

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE PLAGUICIDAS ANTICOLINESTERASA EN SUBPRODUCTOS DE LA REFINACION DE ACEITE VEGETAL

Cantú Obregón H*, Gómez Verastegui A, Aguilera González C, Rodríguez Rodríguez J, Núñez González A.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ecofisiología. Apartado Postal F-96, Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo León C.P. 66450. * carlos.aquileragn@uanl.edu.mx

RESUMEN

Los plaguicidas anticolinesterasa, o inhibidores de colinesterasas son compuestos químicos que inhiben a las enzimas colinesterasas impidiendo que se destruya la acetilcolina liberada, produciendo como consecuencia un aumento en la concentración y en la duración de los efectos del neurotransmisor. Entre los mas usados para el control de las plagas se encuentran los organofosforados y carbamatos y pueden contaminar agua, suelo y tener permanencia en los alimentos. Productos contaminados pueden llegar al consumidor, por lo que seria muy util un método para la detección rapida de estos compuestos. En el presente estudio, se llevó acabo la detección de inhibidores de colinesterasas por del método Ellman, que se basa en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE). Se elaboro un extaracto enzimatico AChE a partir de subproducto de cabezas de pescado y se estandarizo la concentración de extracto que mostró actividad lineal durante cinco minutos. Como inhibidor de AChE se utilizó el organofosforado diazinon a diferentes concentraciones. Se evaluó el efecto de solventes lipidicos a utilizar, seleccionando el etanol al 10%. Finalmente, se ensayaron cuatro muestras de subproductos de la refinación de aceite de soya, solas y con adición de diazinon para detectar inhibidores de colinesterasas. El porcentaje de inhibición fue expresado como equivalentes de diazinon. El método fue sensible por lo que podría ser implementado en el análisis de alimentos.

ABSTRACT

The anticholinesterase pesticides or cholinesterase inhibitors are chemical compounds that inhibit cholinesterase enzymes preventing the acetylcholine released destroy, occurring as a result an increase in the concentration and duration of action of the neurotransmitter. Contaminated products can reach consumers, so it would be very useful method for the rapid detection of these compounds. In the present study, was held detection by cholinesterase inhibitors Ellman method, which is based on the activity in the enzyme activity of acetylcholinesterases (AChE). AChE is an enzymatic extract produced from byproduct of fish heads and extract concentration showed linear activity for five minutes was standardized. AChE inhibitor for organophosphate diazinon was used in different concentrations. The evaluation was based on the selection of 10% ethanol as a solvent effect. Finally, four samples of byproducts of soybean oil, alone and with the addition of diazinon to detect cholinesterase inhibitors tested. Percentage inhibition was expressed as

equivalents of diazinon. The method was sensitive so it could be implemented in food analysis.

Palabras clave: Colinesterasas, Subproducto de aceites vegetales, plaguicidas,

Área: Cereales, Leguminosas y Oleaginosas.

INTRODUCCIÓN.

La tecnología de plaguicidas ha permitido incrementar la productividad de las tierras de cultivo desde la década de 1950. Económicamente, el uso de plaguicidas trae numerosos beneficios a la sociedad. Menores costos de producción y rendimientos más altos atraen a los productores. De la misma manera, los consumidores pueden disfrutar de una gran variedad de productos relativamente baratos. Según datos del INEGI, en México se produjeron 189,809 toneladas de plaguicidas de 2000 a 2007. Según la Asociación Mexicana de la Industria de los Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC), señalan que en 1995 el volumen de plaguicidas utilizados ascendió a 54,678.96 Toneladas. En México se usa el 60% de los 22 plaguicidas como perjudiciales para la salud y el medio ambiente. De ellos el 42% se fabrican en el país. De 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringido en los Estados Unidos, 30 se usan en México (INEGI, 1992).

Los grupos de plaguicidas sintéticos más comunes son los organofosforados, los carbamatos, los piretroides y los organoclorados.

Los plaguicidas organofosforados son ésteres orgánicos de ácidos fosfóricos. Muchos de estos son líquidos de carácter lipofílico y de baja volatilidad; Hoy día ocupan un lugar predominante, entre los plaguicidas más conocidos y utilizados; de los cuales, los primeros utilizados fueron los ésteres sencillos de ácido fosfórico, como el TEPP, HETP y el Parathion.

