

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Especialización y Maestría en Protección Vegetal

Ecotoxicología
Bioensayos de toxicidad

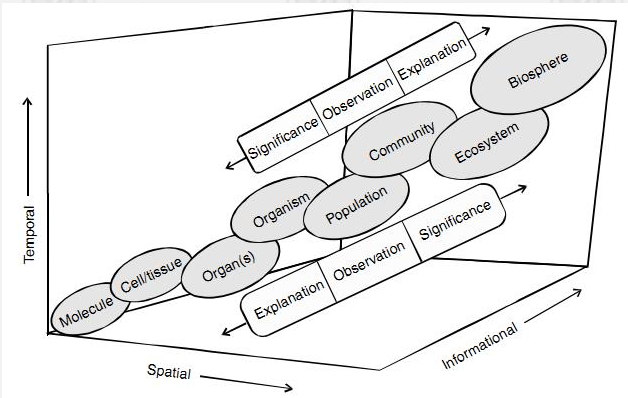
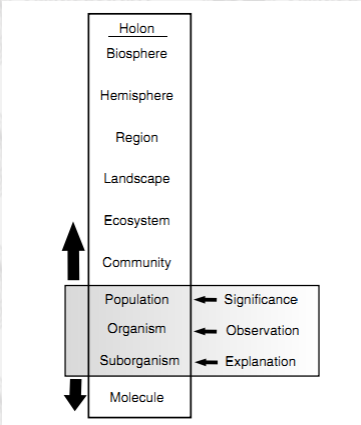


Dr. Pablo M. Demetrio
pablo.demetrio@quimica.unlp.edu.ar

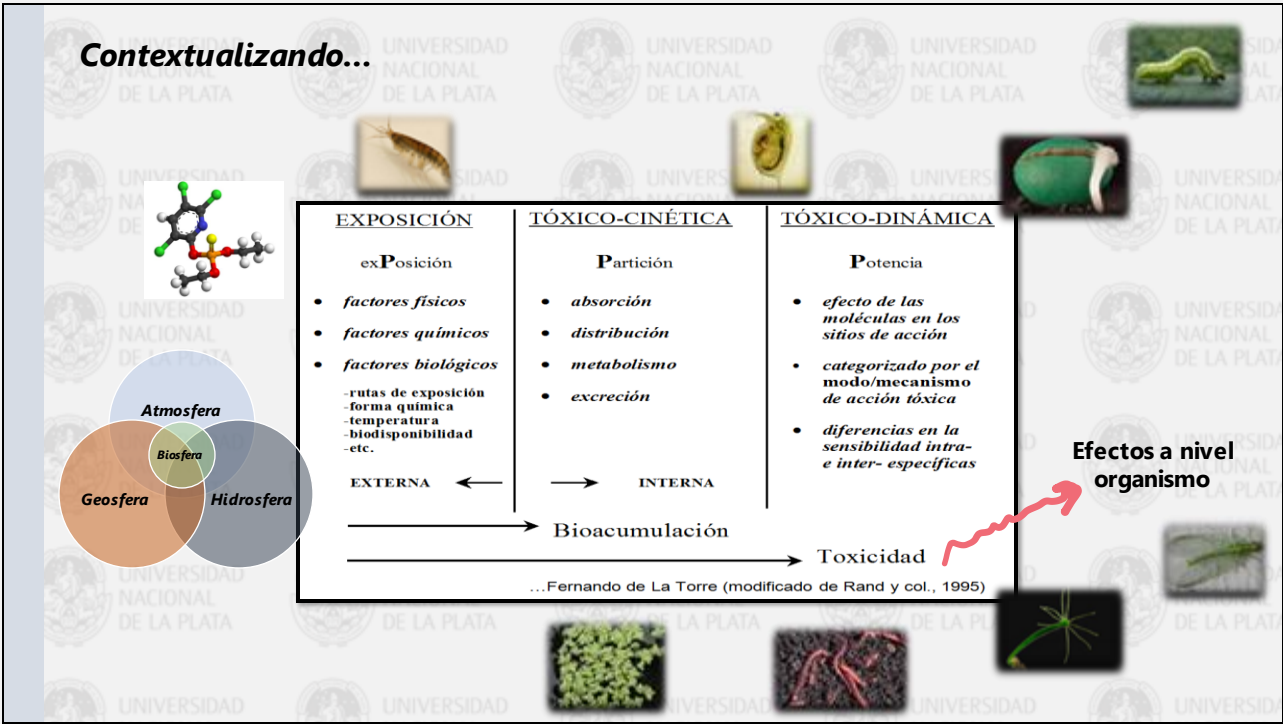
Centro de Investigaciones del Medio Ambiente
CIM / CONICET-UNLP
<https://cim.conicet.gov.ar/>

1

Contextualizando...



2

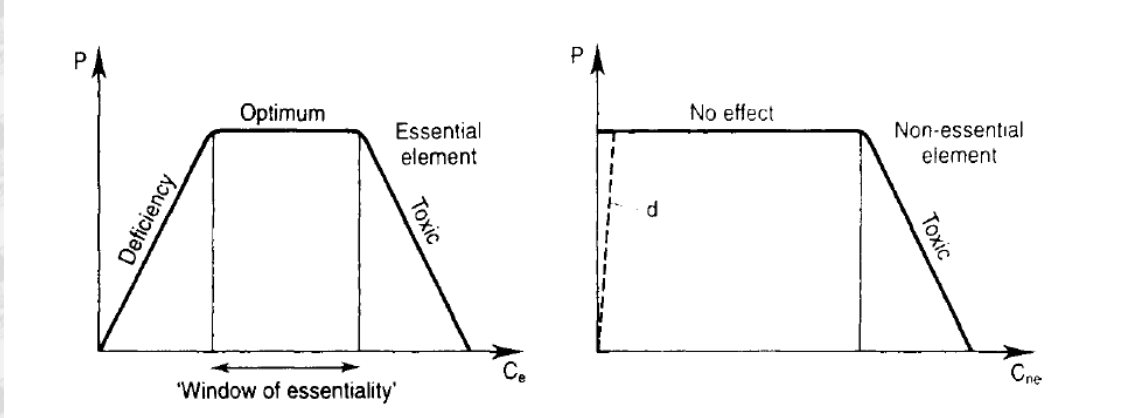


3



6

Respuestas biológicas



7

Respuestas biológicas a nivel organismo



8

Respuestas biológicas a nivel organismo

Available energy

↓

Behavior Growth Survival Reproduction?

