el pirimor-50 fueron incapaces de provocar ICH, con excepción de la concentración más alta (2500 ppm), para el caso de la S9 (Tabla XVI y Fig. 41). La activación vegetal *in vivo* sólo produce efectos significativos a 2000 y 2500 ppm (Tabla XII y Fig. 32).

Con relación a los mecanismos moleculares involucrados en el daño genético en general, los plaguicidas carbámicos actúan como agentes alquilantes con efectos S-dependientes y retardados.

Como se ha demostrado, el lannate-90 en *Vicia faba* es un agente S-dependiente ya que produce sólo aberraciones de tipo cromatídico con un tratamiento de 4 h con tiempos de recuperación de 12 y 44 h (Valencia Quintana *et al.* 1993). Considerando que los ICH son un evento S-dependiente (Wolff *et al.* 1974, Painter 1980), se esperaba que el lannate-90 fuera un eficiente inductor de ICH.

Gran cantidad de sustancias con acción mutagénica son clasificadas como agentes S dependientes, siendo los alquilantes los mejor conocidos (Evans y Scott 1969, Bender *et al.* 1973,1974).

Entre los productos celulares de reacción de estas sustancias, las alquilaciones al ADN son de gran importancia para la toxicología genética (Brendel y Ruhland 1984).

Este tipo de agentes provoca una amplia variedad de efectos biológicos de importancia desde el punto de vista genético (Natarajan *et al.* 1984), que van desde simples sustituciones de pares de bases en el ADN hasta cambios en la cantidad de cromosomas (Brendel y Ruhland 1984, Schmähl 1988, Bonatti *et al.* 1990), incluyendo aberraciones cromosómicas (AC), ICH y muerte celular (Natarajan *et al.* 1984).

Se considera que los "huecos" (gaps) en el ADN que resultan de errores en la replicación (mis-replication) de la hebra patrón alquilada, son los causantes de las alteraciones cromosómicas, pero no son bien conocidas las lesiones específicas de alquilación que forman estos huecos (Schwartz 1989).

Se han explicado los efectos mutagénicos y carcinogénicos de los agentes alquilantes mediante sus enlaces covalentes con el ADN celular (Ferguson *et al.* 1989).

Aunque los efectos biológicos (citotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad) de los agentes alquilantes resultan de sus uniones con el ADN, tales compuestos generalmente no presentan afinidad especial de enlace (Brendel y Ruhland 1984, Ferguson *et al.* 1989). Su ocurrencia en el ambiente es amplia y la exposición humana a fuentes naturales y de contaminación es universal (Beranek 1990).

Los agentes alquilantes son mutagénicos y carcinogénicos en una gran variedad de organismos (Beranek 1990), provocan un amplio espectro de alteraciones en las células expuestas, incluyendo alquilaciones en sitios específicos del ADN (Lawley y Thatcher 1970, Beranek *et al.* 1980).

Ha sido establecida la correlación entre estas alquilaciones específicas y diferentes marcadores biológicos, su acción mutagénica (Vogel y Natarajan 1979a,b, 1982), la estabilidad de los aductos ADN-grupo alquilo (Den Engelse *et al.* 1986) y su reparación *in vitro* e *in vivo* (Saffhill *et al.* 1985 y Singer 1985). También son utilizados en estudios de dosimetría, determinando aductos en la hemoglobina para predecir riesgo mutagénico (Osterman-Golkar *et al.* 1976, Tannenbaum y Skipper 1984, Perera 1988), pero aquellas lesiones involucradas en la producción de alteraciones cromosómicas, han sido ambiguamente identificadas (Connell y Metcalf 1982, Bonatti y Abbondandolo 1989) y se conoce poco sobre los mecanismos que causan esta clase de efectos (Bonatti *et al.* 1990).

Diferentes tipos de daño inducidos en el ADN dependen del agente mutagénico empleado (Darroudi *et al.* 1989). Los alquilantes reaccionan con una amplia variedad de sitios nucleofílicos en el ADN y en las proteínas formando diversas clases de aductos (Natarajan *et al.* 1984)

La principal lesión alquilante que se conoce impide la replicación, es el aducto 3-metil adenina (Larsson *et al.* 1985). Probablemente una proporción de las rupturas del ADN sean los huecos dejados por una replicación incompleta debido a la incapacidad para proseguir al paso de 3-metil adenina *in vitro*. Es posible que existan endonucleasas que actúen en

los sitios de alquilación para causar rupturas en la hebra hija (Schwartz 1989).

Asimismo, se podrían esperar rupturas de doble hebra en el caso de que se formaran "huecos opuestos a los sitios apurínicos. Schwartz (1989) encuentra que este tipo de alteraciones no es una lesión importante involucrada en la ruptura del ADN dependiente de la fase S para la N-nitil-N-nitrosoguanidina (MNNG) y el metil metano sulfonato (MMS).

Otra alteración inducida por los agentes alquilantes es la lesión O<sup>6</sup>-metil guanina. Se desconoce el mecanismo por el cual es letal y genotóxica. El aducto no bloquea la síntesis de ADN, de tal forma que no genera de manera directa "huecos (Larsson et al. 1985).

Los errores en la reparación pueden remover la base que incorrectamente ha sido recién incorporada, opuesta a la alteración, produciendo una ruptura en la hebra del ADN. Si esta no es reparada, posiblemente al persistir, provoca alteraciones y letalidad (Bonatti y Abbondandolo 1989), aunque no existen evidencias directas que apoyen esta hipótesis (Schwartz 1989, Bonatti et al. 1990).

La remoción enzimática del daño inducido por alquilación en células vivas se realiza principalmente a 3 niveles: (1) des- o trans-alquilación del grupo alquilo por la enzima de reparación, (2) la remoción de la base modificada por una glucosilasa (específica) dejando un sitio apurínico o apirimídico y bases alquiladas libres, seguida por inserción de purinas/pirimidinas o rompimientos por endonucleasas AP y (3) escisión de nucleótidos, que provoca la liberación de cadenas de nucleótidos que contienen al sitio dañado (Brendel y Ruhland 1984). Los dos últimos, de acuerdo con Beranek (1990), pueden agruparse como procesos de reparación por escisión. De igual manera, los datos de alquilación obtenidos de varias etapas de desarrollo, indican que la formación de aductos es dependiente del estado del ciclo celular al momento del tratamiento y que los niveles de aducción pueden reflejar la capacidad de reparación del período estudiado en particular (Beranek 1990).

Por otra parte, se ha descrito que las alteraciones cromosómicas causan directamente la muerte celular (Heddle y Salomone 1981), por ello los cambios en el índice mitótico o en la CPC pueden ser considerados como indicadores de daño citotóxico o citostático, respectivamente.

Los bloqueos en la síntesis de ADN inducen regiones sin replicar, "huecos", que pueden provocar la formación de alteraciones cromosómicas. Debido a que éstas se correlacionan estrechamente con la muerte celular, es probable que las lesiones que suprimen la síntesis de ADN sean citotóxicas (Schwartz 1989).

La CPC constituye un criterio para evaluar el daño fisiológico que inducen los diversos agentes. Se ha demostrado que tanto las radiaciones, como algunas sustancias tales como los nucleosidos de adenina, la azaserina, el bromuro de etidio y la cicloeximida, entre otras, producen inhibición de la división celular.

Estos agentes pueden influir principalmente en ciertas fases del ciclo celular, como evitar la entrada de las células en la mitosis, la formación del huso funcional y la citocinesis, suprimiendo la división de la célula, del núcleo, de los cromosomas (cuando actúan en  $G_1$ , ó  $S$ ), así como la separación de las cromátidas (actúan en  $G_2$ ) pero no necesariamente la replicación cromosómica.

Como ya se menciona, la actividad de los plaguicidas carbámicos no sólo puede afectar al ADN, sino también a grupos proteicos de tal manera que no es factible encontrar únicamente daños a nivel genético, evidenciados a través de la inducción de ICH, como se observa al aplicar directamente el lannate-90 y el pirimor-50, tanto con *Vicia faba* como con linfocitos humanos y en el caso del lannate-90 con activación animal *in vitro* por la fracción microsómica S9 de hígado de rata, sino también otro tipo de alteraciones biológicas como serían los efectos sobre la CPC, que sucede en los tratamientos directos con pirimor-50, tanto con *Vicia faba*, en donde sólo pudieron ser evaluadas concentraciones menores de 100 ppm

(Tabla V y Fig. 25), como en linfocitos humanos (Tabla IX y Fig. 29) en los cuales desde 500 ppm se observa retraso en la cinética de proliferación, caracterizada por la acumulación de metafases de 1ª división y una disminución de las de 3ª y en el caso de 2500 ppm también a costa de las de 2ª, encontrándose únicamente metafases de 1ª. En el caso de los tratamientos con activación metabólica, sólo el tratamiento en presencia de la fracción S9 tiene acción sobre este parámetro en todas las concentraciones probadas (Tabla XVII y Fig. 44).

Edmunds (1964) ha demostrado que al impedir la síntesis del ADN no hay división celular. Dentro de los agentes que afectan al ADN y su metabolismo se encuentran los inhibidores de la síntesis de los precursores del ADN y aquellos que modifican su estructura, como los agentes alquilantes (Kihlman 1966).

Para los agentes metilantes, tanto los sitios apurínicos como la N<sup>2</sup>-metiladenina intacta, son capaces de suprimir la replicación del ADN *in vivo* (Sagher y Straus 1983, Larsson *et al.* 1985). Posiblemente algo similar ocurre con los plaguicidas empleados en este estudio por sus grupos alquilantes.

Por otra parte, se ha demostrado que la supresión de los procesos necesarios para que se lleven a cabo tanto el ciclo celular como la síntesis de ARN y de proteínas, reprimen también la proliferación de las células (Donelly y Sissen 1967, Müller 1969, Webster y Van't Hof 1970).

Darroudi *et al.* (1989) al comparar entre sobrevivencia, aberraciones e ICH, encuentran que en las líneas celulares CHO-9 y 43-3B de cricetos, se presenta una relación positiva entre muerte celular y frecuencia inducida de aberraciones después de tratamientos con 4NQO, MMC y DEB.

Los plaguicidas de otra clase como el metil paratión (folidol), el dimetoato (rogor), el oxidemetón metílico (metasistox), el azinphos metílico (gusatión) y el foxim (bay 77488), del grupo de los organofosforados (Gómez-Arroyo *et al.* 1987), al igual que el lannate-90 y el pirimor-50 en el

presente trabajo, inducen ICH; en algunos casos a concentraciones tan bajas como 0.5 ppm (metil paratión), en donde además produce daño a las células y decremento en el índice mitótico. Situación similar a la obtenida con pirimor-50 a partir de 50 ppm que, aunque no se presentan evidencias de daño al tejido meristemático, se observa marcada disminución en la cantidad de células en división, sobre todo en concentraciones más elevadas que fueron ensayadas en tratamientos preliminares dentro del protocolo de investigación (datos no presentados).

Al igual que estos plaguicidas, el NF-133, el bensultap, el tiociclam, el dimetipio, el monocrotofos, el ometoato (Xing y Zhang 1990) y el propoxur (Gómez-Arroyo *et al.* 1995), también inducen ICH en esta planta.

En el caso del pirimor-50 no hay estudios sobre su acción a nivel genético para comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo, con una excepción, que corresponde a una evaluación citogenética de 11 trabajadores de un invernadero experimental, que fue llevada a cabo antes y después de su contacto ocupacional a corto plazo con el insecticida pirimor (pirimicarb). El pirimor fue capaz de incrementar significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de los trabajadores examinados. La sensibilidad individual a la acción citogenética del pirimor *in vivo* e *in vitro* fue analizada antes y después del contacto con éste. Se concluye sobre el riesgo mutagénico potencial del pirimor para los seres humanos (Pilinskaia 1982).

Así, un aspecto importante, desde el punto de vista de la mutagénesis de los pesticidas carbámicos es su actividad alquilante (Gómez Arroyo *et al.* 1992a,b). Los agentes capaces de alquilar al ADN han sido extensamente estudiados como inductores de ICH. Una clara relación no ha emergido todavía entre la especificidad con la que reaccionan con el ADN, o el tipo de reparación desencadenada por estos compuestos y la relativa potencia con que los ICH se forman.

Existen diferencias entre los agentes alquilantes y sus efectos sobre el material genético. Situación evidenciada en el presente trabajo con



dos agentes químicos similares, pero presentando respuestas genotóxicas distintas.

Las acciones mutagénicas diversas del lannate-90 y del pirimor-50 pueden estar relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas. Por otra parte, las transformaciones enzimáticas o no-enzimáticas pueden influenciar los tipos y las frecuencias relativas de los productos de reacción y por lo tanto de sus efectos biológicos (Lawley 1976).

Elespuru *et al.* (1974), establecen que las diferencias en la potencia mutagénica de tres compuestos N-methyl-N-nitroso que incluyen a los derivados nitroso del carbarilo, un pesticida carbámico, pueden ser debidas a la formación de diferentes reactivos intermedios dentro de la célula o a la asimilación diferencial de los compuestos, gobernada por la estructura molecular.

Por otro lado, se sabe que además del tamaño de las moléculas, existen otros factores que afectan la difusión de una sustancia a través de la membrana, tales como el coeficiente de partición. La solubilidad en lípidos es un factor que influye en la actividad biológica de los compuestos. En otros estudios el grupo metil carbamato del carbendazim se sospecha que juega un papel importante en la acción inhibidora del huso (Seiler 1976) y otras alteraciones (Grover *et al.* 1988, Pandita 1988).

Los agentes alquilantes pueden penetrar las células con o sin la ayuda de mecanismos de transporte específicos (Byfield y Calabro-Jones 1981, Colvin 1981). Lo que refleja las diferentes características fisicoquímicas de esta clase heterogénea de compuestos. En adición a su "funcionalidad", las propiedades químicas o las transformaciones metabólicas pueden influir en los productos celulares de reacción en cuanto a tipos y frecuencias relativas y por lo tanto sobre sus efectos biológicos (Lawley 1976).

Por otra parte, tanto la formación, como la persistencia de las lesiones en el ADN, son el resultado de varios procesos sobrelapados, tales

como la activación y la degradación de las moléculas de mutágeno, su transferencia a los blancos biológicos, las propiedades fisicoquímicas (influidas por la temperatura, el pH, etc.) así como la pérdida espontánea o enzimática de lesiones por los procesos de reparación (Brendel y Ruhland 1984).

Una característica general de los agentes alquilantes es la falta de estabilidad tanto de ellos mismos como de las lesiones que inducen. La pérdida de potencia alquilante en soluciones acuosas (hidrólisis) puede ocurrir en minutos (p.e. sulfuro de mostaza) o durante la incubación prolongada (vidas media mayores a 10 h, p.e. metanosulfonatos) (Lawley 1976, Brendel y Ruhland 1984).

Retomando los efectos sobre la cinética de proliferación celular, existen diferencias entre los agentes alquilantes y sus efectos sobre el material genético. Esta situación es evidente en el presente trabajo con el lannate-90 y el pirimor-50, dos agentes químicos similares, que son mutagénicos en las mismas condiciones de estudio, pero sus efectos a nivel fisiológico difieren ya que uno altera el IR y el otro no lo hace (Tablas VII, IX, XI, XIII, XV, XVII y Figs. 27, 29, 31, 33, 37-39, 43-45)).

Resultados similares han sido obtenidos con otros plaguicidas. En el caso del oxamilo, se observa un incremento en la inducción de ICH con el aumento de las concentraciones y por otro lado, la alteración del IR. Las modificaciones en las proporciones de  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ , en los cultivos tratados fueron significativas (Sánchez-Alarcón 1995), aunque a diferencia de nuestro estudio no se encuentra una relación concentración-efecto.

Han sido reportados efectos similares con otros plaguicidas carbámicos así como con organofosforados. Una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de carbendazim, afecta la duración del ciclo celular, ya que la frecuencia de  $M_3$  fue significativamente reducida al igual que el IR correspondiente (Singh y Sandhu 1991). Como ya se menciona anteriormente se sospecha que el grupo metil carbamato del carbendazim juega un papel importante en la inhibición de la síntesis del huso, también ha sido reportado como formador

de complejos con subunidades proteicas resultando en la producción de metafases anormales, inducción de puentes, C-mitosis, cromosomas con el centrómero inactivado, poliploidías y micronúcleos (Grover *et al.* 1988, Pandita *et al.* 1988) y de igual manera se encuentra capaz de provocar muerte celular y retraso del ciclo celular.

Varias investigaciones realizadas con malatión, metilazinfos, nemacur, monitor, bolstar y paratión, han mostrado que retardan el ciclo celular y disminuyen el ciclo mitótico de las células V79 del criceto dorado y otras líneas celulares humanas, observando una relación concentración-respuesta (Chen *et al.* 1981, 1982, Sobti *et al.* 1982, Salvadori *et al.* 1988).

El derivado nitroso del aldicarb causa un ligero decremento en la progresión mitótico de las células en cultivo. Las células tratadas con este insecticida presentan retraso en el ciclo celular, como lo evidencia la disminución de la cantidad de células M<sub>2</sub> y el incremento de células M. (González-Cid *et al.* 1988).

Por su parte, la mayoría de los organofosforados provocan retraso del ciclo celular. Amaze, metil azinfos, bolstar, DEF-desfoliador, fenetiión, monitor y nemacur, disminuyen el IR y no necesariamente se correlaciona con su capacidad para inducir ICH. Metil azinfos no intensifica los ICH, sin embargo fue altamente tóxico y redujo drásticamente el IR, por el contrario, el metil oxidemetón aumenta de manera significativa los ICH pero no tiene efectos sobre el IR (Chen *et al.* 1982).

Chen *et al.* (1981) reportan un retraso de la CPC relacionado con la concentración del metil paratión en las líneas celulares de criceto Chino V79 y en linfocitos humanos.

Fenetiión fue el único plaguicida que origina elevación de la frecuencia de ICH y decremento substancial del IR.

Se ha encontrado que además de, o como consecuencia de, cambios estructurales provocados por agentes alquilantes, se inducen alteraciones

funcionales en varios niveles del metabolismo celular (Fleer y Brendel 1979). Se asume que la inhibición de la replicación es la más significativa (Colvin 1981), pero la síntesis de ARN y proteínas también son suprimidas. De ahí los probables efectos observados en el trabajo sobre el IR (Tablas IX y XVII y Figs. 29 y 44).

En resumen, además de la inducción de ICH, el retraso en el ciclo y la muerte celular pueden ser evidencia del daño biológico causado por agentes químicos (González-Cid y Matos 1984).

## Conclusiones

A pesar de que los insecticidas carbamícos, son menos persistentes que los organoclorados y relativamente menos tóxicos que los organofosforados, el presente estudio demuestra que este tipo de compuestos, al igual que los primeros, es potencialmente peligroso ya que altera la integridad del material genético de los organismos expuestos, como fueron las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* y los linfocitos humanos en cultivo.

A pesar de que existen diversos estudios con otros plaguicidas del mismo grupo no podemos generalizar o extrapolar los resultados de éstos, ya que cada compuesto puede presentar diferentes mecanismos de acción con base a sus propiedades fisicoquímicas lo cual queda demostrado también en el presente trabajo, en donde los dos plaguicidas evaluados pertenecen al mismo grupo y mostraron actividades distintas en los dos sistemas de prueba trabajados.

En forma directa el pirimor-50 resultó ser más tóxico para *Vicia faba* que el lannate-90. Para el caso de linfocitos humanos fue exactamente lo contrario, pudiendo evaluar solo hasta 750 ppm de lannate-90, mientras que para el pirimor-50 se pudieron analizar hasta 2500 ppm.

Los efectos inducidos por ambos compuestos no solo son distintos a nivel genotóxico sino también lo fueron a nivel de proliferación celular, siendo el pirimor-50 el más efectivo para causar un retraso en la cinética de división.

Muchos compuestos requieren ser transformados antes de manifestar alguna actividad, por lo que es importante considerar en este tipo de estudios el papel que pueden jugar las transformaciones metabólicas en estos procesos.

El conocimiento de los procesos metabólicos de las plantas puede ayudar a reducir los riesgos ambientales que implica el uso de plaguicidas, ya que muchos de ellos son incorporados a las plantas cultivadas y en forma indirecta estamos expuestos a los residuos o metabolitos de un gran número de agentes que son empleados para incrementar las cosechas.

La particularidad de cada compuesto queda nuevamente manifestada por los efectos de las fracciones metabólicas sobre el potencial genotóxico.

A pesar de la incorporación de nuevas tecnologías para monitorear los mutágenos ambientales, tanto *Vicia faba* como los linfocitos humanos en cultivo, siguen siendo dos herramientas útiles para los casos más apremiantes en donde se carezca de infraestructura desarrollada, ya que ambos organismos han demostrado ser sensibles al daño provocado por contaminantes, como los plaguicidas (lannate-90 y pirimor-50).

Se ratifica la sensibilidad de los ICH como marcador de daño genético por agentes xenobióticos ya que las frecuencias de estos se

incrementaron en forma estadísticamente significativa a concentraciones muy por debajo de las que fueron capaces de inducir aberraciones cromosómicas, como se demuestra en otros estudios realizados por el grupo de investigación.

Es importante que se pueda profundizar en el estudio del metabolismo de plaguicidas ya que algunas de las veces el compuesto original es inocuo, pero al ser transformado por el metabolismo animal o vegetal, pueden producirse compuestos que pueden ser genéticamente activos. El presente trabajo muestra el incremento de la actividad genotóxica del Iannate-90 por efecto de la fracción S9 de hígado de rata y probablemente el metabolismo vegetal pueda tener algún efecto sobre las propiedades genotóxicas del pirimor-50, aunque los resultados del presente trabajo no son concluyentes.

