

Delfino Luciana B.<sup>1,2</sup>, Picone A. Lorena<sup>2</sup> y Daza Millone M. Antonieta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-UNLP-CONICET), diagonal 113 esq. 64 (1900) La Plata.

<sup>2</sup>CEQUINOR (UNLP, CCT-CONICET La Plata, asociado a CIC-PBA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Blvd. 120 N° 1465, La Plata (1900), Argentina

\*e-mail: ludelfino.b@gmail.com

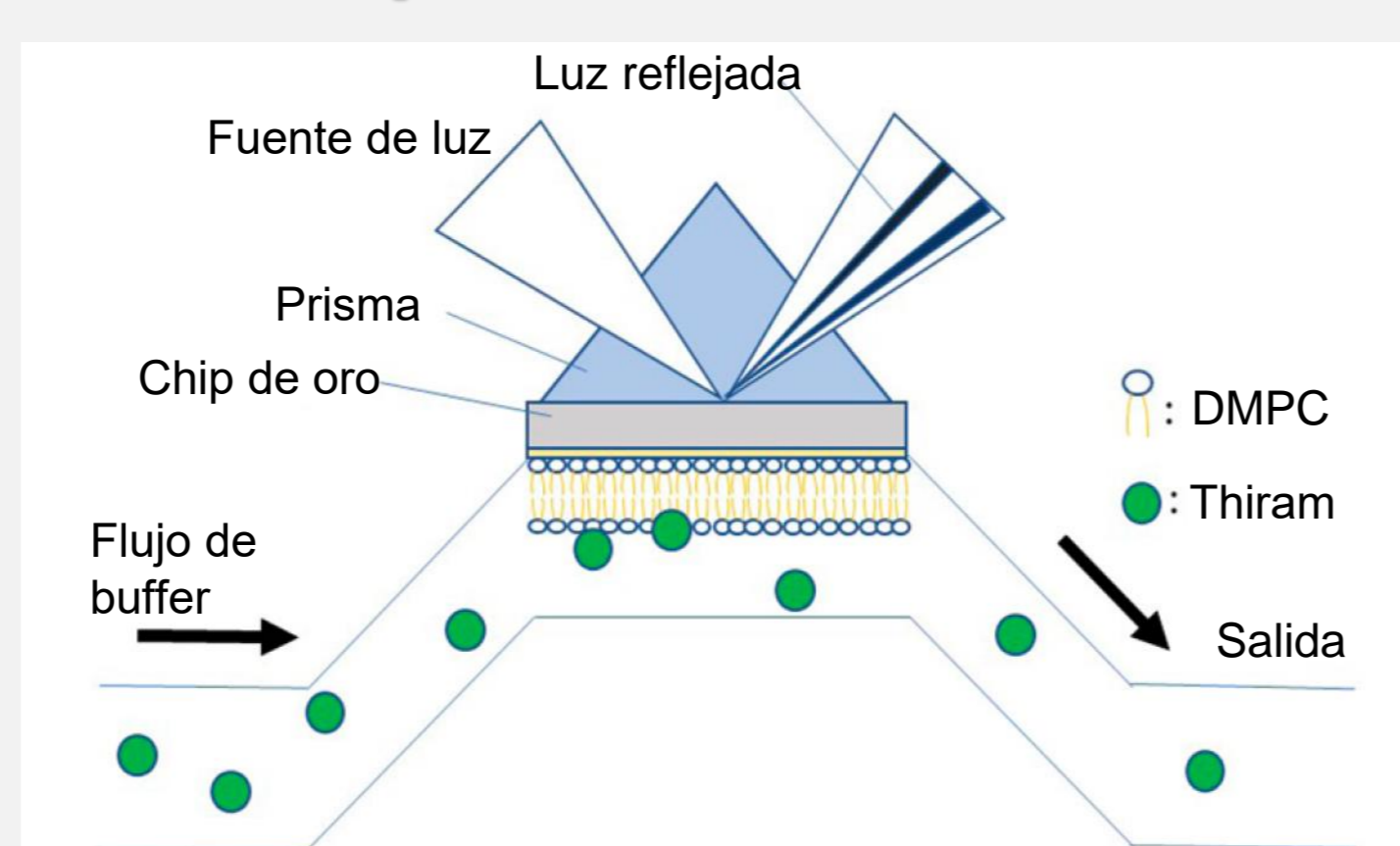
## Introducción

► En Argentina existen más de 400 principios activos registrados que se utilizan para formular los productos químicos de uso agrícola[1]. Si bien ayudan en la producción de alimentos, el uso excesivo e inadecuado puede causar impactos adversos a los suelos, los ecosistemas, la salud animal y de las personas.