Time between life cycle events

Phenotype- and environment-dependent trade-offs/optimization

↓

Conditional maximum fitness

Efectos subletales

Crecimiento y Desarrollo

Reproducción

Comportamiento

Fisiología

Timing

Survival

Reproduction

Behavior

Factor A

Factor B

9

Respuestas biológicas a nivel organismo

Crecimiento y Desarrollo

Reproducción

Comportamiento

Fisiología

Bioassays with sediment

Standardized test protocol

Freshwater invertebrates

Mortality

Growth

Standardized test protocol

Amphibians

Mortality

Growth

Behavior

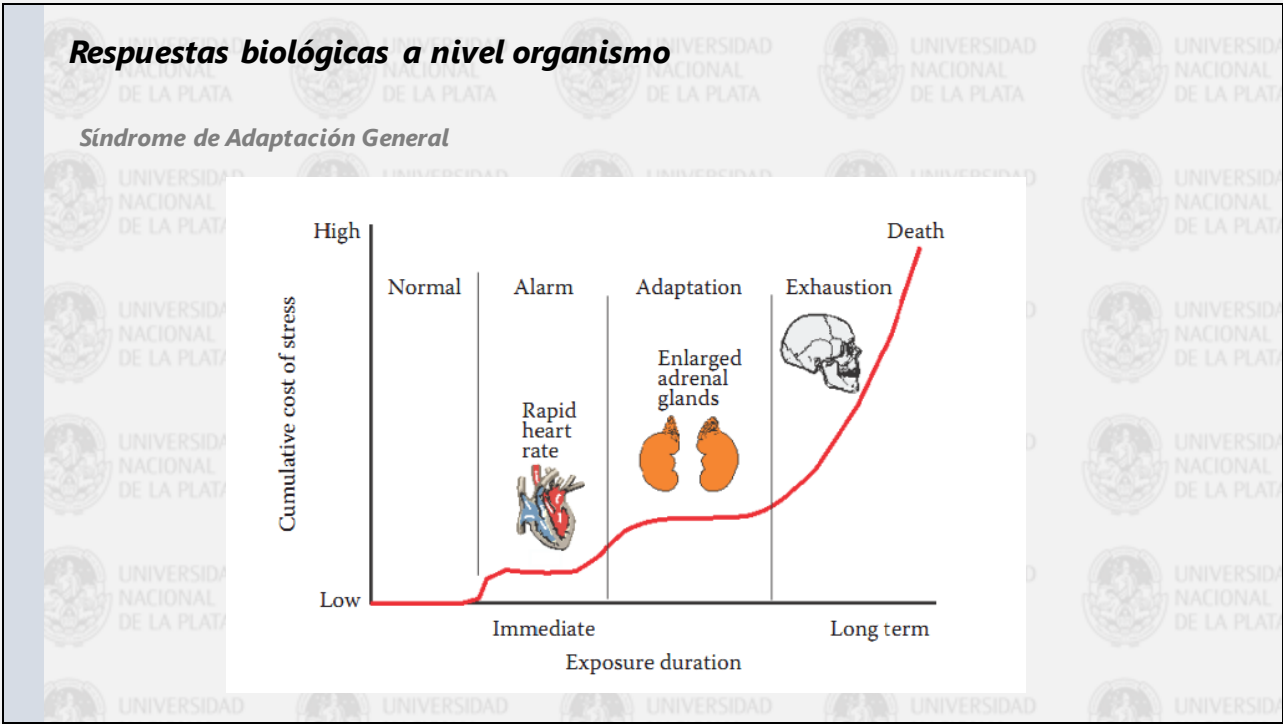
Development

Morphologic abnormalities

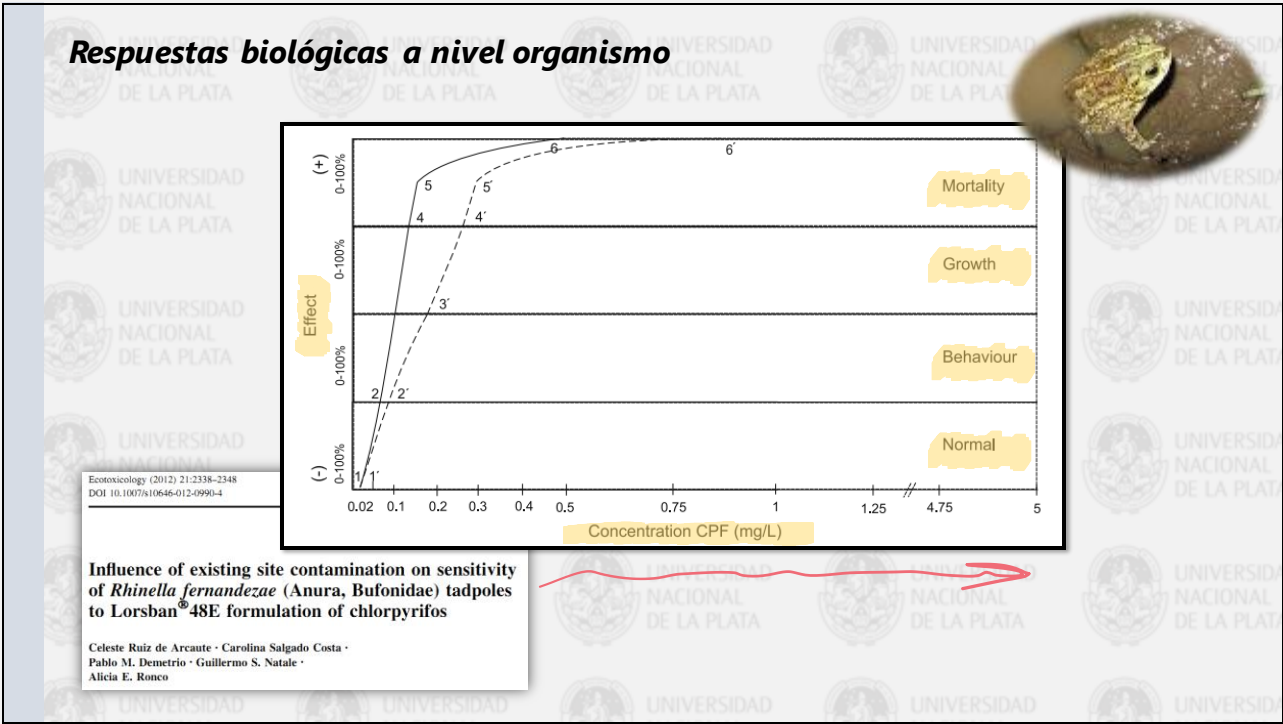
Sites	Mortality	Growth Inhibition	Abnormalities
S0			
S1			
S2			
S3			
S4			
S5			

Fig. 4. Morphologic abnormalities detected in tadpoles of *Rana pipiens*. Panel A, normal tadpole without morphologic abnormalities; Panel B, hyperpigmentation; Panel C, presence of subcutaneous air (arrows); Panel D, displaced intestine (arrow); Panel E, tail flexion (arrow); Panel F, normal larva; Panel G, absence of keratinization (arrows).

10



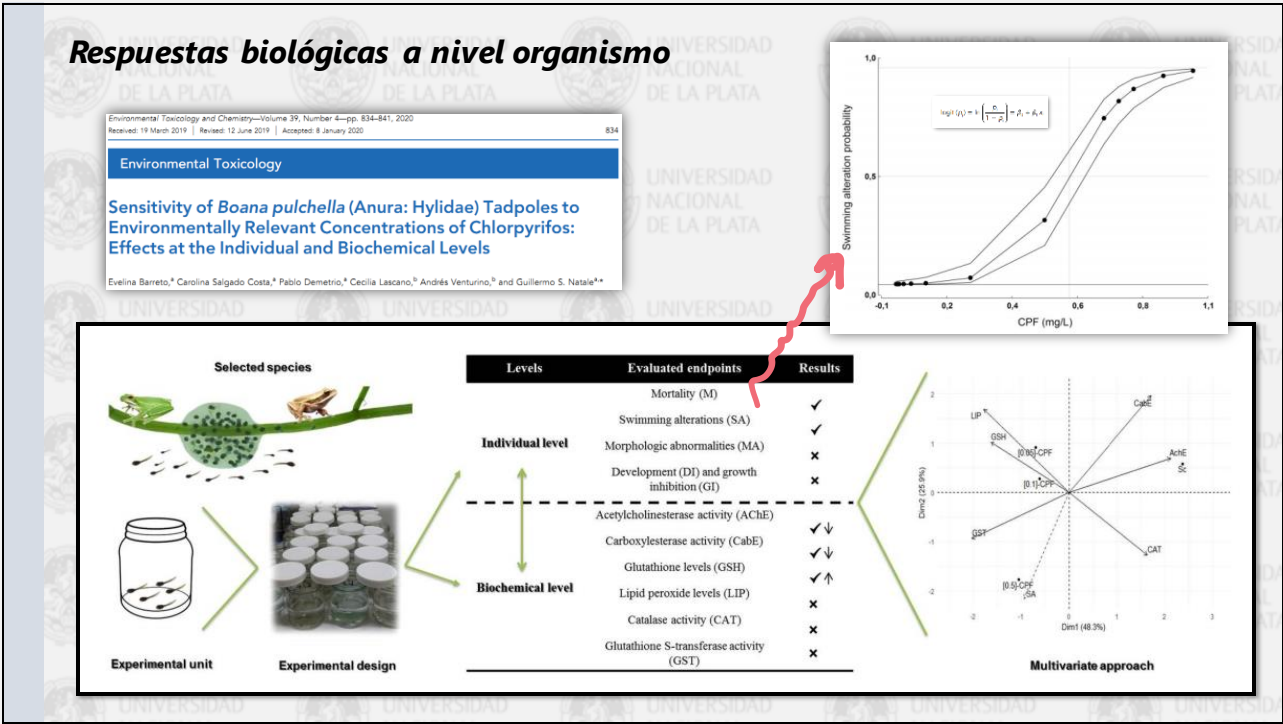
11



12



13



14

Respuestas biológicas a nivel poblacional

$$\sum_1^n e^{-rx} l_x m_x = 1 \quad N_t = N_0 e^{rt} \quad \lambda = e^r$$
$$\frac{dN}{dt} = rN \frac{(K - N)}{K}$$
$$p = 1 - \frac{e}{m}$$
$$\frac{dp}{dt} = mp(1 - p)ep$$

Entidad ecológica	Atributo
Organismo	Tasas fisiológicas (fotosíntesis)
	Anormalidades
	Supervivencia
	Crecimiento
	Reproducción
Población	Tamaño poblacional
	Alteraciones genéticas
	Tasa reproductiva
	Extinción local
Comunidad y ecosistemas (ensambles)	Riqueza específica
	Abundancia
	Producción
	Área
	Función específica (remoción de sólidos)
	Estructura física

17

Respuestas biológicas a nivel comunidad/ecosistema

$$S = \# \text{ spp}$$
$$H = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$
$$J = \frac{H}{\ln S}$$

Entidad ecológica	Atributo
Organismo	Tasas fisiológicas (fotosíntesis)
	Anormalidades
	Supervivencia
	Crecimiento
	Reproducción
Población	Tamaño poblacional
	Alteraciones genéticas
	Tasa reproductiva
	Extinción local
Comunidad y ecosistemas (ensambles)	Riqueza específica
	Abundancia
	Producción
	Área
	Función específica (remoción de sólidos)
	Estructura física

18

¿Cómo mido la toxicidad...?