Es importante que las investigaciones sobre plaguicidas se lleven a cabo con los productos comerciales, como fue el caso del presente trabajo, ya que es a ésta a las que las personas están expuestas y no al compuesto puro. Se ha demostrado algunas veces la inocuidad del compuesto activo pero no así de la fórmula.

Es importante seguir llevando a cabo este tipo de estudios ya que nos van a permitir catalogar a los diferentes compuestos con base en su peligrosidad.

## REFERENCIAS

- Ahdaya S.M., Monroe R.J. y Guthrie F.E. 1981. Absorption and distribution of intubated insecticides in fasted mice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 16: 38-46.
- Aldridge W.N. y Magos L. 1978. *Carbamates, thiocarbamates, and dithiocarbamates*. Luxemburgo, Commission of the European Communities, Luxemburgo, 454 pp.
- Aldridge W.N. y Reiner E. 1972. *Enzyme Inhibitors as Substrates. Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids*. Amsterdam, Oxford, Nueva York, Elsevier Science Publishers, 328 pp.
- Aly O.M. y El-Dib M.A. 1972. Studies of the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment. En: *Fate of Organic*



*Compounds in the Aquatic Environment. III. Advances in Chemistry Series.* Washington DC, American Chemical Society, pp. 210-243.

Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test *Mutat. Res.* 31: 347-364.

Anwar W.A. 1997. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ. Health Perspect.* 105 (Supl. 4): 801-806.

Ashby J. 1988. Series: 'Current issues in mutagenesis and carcinogenesis'. No. 11. Reference to unpublished data in review articles. *Mutat. Res.* 206: 1-2.

Ashby J., Burlinson B., Lefevre P.A. y Topham J. 1985. Non-genotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to the mouse bone marrow and the rat liver: implications for its carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* 58: 14-19.

Atkins E.L., Greywood E.A. y McDonald R.L. 1973. Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees. Laboratory studies. Riverside, USA, University of California, Agricultural Extension Service.

Badr A. e Ibrahim A.G. 1987. Effect of herbicide glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytologia* 52: 293-302.

Baker S.R. y Wilkinson C.F. 1990. The effects of pesticides on human health. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol. 18. Princeton N.J. Princeton Scientific.

Barberá C. 1976. *Pesticidas Agrícolas*. 3a edición. Omega. Barcelona, pp. 201-219.

- Baron R.L. 1991. Carbamate insecticides. En: W.J. Hayes Jr. y E.R. Laws Jr. (Eds.). *The Effects of Pesticides on Human Health. Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol. 3, Academic Press, Nueva York, pp. 1125-1189.
- Beaune P., Lemestre-Comet R., Kremers P., Albert A. y Gielen J. 1985. The *Salmonella*/mammalian micromosome mutagenicity test comparison of human and rat livers as activating systems. *Mutat. Res.* 156: 139-146.
- Beranek D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 231: 11-30.
- Beranek D.T., Weiss C.C. y Swenson D.H. 1980. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethyleted DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1: 595-606.
- Bender M.A., Griggs H.G. y Bedford J.S. 1973. Mechanisms of chromosomal aberrations production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.* 23: 197-212.
- Bender M.A., Griggs H.G. y Bedford J.S. 1974. Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 24:117-123.
- Black A.L., Chiu Y.C., Fahmy M.A.H. y Fukuto T.R. 1973. Selective toxicity of N-sulphenylated derivatives of insecticidal methylcarbamate esters. *J. Agric. Food Chem.* 21: 743-747.
- Blevins R.D., Lee M. y Regan J.D. 1977a. Mutagenicity screening of five methyl carbamate insecticides and their nitroso derivatives using mutants of *Salmonella typhimurium* LT<sub>2</sub>. *Mutat. Res.* 56: 1-6.
- Blevins R.D., Lyjinsky W. y Regan J.D. 1977b. Nitrosated methylcarbamate insecticides. Effect on the DNA of human cells. *Mutat Res.* 44:1-7.

- Bolognesi C., Peluso M., Degan P., Rabboni R., Munnia A. y Abbondandolo A. 1994. Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methomyl. II. In vivo studies with pure compound and the technical formulation, "Lannate 25". *Environ. Mol. Mutagen.* 24: 235-242.
- Bonatti S. y Abbondandolo A. 1989. The search for the molecular lesion responsible for the induction of chromosomal damage by alkylating agents. *Ann. Inst. Super. Sanita* 25: 205-212.
- Bonatti S., Cercignani G., Rocco M. y Abbondandolo A. 1990. Aneuploidy induction by alkylated bases and nucleosides in mammalian cells. En: M.L. Mendelsohn y R.J. Albertini (Eds.) *Mutation and the Environment Parte B. Metabolism, Testing Methods, and Chromosomes.* *Prog. Clin. Biol. Res.* 340B: 237-246.
- Bonatti S., Bolognesi C., Degan P. y Abbondandolo A. 1994. Genotoxic effects of the carbamate insecticide methomyl. I. In vitro studies with pure compound and the technical formulation "Lannate 25". *Environ. Mol. Mutagen.* 23: 306-311.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brendei M. y Ruhland A. 1984. Relationship between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents. *Mutat. Res.* 133: 51-85.
- Bull D.L., Lindquist D.A. y Coppedge J.R. 1967. Metabolism of 2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde O-(methylcarbamoyl) oxime (Temik, UC21149) in insects. *J. Agr. Food Chem.* 15: 610.

- Byfield J.E. y Calabro-Jones P.M. 1981. Carrier-dependent and carrier-independent transport of anti-cancer alkylating agents. *Nature* 294: 281-283.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramirez M. 1999. In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 438: 81-88.
- Cebulska-Wasilewska A. 1988. Detection of ambient air pollutants mutagenicity with *Tradescantia stamen* hairs system. *Nukleonika* 33: 91-104.
- Cebulska-Wasilewska A. 1992. *Tradescantia-stamen-hair-bioassay* on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl accident and one year later. *Mutat. Res.* 270: 23-29.
- Chapalamadugu S. y Chaudhry G.R. 1992. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Crit. Rev. Biotechnol.* 345: 357-389.
- Chen H.H., Hsueh J.L., Sirianni S.R. y Huang C.C. 1981. Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 88: 307-316.
- Chen H.H., Sirianni S.R. y Huang C.C. 1982. Sister chromatid exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides 1 defoliant). *Mutat. Res.* 103: 307-313.
- Chiras D.D. 1991. *Environmental Science. Actino for a sustainable Future.* 3a edición. The Benjamin/Cummings Pub. Co. California, 549 pp.

- Colvin M. 1981. Molecular pharmacology of alkylating agents. *Cancer Chemotherapy* 3: 287-302.
- Conger A.D. y Fairchild L.M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.
- Connel J.R. y Metcalf A.S.C. 1982. The induction of SCE and chromosomal aberrations with relation to specific base methylation of DNA in Chinese hamster cells by N-methyl-nitrosourea and dimethyl sulfate. *Carcinogenesis* 3: 385-390.
- Constantin M.J. 1982. Plant genetic systems with potential for the detection of atmospheric mutagens. En: R.R. Tice, D.L. Costa y K.M. Schaich (Eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Plenum Press, Nueva York, pp. 159-177.
- Constantin M.J. y Owens E. T. 1982. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Res.* 99: 1-12.
- Coppedge J.R., Lindquist D.A. Bull D.L. y Dorough H.W. 1967. Fate of 2-methyl-2-(methylthio)-propionaldehyde O-(methyl-carbamoyl) oxime (Temik) in cotton plants and soil. *J. Agr. Food Chem.* 15: 902.
- Crossen P.E. y Morgan W.F. 1977. Proliferation of PHA stimulation lymphocyte measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 118: 423-426.
- Darroudi F. y Natarajan A.T. 1987. Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells, xrs 5 and xrs 6. II. Induction of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations by X-rays and UV-irradiation and their modulation by inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and alpha-polymerase. *Mutat. Res.* 177: 149-160.

- Darroudi F., Natarajan A.T. y Lohman P.H.M. 1989. Cytogenetical characterization of UV-sensitive repair deficient CHO cell line 43-3B. II. Induction of cell killing, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges by 4NQO, mono- and bi-functional alkilating agents. *Mutat. Res.* 212: 103-112.
- Debuyst B. y Larebeke N.V. 1983. Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by aldicarb, thiophanox and methomyl. *European Environmental Mutagen Society (abstracts)*. *Mutat. Res.* 113: 242-243.
- Degrassi F y Rizzoni M. 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in freshwater pollution. *Mutat. Res.* 97:19-33.
- deKergommeaux D.J., Grant W.F. y Sandhu S.S: 1983. Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* *in vivo* root tip assay system. *Mutat. Res.* 124: 69-84.
- De Marco A., Boccardi P., De Simone C., Piccolo A., Raglione M., Testa A. y Trinca S. 1990. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutat. Res.* 241: 1-6.
- Den Engelse L., Mmenkveld G.J., De Brij R.J. y Tates A.D. 1986. Formation and stability of alkilated pyrimidine and purines (including imidazole ring-opened-7-alkilguanine) and alkilphosphotriesters in liver DNA of adult rats treated with ethylnitrosourea or dimethyl nitrosamine. *Carcinogenesis* 7: 393-403.
- Dennis D. y Weisenburger M.D. 1993. Perspectives in pathology. Human Health effects of agricultural use. *Hum. Pathol.* 24: 571-576.

- Donnelly G.M. y Sissen J.E. 1967. RNA and protein synthesis required for entry of cells into mitosis and during the mitotic cycle. *Exp. Cell Res.* 46: 93-105.
- Dorough H.W., Davis R.B. e Ivie G.W. 1970. Fate of Temik-carbon-14 in lactating cows during a 14-day feeding period. *J Agric Food Chem.* 18:135
- Draetta G.1990. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanism of *cdc2* activation. *Trends Biochem. Sci.* 15: 378-383.
- Dulout F.N., Olivero O.A y Pastori M.C. 1982. The mutagenic effect of thiram analysed by the micronucleus test and the anaphase-telophase test. *Mutat. Res.* 105. 409-412.
- Du Pont 1999a. Lannate, insecticida agrícola. *Boletín de información técnica.* pp. 1-16.
- Du Pont 1999b. Lannate, siempre al frente del combate. *Boletín de difusión* p. 1.
- Dutrillaux B. y Fosse A.M. 1976. [Use of BrdU in the study of cell cycle in normal and abnormal subjects]. *Ann. Genet.* 19: 95.
- Ecobichon D.J. 1982. En: D.J. Ecobichon y R.M. Joy (Eds.). *Pesticides and Neurological Disease.* C.R.C. Press, Boca Ratón. p. 205.
- Ecobichon D.J. y Joy R. 1982. *Pesticides and Neurological Disease.* C.R.C. Press, Boca Ratón. pp. 285-310.
- Edmunds L.N. 1964. Replication of DNA and cell division in synchronously dividing cultures of *Euglena gracilis*. *Science* 145: 266-268.
- Elespuru R. Lijinsky W. y Setlow J. 1974. Nitrosocarbaryl as a potent mutagen of environmental significance. *Nature* 247: 386--387.

- Emerit I. y Cerutti P.A 1981. The tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage and polyploidization in human lymphocytes. *Nature* 293: 144-146.
- Environmental Health Criteria 1986. Environmental Health Criteria for carbamate pesticides a general introduction. *Environ, Health Crit.* 64.
- Environmental Health Criteria 1988. *Thiocarbamate Pesticides. A General Introduction.* WHO, Ginebra.
- Evans H.J. y Scott D. 1969. The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. *Proc. R. Soc. Lond, B. Biol. Sci.* 173: 491-512.
- Evans J.H. y O'Riordan M.L. 1975. Human peripheral blood lymphocytes for analyses of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutat. Res.* 31: 135-148.
- FAO/WHO 1977. 1976 Evaluation of some pesticide residues in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Roma (AGP 1977/M/14).
- FAO/WHO 1985. 1983 Evaluation of some pesticide residues in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Roma.
- Ferguson L.R., Turner P.M., Gourdie T.A, Valu K.K. y Denny W.-A. 1989. 'Petite' mutagenesis and mitotic crossing-over in yeast by DNA-targeted alkylating agents. *Mutat. Res.* 215: 213-222.
- Filip Z. 1974. [Pesticides in powder form]. *Vesmir* 53: 243-244.
- Fiskesjö G. 1985. Allium test on river water from Braän and Saxän before and after closure of a chemical factory. *Ambio.* 14: 99-103.



- Fleer R. y Brendel M. 1979. Formation and fate of crosslinks induced by polyfunctional anticancer drugs in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 176: 41-52.
- Fraga C.G., Shigenaga M.K., Park J.W., Degan P. y Ames B.N. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4533-4537.
- Frantz C.N. y Malling H.V. 1975. The quantitative microsomal mutagenesis assay. *Mutat. Res.* 31: 365-380.
- Fukuto T.R. 1972. Metabolism of carbamate insecticides. *Drug Metab. Rev.* 1: 117-150.
- García. J.F. 1994. *Biología y Control de Plagas*. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. 355 pp.
- Geard C. R. y Peacock W.J. 1969. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 7: 215-223.
- Gichner T., Velemínsky G. y Pospíšil F. 1985. Screening of compounds for antimutagenic properties towards demethylnitrosamine-induced mutagenicity in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.* 27: 417-423.
- Gill B.S. y Sandhu S.S. 1992. Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutat. Res.* 270: 65-69.
- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: F.M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Gúzman-Rinoón (Eds.). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, Nueva York, 95-113.

- Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P. y Villalobos-Pietrini R. 1986. Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-heptane, and ethyl acetate. *Cytologia* 51: 133-142.
- Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. 1987. Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3: 63-70,
- Gómez-Arroyo S., Hernández-García A. y Villalobos-Pietrini R. 1988. Induction of sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* 208: 219-224.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. 1992a. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient* 8: 77-80.
- Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Osorio A., Galicia F., Ling S. y Villalobos-Pietrini R. 1992b. Sister chromatid exchanges analyses in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 281: 173-179.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E., Villalobos-Pietrini R. 1995. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*, *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 324-330.
- Gómez-Arroyo S., Armienta M.A., Cortes-Eslava J., Villalobos-Pietrini R. 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapán, Hidalgo, México. *Mutat. Res.* 394: 1-7.

- Gonsebatt M.E. y Mutchinick O 1990. Human lymphocyte proliferation kinetics in HankV BSS supplemented with autologous plasma and in synthetic medium. *Mutat. Res.* 243: 255-258.
- González F.J. y Gelboin H.V. 1993. Role of human cytochrome P-450 in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40: 289-308.
- González-Cid M. y Matos E. 1984. Induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes by aldicarb, a carbamate pesticide. *Mutat. Res.* 138: 175-179.
- González-Cid M., Loria D. y Matos E. 1988. Nitroso-aldicarb induces sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 204: 665-668.
- González-Cid M., Loria D. y Matos E. 1990. Genotoxicity of the pesticide propoxur and its derivative, NO-propoxur, on human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 232: 45-48.
- Gopalan H.N.B. y Njagi G.D.E. 1981. Mutagenicity testing of pesticides. III. *Drosophila*: recessive sex-linked lethals. *Genetics* 97: 544.
- Grant W.F. 1973. Cytological effects of environmental mutagens-pesticides. *M Res.* 21: 221-222.
- Grant W.F. 1982. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. En: R.A. Fleck y A. Hollaender (Eds.) *Genetic Toxicology. An Agriculture Perspective*. Plenum Press, Nueva York, pp. 353-378.
- Grant W.F. 1993. Plants as detectors of atmospheric mutagens. En: M. Corn (Ed.) *Handbook of Hazardous Materials*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 591-609.

- Grant W.F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310:175-185.
- Grant W.F., Leo H.G., Logan D.M. y Salomone M.F. 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 270: 53-64.
- Graña X. y Reddy P. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKIs). *Oncogene* 11: 2112-19.
- Grover I.S., Dhingra A.K., Adhikari N. y Ladhar S.S. 1988. Genotoxicity of pesticides. A comparative study using a battery of assays. *Nucleus* 31: W77.
- Guerzoni M.E., Ponti I. y Del Cupolo L. 1976. Mutagenic activity of pesticides. *Rev. Sci. Tecn. Alim. Nutr. Um. Anno. VI:* 161-165.
- Hartmann A., Herkommer K. Glück M. y Speid G. 1995. DNA-damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutagen.* 25: 180-187.
- Harvey J. Jr. y Pease H.L. 1973. Decomposition of methomyl in soil. *J. Agric. Food Chem.* 21: 784-786.
- Harvey J. Jr. y Raiser R.W. 1973. Metabolism of methomyl in tobacco, corn, and cabbage. *J. Agric. Food Chem.* 21:775.-783.
- Hassall KA 1990. *The Biochemistry and Uses of Pesticides*. 2ª edición, MacMillan Press, Hong Kong.
- Heddle J.A. y Salomone H.F. 1981. Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environm. Health Perspect.* 39: 23-27.

- Hemavathy K.C. y Krishnamurthy N.B. 1987a. Evaluation of Lannate 20, a carbamate pesticide in the germ cells of male mouse. *Environ. Res.* 42: 362-365.
- Hemavathy K.C. y Krishnamurthy N.B. 1987b. Mutagenicity studies in *Drosophila melanogaster* with lannate 20. *Mutat. Res.* 191: 41-43.
- Hopke P.K., Plewa M.J., Johnston J.B., Weaver D., Wood S.G., Larson R.A. y Hinesly T. 1982. Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 16: 140-147.
- ICI Agrochemicals 1986. *Force Technical Data: Pyrethroid Soil Insecticides PPM993*. Imperial Chemicals Industries, Plant Protection Division, Fernhurst, Haslemere, Surrey GU27 3JE, Reino Unido.
- ICI Agrochemicals 1989. Pirimicarb, 'Pirimor', 'Aphox', the specific aphicide. Imperial Chemical Industries, Reino Unido, 91 pp.
- Ivanova-Chemishanska L y Antov G. 1976. Changes in the activity of some enzymes under the action of benomyl. *Hig. I Zdraveopazvane* 19: 431-435. Sofia, Bulgaria.
- Jasinska J., Steffen J. y Michaelowski A. 1970. Studies on *in vitro* lymphocyte proliferation in cultures synchronized by inhibition of DNA synthesis. II. Kinetics of initiation of proliferative response. *Exp. Cell Res.* 61: 333-341.
- Kanaya N, Takehisa S, Nicholoff H., Nikolowa T. y Demianova V. 1992. Plant extracts induce chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells and human lymphocytes. *Mutat. Res.* 281: 47-54.

- Kaplan A.M. y Sherman H. 1977. Toxicity studies with methyl-N-methylamino-carbonyl-oxiethanimidotioato. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 40:1-17.
- Kierszenbaum F., Cuna W.R., Beitz L.A., Sztein M.S. 1990. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 144: 4000-4004.
- Kihlman B.A. 1966. *Actions of Chemicals on Dividing Cells*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 260pp.
- Kihlman B.A. 1971. Root tips for studying the effect of chemicals on chromosomes. En: A. Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens Principles and Methods for Their Detection*. Vol. 2 Plenum Press, Nueva York, pp. 489-514.
- Kihlman B.A. 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 31: 401-412.
- Kihlman B.A. y Andersson H. C. 1984, Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. En: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2ª edición, Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.
- Kihlman B.A. y Kronborg D. 1976. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. 1. Demostración by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* 51: 1-10.
- Kirschner M. 1992. The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.* 17: 281-285.

- Kligerman A.D., Erexon G.L. y Wilmer J.L. 1984. Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage *in vivo*. En: R.R. Tice y A. Hollaender (Eds.), *Sister Chromatid Exchanges* Plenum Press, Nueva York, pp. 569.-584.
- Knaak J.B., Tallant M.J. y Sullivan L.J. 1966. Metabolism of 2-methyl-2-(methylthio) propionaldehyde O-(methylcarbamoyl) oxime in the rat. *J. Agr. Food Chem.* 14: 573.
- Krechniak J. y Foss W. 1982. Cholinesterase activity in rats treated with propoxur. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 599-604.
- Krishna G., Xu J., Nath J., Petersen M. y Ong T. 1985. *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed lo ethilene dibromide. *Mutat. Res.* 158: 81-87.
- Krishna G, Nath J, Soler L, Ong T. 1986. Comparative *in vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of airborne particicle in mice. *Mutat. Res.* 171: 81-87.
- Larsson K.S., Sahm J, Shenkar R. y Strauss B. 1985. Methylation-induced blocks to *in vitro* DNA replication *Mutat. Res.* 150: 77-84.
- Latt S.A. 1973. Microfluorometric detection of deoxiribonucleic acid replcation in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3395-3399.
- Latt S.A. 1974. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair. detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3162-3166.
- Latt S.A. 1976. En: P.L Pearson y KR. Lewis (Eds.) *Chromosomes Today*, Vol. 5. Wiley, Nueva York. pp. 367-394.

- Latt S.A. Allen J., Bloom S.E., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E, Schreck R., Tice R., Whitfield B. y Wotff S. 1981. Sister-chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox Program Mutat. Res. 87: 17-62.
- Lawley P.D. 1976. Carcinogenesis by alkylating agents. En: C.E. Searle (Ed.) *Chemical Carcinogens*, American Chemical Society, Washington DC, ACS Monographs 173: 83-244.
- Lawley P.D. y Thatcher C.J. 1970. Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem. J.* 116: 693-707.
- Leeling N.C. y Casida J.E. 1966. Metabolites of carbaryl (1 naphthyl methylcarbamate) in mammals and enzymatic systems for their formation. *J. Agric. Food Chem* 14: 281-290.
- Ling N.R. y Kay 1975. *Lymphocyte Stimulation*, 2ª edición, North Holand. Publ. Co., Amsterdam.
- Lower W.R., Drobney V.K, Aholt B.J. y Politte R. 1983a. Mutagenicity of the environments in the vicinity of an oil refinery and a petrochemical complex. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 3: 65-73.
- Lower W.R., Thompson W.A., Drobney V.K y Yanders A.F. 1983b. Mutagenicity in the vicinity of a lead smelter. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 3: 231-253.
- Ma T.-H. 1982. *Vicia* cytogenetic test for environmental mutagens. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99: 257-271.



