

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
CATEDRA DE BIOLOGIA MOLECULAR



**Evaluación de la fotoinactivación del pesticida Metamidofó
producida por la irradiación UV artificial y solar, mediante la
determinación de la mutagenicidad y genotoxicidad**

Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica

Elaborado por: Univ. Lizeth Pamela Laura Mejía

LA PAZ-BOLIVIA

2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
CATEDRA DE BIOLOGIA MOLECULAR



**Evaluación de la fotoinactivación del pesticida Metamidofó
producida por la irradiación UV artificial y solar, mediante la
determinación de la mutagenicidad y genotoxicidad**

Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica

Elaborado por: Univ. Lizeth Pamela Laura Mejía

Tutores: MSc. Rolando S. Sánchez Montaña (†)

MSc. Maribel Ximena M. Taborga Manrique

LA PAZ-BOLIVIA

2021



ROTA DE DEFENSA DE TESIS

Facultad	: Of. Farmacéuticas y Bioquímicas
Carrera	: Bioquímica
Postulante	: LIZETH PAMELA LAURA MEJIA
Grado Académico	: Licenciatura
Lugar	: Auditorium Facultativo "DOMINGO LORINI"



En la ciudad de La Paz a hrs. 10:00 am. del día 2 de diciembre del 2021 años, en el Auditorium "Domingo Lorini" de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; se hizo presente la Univ. Lizeth Pamela Laura Mejia con c.i. 11093631 y r.u. 1685964, para la presentación y defensa de la modalidad de graduación *Tesis de Grado con el tema:*

"EVALUACION DE LA FOTOINACTIVACION DEL PESTICIDA METAMIDOSO PRODUCIDA POR LA IRRADIACION UV ARTIFICIAL Y SOLAR. MEDIANTE LA DETERMINACION DE LA MUTAGENICIDAD Y GENETOXICIDAD"

Cualificación obtenida:

NUMERAL : 100
LITERAL : Cien
VALORACIÓN : Excelente

Escala de valoración

Aprobado "XI CONGRESO NAL. UNIV. 2006"

Bueno	: 51 a 79
Sobresaliente	: 80 a 89
Excelente	: 90 a 100

Concluido el acto de la Defensa de Tesis, se procede a las firmas del tribunal examinador.

Dr. Antonio Hans Scholz Delgado
TRIBUNAL

Ph.D. María Teresa Álvarez Aliaga
TRIBUNAL

Dr. Miguel H. Estebanero Coronado
TRIBUNAL

M.Sc. Maribel G. M. Taborga Manrique
ASESOR

Dr. Yohel Jiménez Velardo
DIRECTOR CARRERA BIOQUIMICA

Dra. Carolina Montenegro Reynag
VICEDEORANA - F.O.F.B.

Dedicatoria

El presente trabajo va dedicado a Dios, quien me bendijo y me dio fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer. A mi familia que, con apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme en cada momento.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés por albergarme durante todo el tiempo de formación profesional, por permitirme conocer amigos como Ximena Tiniñi, Fresia Ximenez, Asahi Pacheco, Karen Ledezma y docentes que me ayudaron con sus enseñanzas como el Dr. Irahola y la Dra. Amalia Espinoza.

Al laboratorio de la cátedra de Biología Molecular, donde conocí a grandes compañeros: Francisca Gutiérrez, Beatriz Medrano, Brenda Peñaranda, Jonatan Aliaga y a Tatiana Callejas. A mi querido tutor el Dr. Rolando Sánchez Montaña que en paz descansa, quien me guio desde el momento que trabaje en el laboratorio, me enseñó a seguir adelante sin importar los obstáculos y nunca perdió la fe en mí. Al Dr. Oscar Cárdenas Alegría que me incentivo a seguir aprendiendo, escribiendo y soñando. A mi tutora la Dra. Ximena Taborga Manrique que en el momento más difícil de mi tesis me brindo su ayuda para culminarla.

A mi familia, mi mamá Brígida Mejía Choque que me tuvo mucha paciencia, mi papá Ismael Laura Mayta, mi hermana Belén Laura Mejía quienes incentivaron mi culminación profesional. A quien me acompaño y cuido con amor Luis Martínez Pimentel.