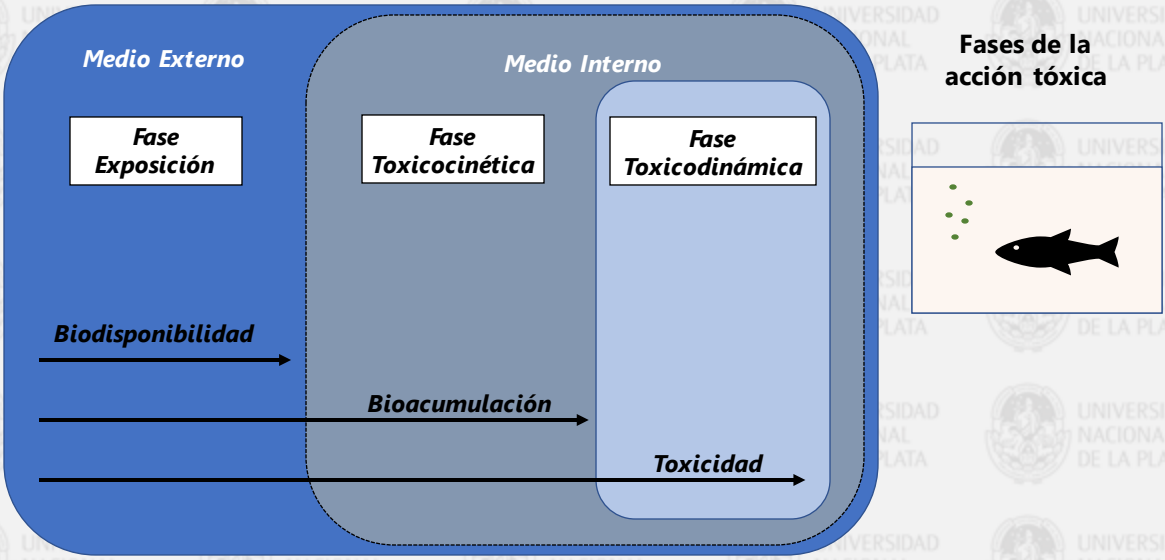
No se ha desarrollado aun ningún instrumento que permita medir toxicidad.
Solo la materia viva puede ser utilizada para medirla.

No existe ninguna especie, sistema o ensayo que mida o indique los efectos
potenciales de todos los compuestos químicos o mezclas de los mismos .

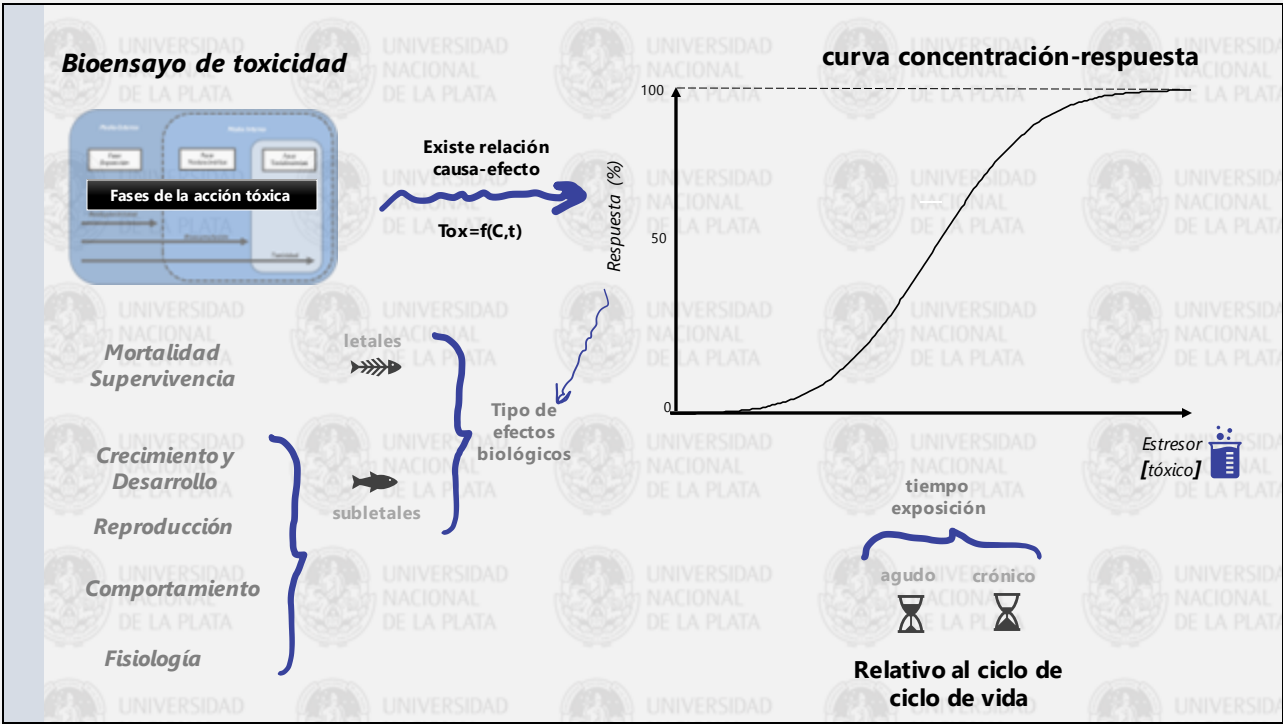
19

Bioensayo de toxicidad

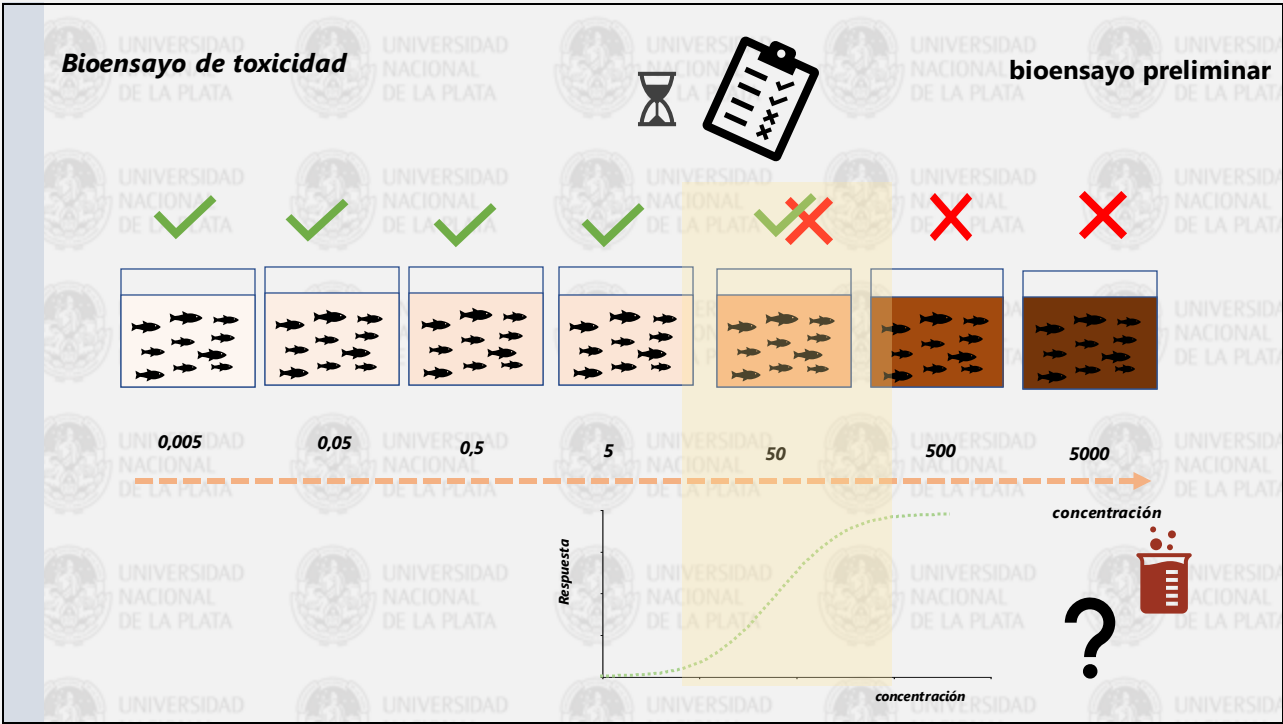
Experimento para evaluar la potencia de un tóxico utilizando la respuesta de organismos vivos