Estos plaguicidas organofosforados son de importancia no solo por su efectividad para el control de plagas, sino por su poder de inhibir las enzimas colinesterasas que es de gran importancia, ya que degrada la acetilcolina, que es neurotransmisor que si se acumula en el organismo puede producir la muerte.

Como otras enzimas, la colinesterasa actúa sobre la acetilcolina formando un complejo de vida muy breve degradándola. Pero si a la colinesterasa se le presenta un sustituto de la acetilcolina, actúa sobre este y deja en libertad a la acetilcolina, la cual ejerce entonces su acción mortal. Los derivados fosfóricos actúan como inhibidores de la colinesterasa presentándose como sustitutos de la acetilcolina y a ello se debe su acción tóxica. Tomando en cuenta “el criterio de selectividad toxica” confirma la identidad de acción de los derivados fosfóricos, tanto en mamíferos como en insectos es la de inhibición de la colinesterasa.

La inhibición de la colinesterasa es considerado como un biomarcador específico a exposición a plaguicidas organofosforados. Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos, ocasionadas por la exposición a contaminantes.

Estos plaguicidas persisten en las oleaginosas utilizadas en la producción de aceite, el cual pasa por una serie de procesos para su refinación. Estos procesos son: desgomado, neutralización, decoloración y desodorización. En el último proceso, los subproductos de la desodorización pueden ser reutilizados dado que concentran compuestos funcionales como tocoferoles y fitosteroles, por lo que deben ser analizados dado que podrían contener residuos de estos plaguicidas, gracias al vapor que se inyecta al aceite con una presión baja y temperaturas altas (252-266°C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los extractos:

El extracto se obtuvo homogenizando tejido cerebral de peces tilapias en buffer PBS (pH 7.3) en proporción 1:10 (peso:volumen), la extracción se realizó a 4°C y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático de acetilcolinesterasa (AChE), separado en alícuotas de 250 μ L y almacenado a -70°C hasta su utilización.

Concentración óptima del extracto AChE:

La actividad enzimática AChE del extracto fue evaluada siguiendo el método de Ellman *et al.* (1961). La cinética se realizó utilizando microplacas de 96 pozos, en las cuales se colocan en cada pozo 10 μ L de extracto enzimático, 280 μ L de 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) en buffer PBS y 10 μ L de acetiltiocolina para obtener una concentración final del sustrato de 0.0005 M. Se realizaron diluciones del extracto de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 y de 1/10, 1/20, 1/30 y 1/40, con lecturas cada 120 segundos durante 10 minutos. Para cada muestra se realizan tres replicados con lecturas espectrofotométricas cada 120 segundos durante 10 minutos a 405 nm, además se colocarán 3 blancos sin extracto por microplaca.

Efecto del solvente.

Para la elección y estandarización del solvente adecuado para muestras lipídicas, se estudió el efecto del DMSO, etanol y metanol sobre la actividad AChE. Las condiciones de la cinética fueron similares a las descritas en el apartado anterior.

Inhibición de la actividad AChE con el organofosforado diazinon.

La inhibición de la actividad AChE fue realizada de acuerdo al método descrito por Rodríguez y Gold (1999), utilizando diferentes concentraciones de diazinon. El efecto de la concentración de diazinon se realizó preparando una solución inicial a 75 g de ingrediente activo por litro, en etanol al 10%. De esta solución se realizaron diluciones de decreciente de 37.5, 18.75, 9.375, 4.68, 1.44, 1.17, 0.58 g/L. Previo al inicio de la cinética la placa se preincubó durante 30 minutos para permitir la interacción enzima-inhibidor.

Evaluación de muestras de subproductos de la refinación del aceite vegetal de soya.

Cuatro muestras de subproductos de la deodorización de aceite de soya fueron utilizadas para evaluar el método. 300 mL de subproducto fueron disueltos en 700 mL de etanol 10%. Estas muestras fueron analizadas solas y con la adición 1:1 (v:v) de diazinon en concentración de 75 g/mL. La cinetica fue realizada de acuerdo a los anteriores puntos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración óptima del extracto.

En la figura 1 se muestra la actividad enzimática AChE en las diferentes concentraciones en la cual se observa que la concentración de 1:10 es la que muestra un comportamiento lineal hasta el minuto 5, lo cual indica que la reacción es dependiente de la concentración de la enzima.