- Ma T.-H. 1990. *Tradescantia* micronucleus test on clastogens and *in situ* monitoring. En: M.L. Mendelsohn y R.J. Alberitini (Eds.). *Mutation and the Environment*, Parte E, Wiley. Liss, Nueva York, pp- 83.-90.
- Ma T.-H., Lower W.K., Harris F.D., Foku J., Anderson V.A., Harris M.M. y Bare J.I. 1983. Evaluation by the *Tradescantia*-micronucleus test of the mutagenicity of internal combustion engine exhaust fumes from diesel and diesel-soybean oil mixed fuel. En: M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff y S. Nesnow (Eds.). *Short-Term Bioassay in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*. Plenum Press, Nueva York, pp. 89-99.
- Ma T.-H., Anderson V.A, Harris M.M., Neas R.E. y Lee T.-S. 1985. Mutagenicity in drinking water detected by the *Tradescantia* micronucleus test. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 143-150.
- Malaragno M.I. y Smith M.D.A. 1990. Sister chromatid exchange and proliferation in lymphocytes from newborns, elderly subjects and in premature ageing syndromes. *Mech. Ageing Dev.* 15: 43-53.
- McClintock B. 1938. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring shaped chromosomes. *23*: 315-376.
- Menn J.J. 1978. Comparative aspects of pesticide metabolism in plant and animals. *Environ. Health Perspect.* 27: 113-124.
- Metcalf R.L., Collins C., Borck K, Burk J., Reynolds H.T. y Osman M.F. 1966. Metabolism of 2-methyl-2(methylthio)propionaldehyde O-(methylcarbamoyl)-oxime in plant and insect. *J. Agr. Food Chem.* 14: 579.
- Moriya M., Ohta T., Watanabe K., Miyazawa T., Kato K. y Shirasu Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutat. Res.* 116: 185-216.

- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M. y Degreave N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of insecticides. En: M. Kirsch-Volders (Ed.), *Mutagenicity, Cacinogeniciti and Teratogenicity of Industrial Pollutants. Cap.3*, Plenum Press, Nueva York pp. 127-203.
- Müller G.C. 1969. Biochemical events in the animal cell cycle. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp.* 26: 1780-1789.
- Murray A.W. 1992. Creative blocks: cell cycle check points and feedback controls. *Nature* 359: 599-603.
- Mutchinick O., Lisker R., Ruz L., Salamanca F. y Armendares S 1979. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann. Genet.* 22: 129-132.
- Mutchinick O., Ruz L. y Casas L. 1980. Time of first-generation metaphases. 1. The effect of various culture media and af fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 72: 127-134.
- Nasmyth K.A. 1990. FAR-reaching discoveries about the regulation of START. *Cell* 63: 117-120.
- Natarajan A.T., Simons J.W.I.M., Vogel E.W. y van Zeeland A.A. 1984. Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional aikilating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutat. Res.* 128: 31-40.
- Nilan R.A. 1978. Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. *Environ. Health Perspect.* 37: 181-196.

- Nilan R.A, y Vig B.K. 1976. Plant test systems for detection of chemical mutagens. En: A Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection*. Vol. 4, Plenum Press, Nueva York, pp. 143-170.
- Njagi G.D.E. y Gopalan H.N.B. 1981. Mutagenicity testing of herbicides, fungicides and insecticides. 1. Chromosome aberrations in *Vicia faba*. *Cytologia* 46: 169-172
- Obe G. y Ristow H. 1977. Acetaldehyde, but no ethanol, induces chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutat. Res.* 56: 211-213.
- Obe G. y Ristow H. 1979. Mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat. Res.* 65: 229-259.
- Obe G, Beek B, y Dudin G 1975. The human leukocyte test system. V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures. *Humangenetik* 28: 295-302.
- Obe G., Natarajan T., Meyers A. y Den Hertog A. 1979. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro*, and of SCEs in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* 68: 291-294.
- Obe G., Jonas R. y Schmidt S. 1986. Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister chromatid exchanges in humans peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat, Res.* 174: 47-51,
- Osterman-Golkar S., Ehrenberg S.L., Segerback D. y Halstrom I. 1976. Evaluation of genetic risks of alkylating agents. II. Haemoglobin as a dose monitor. *Mutat. Res.* 34: 1-10.
- Pandita T.K. 1988. Assessment of the mutagenic potencial of a fungicide bavistin using multiple assays. *Mutat. Res.* 204-627-843.

- Painter R.B. 1980. A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70: 337-341.
- Pant J.C. y Singh T. 1983. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 294.
- Perera F.P. 1988. The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 205: 255-269.
- Perry P. y Wotff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Londres)* 251: 156-158.
- Perry P. y Evans H.J. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (Londres)* 258: 121-125.
- Pilinkaia M.A 1982. Cytogenetic effect of the pesticide pirimor in a lymphocyte culture of human peripheral blood *in vivo* and *in vitro* . *Tsitol. Genet.* 16: 38-42.
- Pilinkaia M.A y Stepanova LS. 1984. Effect of the biotransformation of the insecticide furadan on *in vivo* and *in vitro* manifestations of its cytogenetic activity. *Tsitol Genet.* 18: 17-20.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. 1982. The action of chemicals into mutagens by green plants. En: F.J. de Serres y A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Plenum Press, Nueva York, Vol. 7 pp. 401-420.
- Plewa M.J., Wagner E.D., Gentile M.J. y Gentite J.M. 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat Res.* 136: 233-245.

- Plewa M.J., Wagner E.D. y Gentile J.M. 1988. The plant cell / microbe assay for the analysis of plant activated promutagens. *Mutat. Res.* 197: 207-209.
- Quinto I., Martire G., Vricella G., Riccardi F., Perfumo, Giulivo R. y De Lorenzo F. 1981. Screening of 24 pesticides by *Salmonella*/microsome assay: mutagenicity of benazolin, metoxuron and paraoxon. *Mutat. Res.* 85: 265.
- Rannug A. y Rannug U. 1984, Enzyme inhibition as a possible mechanism of the mutagenic of dithiocarbamic acid and derivattives in *Salmoonela typhimurium*. *Chem. Biol. Interac.* 49: 329-340.
- Rao B.V., Rao B.G.S. y Sharma C.B.S.R. 1988. Cytological effects of herbicides and insecticides on *Allium cepa* root meristems. *Cytologia* 53: 255-261.
- Rasquinha I.A, Wildeman A.G. y Nazar R.N. 1988. Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* 197: 261-272.
- Read J. 1959. *Radiation Biology of Vicia faba in Relationb to the General Problem*. Blachwell, Oxford, 270 pp.
- Regenstein L. 1982. *America the Poisoned*. Acropolis Books, Washington, DC. p103.
- Reiner E. 1971. Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. *Bull. World Health Org.* 44: 109-112
- Roitt I.M., Bronstoff J. y Male D.K. 1989. *Immunology*. C,V, Mosby Press, Missouri, p.22.

- Ruíz E.F., Rabago V.M.E., Lecona S.U., Pérez A.B. y Ma T.-H. 1992. Tradescantia-micronucleus (TradMCN) bioassay on clastogenicity of waste water and *in situ* air monitoring. *Mutat. Res.* 270: 45-51
- Sagher D. y Strauss S. 1983. Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidic sites in deoxyribonucleic acid during *in vitro* synthesis: uniqueness of adenine nucleotides. *Biochem.* 22: 4518-4526.
- Salvadori D.M., Ribeiro L.R., Pereira C.A. y Becak W. 1988. Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. *Mutat. Res.* 204: 283-287.
- Sánchez-Alarcón J. 1995. Efecto citogenético de los plaguicidas carbámicos oxamilo y tiodicarb en cultivo de linfocitos humanos. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Sandhu S.S., Waters M.D., Simmon V.F., Mortelmans K.E., Mitchel A.D., Jorgenson T., Jones D.C.L, Valencia R, y Stack F. 1985. Evaluation of the genotoxic potential of certain pesticides used in Pakistan. *Basic Life Sci.* 34: 185-219.
- Schlagbauer B.G.L. y Schlagbauer A.W.J. 1972. The metabolism of carbamate pesticides. A literature analysis. *Res. Rev.* 42:35.
- Schmähl D. 1988. Carcinogenicity of anticancer drugs and specially alkylating agents, En: D. Schmähl y J.M. Kaldor (Eds.). *Carcinogenicity of Alkylating Cytostatic Drugs.* IARC Sci. Publ. 78: 143-146.
- Schwartzman J.B. 1987. Sister-cromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* 181: 127-145.

- Schwartzman J.B., Cortés F., Gutiérrez C. y López-Sáez J.F. 1979. On the nature of sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Genetics* 92: 1251-1264.
- Schwartz J.L. 1989. Monofunctional alkylating agents induces S-phase-dependent DNA damage. *Mutat. Res.* 216: 111-118.
- Seiler J.P. 1976. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the Chinese hamster. *Mutat. Res.* 40: 339-340.
- Shelby M.D. 1980. Plants as monitors for environmental mutagens. En: D.L. Worf (Ed.). *Biological Monitoring for Environmental Effects*. Heath, Lexington, MA, pp. 185-189.
- Simmon V.F., Pool D.C. y Newell G.W. 1976.. *In vitro* mutagenic studies of twenty pesticides. *Toxicol.. Appl. Pharmacol.* 37: 109.
- Simmon V.F., Mitcjell D. y Jorgenson T. 1977. Evaluation of selected pesticides as chemical mutagens *in vitro* and *in vivo* studies. Rep. No. EPA-600/1-77-028. USEPA, Research Triangle Park, Carolina del Norte.
- Singer B. 1985. *In vivo* formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents. *Environ. Health Perspect.* 62: 41-48
- Singh J.R. y Sandhu D.K 1991. *In vitro* cytogenetic effects of agrizim on human lymphocytes with and without metabolic activation. *Cytologia* 56: 333-341.
- Snell K. y Mullock B. 1987. *Biochemical Toxicology*. IRL Press, Washington D.C. 1ª edición, 286 pp.

- Sobti R.C., Krishan A y Pfaffenberger C.D, 1982. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates. *Mutat. Res.* 102: 89-102.
- Speit G, During R y Mehnert K 1986. Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures. *Hum. Genet.* 72:179:181.
- Stehrer-Schmid P. y Wolf H.U. 1995. Genotoxic evaluation of three heterocyclic N-methylcarbamate pesticides using the mouse bone marrow micronucleus assay and the *Saccharomyces cerevisiae* strains D7 and D61.M. *Mutat. Res.* 345: 111-125.
- Still G.G. y Herret R.A. 1975. Methylcarbamates, carbanilates, and acylanilides, En: P.C. Kearney y D.D. Kaufman (Eds.), *Herbicides Chemistry, Degradation and Mode of Action*. Vol.2, Marcel Dekker, Nueva York, pp. 609-664.
- Still G.G. y Rusness D.G. 1977. S-cysteinyl-hydroxychlorpropham: formation of the S cysteinyl conjugate of isopropyl-3'-chloro-4'-hydroxy-carbanilate in oat (*Avena sativa* L). *Pestic. Biochem.Physiol.* 7: 210219.
- Sztein M.B., Cuna W.R. y Kiersuenbaum F. 1990. Trypanosoma cruzi inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitongen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes, *L. Immunol.* 144: 3558-3582.
- Takehisa S. 1986. Pro-mutagen activation by *Vicia faba* measurement with SCE induction in CHO colas. *Bil. Zbl.* 105: 37-40.
- Takehisa S. y Kanaya N. 1983. A comparison of *Vicia faba* root S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hidrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197: 195-205.



- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1982. Induction of sister chromatid exchanges in CHO cells by extracts from *Vicia faba* root exposed to ethanol. *Mutat. Res.* 105: 169-174.
- Takehisa S., Kanaya N., Rieger R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197: 195-205.
- Takehita T. y Conner M.K. 1985. Persistence of cyclophosphamide-induced damage in bone marrow as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Carcinogenesis* 6: 1097-1102.
- Tannenbaum S. y Skipper P.L. 1984. Biological aspects to the evaluation risk. Dosimetry of carcinogens to man. *Fund. Appl. Toxicol.* 4: 5367-5373.
- Taylor J.H. 1958. Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* 43: 515-529.
- Taylor J.H., Woods P.S. y Hughes M.L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 43: 122-128.
- Tempelaar M.J., de Both M.T. y Versteegh J. E. 1982. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 103: 321-326.
- Tice R.R., Chaillet J. y Schneider E. L. 1976. Demonstration of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 102: 426-429.
- Tice R.R. y Hollaender A. (Eds.) 1984. *Sister Chromatid Exchanges: 25 Years of Experimental Research*. Parte A: the nature of SCE, Plenum Press, Nueva York.

- Tice R.R., Ivett J.L. y McFee A.F. 1987. The effect of agent treatment time on the induction of sister chromatid exchanges in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Mutat. Res.* 182: 15-29.
- Tucker J.D., Christensen M.L., Strout C.L. y Carrano A.V. 1986. Determination of the baseline sister chromatid exchange frequency in human and mouse peripheral lymphocytes using monoclonal antibodies and very low dosis of bromodeoxiuridine. *Cytogenet. Cell Genet.* 43. 38-42.
- Tucker J.D., Auletta A. Cimino M.C., Dearfield K.L, Jacobson-Kram D., Tice R.R. y Carrano A.V. 1993. Sister-chromatid exchange. second report of the Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 297: 101-180.
- Valencia R. 1982. Mutagenesis screening of pesticides-*Drosophila*. Rep. No. EPA-600/1-81-017. USEPA, Research Triangle Park, Carolina del Norte.
- Valencia-Quintana R. 1992. Efecto de los insecticidas carbámicos metomil y oxamil sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias UNAM, 139 pp.
- Valencia Quintana R., Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. 1993. Cytological effects of some carbamate insecticides. I. Methomyl and oxamil in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 9: 65-69.
- Valencia-Quintana R., Juárez-Santacruz L., Delgado-Rodríguez A. y Sánchez-Alarcón J. 1998. Cytological effects of some carbamate insecticides. II. Induction of sister chromatid exchanges in *faba* by lannate-90. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14: 49-53.
- Vandekar M., Plestina R. y Wilhelm K 1971. Toxicity of carbamates for mammals. *Bull. World Health Org.* 44: 241-249.

- Villarini M., Moretti M., Scassellati-Sforzolini G., Monarca S., Pasquini R., Crea M.G. y Leonardis C. 1995. Studies on hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes in rats treated with insecticide deltamethrin. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 14: 45-52.
- Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A.R. y Gómez Arroyo S. 1994. Cytogenetics effects in *Vicia faba* of the polluted water from the rivers of the Tlaxcala Hydrological System, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10: 83-88.
- Vogel E., Natarajan A.T. 1979a. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62: 101-123.
- Vogel E. y Natarajan A.T. 1979b. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62: 51-100.
- Vogel E., y Natarajan A.T. 1982. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. Interspecies comparisons. En: F.J. de Serres y A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 7, Plenum Press, Nueva York, pp. 295-236.
- Waliszewski S. 1990. Revisión bibliográfica de técnicas para determinación de insecticidas organofosforados. *Textos Universitarios*, 1ª Edición, Universidad Veracruzana.
- Walters R.A. y Petersen D.F. 1968. Radiosensitivity of mammalian cells. II. Radiation effects on macromolecular synthesis. *Biophys J.* 8: 1487-1504.

- Webster P.L. y Van't Hof J. 1970. Initiation of DNA synthesis and mitosis in stationary, translational and proliferative phase meristemos: requeriments for RNA and protein synthesis. *Amer. J. Bot* 57: 130-139.
- Wen W.N., Liew T.L. 1983. The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured *in vitro*. *Mech. Ageing Dev.* 21: 377-384.
- White A.D. y Hesketh L.C. 1980. Method utilizjng human lymphocytes with *in vivo* metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by sister chromatid exchanges analyses. *Mutat. Res.* 18: 885-893.
- WHO 1984-1985. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. VBC 184.2. Genova, pp. 1-30
- WHO 1985. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. *Environ. Health Criteria.* 51, Genova, 208 pp.
- Wojciechowski J.P., Kaur P. y Sabharwal P.S. 1982. Induction of oubain resistance in V-79 cells by four carbamate pesticides. *Environ. Res.* 29: 48-53.
- Wolff S. y Perry P. 1974. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 48: 341-353.
- Wolff S. y Bodycote J. 1977. The production al harlequin chromosomes with chemical and physical agents that disrupt protein structure. En: *Human Molecular Cytogenetics*, Academic Press, Nueva York.
- Wolff S. Bodycote J. y Painter R.B. 1974. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation at different stages of the cell cycle: The necessity of cells to pass through S. *Mutat. Res.* 25: 73-81.

- Woiff S, Afzal V, Lindquist PB 1984. Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mutat. Res.* 129: 207-213.
- Xing W..I. y Zhang Z.L. 1990. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 241: 109-113.
- Yin-Tak W. 1983. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: an overview of structure-activity relationship and environmental concerns. *J. Environ. Sci. Health* 1: 97-133.
- Zhang Z.L., Yang J., Zhang Q.A. y Cao X.S. 1991. Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutat. Res.* 261: 69-73,
- Zilbermnan D., Shmitz A. y Casterline G. 1991. The economics of pesticide use and regulation. *Science* 253: 518-522.

## **Tablas**



**Tabla II. Características fisicoquímicas y biológicas de algunos insecticidas carbámicos**

Compuesto (subgrupo)	Ruta de acción sistémica	Toxicidad oral DL <sub>50</sub> a ratas <sup>a</sup> (mg/kg)	Presión de vapor a 25-30 °C (mmHg)	Otros usos, aparte de insecticida	Solubilidad en agua a 25-30 °C (ppm)
Carbarilo (1)	Ninguna	700	3 x 10 <sup>-3</sup>	Mata gusanos de tierra, adelgazadores de frutos	40
Propoxur (1)	Ninguna	90	-	-	1000
Metiocarb (1)	Ninguna	130	-	Moluscicida	-
Carbofuran (2)	Por absorción radicular	11	1 x 10 <sup>-5</sup>	Nematicida a dosis elevadas	700
Pirimicarb (2)	A través de hojas o raíces, pero la persistencia es muy baja	~100	3 x 10 <sup>-5</sup>	-	2700
Aldicarb (3)	Por las raíces	1	1 x 10 <sup>-4</sup>	Nematicida	6000
Oxamilo (3)	Por las raíces	5	-	Nematicida, mata milpies	-
Metomilo (3)	Por las hojas	21	5 x 10 <sup>-5</sup>	-	58000

<sup>a</sup> Datos de la literatura comercial, de Kuhr y Dorough (1976) y de Matsumura (1975)



**Tabla III. Algunos usos de plaguicidas carbámicos para la protección de los cultivos**

Cultivo	Plaga	Compuesto
Alfalfa	Gorgojo de la alfalfa	Metomilo
Manzanas	Ácaros	Carbarilo, metiocarb, oxamilo
Platanos	Diversas plagas	Carbarilo
Frijol	Afidos resistentes a organofosforados	Pirimicarb
"Brassicas"	Afidos resistentes a organofosforados	Pirimicarb
Cítricos	Ácaros	Oxamilo, metiocarb
Cáfe	Moscas de la fruta	Carbarilo, carbofuran
Algodón	Gusano bellotero	Aldicarb, carbarilo, metiocarb
Chicharo	Polilla del chicharo	Carbarilo, carbofuran, pirimicarb
Maíz	Afido del chicharo	Carbofuran
	Gusano de la raíz	Metomilo
	Gusano elotero	Metalkamate
	Diversas plagas	Aldicarb
Cebollas	Nematodo del tallo	Aldicarb
Cacahuates	Varias plagas de nematodos	Aldicarb
Piñas	Diversas plagas	Metalkamate
Papas	Escarabajo colorado	Oxamilo
	Nematodo nodulador	Aldicarb, pirimicarb
Arroz	Gusano soldado, Perforador del tallo, Gorgojo del agua	Metalkamate, carbofuran
Remolacha	Minador de la hoja, Milpies	Aldicarb, carbofuran
	Afidos resistentes a organofosforados	Pirimicarb
Caña de azúcar	Perforador de la caña	Carbarilo, carbofuran, aldicarb
Tabaco	Gusano cuerno	Metomilo
	Gusano peludo	Oxamilo
Vegetales, Zanahorias, Cebollas	Diversas plagas, Caracoles y babosas	Carbarilo, metomilo, Metiocarb

**Efectos sobre *Vicia faba***

Tabla IV. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 en cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
<b>Testigo</b>	<b>28.40</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.13</b>	
<b>500</b>	<b>39.92</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.65</b>	<b>*</b>
<b>750</b>	<b>46.92</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.88</b>	<b>*</b>
<b>1000</b>	<b>48.45</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.93</b>	<b>*</b>
<b>1500</b>	<b>49.48</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>2.16</b>	<b>*</b>
<b>2000</b>	<b>56.33</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>2.64</b>	<b>*</b>
<b>2500</b>	<b>63.44</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>2.37</b>	<b>*</b>

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza, P < 0.001 y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con P < 0.001