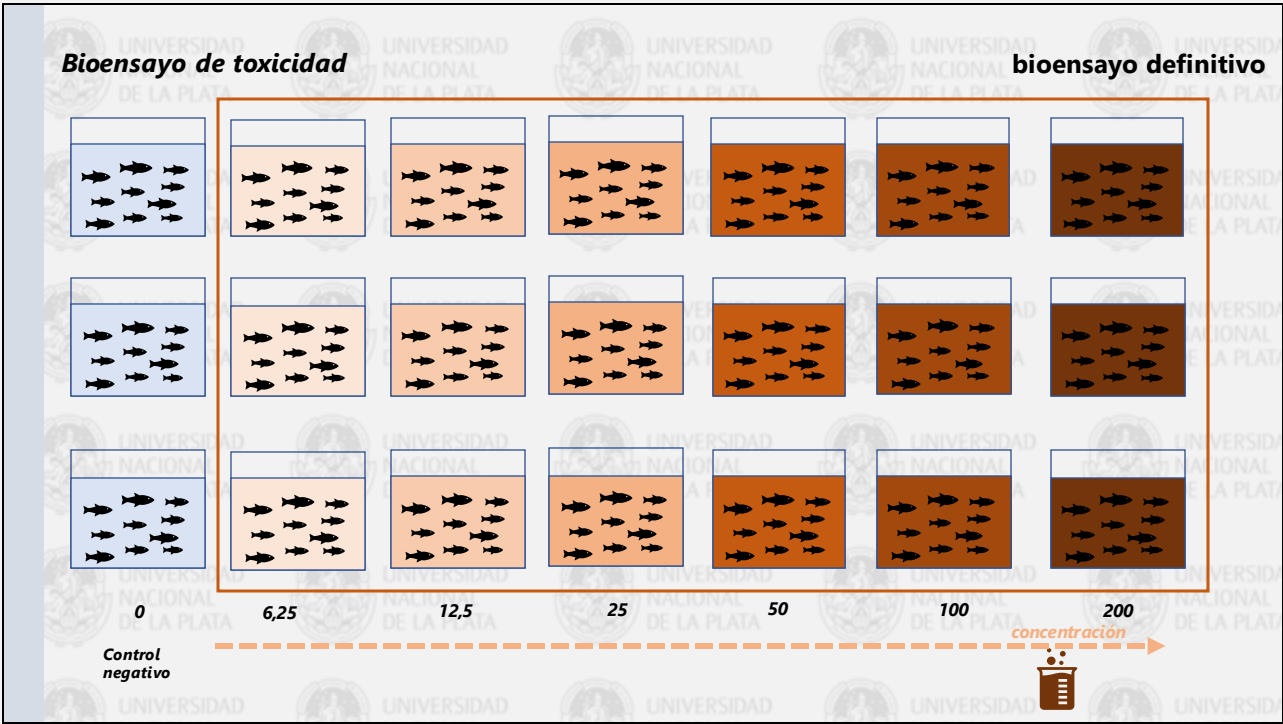
20



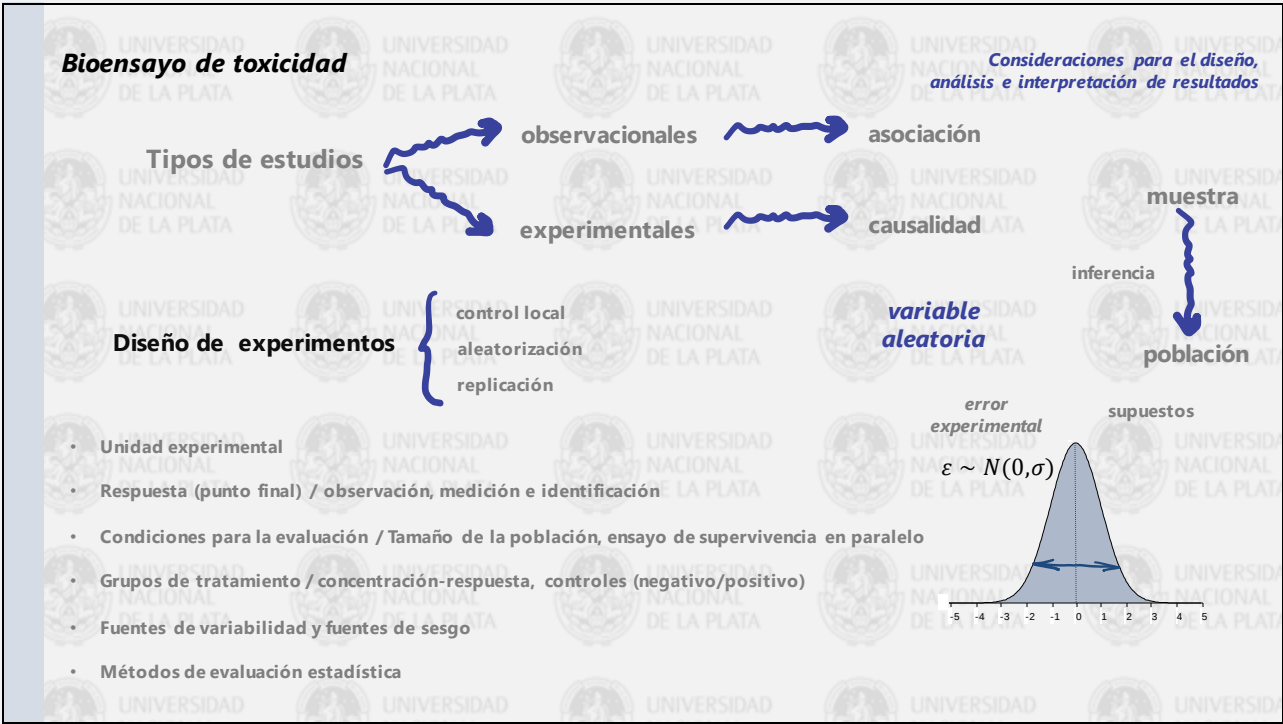
21



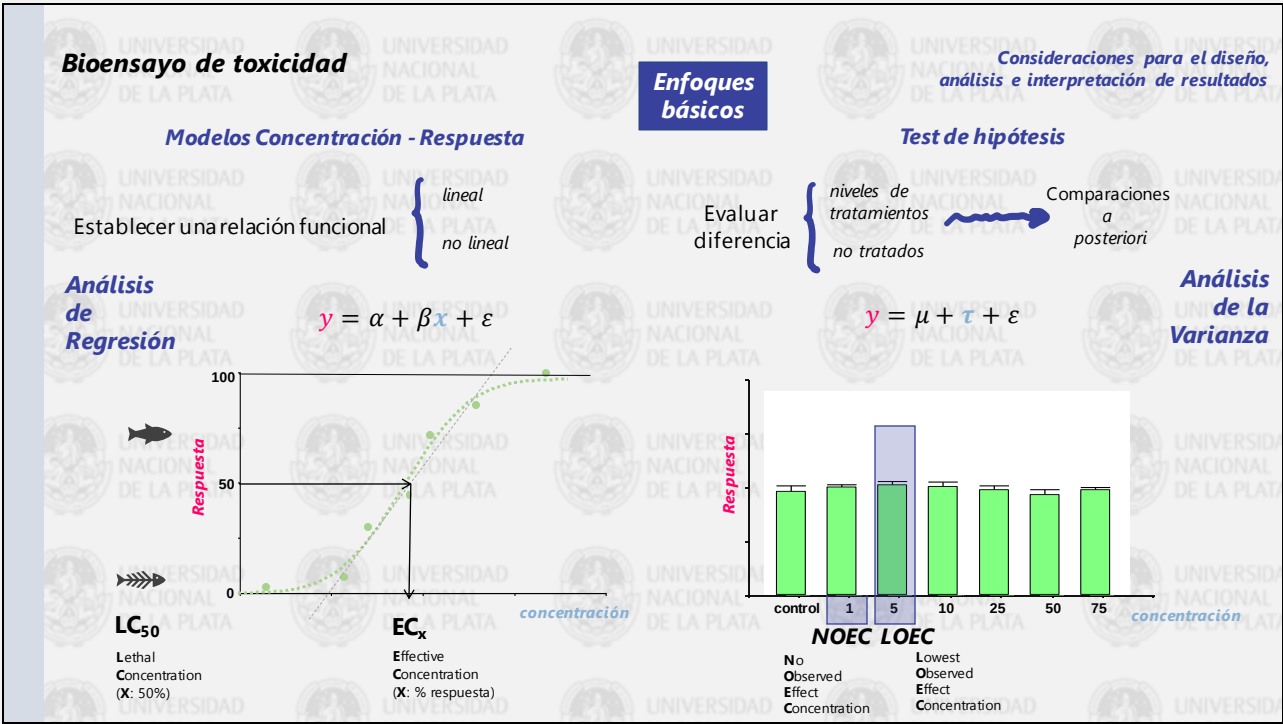
22



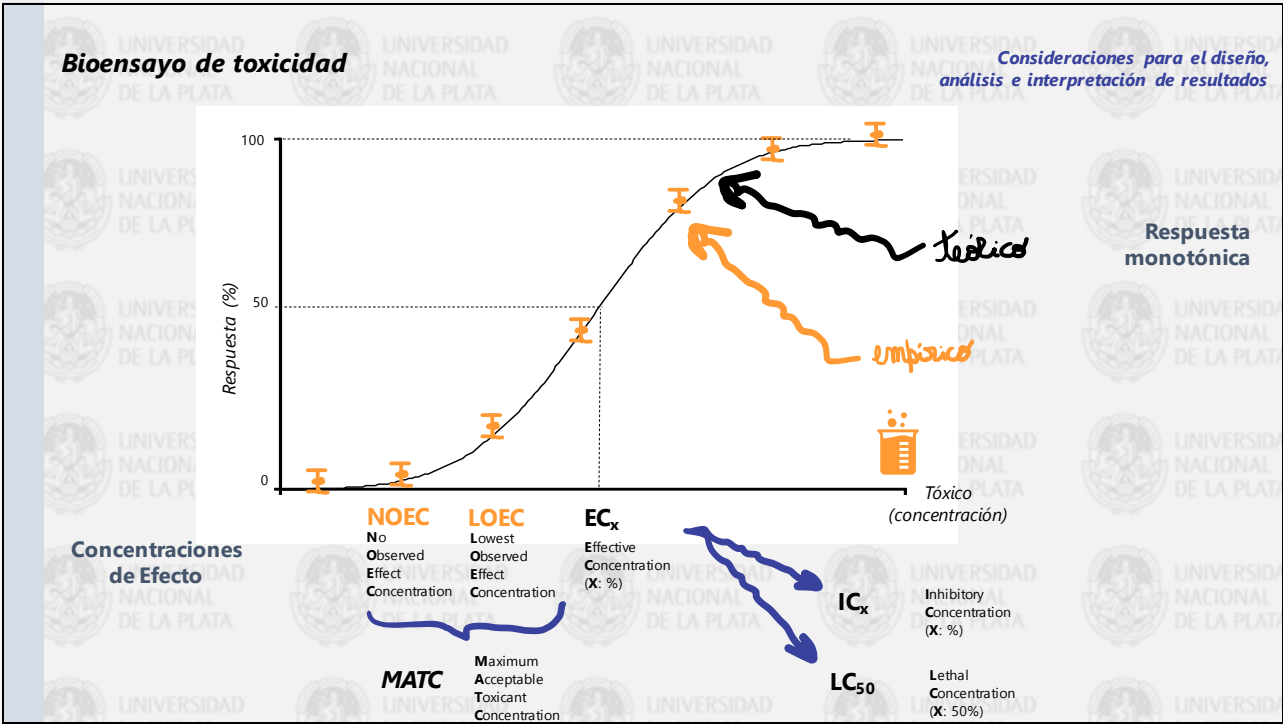
23



24



25



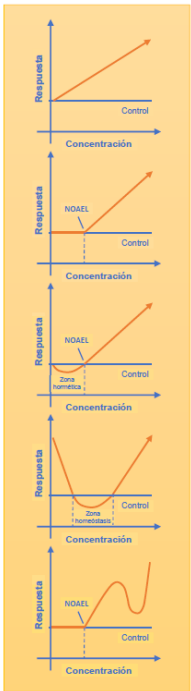
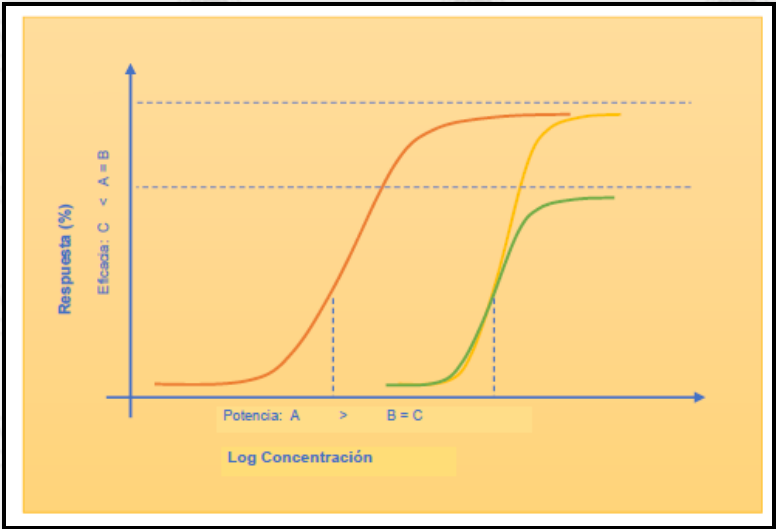
26

Bioensayo de toxicidad

- Agudo / Crónico
- Letal / Subletal
- Criterios de aceptación de resultados
- Ajustes / Intervalos de confianza
- Puntos finales de evaluación
- Puntos finales estadísticos
- DL50 / CL50 / EC50 / IC50
- IC10 / IC1
- NOEC / LOEC

36

Curva concentración-respuesta



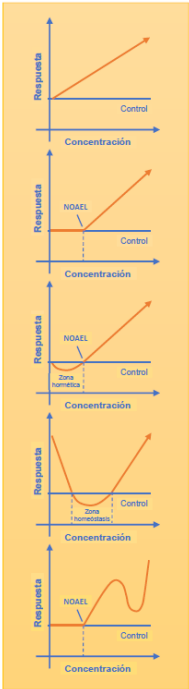
41

Curva concentración-respuesta

La **hormesis** es un efecto que tiene lugar cuando la sustancia ensayada es estimulante a bajas concentraciones pero es inhibitoria a concentraciones altas.

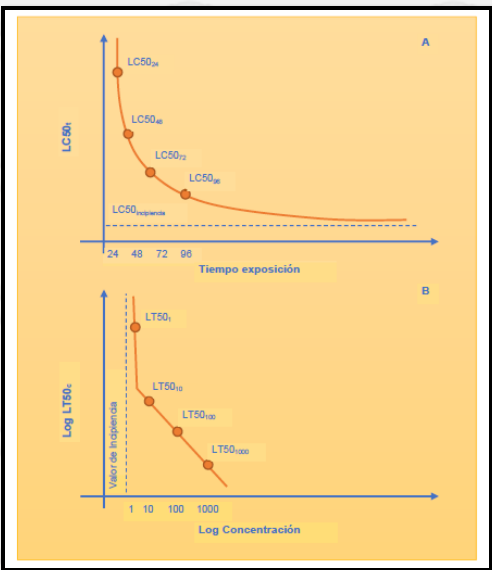
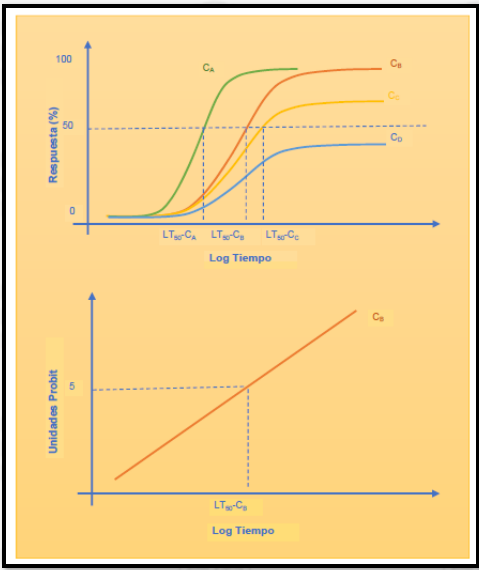
El resultado es una **relación concentración/respuesta bifásica** (o en forma de U).

Este efecto de estimulación observado puede atribuirse a la sustancia ensayada, pero también a un artefacto experimental (ej.: efecto de solvente, error experimental, problema de adjudicación de los tratamientos a las unidades experimentales no al azar, etc.)