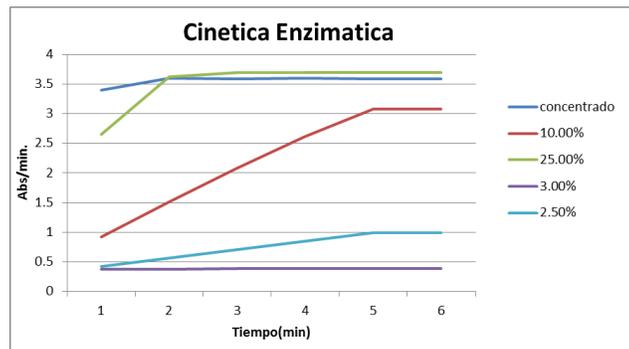


Figura 1. Graficas de la concentración óptima del extracto

Efecto del solvente.

En la figura 2, se muestra que el etanol 1/10 es la que tiene menor interferencia en la actividad de la AChE por lo cual es la más mejor para utilizar. El DMSO y el metanol aumentan la actividad.



Figura 2. Grafica del efecto del solvente

Inhibición de la actividad AChE con el organofosforado diazinon.

La figura 3 se muestra el efecto que tienen el diazinon a diferentes concentraciones, conforme aumenta la concentración de diazinon aumenta el % de inhibición, pero también se puede observar que la gráfica muestra un comportamiento logarítmico y su $R^2 = 0.90$. Si se observa bien la gráfica en concentraciones cercanas al origen la gráfica presenta una tendencia lineal por lo cual se pueden manejar concentraciones menores para el desarrollo correcto de una curva de calibración.

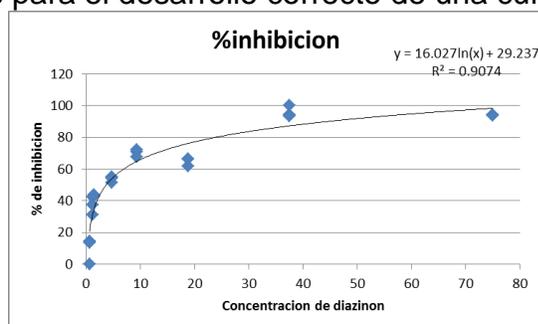


Figura 3. Gráfica del Efecto de la concentración de diazinon

Evaluación de muestras de subproductos de la refinación del aceite vegetal de soya.

En el cuadro 1 se muestra el porcentaje de inhibición y los equivalentes de diazinon para cada muestra de subproductos de la refinación del aceite vegetal soya. Como se puede observar existe una inhibición inicial de los subproductos la cual se incrementa con la adición del diazinon.

Muestra	Tratamiento	%Inhibición	Meq de diazinon (g/mL)
1	subproductos sin diazinon	24.70 ± 0.07139	0.75
	subproductos con diazinon relación 1:1	62.89 ± 0.03365	8.16
2	subproductos sin diazinon	33.26 ± 0.03795	1.28
	subproductos con diazinon relación 1:1	64.88 ± 0.04265	9.24
3	subproductos sin diazinon	35.54 ± 0.03063	1.48
	Subproductos con diazinon relación 1:1	68.72 ± 0.18472	9.37
4	Subproductos sin diazinon	19.16±0.11045	0.53
	Subproductos con diazinon relación 1:1	63.80 ± 0.05620	8.64

Cuadro 1. De porcentajes y equivalentes de diazinon de las muestras de Subproductos de la refinación del aceite vegetal de soya.

Los métodos más utilizados para determinación de plaguicidas son la cromatografía de gases y HPLC. Sin embargo, éstos tienen un costo elevado por el precio de los equipos, reactivos y requiere procedimientos más largos. Por el contrario, el método propuesto tiene menor costo y es más rápido. Sin embargo, no es un método específico cuantitativo y solo permite determinar una posible contaminación por

algún plaguicida organofosforado o carbamato. Por lo que su utilidad sería como prueba preliminar, antes de decidir un análisis más específico y requiere mayores pruebas para su estandarización.

CONCLUSIÓN

El método para la detección de plaguicidas anticolinesterasa fue sensible, por lo que podría ser implementado como técnica preliminar rápida en el análisis de alimentos.

BIBLIOGRAFÍAS

Barrera C. 1976. Pesticidas agrícolas. Ediciones Omega S.A.: Barcelona, pp.146-167.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88±95.

Rodríguez G., Gold G. 1999. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research* 50 (2000) 357-360