► Es de suma importancia obtener información acerca del comportamiento de estas sustancias una vez que entran en contacto con los organismos vivos. Existen numerosos trabajos que reportan la acumulación de pesticidas en órganos y tejidos.[2] Sin embargo, existe poca información a nivel molecular acerca del comportamiento de los pesticidas cuando se ponen en contacto con la superficie celular.

► La espectroscopía SPR (resonancia de plasmones superficiales) es una técnica analítica que permite seguir interacciones en tiempo real, sin el agregado de sondas, entre una contraparte inmovilizada en una superficie y otra libre en la fase móvil. Los chips de SPR se pueden modificar de forma sencilla con vesículas lipídicas de forma de obtener bicapas lipídicas soportadas (SLBs) que representen un sistema celular de estudio.[3]

### Esquema celda SPR

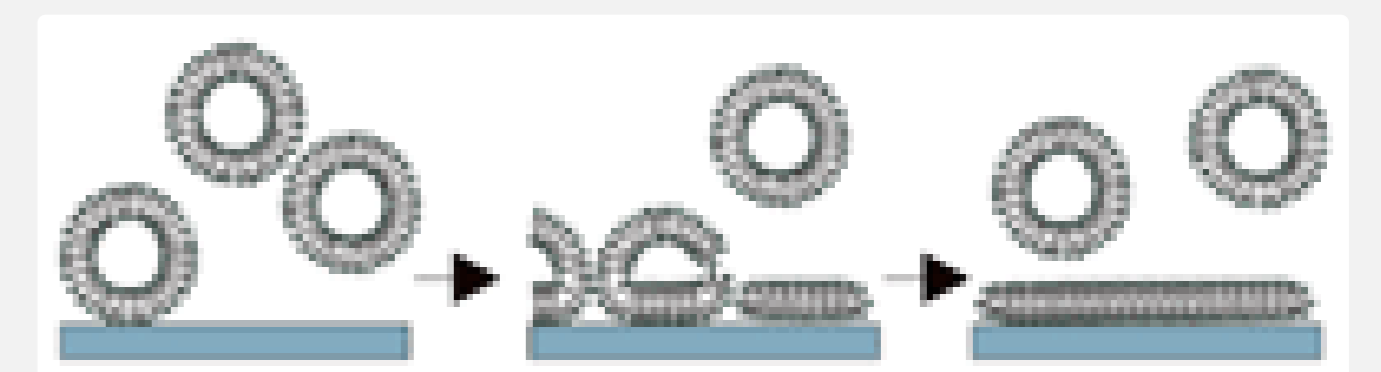


## Procedimiento experimental

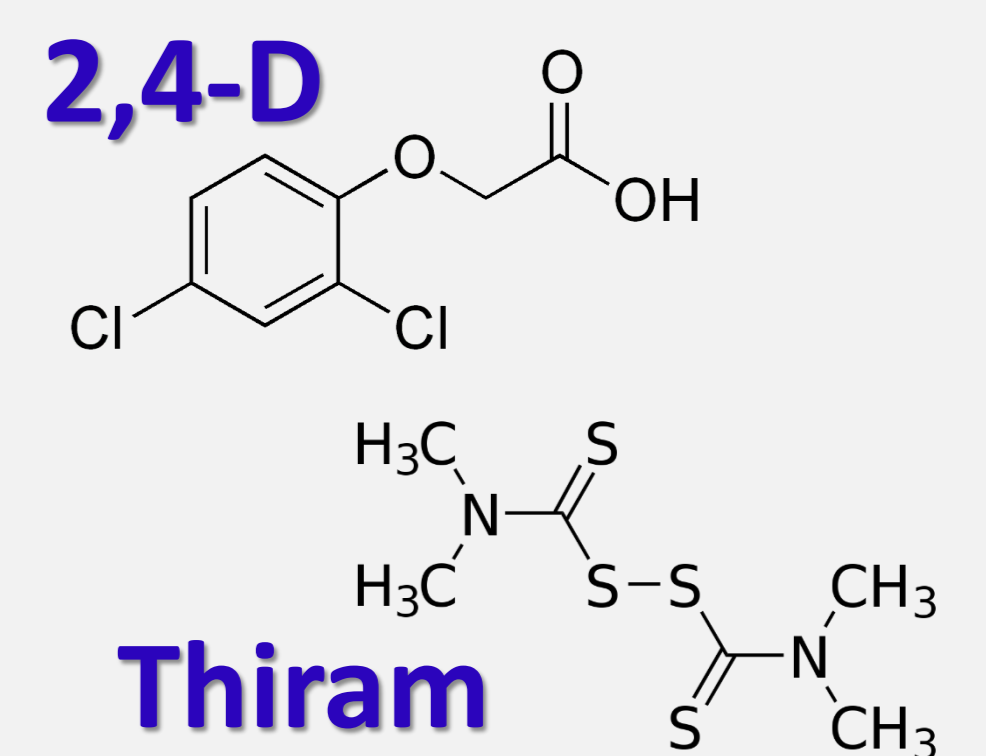
❖ Se emplearon vesículas unilamelares (SUVs) de DMPC como modelo de membrana biológica. Para ello en primer lugar se prepararon vesículas multilamelares (MLVs) y luego mediante sonicación se obtuvieron SUVs para realizar los experimentos.

❖ Las mediciones de SPR se llevaron a cabo en un instrumento BioNavis SPR Navi™ 200 multiparamétrico (MP-SPR) en dos canales simultáneos con  $\lambda = 785$  nm.

❖ Se utilizó el método de fusión de vesículas *in situ* para formar bicapas lipídicas soportadas (SLBs) en superficies de oro SPR mediante la modificación de la superficie con una monocapa autoensamblada de ditiotretol (DTT).