42

Curva tiempo-respuesta



43

Ejemplos de bioensayos de toxicidad

48



53

UNIVERSIDAD NACIONAL

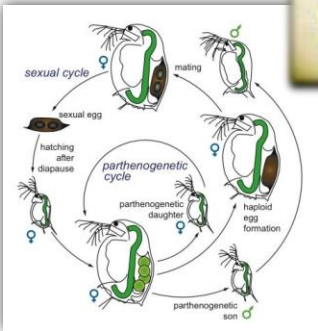
ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS

ESTANDARIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN, RESULTADOS Y APLICACIONES

Editado por Gabriela Castillo

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Daphnia magna Reproduction Test



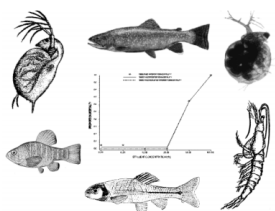
EPA

United States Environmental Protection Agency

Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms

Fifth Edition

October 2002



ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS

ESTANDARIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN, RESULTADOS Y APLICACIONES

55

Bioensayos de toxicidad



Mantenimiento y cría



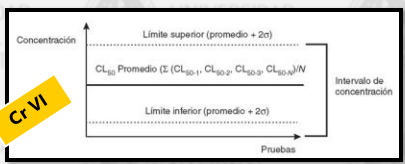
Madurez sexual Inicio de partos **neonatos**

0-24 h 1 semana 2 semanas 3 semanas 4 semanas 5 semanas

Neonatos con los que se reinicia un nuevo cultivo

Hembras que se descartan

QA&QC



Cr VI

Concentración

Limite superior (promedio + 2σ)

CL₅₀ Promedio ($\Sigma (CL_{50,1} + CL_{50,2} + CL_{50,3} + CL_{50,4})/4$)

Limite inferior (promedio - 2σ)