Tabla V. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 en cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
<b>Testigo</b>	<b>26.20</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.89</b>	
<b>5</b>	<b>32.84</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.21</b>	<b>*</b>
<b>10</b>	<b>37.10</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.13</b>	<b>*</b>
<b>15</b>	<b>41.18</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.21</b>	<b>*</b>
<b>20</b>	<b>42.06</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.03</b>	<b>*</b>
<b>25</b>	<b>61.48</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.33</b>	<b>*</b>
<b>50</b>	<b>59.75</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.56</b>	<b>*</b>
<b>75</b>	<b>53.87</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.27</b>	<b>*</b>
<b>100</b>	<b>40.26</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>1.36</b>	<b>*</b>

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza, P < 0.001 y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con P < 0.001

**Efectos sobre linfocitos humanos**

*Tratamientos directos*

Tabla VI. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
0	4.79	$\pm$	0.35	
50	6.36	$\pm$	0.34	NS
100	6.45	$\pm$	0.35	NS
250	8.94	$\pm$	0.53	*
500	11.18	$\pm$	0.54	*
750	13.44	$\pm$	0.74	*
1000	INHIBICIÓN DE LA MITOSIS			

\* n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza,  $P < 0.001$  y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con  $P < 0.001$

**Tabla VII. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90**

Concentración (ppm)	Metafases				IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	
	1a	2a	3a				
<b>0</b>	<b>26</b>	<b>38</b>	<b>36</b>	<b>2.10</b>			
<b>50</b>	<b>31</b>	<b>46</b>	<b>23</b>	<b>1.92</b>	<b>4.06</b>	<b>NS</b>	
<b>100</b>	<b>25</b>	<b>33</b>	<b>42</b>	<b>2.17</b>	<b>0.83</b>	<b>NS</b>	
<b>250</b>	<b>24</b>	<b>37</b>	<b>39</b>	<b>2.15</b>	<b>0.21</b>	<b>NS</b>	
<b>500</b>	<b>20</b>	<b>39</b>	<b>41</b>	<b>2.21</b>	<b>1.12</b>	<b>NS</b>	
<b>750</b>	<b>25</b>	<b>41</b>	<b>34</b>	<b>2.09</b>	<b>0.19</b>	<b>NS</b>	
<b>1000</b>							<b>INHIBICIÓN DE LA MITOSIS</b>

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;  
 NS = No significativo (P < 0.05)

Tabla VIII. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
0	4.79	$\pm$	0.35	
DMSO	4.90	$\pm$	0.55	NS
50	6.72	$\pm$	0.57	NS
100	7.02	$\pm$	0.51	NS
250	6.62	$\pm$	0.38	NS
500	7.08	$\pm$	0.52	NS
750	6.96	$\pm$	0.45	NS
1000	9.62	$\pm$	0.57	*
1500	9.50	$\pm$	0.60	*
2000	9.44	$\pm$	0.71	*
2500	NO HUBO METAFASES DE 2A DIVISIÓN			

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza,  $P < 0.001$  y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con  $P < 0.001$



Tabla IX. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50

Concentración (ppm)	Metafasas			IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	
	1a	2a	3a			
0	25	35	40	2.15		
DMSO	29	34	37	2.08	0.43	NS
50	26	33	41	2.15	0.09	NS
100	26	35	39	2.13	0.02	NS
250	25	39	36	2.11	0.43	NS
500	49	40	11	1.62	24.61	*
750	50	40	10	1.60	36.67	*
1000	45	45	10	1.65	24.96	*
1500	59	35	6	1.47	38.89	*
2000	55	43	2	1.47	46.45	*
2500	100	0	0	1.00		*

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;

NS = No significativo (P < 0.05)

\* = Significativo (P < 0.05)

## **Efectos sobre linfocitos humanos**

*Tratamientos con activación metabólica vegetal in vivo*

Tabla X. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo previa activación metabólica vegetal en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
<b>TESTIGO</b>	<b>4.57</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.35</b>	
<b>ETANOL</b>	<b>8.96</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.53</b>	<b>*</b>
<b>0</b>	<b>5.34</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.43</b>	<b>NS</b>
<b>500</b>	<b>7.54</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.42</b>	<b>*</b>
<b>1000</b>	<b>7.59</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.51</b>	<b>*</b>
<b>1500</b>	<b>7.88</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.35</b>	<b>*</b>
<b>2000</b>	<b>8.38</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.52</b>	<b>*</b>
<b>2500</b>	<b>9.29</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.56</b>	<b>*</b>

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza,  $P < 0.001$  y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con  $P < 0.001$

Tabla XI. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 previa activación metabólica vegetal en células de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	Metafases			IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	
	1a	2 <sup>a</sup>	3a			
TESTIGO	20	37	43	2.23		
ETANOL	17	37	46	2.29	1.84	NS
0	23	28	49	2.26	0.34	NS
500	20	28	52	2.32	2.09	NS
1000	22	30	53	2.41	2.81	NS
1500	23	30	47	2.24	1.12	NS
2000	20	27	53	2.33	2.60	NS
2500	25	27	48	2.23	2.39	NS

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;  
NS = No significativo (P < 0.05)

Tabla XII. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo previa activación metabólica vegetal en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase			
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	
<b>TESTIGO</b>	<b>4.57</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.35</b>	
<b>ETANOL</b>	<b>8.96</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.53</b>	<b>*</b>
<b>0</b>	<b>5.34</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.43</b>	<b>NS</b>
<b>500</b>	<b>5.30</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.41</b>	<b>NS</b>
<b>1000</b>	<b>5.42</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.58</b>	<b>NS</b>
<b>1500</b>	<b>6.24</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.51</b>	<b>NS</b>
<b>2000</b>	<b>7.56</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.47</b>	<b>*</b>
<b>2500</b>	<b>9.54</b>	<b><math>\pm</math></b>	<b>0.53</b>	<b>*</b>

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza, P < 0.001 y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con P < 0.001

Tabla XIII. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 previa activación metabólica vegetal en células de la raíz de *Vicia faba*<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	Metafases			IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	
	1a	2a	3a			
TESTIGO	20	37	43	2.23		
ETANOL	17	37	46	2.29	1.84	NS
0	23	28	49	2.26	0.34	NS
500	15	29	56	2.41	3.39	NS
1000	12	33	55	2.43	3.70	NS
1500	25	25	50	2.25	3.41	NS
2000	13	35	52	2.32	3.08	NS
2500	16	33	51	2.35	1.35	NS

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;

NS = No significativo (P < 0.05)

## **Efectos sobre linfocitos humanos**

*Tratamientos con activación metabólica in vitro*

Tabla XIV. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo con dos horas de tratamiento con y sin activación metabólica<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA			ICH / metafase CON ACTIVACIÓN METABÓLICA ANIMAL			ICH / metafase CON ACTIVACIÓN METABÓLICA VEGETAL					
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	$\bar{X}$	$\pm$	EE	$\bar{X}$	$\pm$	EE			
<b>0</b>	<b>4.98</b>	<b>+</b>	<b>0.30</b>	<b>6.94</b>	<b>+</b>	<b>0.38</b>	<b>6.22</b>	<b>+</b>	<b>0.32</b>			
<b>DMSO</b>	<b>6.10</b>	<b>+</b>	<b>0.51</b>	<b>NS</b>	<b>5.95</b>	<b>+</b>	<b>0.42</b>	<b>NS</b>	<b>6.56</b>	<b>+</b>	<b>0.52</b>	<b>NS</b>
<b>CF</b>	<b>6.59</b>	<b>+</b>	<b>0.34</b>	<b>NS</b>	<b>41.19</b>	<b>+</b>	<b>2.14</b>	<b>*</b>	<b>7.40</b>	<b>+</b>	<b>0.34</b>	<b>NS</b>
<b>ETANOL</b>	<b>6.01</b>	<b>+</b>	<b>0.35</b>	<b>NS</b>	<b>7.96</b>	<b>+</b>	<b>0.47</b>	<b>NS</b>	<b>11.46</b>	<b>+</b>	<b>0.57</b>	<b>*</b>
<b>500</b>	<b>6.94</b>	<b>+</b>	<b>0.44</b>	<b>NS</b>	<b>8.41</b>	<b>+</b>	<b>0.54</b>	<b>NS</b>	<b>7.16</b>	<b>+</b>	<b>0.38</b>	<b>NS</b>
<b>1000</b>	<b>7.20</b>	<b>+</b>	<b>0.48</b>	<b>NS</b>	<b>9.82</b>	<b>+</b>	<b>0.40</b>	<b>NS</b>	<b>6.94</b>	<b>+</b>	<b>0.38</b>	<b>NS</b>
<b>1500</b>	<b>6.67</b>	<b>+</b>	<b>0.34</b>	<b>NS</b>	<b>13.78</b>	<b>+</b>	<b>0.39</b>	<b>NS</b>	<b>5.46</b>	<b>+</b>	<b>0.29</b>	<b>NS</b>
<b>2000</b>	<b>6.50</b>	<b>+</b>	<b>0.39</b>	<b>NS</b>	<b>14.07</b>	<b>+</b>	<b>0.98</b>	<b>*</b>	<b>5.96</b>	<b>+</b>	<b>0.28</b>	<b>NS</b>
<b>2500</b>	<b>8.52</b>	<b>+</b>	<b>0.37</b>	<b>*</b>	<b>16.75</b>	<b>+</b>	<b>2.21</b>	<b>*</b>	<b>6.78</b>	<b>+</b>	<b>0.81</b>	<b>NS</b>

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza, P < 0.001 y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con P < 0.001



Tabla XV. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Lannate-90 con dos horas de tratamiento con y sin activación metabólica

Concentración (ppm)	Metafases					Metafases					Metafases							
	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	$\chi^2$	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	$\chi^2$			
0	42	39	19	1.77		41	38	21	1.80		48	38	14	1.66				
DMSO	42	37	21	1.79	0.15	NS	47	33	20	1.73	0.79	NS	43	34	23	1.80	2.67	NS
CF	43	39	18	1.75	0.04	NS	40	40	20	1.80	0.09	NS	50	33	17	1.67	0.68	NS
ETANOL	47	39	14	1.67	1.04	NS	48	37	15	1.67	1.57	NS	44	35	21	1.77	1.70	NS
1000	42	42	16	1.74	0.37	NS	40	33	27	1.87	1.11	NS	46	32	22	1.76	2.66	NS
1500	39	36	25	1.86	1.05	NS	47	39	14	1.67	1.82	NS	50	34	16	1.66	0.39	NS
	40	38	22	1.82	1.04	NS	45	36	19	1.74	0.34	NS	46	32	22	1.76	2.33	NS
2000	43	37	20	1.77	0.09	NS	46	36	19	1.73	0.51	NS	46	30	24	1.78	3.61	NS
2500	43	38	19	1.75	0.02	NS	49	31	20	1.71	1.44	NS	50	36	14	1.64	0.10	NS

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;

NS = No significativo (P < 0.05)

Tabla XVI. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo con dos horas de tratamiento con y sin activación metabólica<sup>a</sup>

Concentración (ppm)	ICH / metafase SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA			ICH / metafase CON ACTIVACIÓN METABÓLICA ANIMAL			ICH / metafase CON ACTIVACIÓN METABÓLICA VEGETAL					
	$\bar{X}$	$\pm$	EE	$\bar{X}$	$\pm$	EE	$\bar{X}$	$\pm$	EE			
0	4.98	$\pm$	0.30	6.94	$\pm$	0.38	6.22	$\pm$	0.32			
DMSO	6.10	$\pm$	0.51	NS	5.95	$\pm$	0.42	NS	6.56	$\pm$	0.52	NS
CF	6.59	$\pm$	0.34	NS	41.19	$\pm$	2.14	*	7.40	$\pm$	0.34	NS
ETANOL	6.01	$\pm$	0.35	NS	7.96	$\pm$	0.47	NS	11.46	$\pm$	0.57	*
500	6.16	$\pm$	0.37	NS	6.47	$\pm$	0.48	NS	5.32	$\pm$	0.29	NS
1000	6.83	$\pm$	0.31	NS	6.26	$\pm$	0.39	NS	6.00	$\pm$	0.37	NS
1500	6.33	$\pm$	0.36	NS	5.94	$\pm$	0.33	NS	6.96	$\pm$	0.25	NS
2000	6.42	$\pm$	0.25	NS	6.70	$\pm$	0.79	NS	6.54	$\pm$	0.30	NS
2500	7.39	$\pm$	0.30	*	7.74	$\pm$	0.84	NS	6.40	$\pm$	0.41	NS

<sup>a</sup> n = 50 metafases en dos experimentos;

NS = No significativo

\* Las diferencias significativas entre el testigo y cada una de las concentraciones son obtenidas por análisis de varianza, P < 0.001 y así la prueba de Student-Newman-Keuls fue aplicada con P < 0.001

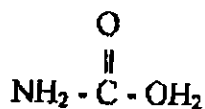
Tabla XV. Efectos sobre la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico Pirimor-50 con dos horas de tratamiento con y sin activación metabólica

Concentración (ppm)	Metafases					Metafases					Metafases							
	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	χ <sup>2</sup>	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	χ <sup>2</sup>	1a	2a	3a	IR <sup>a</sup>	χ <sup>2</sup>			
<b>0</b>	<b>42</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>1.77</b>		<b>41</b>	<b>38</b>	<b>21</b>	<b>1.80</b>		<b>48</b>	<b>38</b>	<b>14</b>	<b>1.66</b>				
<b>DMSO</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	<b>21</b>	<b>1.79</b>	<b>0.15</b>	NS	<b>47</b>	<b>33</b>	<b>20</b>	<b>1.73</b>	<b>0.79</b>	NS	<b>43</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>1.80</b>	<b>2.67</b>	NS
<b>CF</b>	<b>43</b>	<b>39</b>	<b>18</b>	<b>1.75</b>	<b>0.04</b>	NS	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>1.80</b>	<b>0.09</b>	NS	<b>50</b>	<b>33</b>	<b>17</b>	<b>1.67</b>	<b>0.68</b>	NS
<b>ETANOL</b>	<b>47</b>	<b>39</b>	<b>14</b>	<b>1.67</b>	<b>1.04</b>	NS	<b>48</b>	<b>37</b>	<b>15</b>	<b>1.67</b>	<b>1.57</b>	NS	<b>44</b>	<b>35</b>	<b>21</b>	<b>1.77</b>	<b>1.70</b>	NS
<b>500</b>	<b>54</b>	<b>38</b>	<b>08</b>	<b>1.54</b>	<b>5.99</b>	NS	<b>58</b>	<b>34</b>	<b>08</b>	<b>1.50</b>	<b>8.97</b>	*	<b>48</b>	<b>37</b>	<b>15</b>	<b>1.67</b>	<b>0.05</b>	NS
<b>1000</b>	<b>57</b>	<b>34</b>	<b>09</b>	<b>1.52</b>	<b>6.18</b>	NS	<b>65</b>	<b>26</b>	<b>09</b>	<b>1.44</b>	<b>12.48</b>	*	<b>51</b>	<b>34</b>	<b>15</b>	<b>1.64</b>	<b>0.35</b>	NS
<b>1500</b>	<b>49</b>	<b>41</b>	<b>10</b>	<b>1.61</b>	<b>3.38</b>	NS	<b>63</b>	<b>29</b>	<b>08</b>	<b>1.45</b>	<b>11.69</b>	*	<b>50</b>	<b>33</b>	<b>17</b>	<b>1.67</b>	<b>2.04</b>	NS
<b>2000</b>	<b>47</b>	<b>44</b>	<b>09</b>	<b>1.62</b>	<b>4.15</b>	NS	<b>58</b>	<b>34</b>	<b>08</b>	<b>1.50</b>	<b>8.97</b>	*	<b>57</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>1.57</b>	<b>1.98</b>	NS
<b>2500</b>	<b>55</b>	<b>35</b>	<b>10</b>	<b>1.55</b>	<b>1.55</b>	NS	<b>60</b>	<b>31</b>	<b>09</b>	<b>1.49</b>	<b>8.55</b>	*	<b>58</b>	<b>39</b>	<b>13</b>	<b>1.65</b>	<b>0.05</b>	NS

<sup>a</sup> = Índice de replicación en 200 metafases consecutivas;

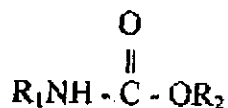
NS = No significativo (P < 0.05)

Figuras . . .



El ácido carbónico es el esqueleto de los carbamatos

Los carbamatos son ésteres N-sustituídos del ácido carbónico.  
Su fórmula general es:

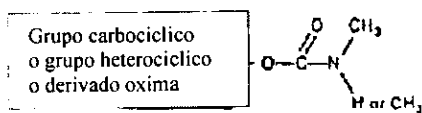


donde  $\text{R}_2$  es una parte aromática o alifática.

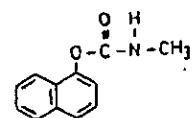
Se conocen tres clases principales de plaguicidas carbámicos:

- 1) insecticidas carbámicos;  $\text{R}_1$  es un grupo metilo
- 2) herbicidas carbámicos;  $\text{R}_1$  es una parte aromática
- 3) funguicidas carbámicos;  $\text{R}_1$  es una parte bencimidazol

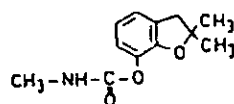
Figura 1. Identidad de los carbamatos



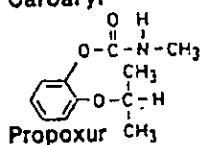
**Figura 2. Estructura general de los carbamatos con propiedades insecticidas (o relacionadas)**



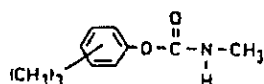
Carbaryl



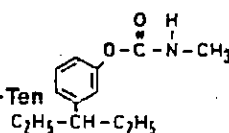
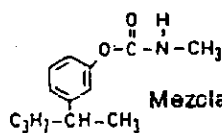
Carbofuran



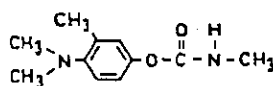
Propoxur



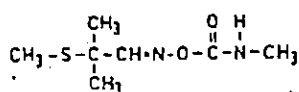
Landrin



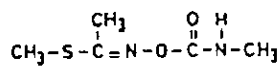
Mezcla de Bux-Ten



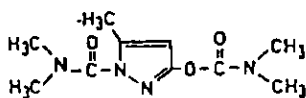
Aminocarb



Aldicarb

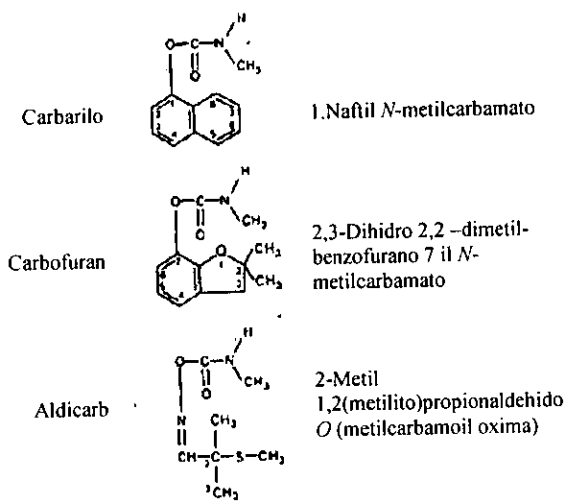


Metomil



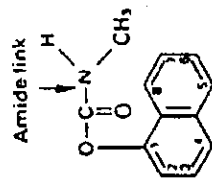
Dimetilan

Figura 3. Fórmulas de insecticidas carbámicos específicos

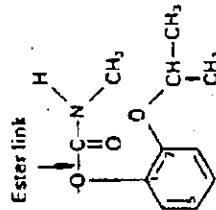


**Figura 4. Un miembro importante de cada uno de los subgrupos de insecticidas carbámicos**

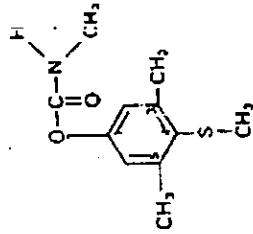




(a) Carbarilo

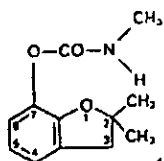


(b) Propoxur

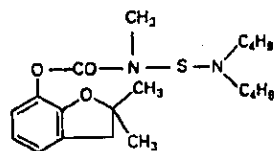


(c) Metiocarb

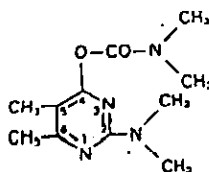
Figura 5. Subgrupo 1., anil metilcarbamatos: (a) 1 naftil *N*-metilcarbamato; (b) 2-isopropoxifenil *N*-metilcarbamato; (c) 3,5-dimetil-4-metilifenil *N*-metilcarbamato