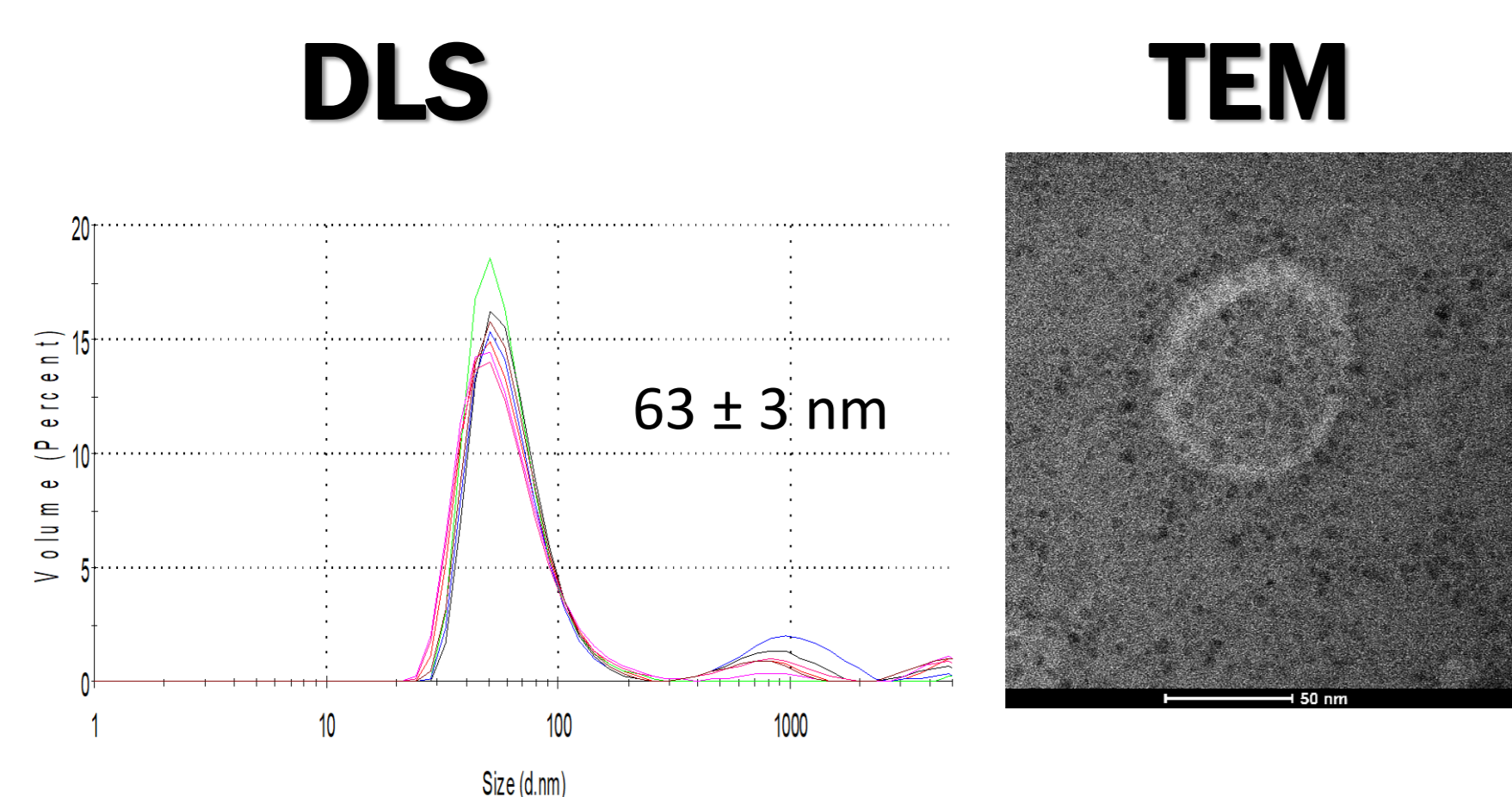


❖ Para evaluar la interacción de las SLBs con 2,4-D y thiram disueltos en metanol al 1% se inyectaron a flujo constante (10  $\mu$ L/min) soluciones de distinta concentración para obtener parámetros cinéticos y de interacción (medidas por triplicado). Además se hizo un blanco con metanol 1%. Cada interacción se evaluó en una bicapa recién preparada. Luego de la interacción, se regeneró con Triton X-100 al 1% en el buffer de corrida (TRIS 20 mM pH 7,4 +  $Ca^{2+}$  2,5 mM).