Intervalo de concentración

Pruebas

neonatos < 24 hs

20 ± 2 °C, e iluminación 600-1 000 lux

8 h/16 h

Agregar diez organismos a cada vaso

Réplicas

Control positivo (Cr VI) Control negativo

Concentraciones

bioensayo agudo

48 h

estático

LC₅₀ mortalidad

bioensayo crónico

21 d

estático con renovación

NOEC LOEC crecimiento reproducción

57

Bioensayos de toxicidad

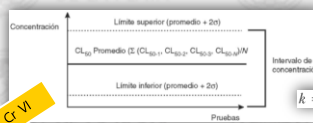


ayuno 24 h

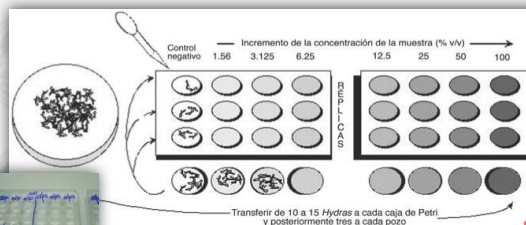
Bioensayos de

Control de Calidad

Cr VI



$$k = (\ln 2) / T = 0,693 / T$$



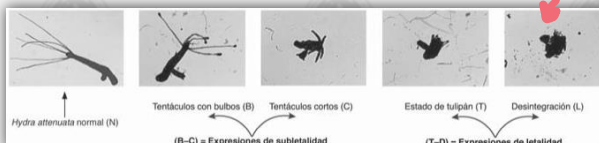
96 h

[illegible]

Resultados

LC₅₀ / EC₅₀

Toma de Datos

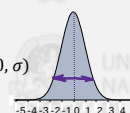


58

Modelo Concentración-Respuesta

$$y = \alpha + \beta x + \varepsilon$$

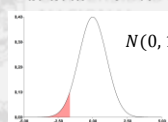
$$\varepsilon \sim N(0, \sigma)$$



$$y = a + bx$$

NED+5

Distribución Normal Estándar



probit

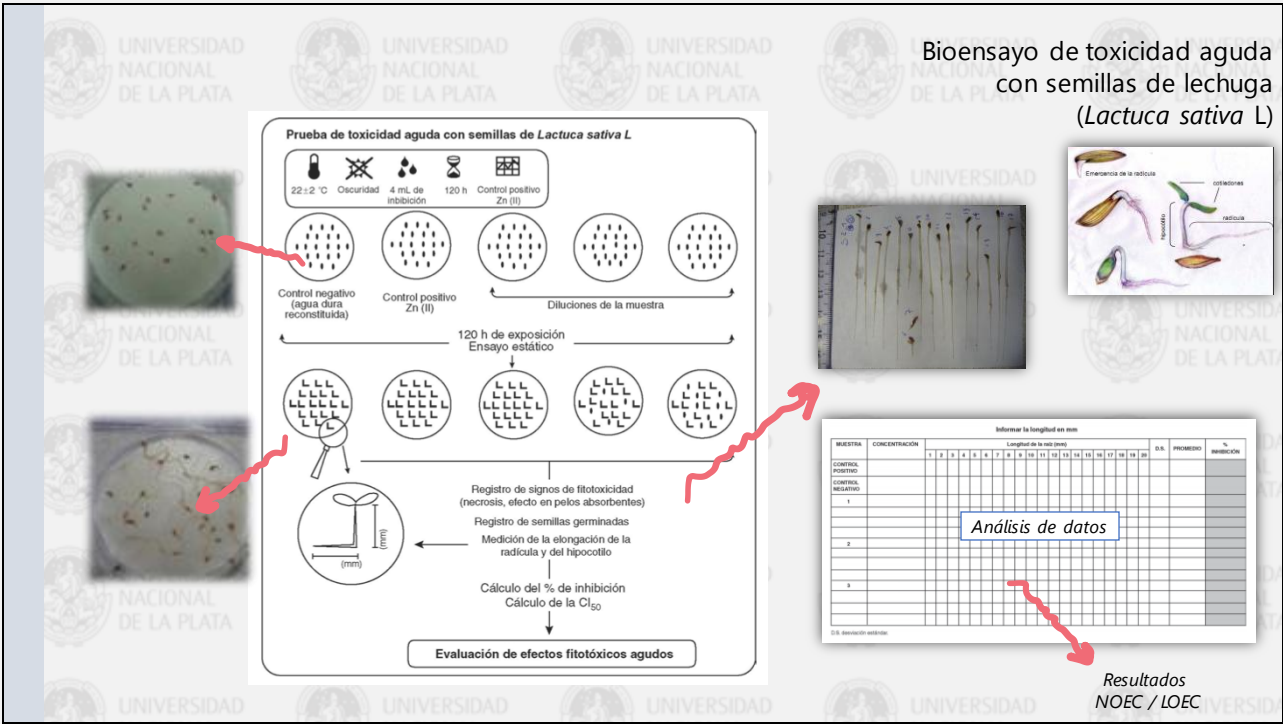
5

$$EC_{50} = 19,18$$

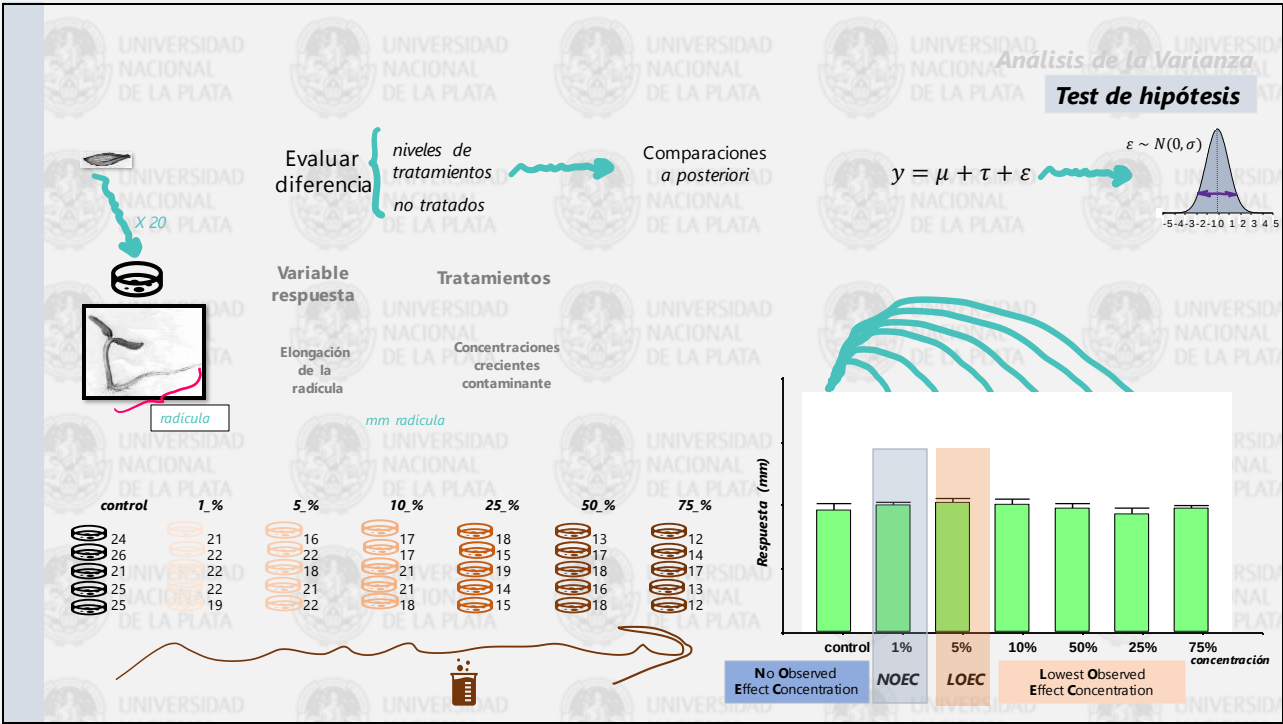
101 28

1,28 $\log 10$ [concentración]