(a) Carbofuran

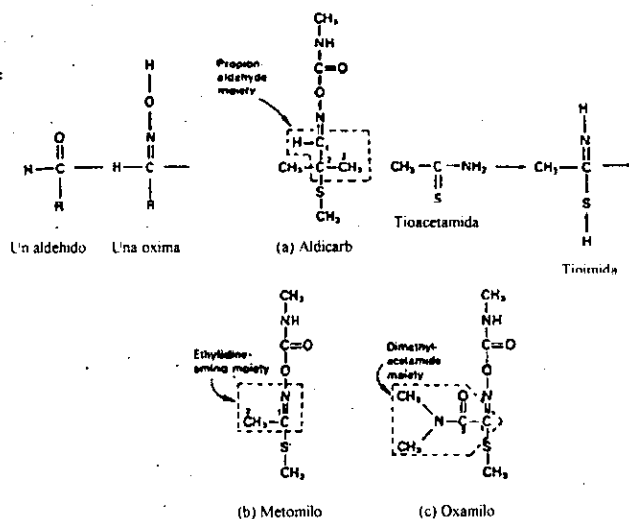


(b) Carbosulfan

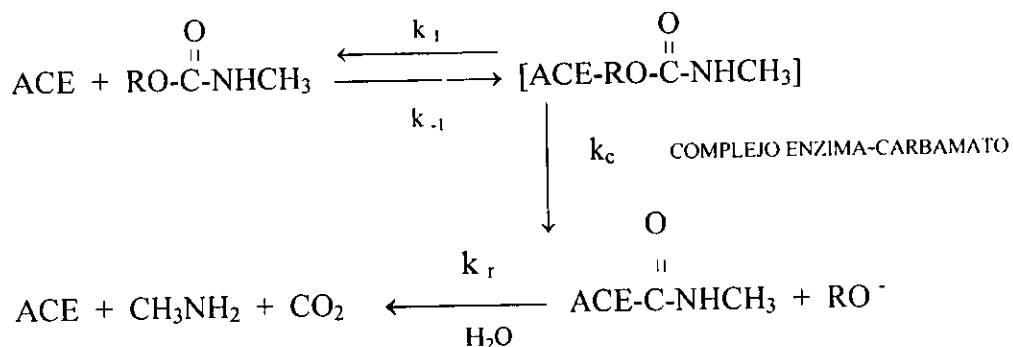


(c) Pirimicarb

Figura 6. Subgrupo 2, carbamatos heterociclicos: (a) 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il *N*-metilcarbamato; (b) 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il dibutilaminotio-*N*-metilcarbamato; (c) 2-dimetilamino-5-6-dimetilpirimidina-4-il *N*-dimetilcarbamato



**Figura 7. Subgrupo 3, N-metilcarbamatos de oximas:**  
**(a) 2-metil-2-(metilito)-propionaldehido O-metilcarbamoil oxima;**  
**(b) 1-(metilito)etil-idineamino N-metilcarbamato;**  
**(c) S-metil N-[(metilcarbamoil)oxi]1-tioacetimidate**



Donde  $k_1$  = Constante de velocidad de segundo orden para la formación del complejo;  
 $k_{-1}$  = Constante de velocidad de primer orden para el rompimiento del complejo en los compuestos originales

Figura 8. Mecanismos de inhibición de la ACE  
 Por ésteres carbámicos

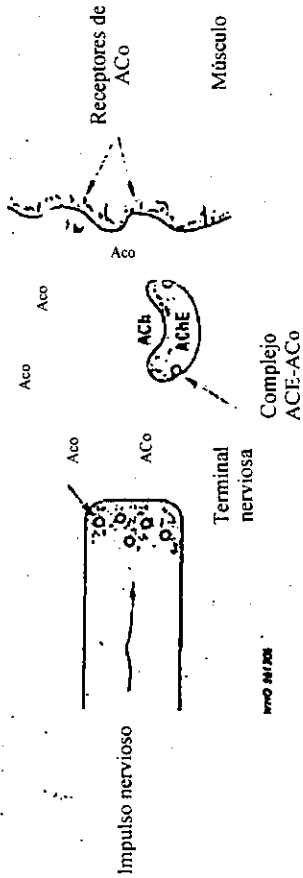
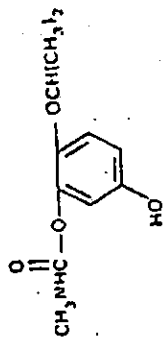
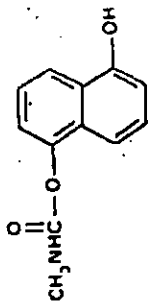


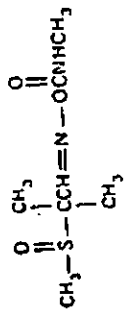
Figura 9. Esquema de los eventos en la función neuromuscular durante la estimulación



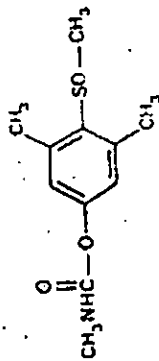
5-hidroxiropoxur



5-hidroxicarbartilo

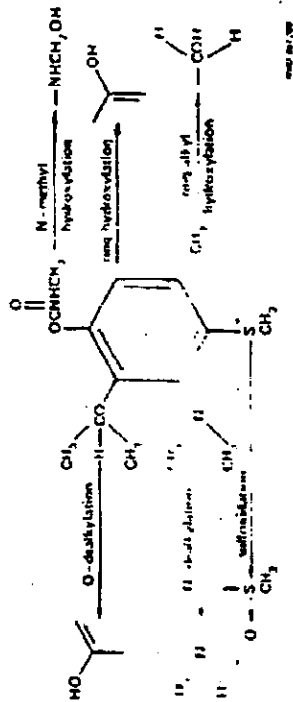


Aldicarb sulfoxido



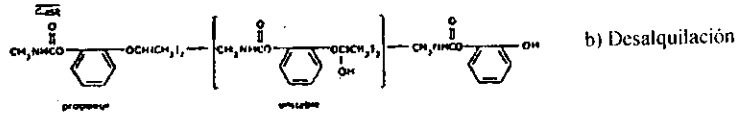
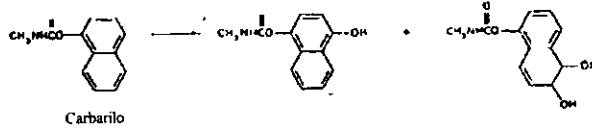
Meticarb sulfoxido

Figura 10. Metabolitos tóxicos de insecticidas metilcarbarnatos

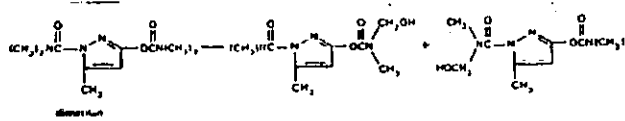


**Figura 11. Sitios de oxidación de un insecticida metilcarbamato hipotético.**  
**(Aldridge y Magos (1978))**

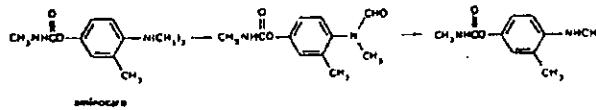
a) Hidroxilación de los anillos (o epoxidación)



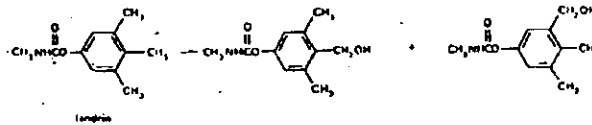
c) N-metil hidroxilación



d) N-desalquilación



(e) Oxidación de la cadena lateral alifática



(f) Oxidaciones tioeter

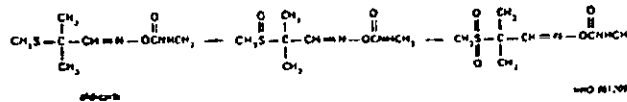


Figura 12. Mecanismos de desintoxicación para carbamatos (Fukuto 1972)



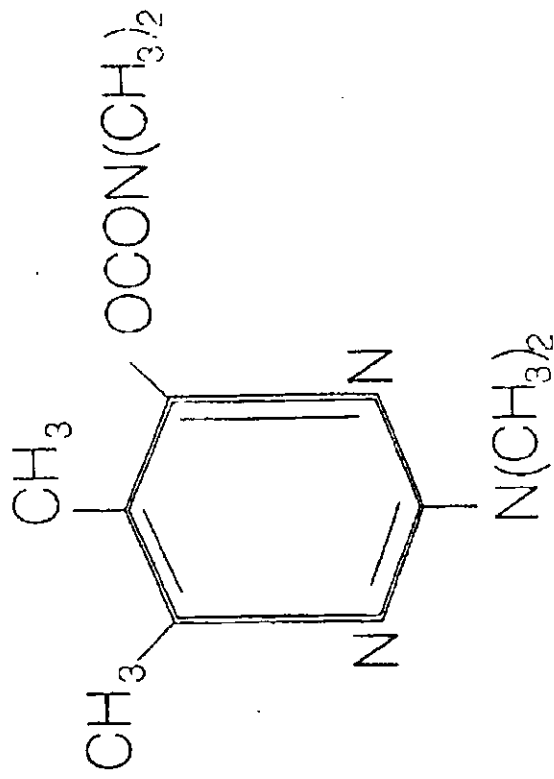


Figura 14. Estructura química del pirimicarb

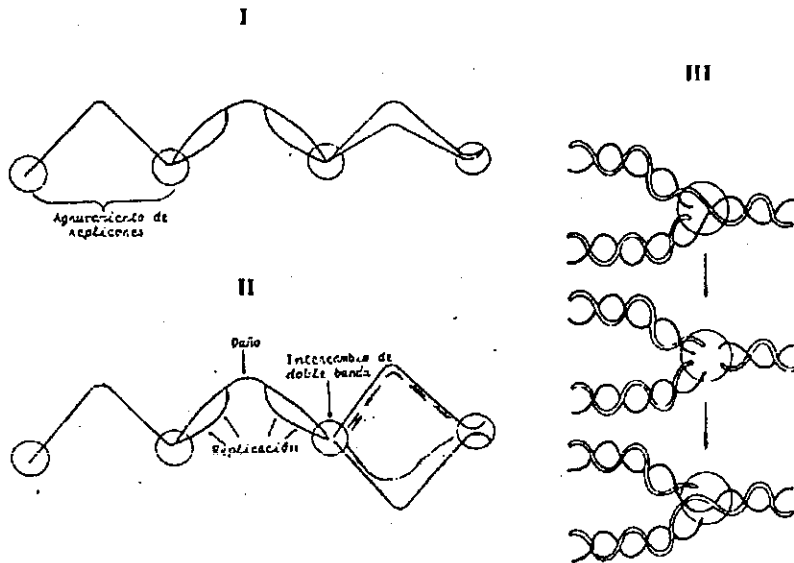


Figura 15. Modelo de inducción de ICH de Painter (1980)

- I** Progresión de la duplicación del ADN entre los agrupamientos de replications (círculos) que separan replicones subsecuentes.
- II** Retardo en la duplicación debido a daño, e incremento de la posibilidad de intercambio de doble banda.
- III** Ruptura de doble banda y reunión de la banda hija de la molécula replicada a la molécula no replicada dando lugar al intercambio de doble banda.

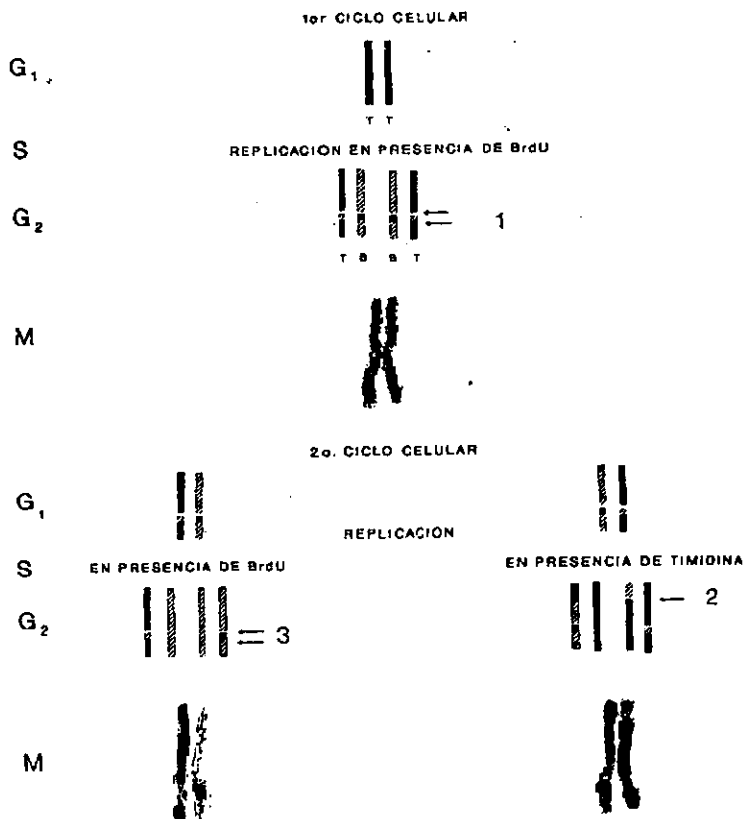


Figura 16. Diagrama de Tinción diferencial

- 1 ICH doble no detectable en la primera mitosis por no haber tinción diferencial.
- 2 ICH sencillo detectable al igual que el ICH doble de la primera mitosis.
- 3 ICH doble de la primera mitosis detectable por haber tinción diferencial.

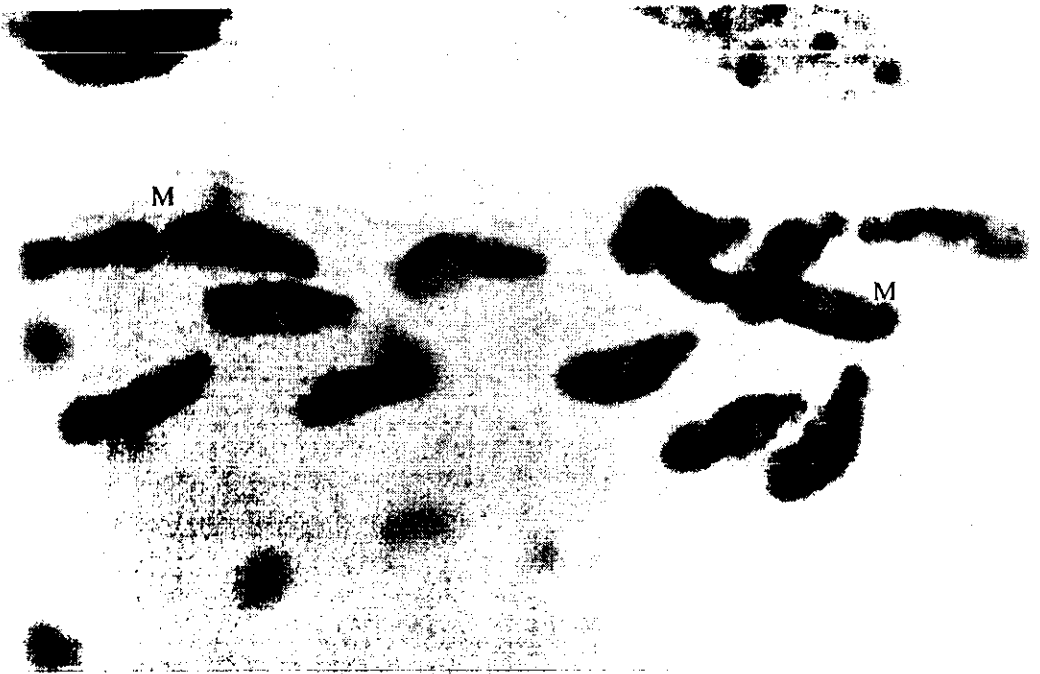


Figura 17. Metafase de *Vicia faba* presentando tinción diferencial en los dos cromosomas metacéntricos (M) y sus 10 acrocéntricos

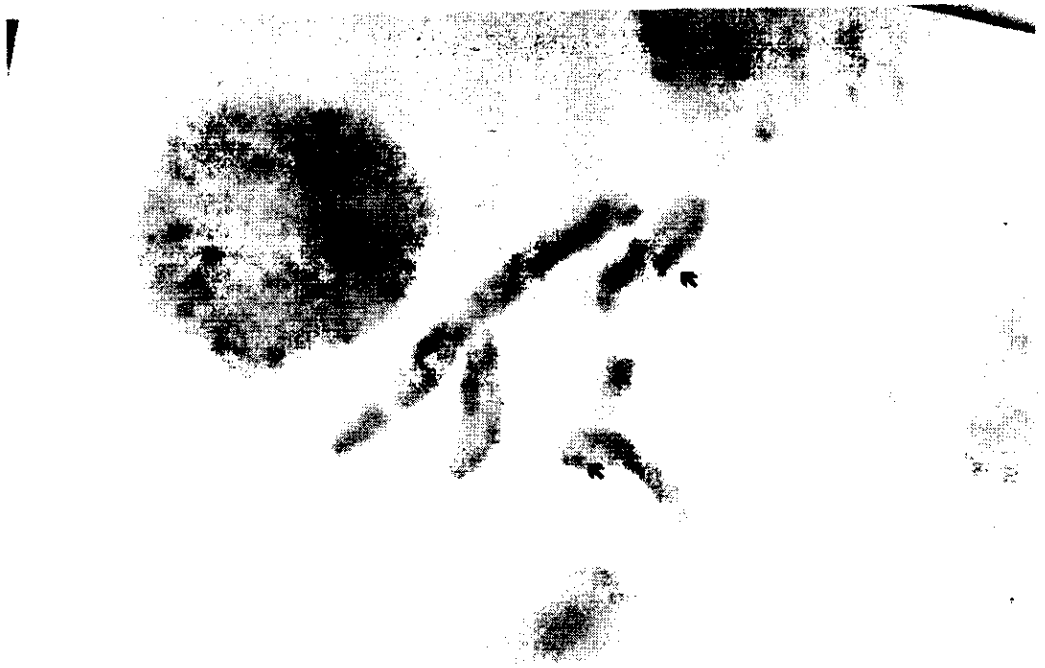


Figura. 18. Cromosomas acrocéntricos de *Vicia faba* presentando un intercambio terminal (↖), que se registra como un evento de daño



Figura 19. Cromosoma acrocéntrico de *Vicia faba* que presenta dos intercambios intersticiales, que se registran como dos eventos de daño en cada caso.



Figura 20, Metafase de segunda división en linfocitos humanos en donde se presenta la tinción diferencial



Figura 21. Metafase de primera división. Con cromosomas unifilarmente sustituidos con BrdU, sin tinción diferencial



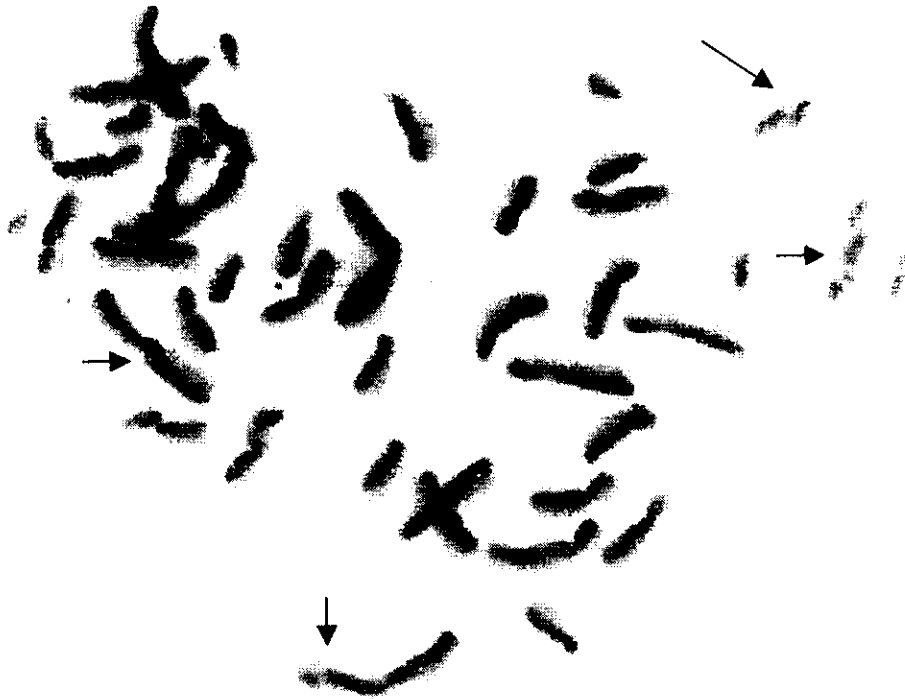


Figura. 22. Metafase de segunda división en donde son evidentes intercambios de cromátidas hermanas, terminales e intersticiales, que se registran como uno y dos eventos de daño respectivamente



Figura 23. Metafase de tercera división en donde son evidentes cromosomas con ambas cromátidas bifilarmente sustituidas, las cuales presentan una tinción clara

**Efectos sobre *Vicia faba***

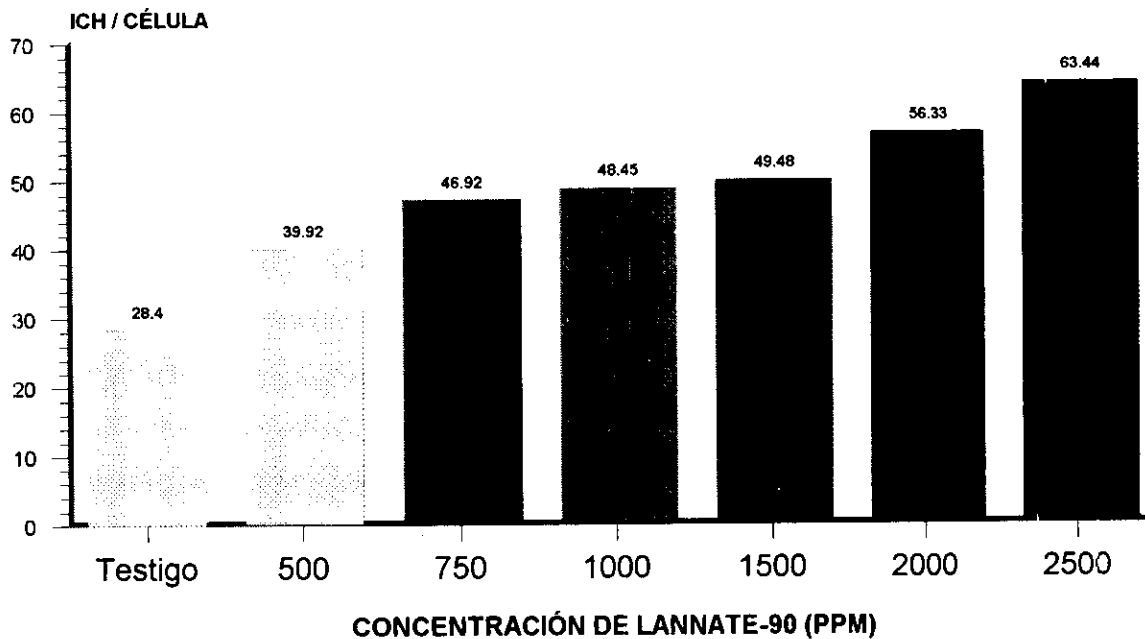


Figura 24. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico lannate-90 en cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*