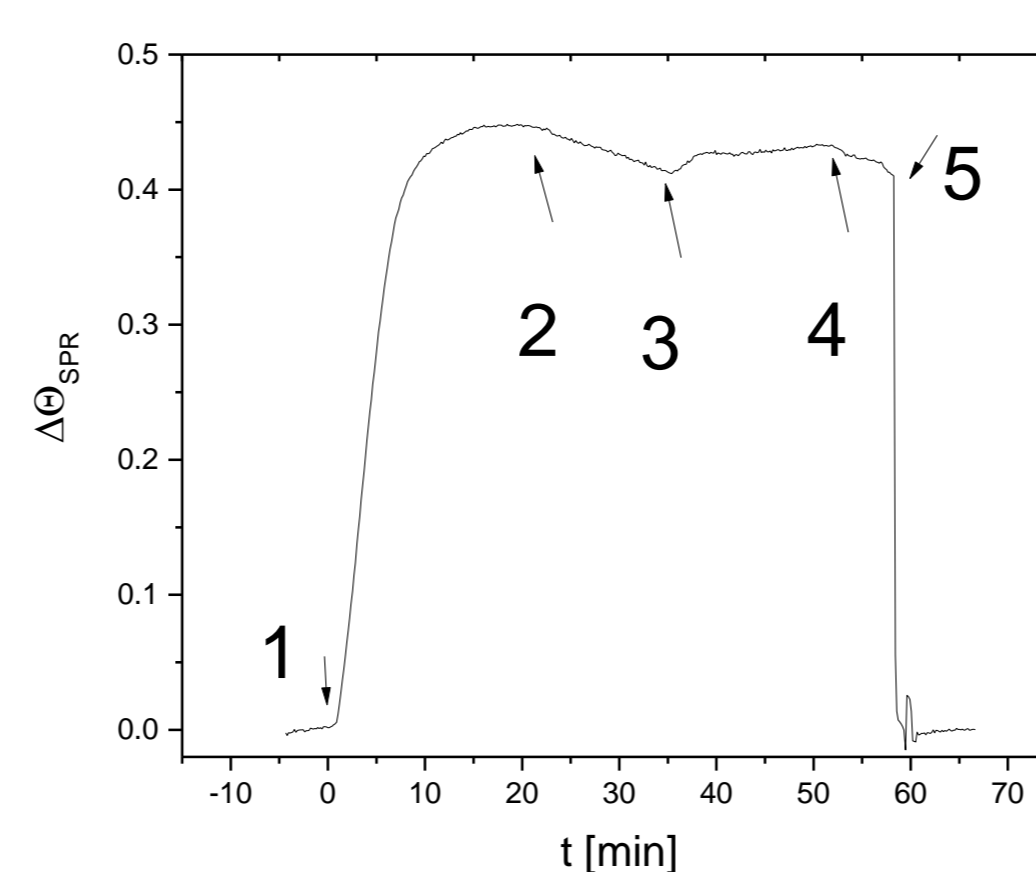


## Resultados

### Caracterización SUVs DMPC

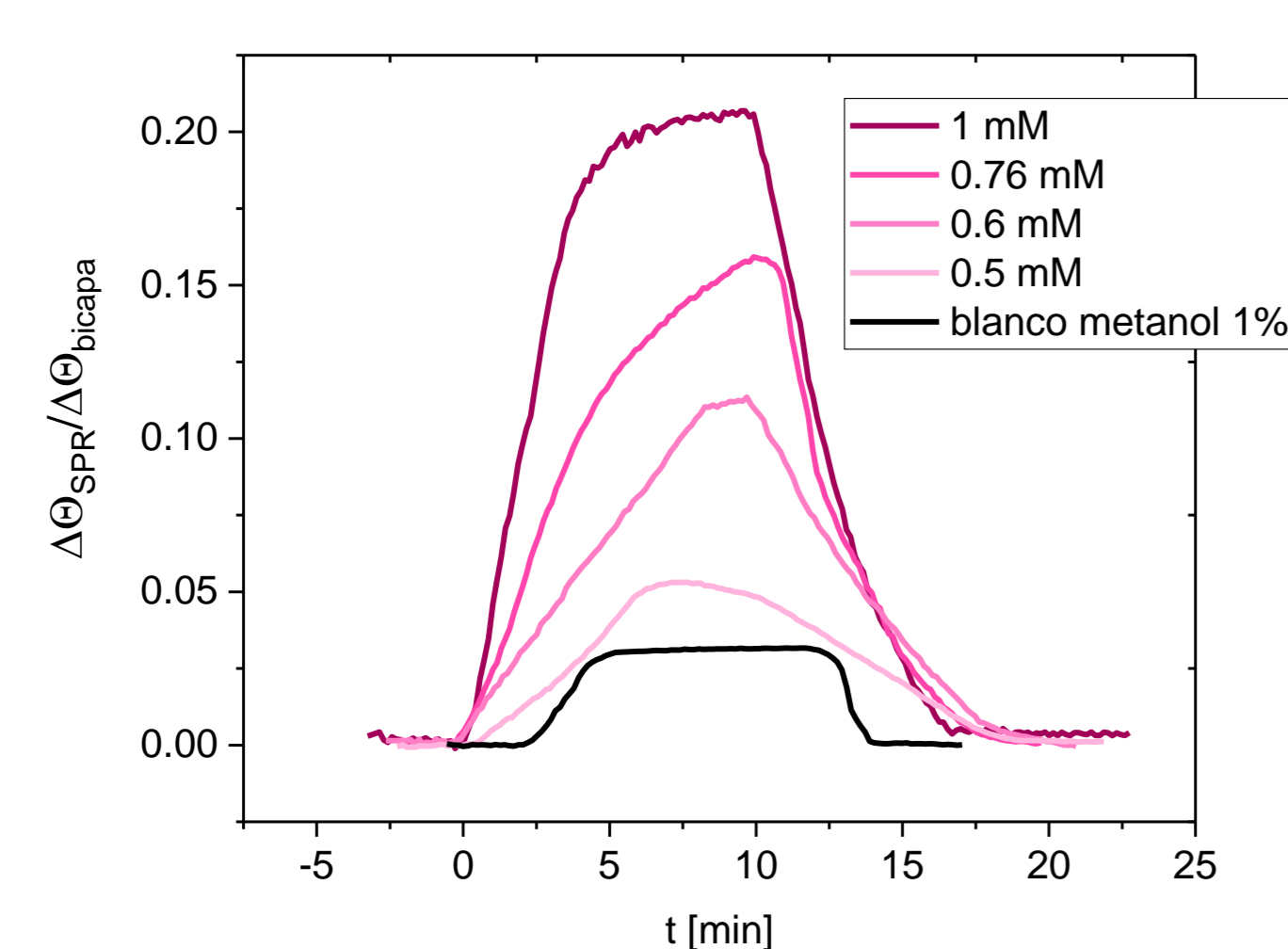


### Pasos sensorgrama SPR

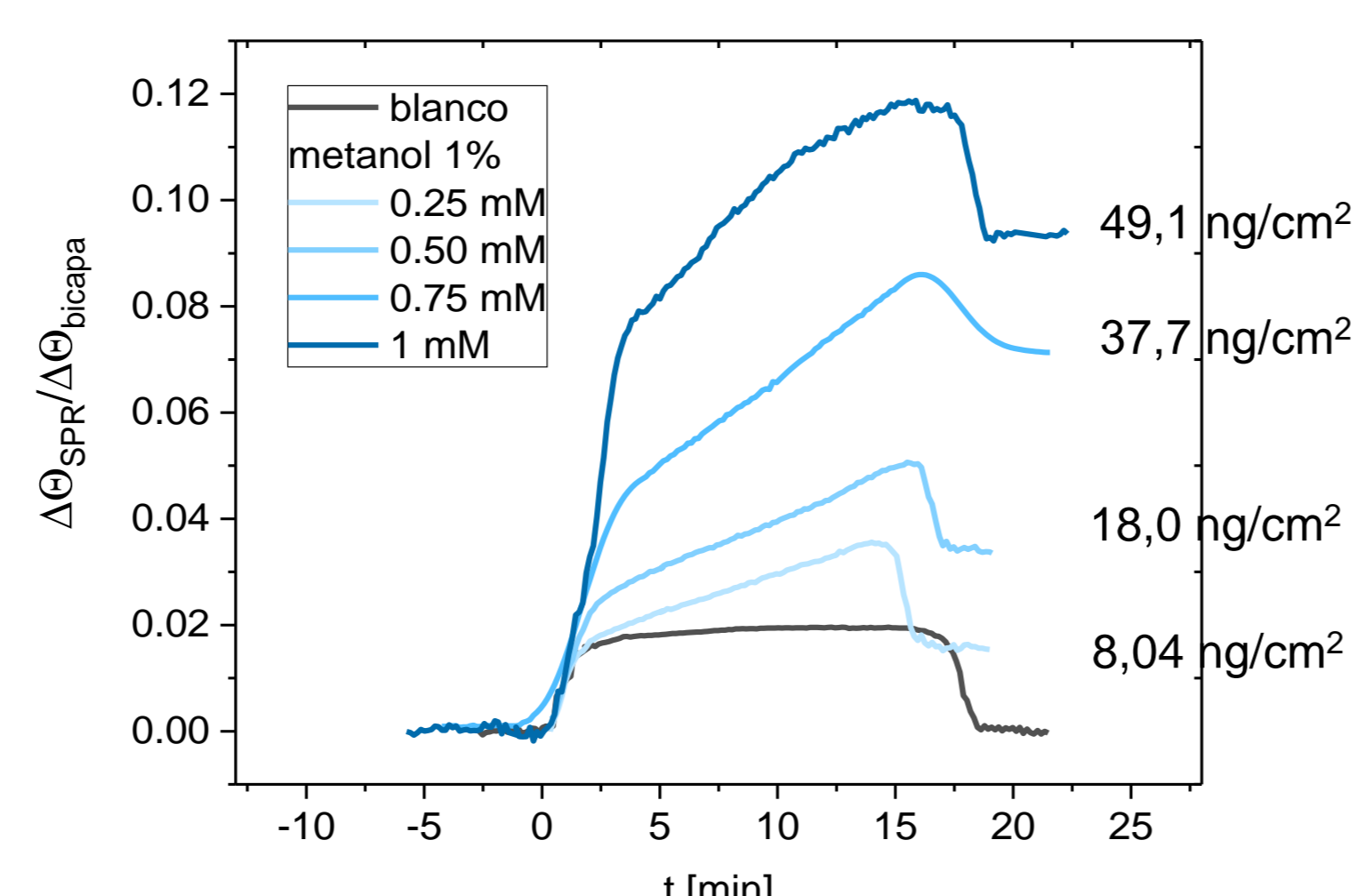