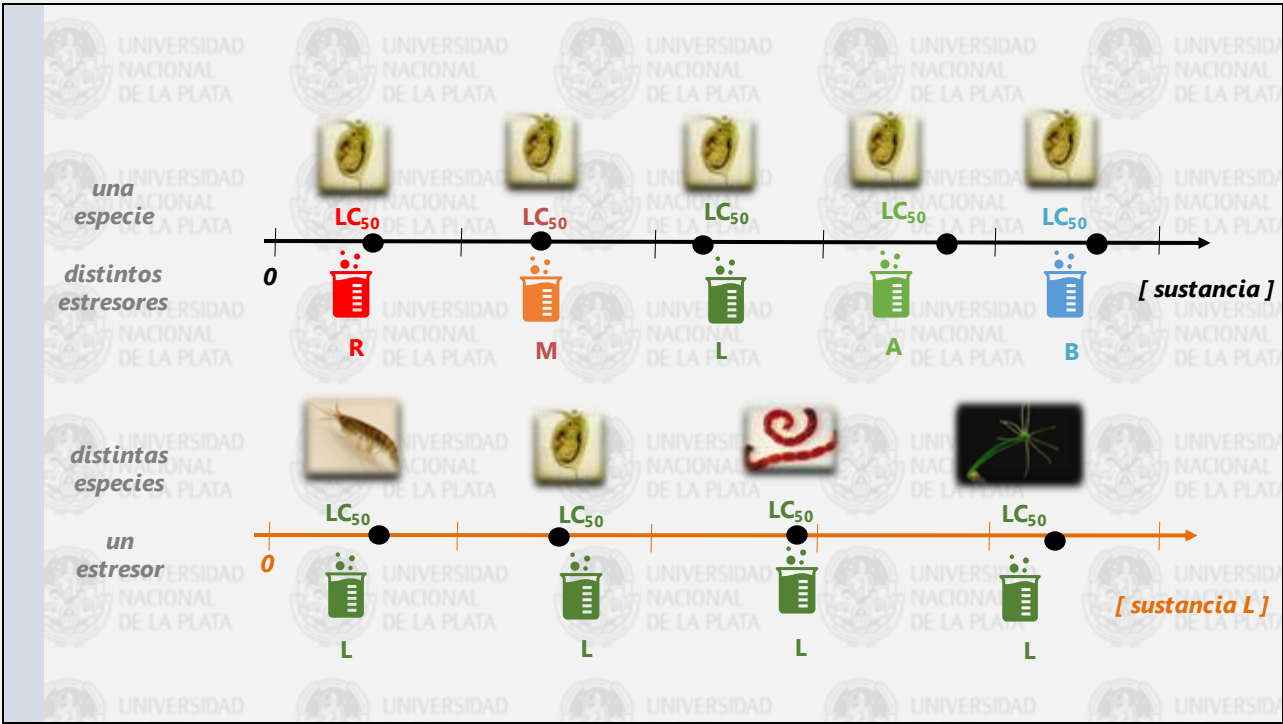
59



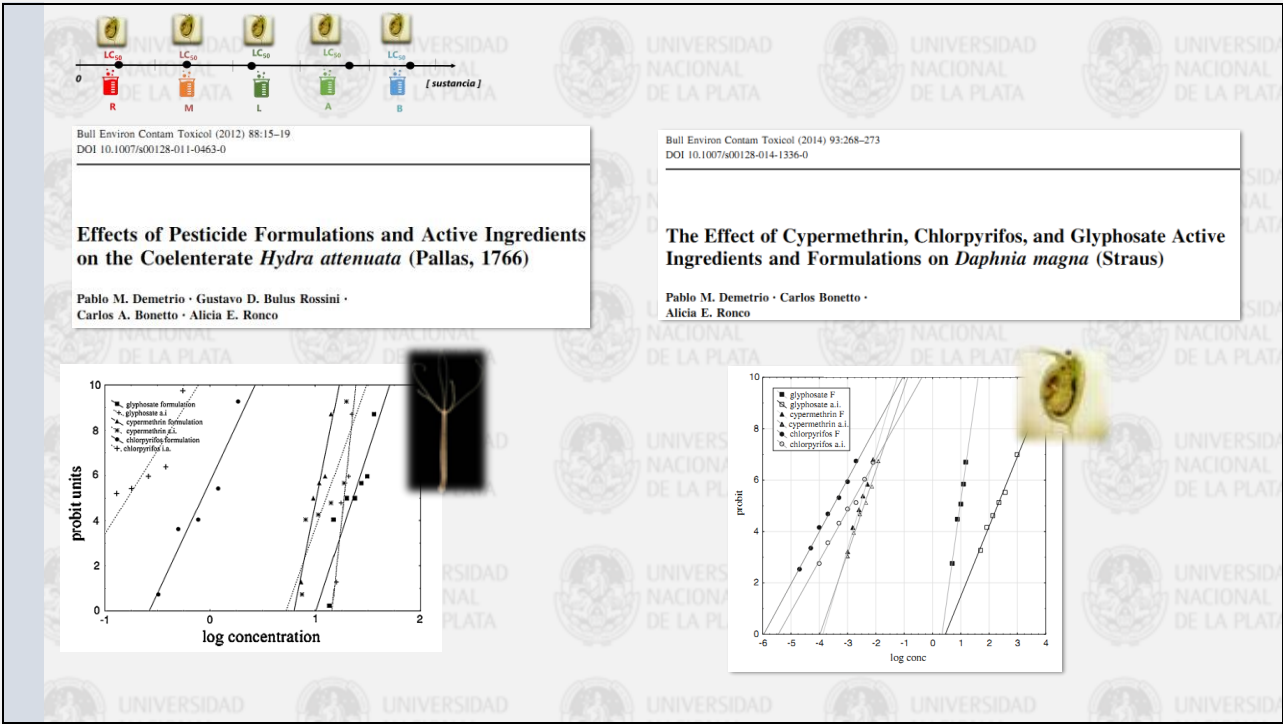
60



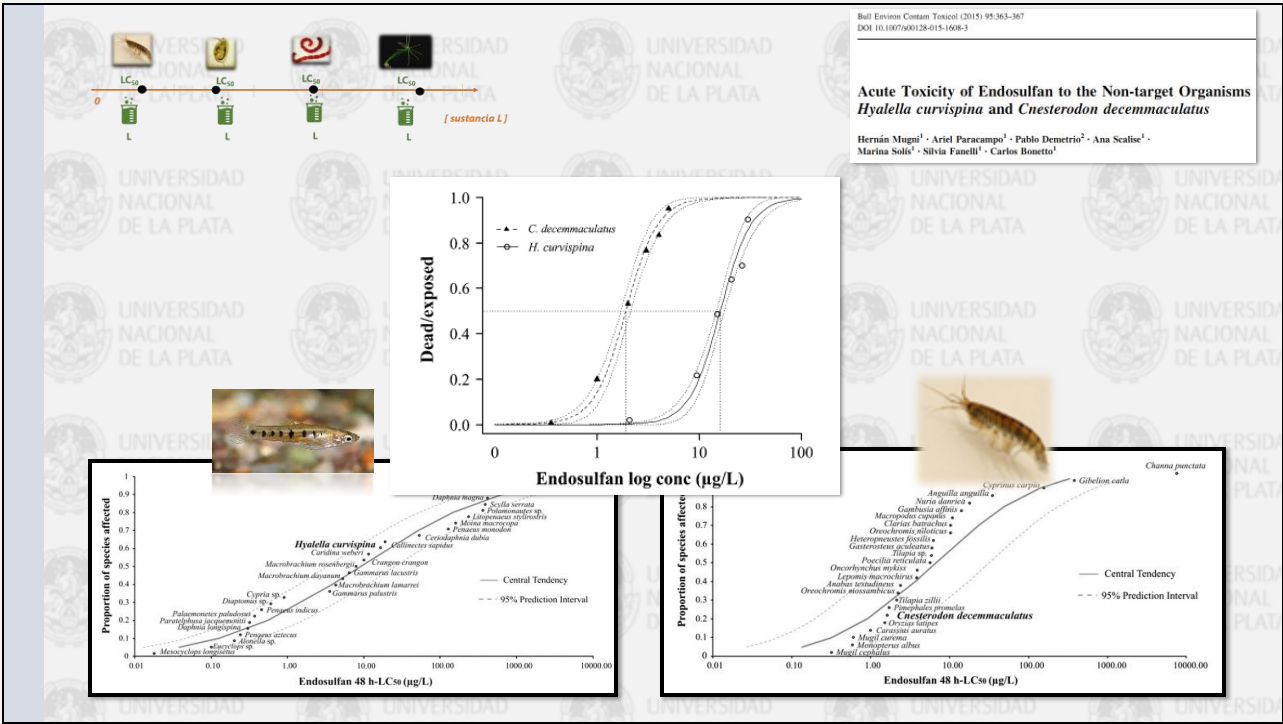
61



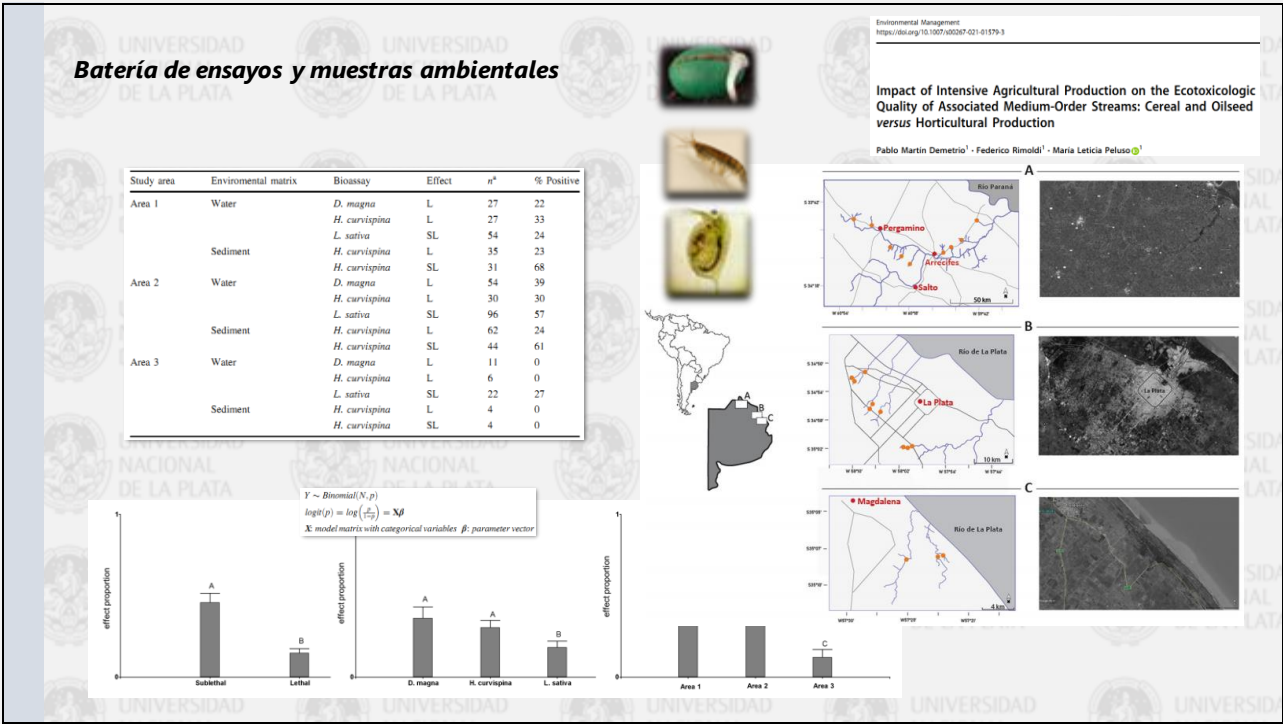
66



67



68



69

Para cerrar....