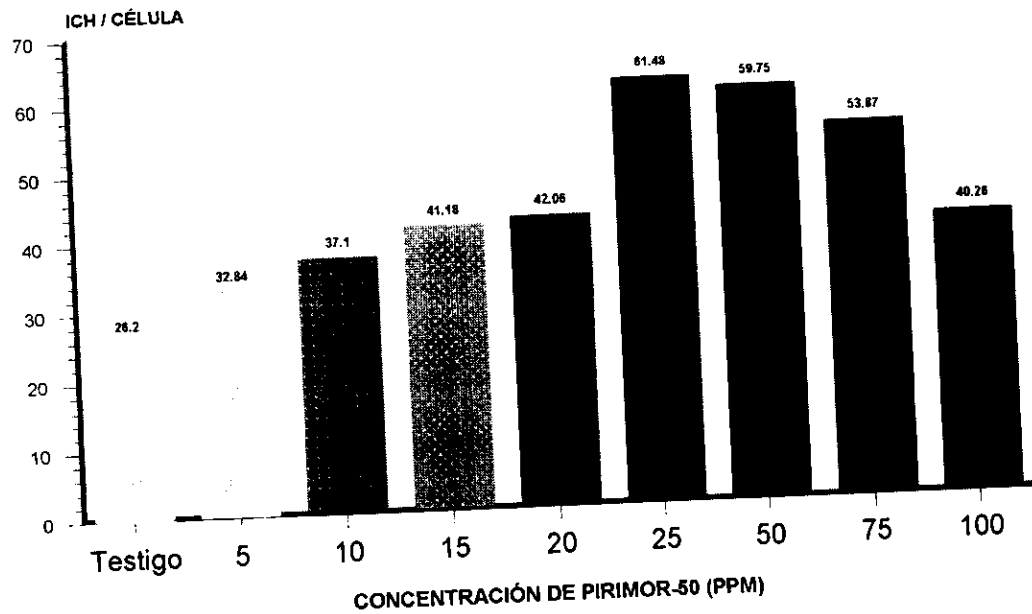


Figura 25. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50 en cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*

## **Efectos sobre linfocitos humanos**

*Tratamientos directos*

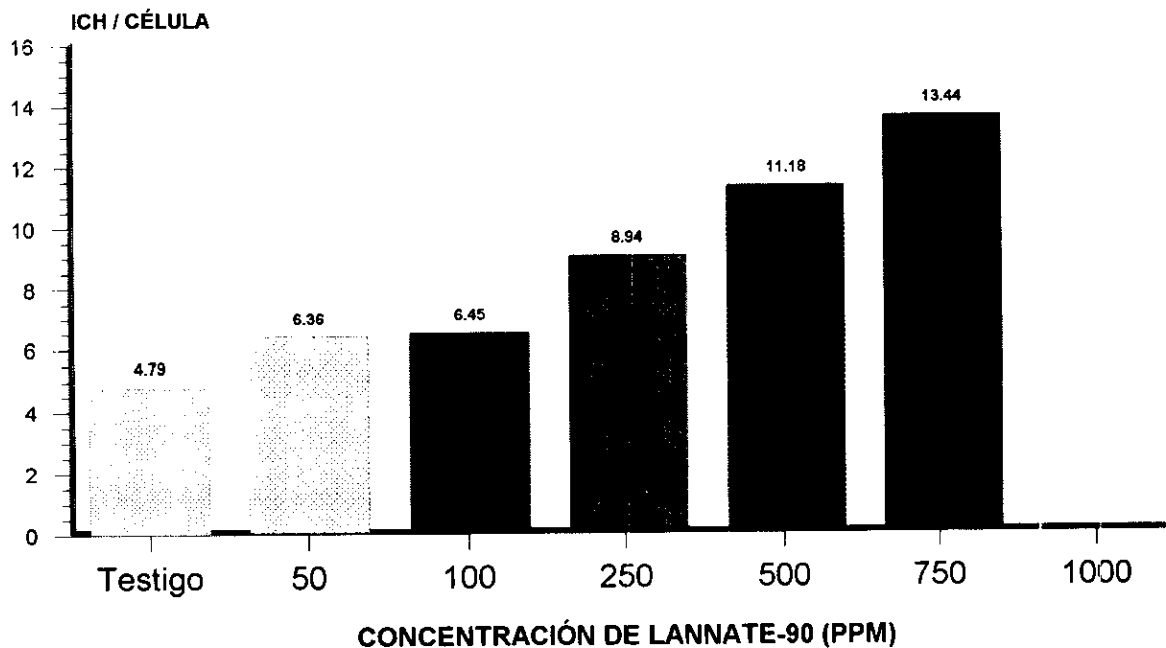


Figura 26. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico lannate-90 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo

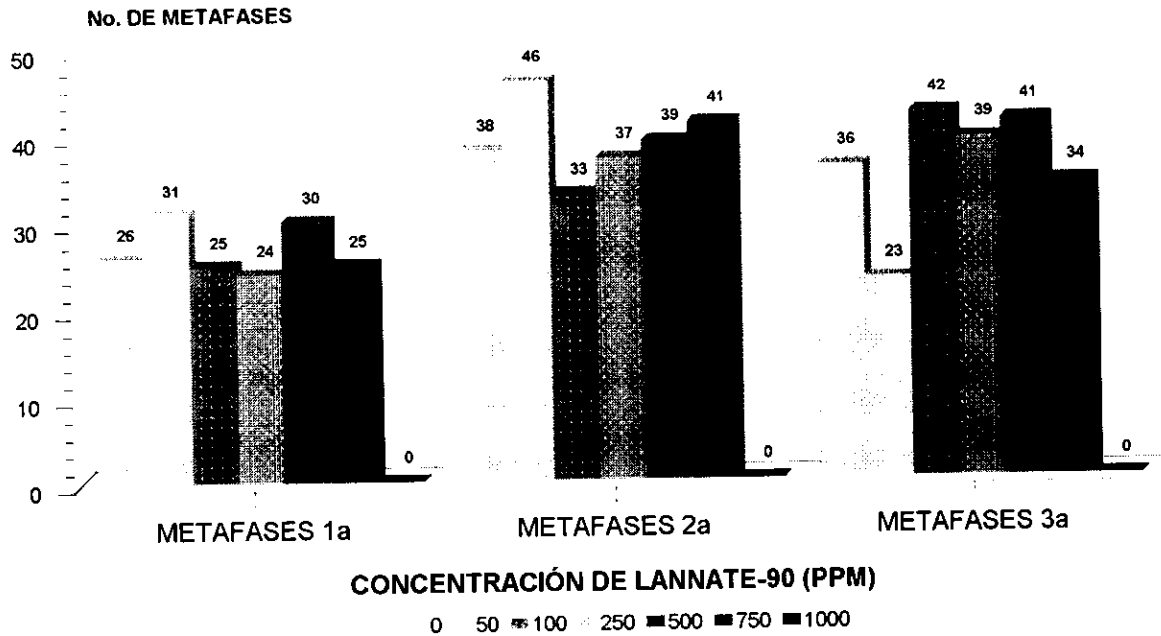


Figura 27. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90



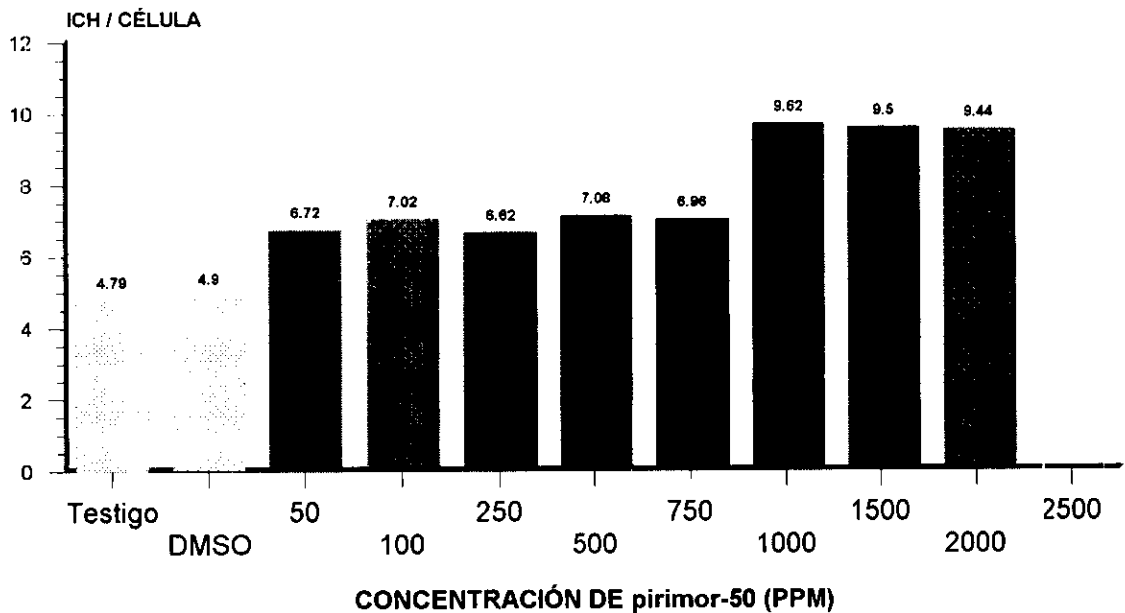


Figura 28. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50 en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo

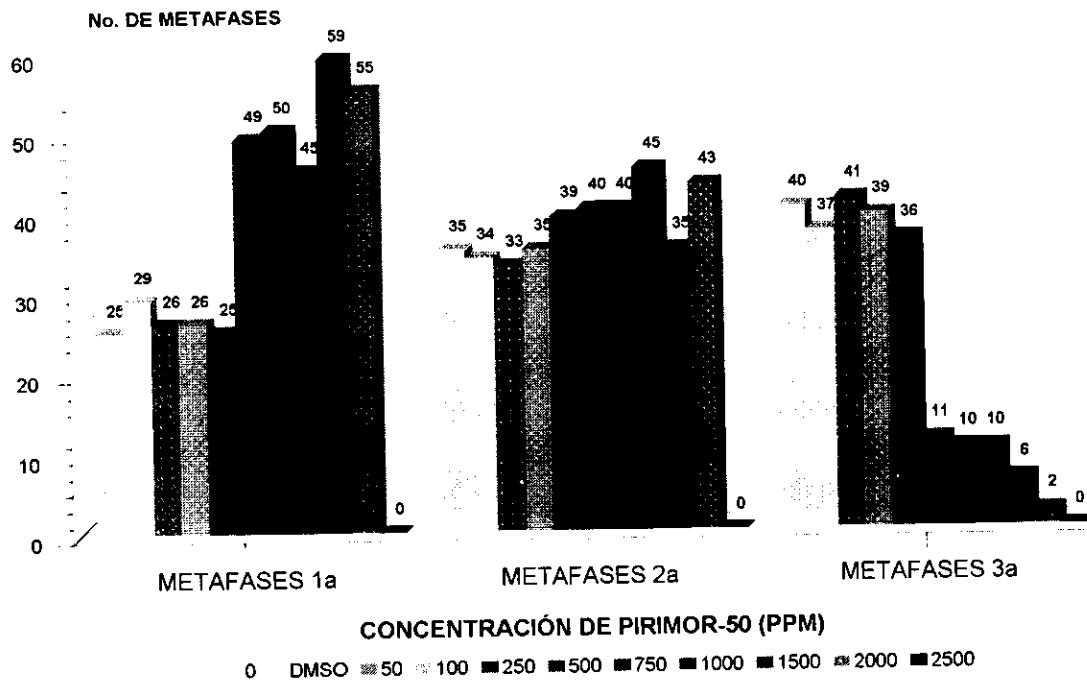


Figura 29. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50

## **Efectos sobre linfocitos humanos**

*Tratamientos con activación metabólica vegetal in vivo*

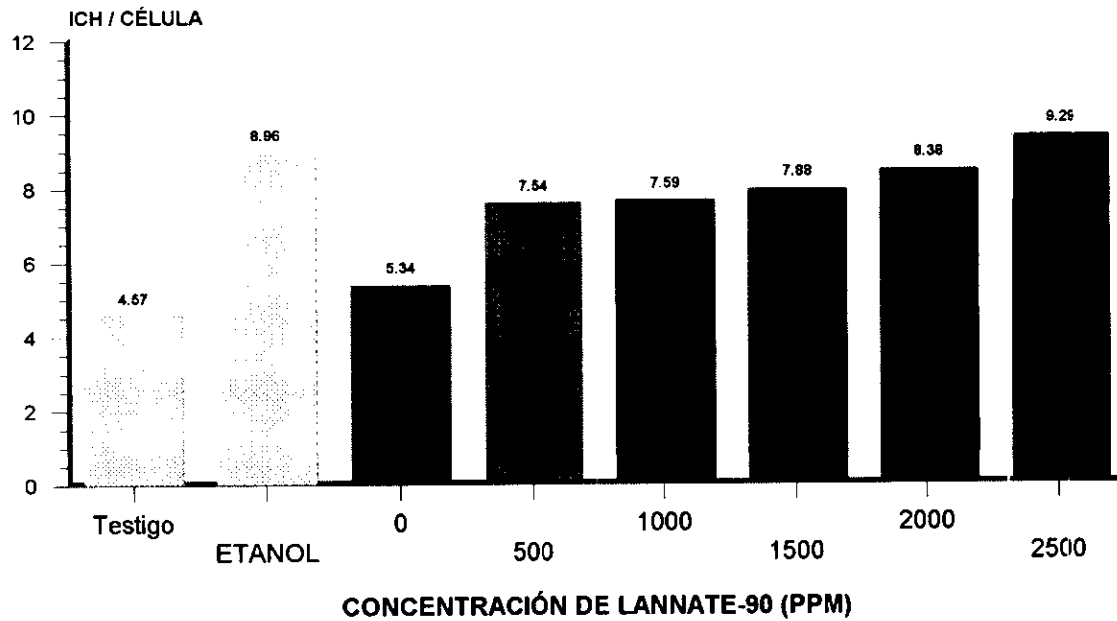


Figura 30. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico lannate-90 previa activación metabólica vegetal en células de la raíz de *Vicia faba*

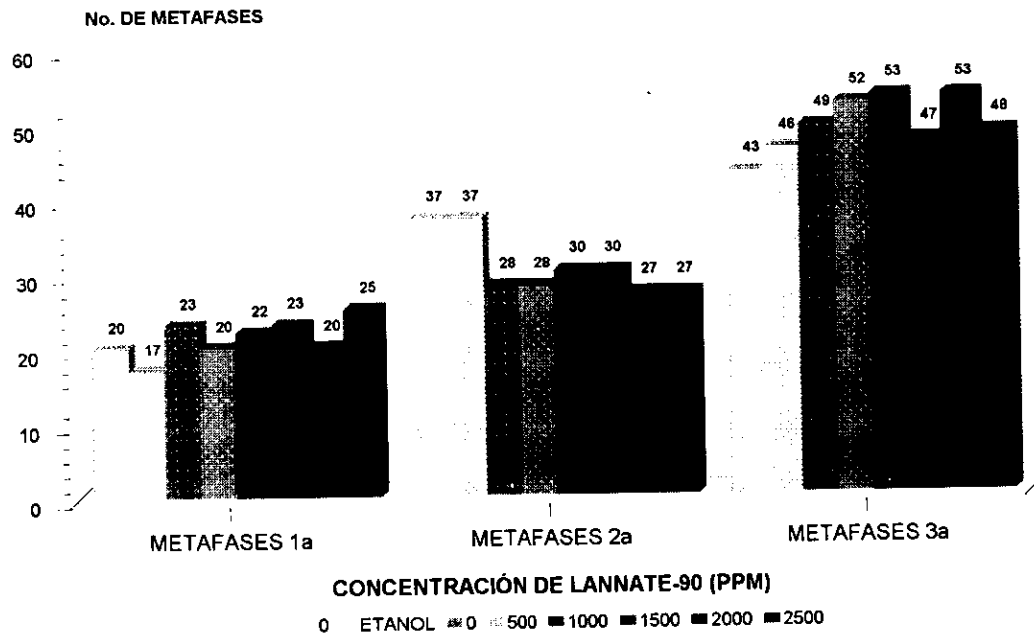


Figura 31. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90, previa activación metabólica vegetal en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*

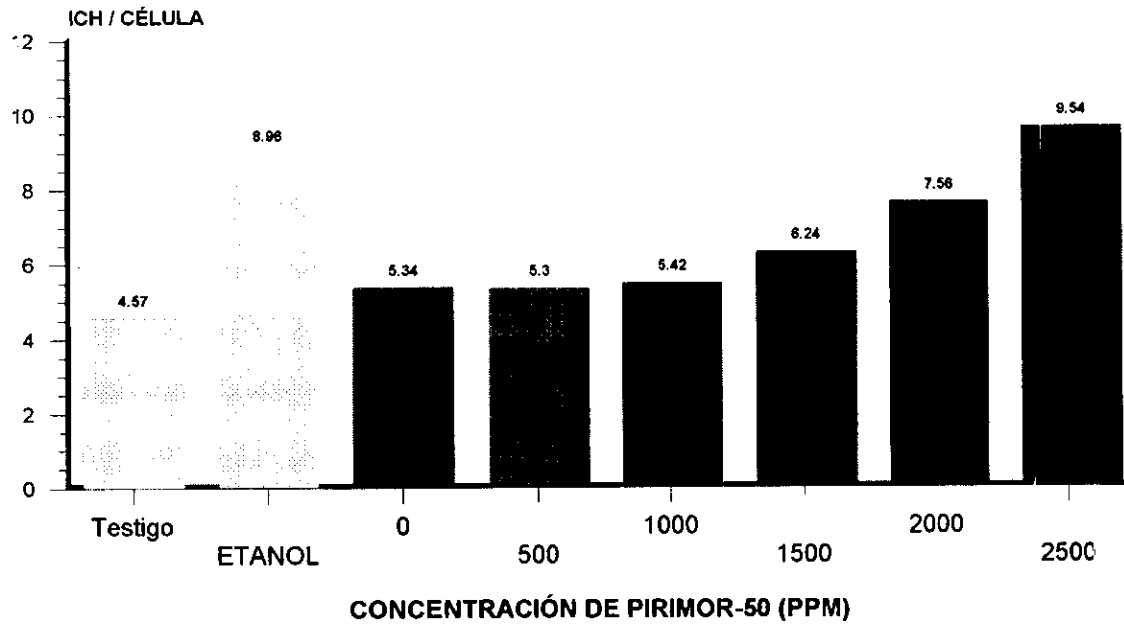


Figura 32. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico pirimor-50 previa activación metabólica vegetal en células de la raíz de *Vicia faba*

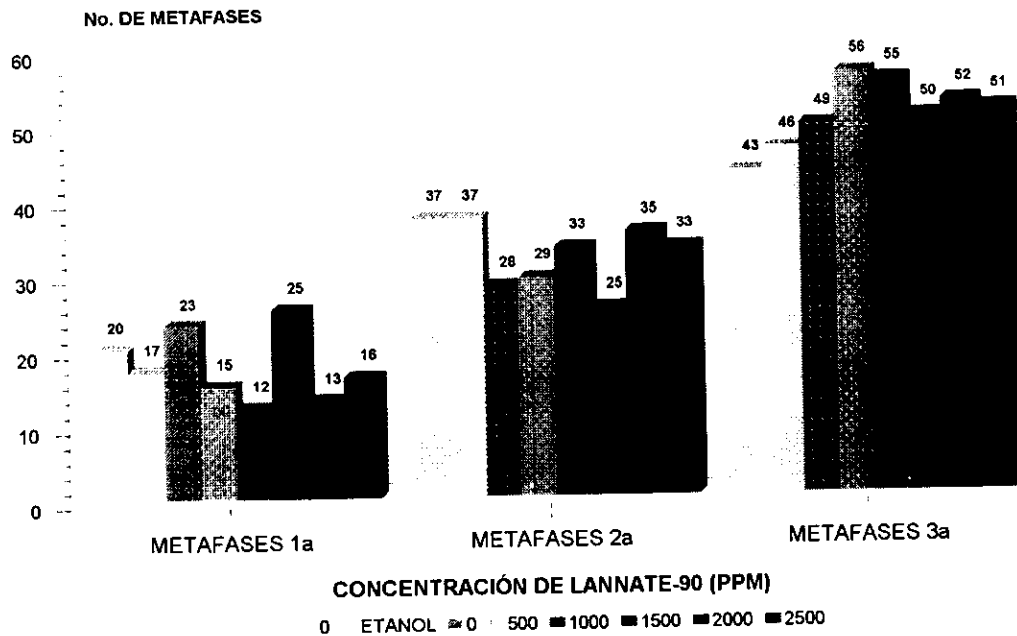


Figura 33. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90, previa activación metabólica vegetal en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*