- 1: inyección SUVs DMPC
- 2: lavado con buffer
- 3: inyección de Thiram 1 mM
- 4: pasaje de buffer (disociación)
- 5: regeneración con Triton X-100 1% y lavado hasta alcanzar línea de base

### 2,4-D – DMPC (SLBs)



### Thiram – DMPC (SLBs)



### Cálculo de cubrimiento

Ecuación de "de Feijter"

$$\Gamma_p = \frac{\Delta\theta \cdot k \cdot d_p}{dn/dc}$$

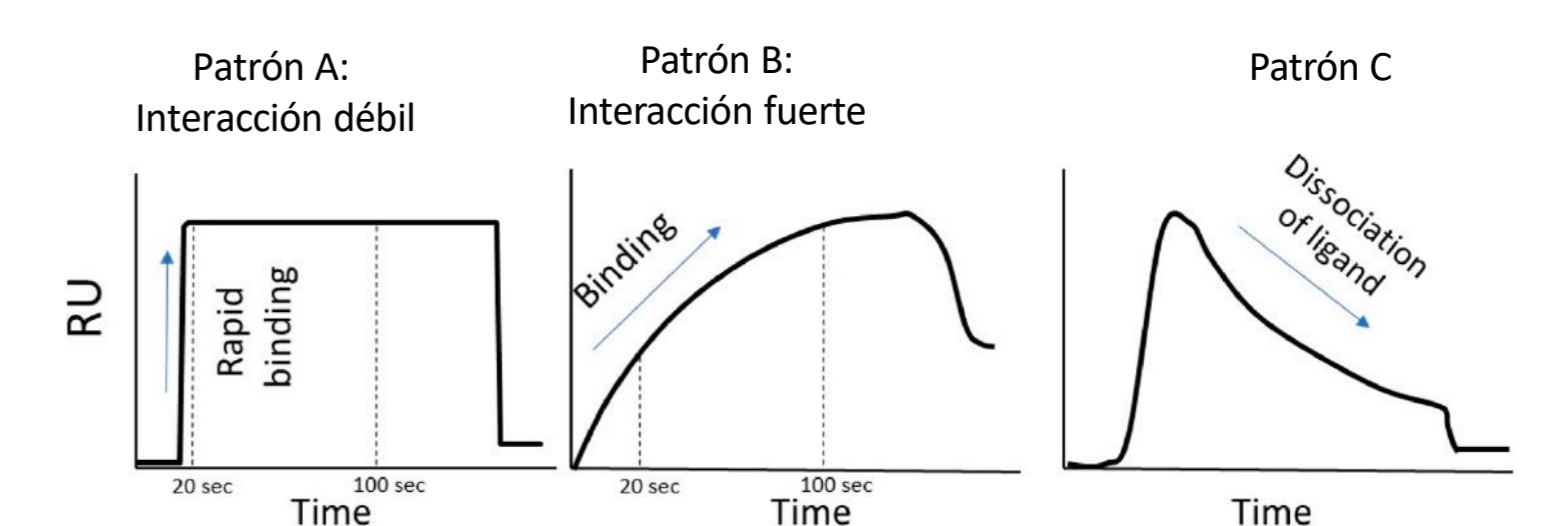
$\Gamma_p$ : cubrimiento en  $ng/cm^2$   
 $dn/dc$ : incremento de RI  
 $k$ : coeficiente de sensibilidad del equipo (depende de  $\lambda$  y sensor)  
 $d_p$ : espesor de capa molecular adsorbida