**Puntos finales
de los bioensayos de toxicidad !!**

Bioensayos estáticos, semi-estáticos y de flujo continuo.

Bioensayos estandarizados y normalizados.

Control de calidad.

protocolos, tóxico de referencia, carta control, criterios de aceptación de resultados.

Bioensayos con organismos terrestres..

Bioensayos con organismo acuáticos (columna de agua y sedimento)

Bioensayos de laboratorio y a campo.

Bioensayos monoespecíficos y mutiespecíficos. Batería de bioensayos.

Microcosmos y mesocosmos.

79

**Abordajes para evaluar el
efecto de las mezclas**

Estrategias

**Evaluar efectos de la mezcla
completa**

**Análisis basado en
componentes**

80

Evaluar efectos de la mezcla completa

- Desconocemos composición complejidad, \$\$, alta variabilidad espacial/temporal
- Utilizada en regulación (EPA, 1986)
- Representatividad → sitio-específico
- Abordaje para generar herramientas predictivas → caso-específico
- Operativamente → trabajo como una sustancia individual y expreso el efecto en función del % de dilución

Diagrama de flujo:

Aplicación de mezclas plaguicidas → Escorrentía → Medio Receptor

Escorrentías superficiales

81

Evaluar efectos de la mezcla completa

• 10 parcelas de 8 × 30 m

• Pendiente < 1% → 5 l de agua de escorrentía por parcela

Sistema de riego

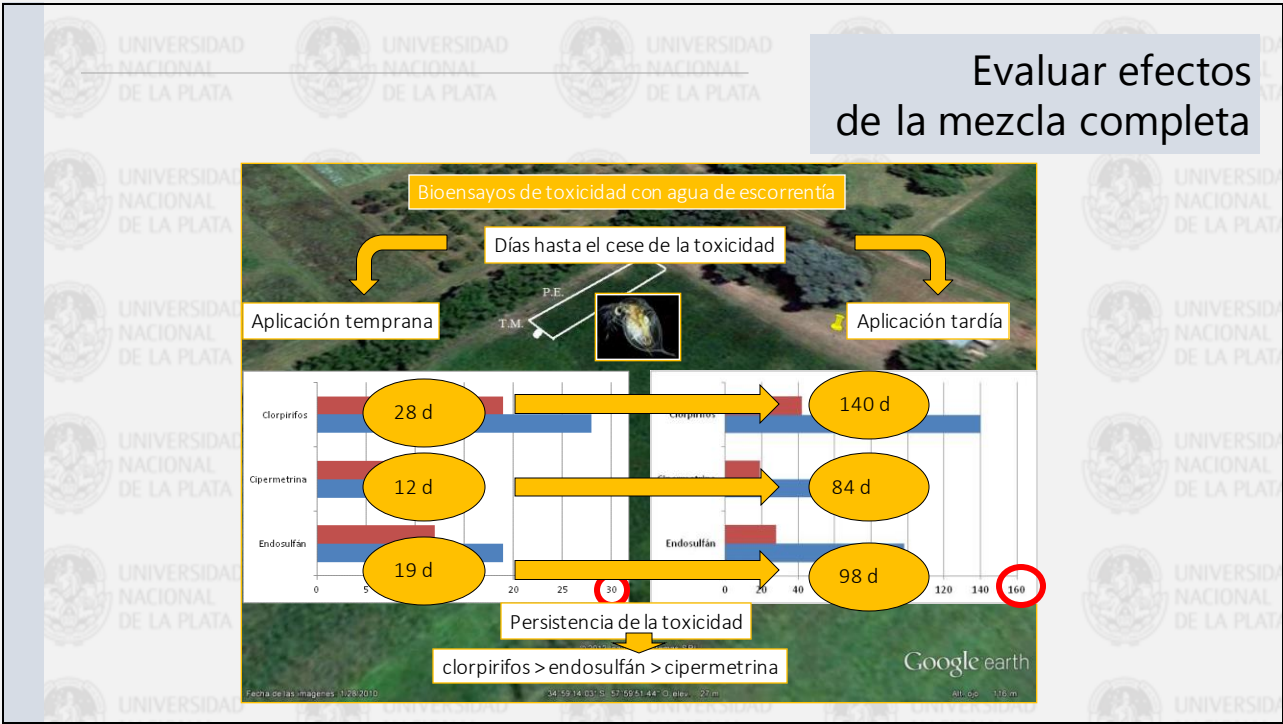
16 mm/h
gotas < 1 mm

Imagen de campo: Parcelas de cultivo con sistema de riego y escorrentía.

82



83



85

Análisis basado en componentes

- Objetivo → explicar el efecto de la mezcla en función del efecto de sus constituyentes
- Necesito conocer la composición de la mezcla → limitación operativa en función de la cantidad de constituyentes
- Representatividad → no sitio-específicos
- Mayor desarrollo de herramientas predictivas → no caso-específicos

87

Análisis basado en componentes

Efectos Aditivos en Mezclas

- Aditividad → no interacción
- 2 conceptos

Concentración Adición (CA) → Dosis Adición / Aditividad de Loewe

Acción Independiente (IA) → Respuesta Adición / Aditividad de Bliss

88

Análisis basado en componentes

Concentración Adición

- Principio de dilución → un compuesto puede ser remplazado total o parcialmente por una concentración equi-efectiva de otro, sin disminuir el efecto de la mezcla
- Fracciones equi-efectivas → Unidades Tóxicas ($\sum TU = 1$)
- Implica que todos los compuestos en cualquier concentración contribuyen a la toxicidad global de una mezcla → todas las dosis individuales tienen efecto por sí mismo aunque se encuentre debajo del umbral de efecto individual
- TEF (Toxic Equivalent Factor) dioxinas / se asuma curvas paralelas dosis-respuesta

89

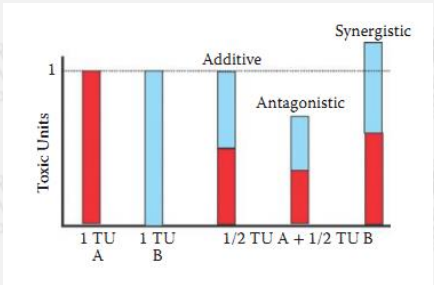
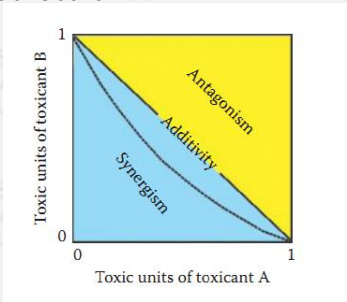
Análisis basado en componentes

Concentración Adición

Mezcla de n componentes
$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$$

c_i es la concentración (o dosis) del componente i en una mezcla de n compuestos que provoca $x\%$ del efecto total y EC_{xi} es la concentración de ese compuesto que provoca efecto $x\%$ si se aplican individualmente.

$c_i / EC_{xi} \rightarrow$ “Unidad Tóxica” (TU) es la concentración de un compuesto en la mezcla escalada en función de su potencia relativa



90

Análisis basado
en componentes

Acción Independiente

- Eventos Independientes (estadística) → el efecto combinado de compuestos puede ser calculado de las respuestas individuales a cada uno de los componentes
- Implica que todos los compuestos debajo de su umbral de efecto individual no contribuyen al efecto global de la mezcla

$$E(c_{Mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

$$c_{Mix} = \sum_{i=1}^n c_i$$

$E(c_{Mix})$ es el efecto provocado por la concentración de i sobre la mezcla total y $E(c_i)$ son los efectos proporcionales que los componentes individuales causan si se aplican individualmente a esa concentración en la que están presentes en la mezcla

91

Análisis basado
en componentes

Interacción

No se cumple el supuesto de aditividad / no-interacción

- **Sinergismo** → efecto de la mezcla mayor que el esperado por aditividad a partir de sus componentes individuales
- **Antagonismo** → efecto de la mezcla menor que el esperado por aditividad a partir de sus componentes individuales

Ambos se definen en términos cuantitativos en relación a una aditividad específica esperada

- **Potenciación** → sustancia que no es tóxica por sí mismo, pero causa que otra sustancia si lo sea

92