## **Efectos sobre linfocitos humanos**

Tratamientos con activación metabólica in vitro



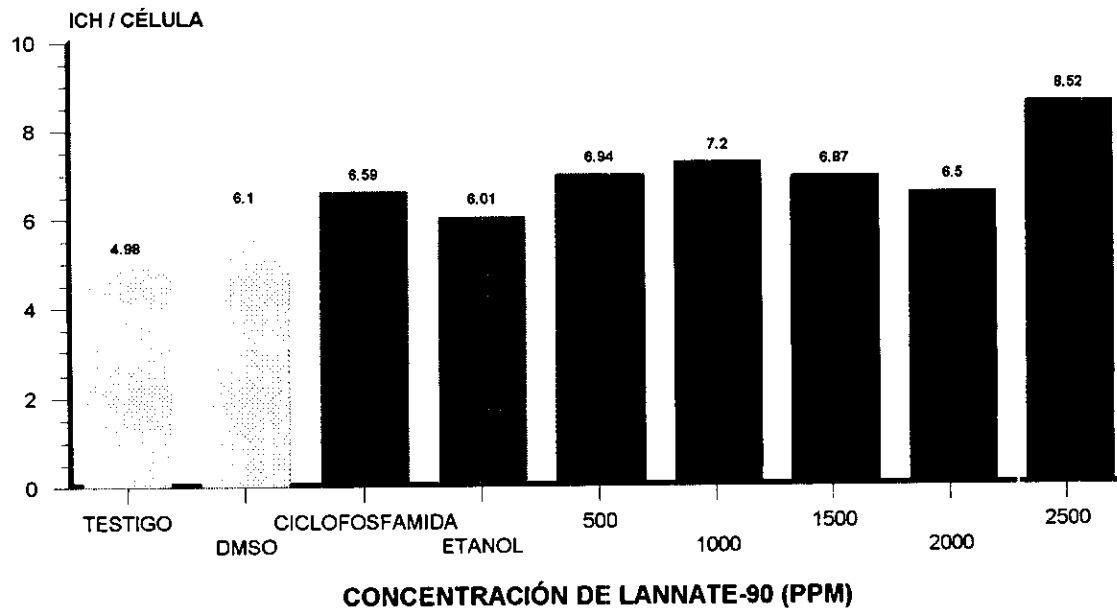


Figura 34. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico lannate-90 con dos horas de tratamiento sin activación metabólica

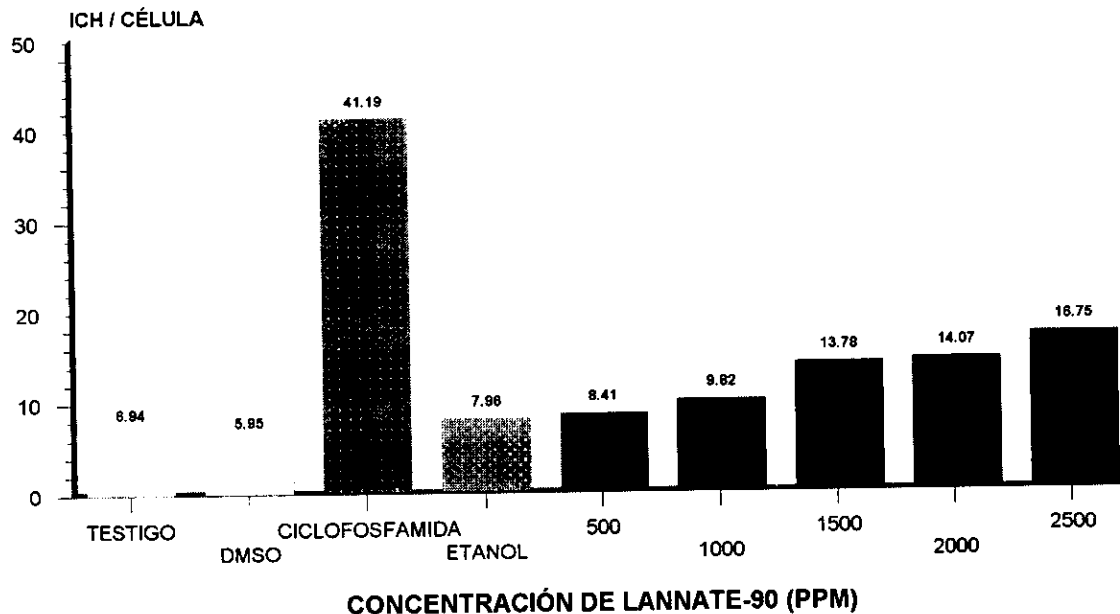


Figura 35. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico lannate-90 con dos horas de tratamiento con activación metabólica animal

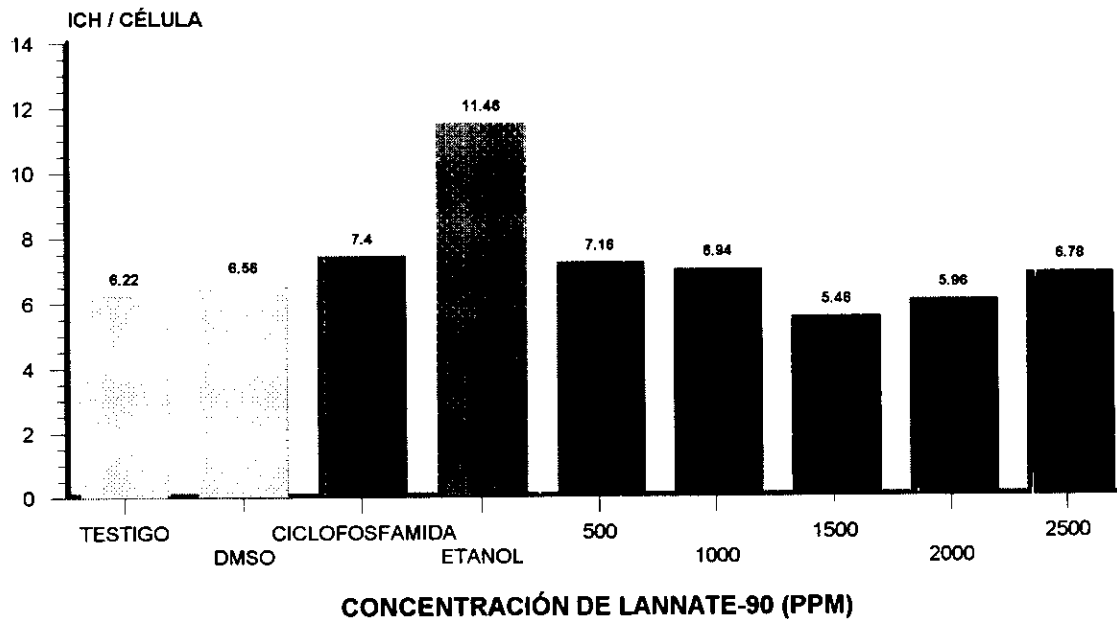


Figura 36. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico lannate-90 con dos horas de tratamiento con activación metabólica vegetal

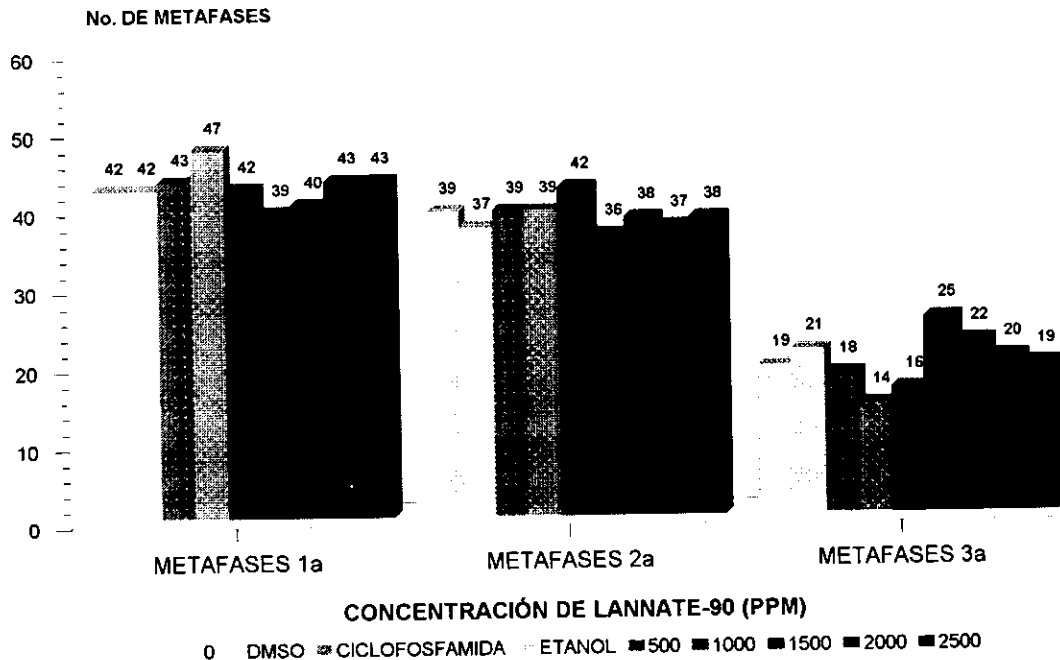


Figura 37. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90, con dos horas de tratamiento sin activación metabólica

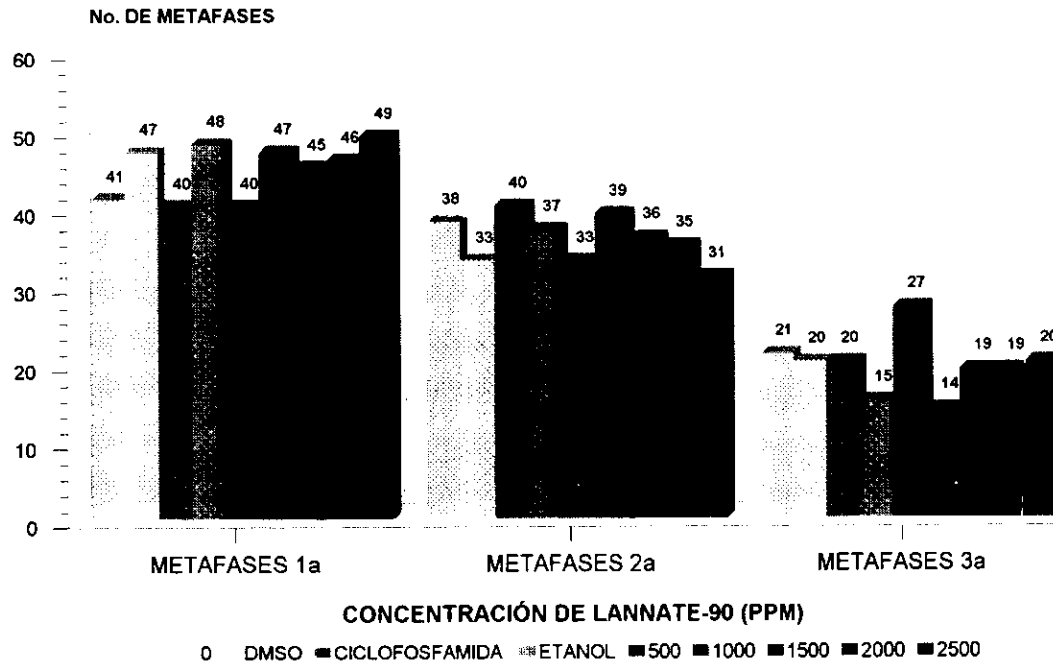


Figura 38. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90, con dos horas de tratamiento con activación metabólica animal

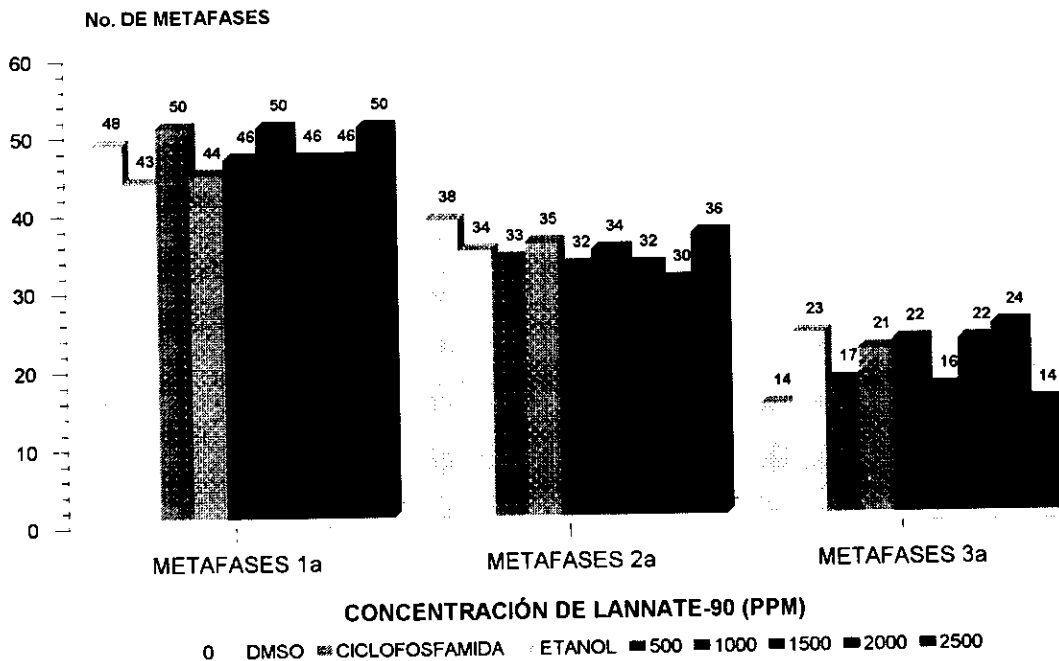


Figura 39. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico lannate-90, con dos horas de tratamiento con activación metabólica vegetal

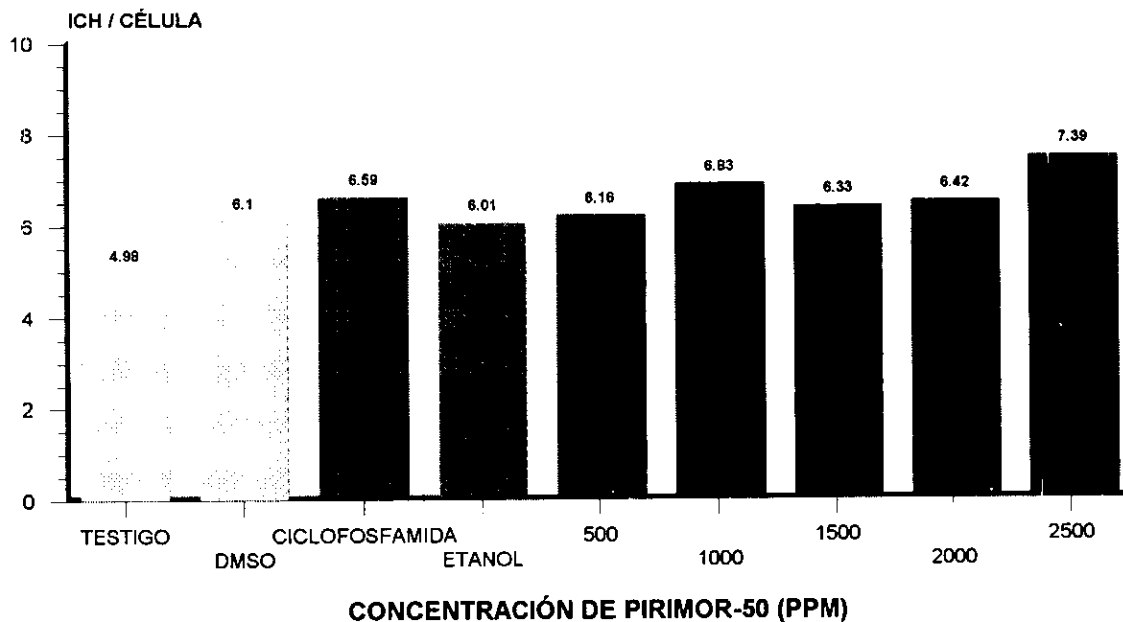


Figura 40. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico pirimor-50 con dos horas de tratamiento sin activación metabólica

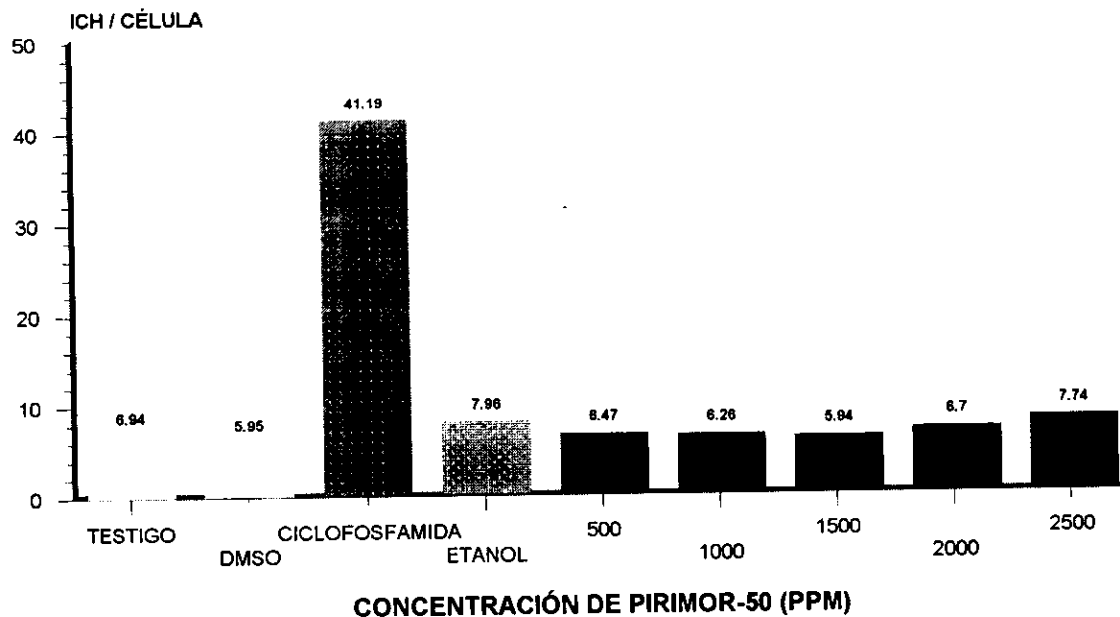


Figura 41. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico pirimor-50 con dos horas de tratamiento con activación metabólica animal



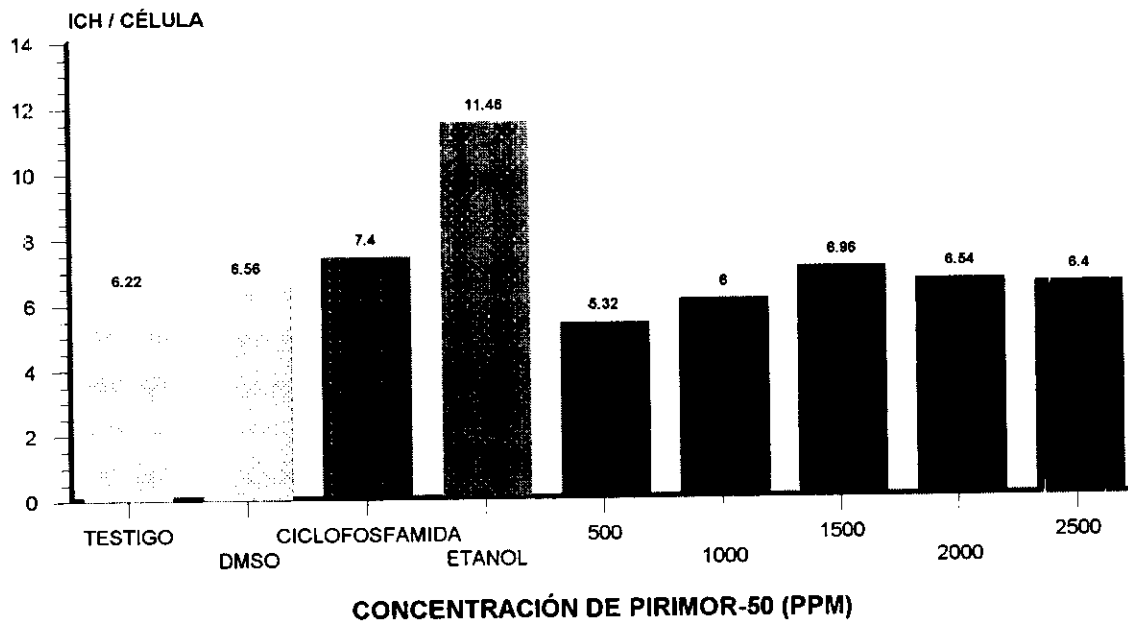


Figura 42. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos en cromosomas de linfocitos humanos en cultivo por el insecticida carbámico pirimor-50 con dos horas de tratamiento con activación metabólica vegetal