Para capas delgadas ( $< 100$  nm):

$$k \cdot d_p \begin{cases} 670 \text{ nm} \rightarrow 1,0 \cdot 10^7 \text{ nm/degree.} \\ 785 \text{ nm} \rightarrow 1,9 \cdot 10^7 \text{ nm/degree.} \end{cases}$$

## Discusión

❖ Se han descrito los siguientes patrones de interacción de pesticidas con bicapas [4]:



- ❖ Las curvas obtenidas para 2,4-D poseen una interacción débil (patrón A) con disociación completa.
- ❖ Por otra parte, el Thiram exhibe una interacción fuerte (patrón B) con las bicapas de DMPC, con retención neta dependiente de la concentración de exposición.
- ❖ Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), ambos pesticidas pertenecen a la clase II de toxicidad moderada, según  $LD_{50}$  (toxicidad aguda):

WHO class	Toxicity level	$LD_{50}$ for the rat (mg/kg body weight)		Examples
		Oral	Dermal	
Class Ia	Extremely hazardous	<5	<50	Parathion, Dieldrin
Class Ib	Highly hazardous	5–50	50–200	Eldrin, Dieldrin
Class II	Moderately hazardous	50–2000	200–2000	DDT, Chlordane
Class III	Slightly hazardous	>2000	>2000	Malathion
Class IV	Unlikely to present acute hazard in normal use	$\geq 5000$		Carbamate, Cycloprothrin

Esta clasificación no tiene en cuenta la toxicidad crónica, relacionada con la acumulación de pesticidas en órganos y tejidos.

## Conclusiones

- ❖ Se pudieron evaluar las interacciones moleculares puestas en juego entre 2,4-D y Thiram con bicapas de DMPC mediante la técnica de SPR.
- ❖ Los resultados para 2,4-D fueron comparables a los reportados por Moriwaki *et al.* [4], donde se aprecia una interacción débil, la cual se correlaciona con la baja acumulación en tejidos.
- ❖ Por otra parte, se muestran por primera vez resultados de interacción para Thiram con modelos de membrana. Este pesticida, exhibe una interacción fuerte para la cual se pudo cuantificar el remanente en  $ng/cm^2$  de bicapa. Este tipo de interacción se ha podido correlacionar con acumulación en tejidos (toxicidad crónica) [4].
- ❖ Este modelo de bicapas permite clasificar pesticidas en cuanto a interacción débil/fuerte y predecir su efecto de acumulación en tejidos relacionado con la toxicidad crónica.

### Referencias

- [1] <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/control/productos-quimicos/agroquimicos>
- [2] a. Zhao, Z.; Wang, Y.; Zhang, L.; Cai, Y.; Chen, Y. Environ. Sci. Pollut. Res. 2014, 21, 8740–8749. b. Lazartigues, A.; Thomas, M.; Banas, D.; Brun-Bellut, J.; Cren-Olivé, C.; Feidt, C. Chemosphere 2013, 91, 530–535.
- [3] Daza Millone, M. A.; Vázquez, R. F.; Maté, S. M.; Vela, M. E Coll. Surf. B 2018, 172, 423–429
- [4] Moriwaki, H.; Yamada, K.; Nakanishi, H. J. Agric. Food Chem. 2017, 65, 5390–5396.