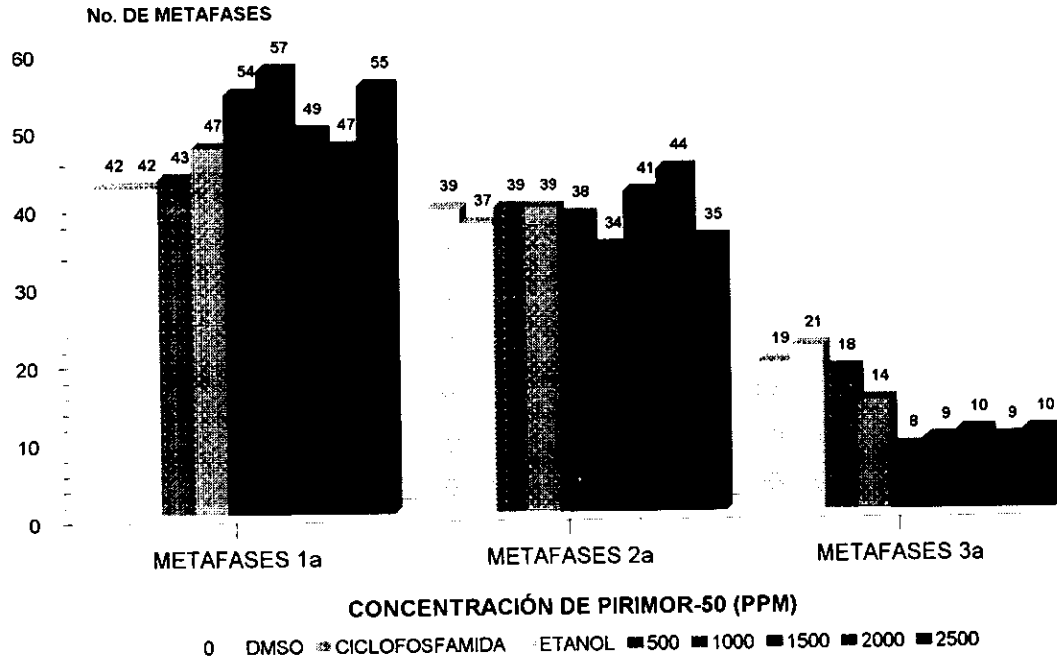


Figura 43. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50, con dos horas de tratamiento sin activación metabólica

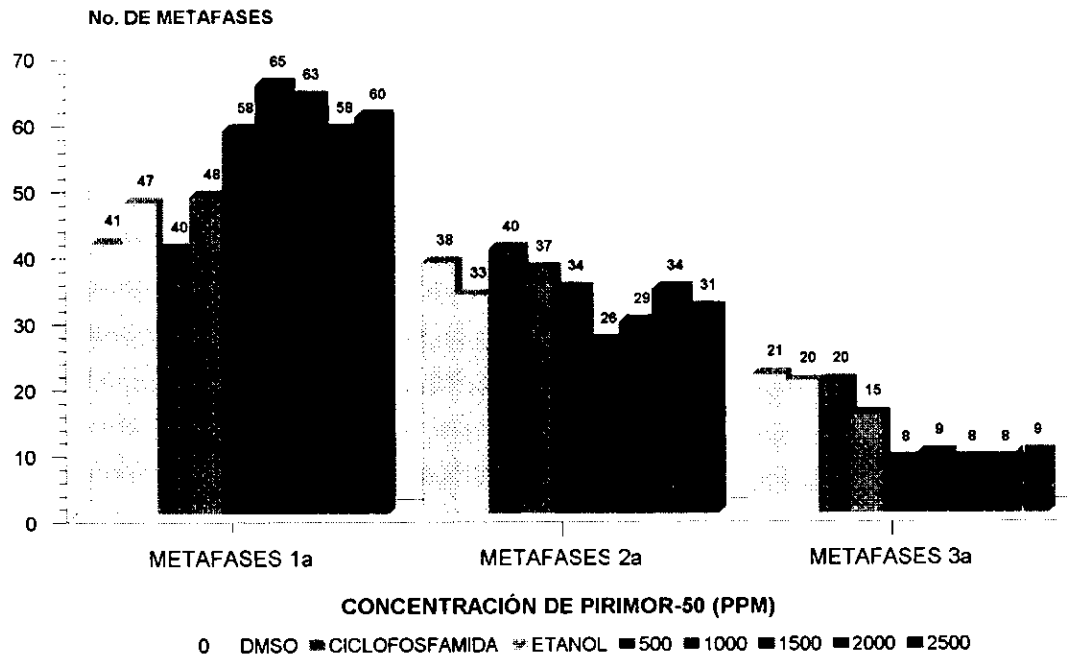


Figura 44. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50, con dos horas de tratamiento con activación metabólica animal

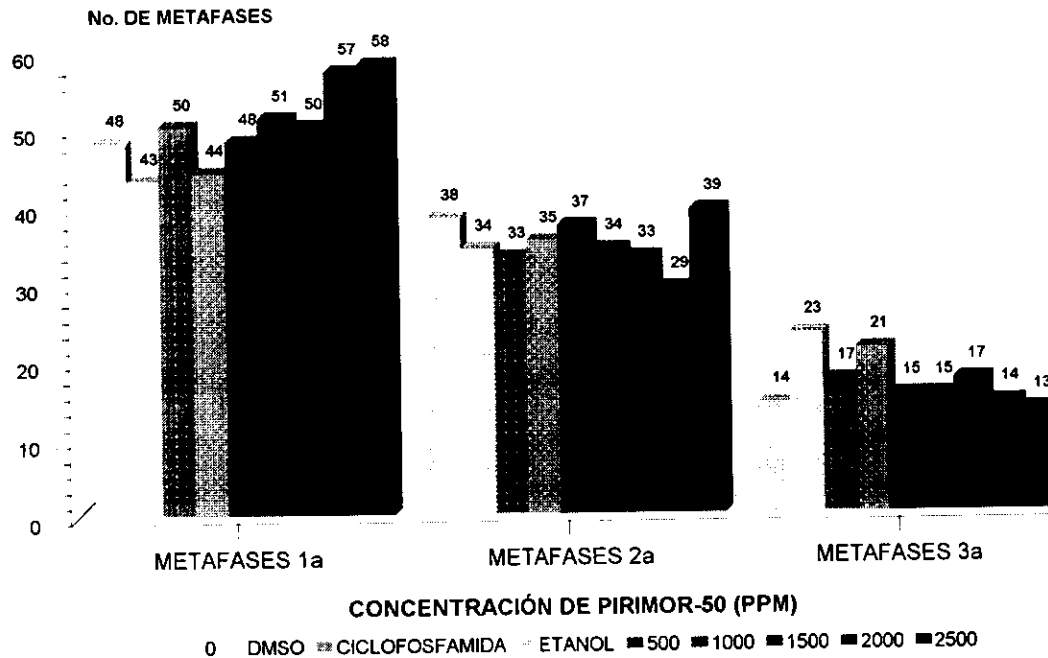


Figura 45. Efectos sobre la cinética de proliferación celular (CPC) de linfocitos humanos en cultivo inducidos por el insecticida carbámico pirimor-50, con dos horas de tratamiento con activación metabólica vegetal

Anexos

## ANEXO 1

### Algunos de los plaguicidas formulados más comúnmente usados y sus características

Formulación	Características	Ventajas y desventajas	Ejemplos de productos
<b>1. Preparaciones líquidas</b>			
a) Concentrados emulsionables (CE).	Diluido con agua para formar una masa lechosa o un líquido transparente para usar con spray.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de mezclar y aplicar.</li> <li>• Requiere pequeña agitación.</li> <li>• Residuo no visible o pequeño.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácilmente absorbible a través de la piel.</li> <li>• Los disolventes pueden causar corrosión en el envase del spray.</li> <li>• Fitotóxico para algunas plantas.</li> </ul>	Dursban LO, Se-Irofin, Diazinon, otros.
b) Soluciones (S).	Soluble en agua o aceite. Se trató de un líquido claro usado con spray.	Pocos productos disponibles para su aplicación como plaguicidas urbanos.	
c) Filtrantes (F).	Diluidas con agua. La mezcla forma una suspensión.	Pocos productos disponibles para el manejo como plaguicidas urbanos.	
d) Microencapsulado flotante (MF).	Los ingredientes activos se presentan encapsulados en cápsulas de plástico delgado suspendidas en agua para pulverizar.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Excelente actividad residual.</li> <li>• Muy baja toxicidad.</li> <li>• No se altera fácilmente en agua.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Normalmente más caro.</li> <li>• Requiere constante agitación.</li> <li>• Residuos visibles en algunas superficies.</li> </ul>	Knox-out 2FM, Dursban ME.
e) Fumigantes.	Los ingredientes activos son gases que se presentan a veces como líquidos cuando se embalan a cierta presión, que se transforman en gases al liberarlos durante la aplicación. Algunos son líquidos volátiles, y se convierten en gases cuando se liberan a la atmósfera.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tóxico para un amplio número de plagas.</li> <li>• Puede penetrar estructuras, sue- los, granos, alimentos almacenados.</li> <li>• Los tratamientos de esta naturaleza matan normalmente la mayoría de las plagas del área tratada.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Las áreas tratadas tienen que ser tapadas o cerradas para prevenir la liberación de gas tóxico a la atmósfera.</li> <li>• Alta toxicidad para el hombre. Es necesario medidas y equipo de protección especiales y procedimientos utilizados adecuadamente.</li> </ul>	Vikane, Metho-gas.
<b>2. Preparaciones secas:</b>			
a) Polvos.	Los ingredientes activos transportados en partículas secas (arcilla inerte o talco) o polvo es activo en un 100%.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de usar. No es necesario mezclar previamente a su uso.</li> <li>• Deja residuos cuando se seca.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lleva tiempo adquirir experiencia para su aplicación correcta.</li> <li>• Posibles residuos visibles.</li> <li>• Dificultad de controlar la dispersión de partículas de polvo en las áreas no dianas.</li> </ul>	Acido bórico en polvo, Ficam D, Dursban D, Drione, Diatic.

Continúa

Algunos de los plaguicidas formulados más comúnmente usados  
y sus características (Continuación)

Formulación	Características	Ventajas y desventajas	Ejemplos de productos
<b>2. Preparaciones secas (Continuación):</b>			
b) Polvo húmedo (PH).	Usualmente contiene 50 % o más de ingredientes activos. No se disuelven en agua y permanecen suspendidos.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejor efecto residual en superficies porosas que los concentrados emulsionables (CE).</li> <li>• Más baja fitotoxicidad que los CE.</li> <li>• Menos absorción por la piel y ojos que los CE.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Riesgo de inhalación al aplicar cuando se vierte y mezcla el polvo concentrado.</li> <li>• Requiere constante agitación en el recipiente de spray.</li> <li>• Los residuos pueden resultar visibles.</li> </ul>	Demon WP, Dursban W, Ficam W, Baygon WP, Commodore WP
c) Polvos mojables (PM).	Similar en apariencia que los polvos, pero cuando los mezclan con agua se disuelven rápidamente y forman una auténtica solución.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Las mismas que los polvos.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Riesgo de inhalación al aplicar o mezclar el polvo concentrado a la formulación.</li> </ul>	Orthene.
d) Cebos (C).	Los ingredientes activos van mezclados con comida y sustancias que contienen atracción a la formulación para los roedores. Pueden ser sólidos o líquidos. El ingrediente activo se encuentra normalmente en una proporción inferior al 5 %.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de usar.</li> <li>• Larga actividad residual.</li> <li>• El área no necesita ser cubierta porque las especies se dirigen selectivamente hacia los cebos.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunos cebos pueden ser peligrosos para niños o animales no diana.</li> <li>• Los cebos tienen que competir contra otros alimentos disponibles para las especies diana.</li> <li>• La muerte de la plaga puede causar problemas de odor.</li> </ul>	Max Force, Combat (Roaches), Talon, Con- tract (Roden- ts), Avitrol.
e) Gránulos (G).	Las partículas granu- ladas son más lar- gas que los polvos. Los ingredientes activos son trans- portados en arcilla u otro material. El ingrediente activo reviste el gránulo o es absorbido en su interior. La propor- ción del activo es baja, normalmente del 1-15 %.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de usar, no necesita formu- larse.</li> <li>• Provee un residuo más persisten- te que PHs y CEs.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Más costosos que PHs o CEs.</li> <li>• Pueden necesitar mojarse para ac- tivar la acción del plaguicida.</li> </ul>	
f) Fumigantes.	Tabletas o píldoras. El fumigante es lentamente libera- do cuando reaccio- na con el aire o tie- rra mojada.	<b>Ventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de manejar.</li> <li>• Bajo riesgo.</li> <li>• Requiere un pequeño equipamien- to para las aplicaciones.</li> </ul> <b>Desventajas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesita dedicar un periodo de tiempo mayor para ejecutar la fu- migación.</li> </ul>	

## ANEXO 2

### INTOXICACIONES CON CARBAMATOS

Los carbamatos inhiben a la colinesterasa; sin embargo, en comparación con los organofosforados la supresión es mas rápida y reversible.

Los síntomas primarios son la estimulación del sistema parasimpático y se pueden presentar como sigue:

- 1) Contracción de la pupila (miosis)
- 2) Sudoración excesiva
- 3) Debilidad
- 4) Pulso débil
- 5) Náuseas y vómito
- 6) Temblores musculares
- 7) Visión borrosa
- 8) Calambres abdominales y diarrea

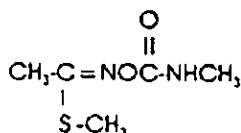
El orden de los síntomas puede variar, pero los enumerados aquí son los que primero se manifiestan cuando hay intoxicación.



## ANEXO 3

### PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

NOMBRE COMERCIAL:	LANNATE
NOMBRE COMUN:	Melthomyl
NOMBRE QUIMICO:	S-Metil N-[(metilcarbamoi]oxi] tioacetimidato
REGISTRO EPA:	352-342-AA
FORMULA EMPIRICA:	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
FORMULA ESTRUCTURAL:	



FORMA FISICA:	Cristales sólidos.
PESO MOLECULAR:	162.2
GRAVEDAD ESPECIFICA:	1.2946 25°/4°
OLOR:	Ligeramente sulfuroso.
COLOR:	Blanco.
PUNTO DE FUSION:	78-79°C
PRESION DEL VAPOR:	5 × 10 <sup>-5</sup> mm de mercurio a 25°C.
SOLUBILIDAD:	En agua 5.8 g/100 g; etanol 42 g/100 g; metanol 100 g/100 g; acetona 73 g/100 g; tolueno 3 g/100 g.
ESTABILIDAD:	Estable en forma sólida, en solución acuosa bajo condiciones convencionales. La aireación, luz solar, alcalinidad y altas temperaturas incrementan el grado de descomposición en agua.

### METODOS ANALITICOS

ANALISIS:	Por el método de cromatografía de gases utilizando un detector microcolorimétrico sulfúrico.
RESIDUOS:	El proceso de análisis está descrito como: Microcoulometric Gas Chromatography J. Ag. & Food Chem. 16:(4)554-557 (1968).

## ANEXO 4

### TOXICOLOGIA

Methomyl es un poderoso agente inhibidor de la acetilcolinesterasa. Los datos obtenidos en el Laboratorio de Toxicología y Medicina Industrial de Haskell (Du Pont) indican lo siguiente:

#### TOXICIDAD ORAL: (ratas albinas)

- LD<sub>50</sub> 17 mg/Kg. (machos); 23.5 mg/Kg. (hembras), para LANNATE 90 polvo soluble en agua.
- LD<sub>50</sub> 130 mg/Kg. (machos) para LANNATE L al 24%.
- LD<sub>50</sub> 4060 mg/Kg. (machos) para LANNATE polvo al 2%.

#### EFECTOS DERMALES: (conejos albinos)

- Una suspensión acuosa al 5% de polvo humectable y una pasta (propilenglicol) al 60% aplicada sobre la piel, no produjo ninguna reacción irritante.
- LD<sub>50</sub> 5000 mg/Kg. para LANNATE no formulado en una solución acuosa al 52.8%.

#### IRRITACION EN LOS OJOS: (conejos)

- LD<sub>50</sub> (24% líquido) = 5880 mg/Kg.

Administrando 10 mg. de LANNATE en forma de polvo o en una solución con propilenglicol a los ojos de los conejos, se produjo una leve conjuntivitis y congestión del iris el día en que se hizo la prueba; no hubo daño de la córnea. Las presentaciones descritas del producto causaron constricción pupilar. En adición, 0.1 ml. de LANNATE-L no diluido causó un daño moderado a la córnea la cual sanó a los 14 días.

#### INHALACION: (ratas albinas)

Se reporta que LANNATE no formulado mostró alta toxicidad cuando se expuso por cuatro horas a un grupo de 4 ratas en una atmósfera que contenía el insecticida en forma de aerosol, cuando el aire fue calentado a 100-130°C.

LC<sub>50</sub> 0.30 mg/Li. de aire.

Este producto es tóxico a peces, pájaros y otros animales silvestres. Tóxico a las abejas cuando reciben directamente la aspersión; una vez que LANNATE ha perdido la humedad, no causa daño a las abejas e insectos benéficos, ya que su acción se expresará en los insectos masticadores (ingestión).

## ANEXO 5

### TOLERANCIA DE RESIDUOS

10 ppm	Alfalfa, forraje a base de residuos de: chícharo, frijol, maíz, soya.
6 ppm	Espinacas.
5 ppm	Cabaza, chícharo, durazno, lechuga, nectarina, pera, uva.
3 ppm	Apio, brocoli.
2 ppm	Coles de Bruselas, coliflor, limones, naranjas, tangerinas; vainas frescas de: frijol común y otras vainas de leguminosas.
1 ppm	Forraje de sorgo y manzanas.
0.2 ppm	Ajo, berabel, calabaza, camote, cebolla, chile, jitomate, melón, nabo, papa, pimiento morrón, rábano, sandía, soja, sorgo, zanahoria.
0.1 ppm	Cacahuete, frijol, garbanzo, maíz, semilla de algodón.

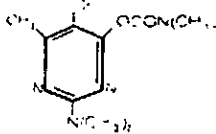
## ANEXO 6

### PLAGAS DE AFIDOS QUE CONTROLA PIRIMICARB

CULTIVO	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMUN	DOSIS (kg i.a. / ha)
Alfalfa	<i>Acyrtosiphum pisum</i>	Afido del chicharo	0.100 - 0.250
	<i>Aphis kondoi</i>	Afido verde-azul	
	<i>Therioaphis maculata</i>	Afido de la alfalfa	
	<i>Therioaphis trifolii</i>	Afido manchado de la alfalfa	
Manzana	<i>Aphis pomi</i>	Afido verde de la manzana	0.250 - 0.375
	<i>Eriosoma lanigerum</i>	Afido lanudo de la manzana	
	<i>Dysaphis platynea</i>	Afido rizado de la hoja rosa	
Cereales	<i>Sitobion avenae</i>	Afido del grano	0.125 - 0.250
	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Afido de la cereza	
	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Afido de las hojas del cereal	
	<i>Schizaphis graminum</i>	Afido del trigo de primavera	
	<i>Metopolophium dirhodum</i>	Afido rosa del grano	
Cítricos	<i>Aphis spiraecola</i>	Afido verde de cítrico	0.250 - 0.375
	<i>Toxoptera aurantii</i>	Afido café de los cítricos	
	<i>Toxoptera citricidus</i>	Afido negro de los cítricos tropicales	
	<i>Aphis citricola</i>	Afido de los cítricos	
Ornamentales	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	0.250
	<i>Aulacorthum solani</i>	Afido de la papa de invernadero	
	<i>Macrosiphum rosae</i>	Afido de la rosa	
Durazno	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	0.250 - 0.750
	<i>Brachicandus persicae</i>	Afido negro del durazno	
	<i>Aphis citricole</i>	Afido de los cítricos	
Papas	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	0.140 - 0.280
	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Afido de la papa	
	<i>Aulacorthum solani</i>	Afido de la papa de invernadero	
	<i>Aphis nasturtii</i>	Afido de la papa	
Betabel	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	0.140 - 0.250
	<i>Aphis fabae</i>	Afido negro del frijol	
Tabaco	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y el durazno	0.200 - 0.250
	<i>Aulacorthum solani</i>	Afido de la papa de invernadero	
Vegetales	<i>Brevicoryne brassicae</i>	Afido gms de la col	0.140 - 0.280
	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	
	<i>Aphis fabae</i>	Afido negro del frijol	
	<i>Acyrtosiphum pisum</i>	Afido del chicharo	
	<i>Nasonona ribis</i>	Afido de la lechuga	
Invernadero	<i>Myzus persicae</i>	Afido de la papa y durazno	
	<i>Aulacorthum solani</i>	Afido de la papa de invernadero	
	<i>Macrosiphum rosae</i>	Afido de la rosa	
	<i>Macrosiphonella sanborni</i>	Afido del crisantemo	

## ANEXO 7

### PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL PIRIMICARB

<b>Nombre químico</b>	2- dimetilamino-5, 6-dimethylpyrimidin-4-yl dimetilcarbámico
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Fórmula estructural</b>	
<b>Peso molecular</b>	238.3
<b>Nombre común</b>	Pirimicarb
<b>Otro nombre</b>	Pirimor, Aphox, Rapid, Femos, Abol
<b>Otras designaciones</b>	PP062 ICIA0062
<b>Punto de fusión</b>	90.5 °C
<b>Presión de vapor</b>	1.6 X 10 <sup>-3</sup> mm Hg a 25 °C 1.7 X 10 <sup>-4</sup> mm Hg a 45 °C 1.8 X 10 <sup>-4</sup> mm Hg a 65 °C
<b>Solubilidad</b>	g / 100 ml a 25 °C en: agua 0.27 etanol 25.00 acetona 40.00 metanol 23.00 xileno 29.00 cloroformo 32.00
<b>Reacciones químicas</b>	Forma sales estables con ácidos orgánicos e inorgánicos. Se degrada por ebullición prolongada con ácidos y álcalis. Las soluciones acuosas tienden a ser inestables a la luz.
<b>Propiedades corrosivas</b>	No corrosivo para los materiales normalmente usados para equipos de aspersión.
<b>Olor</b>	Ninguno