Por último, a cada persona que en momentos de mi tesis me acompaño y ayudo.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	8
a. Objetivo general	8
b. Objetivos específicos	8
5. DISEÑO TEORICO	9
5.1. MARCO REFERENCIAL	9
5.2. MARCO TEÓRICO	12
5.2.1. Pesticidas	12
5.2.2. Organofosforados	12
5.2.3. Metamidofos	14
5.2.4. Toxicidad	14
5.2.5. Enfermedades relacionadas con los pesticidas organofosforados	15
5.2.6. Mutagenicidad y genotoxicidad	19
5.2.7. Formas de eliminar pesticidas	20
5.2.8. Pruebas de mutagenicidad	26
5.2.9. Pruebas de genotoxicidad	26
5. MARCO CONCEPTUAL	27
6. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	28
7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES EN ESTUDIO	29
8. DISEÑO METODOLOGICO	30
8.2. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación	31
9.2. Tipo de investigación	31
10. MATERIALES Y MÉTODOS	31
10.1. Productos agroquímicos	31
10.2. Análisis químico por espectrofotometría	31
10.3. Elaboración de perlas de arcilla con TiO₂	32
10.4. Irradiación con luz UV	33
10.5. Irradiación solar	34
10.6. Cinética de la fotoinactivación	34

10.7.	Test de Ames: prueba de mutagenicidad	34
10.8.	Test de <i>Allium</i>: prueba de genotoxicidad	35
10.8.1.	Preparación de bulbos de cebolla.....	35
10.8.2.	Evaluación de la actividad genotóxica del Metamidofó	36
10.8.3.	Interpretación de resultados de test de <i>Allium</i>	37
11.	PROCESAMIENTO DE DATOS	38
11.1.	Recolección	38
11.2.	Elaboración	38
11.3.	Análisis	39
12.	RESULTADOS Y DISCUSION	39
12.1.	Curva de calibración del Metamidofó	39
12.2.	Fotoinactivación del pesticida Metamidofó	42
12.3.	Tratamiento con irradiación UV artificial	43
12.4.	Tratamiento con irradiación UV artificial con perlas de arcilla con TiO₂	44
12.5.	Tratamiento con irradiación UV solar	46
12.6.	Tratamiento con irradiación UV solar acompañado con perlas de arcilla y TiO₂	47
12.7.	Cinética de la fotoinactivación	49
12.8.	Test de Ames	52
12.9.	Test de <i>Allium</i>	56
12.10.	Análisis de resultados	62
13.	CONCLUSIONES	70
14.	RECOMENDACIONES	71
15.	ANÁLISIS PROSPECTIVO DEL IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN	71
16.	BIBLIOGRAFIA	73
17.	ANEXOS	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de organofosforados, según la Toxicología.	13
Tabla 2. Clasificación de la toxicidad de los pesticidas en la vía oral y dérmica.	15
Tabla 3. Comparación de niveles genotóxicos cuando se expone el pesticida en agua.....	38
Tabla 4. Análisis de mutagenicidad de Metamidofo bajo diversos tratamientos de fotoinactivación, mediante el ensayo de <i>S. typhimurium</i> con las cepas, TA98 y TA100.	53
Tabla 5. Aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas de la raíz de <i>Allium</i> cepa expuestas a diferentes tratamientos para la fotoinactivación de Metamidofo.	57
Tabla 6. Costo de producción de la perla de arcilla con TiO ₂ para la fotoinactivación de 1L a 10000000 L de pesticida Metamidofo.....	72
Tabla 7. Costos de tratamiento con perlas de arcilla y TiO ₂ para cada río que presenta contaminación con pesticida Metamidofo	73

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. El pesticida al ingresar a la célula, modula varias actividades celulares y subcelulares que conducen a cambios genéticos y epigenéticos y causan diversas enfermedades o muerte celular.....	16
Figura 2. Posibles vías de daño hepático por pesticidas organofosforados.	19
Figura 3. Mecanismo de acción del Oxido de Titanio con luz UV y luz solar ante un químico aromático complejo.....	21
Figura 4. vías de fotoinactivación del metamidofos catalizadas por el TiO ₂	25
Figura 5. Fotografía de las perlas de arcilla realizadas manualmente con la inmovilización del TiO ₂ al 2%.	33
Figura 6. A) Barrido espectrofotométrico del pesticida comercial, longitud de onda 237nm con mayor absorbencia. B) Barrido espectrofotométrico del patrón Metamidofos, longitud de onda 237nm con mayor absorbencia, pruebas realizadas por triplicado.....	40
Figura 7. A) Curva de calibración del patrón Metamidofos. B) Curva de calibración del Metamidofos comercial, ambos a 237nm.....	42
Figura 8. A) Concentración del pesticida Metamidofos durante cuatro horas de irradiación con los distintos tratamientos. B) Porcentaje de degradación del pesticida Metamidofos durante cuatro horas con los diversos tratamientos. Todos los tratamientos con irradiación solar, irradiación solar con TiO ₂ , irradiación UV e irradiación UV con TiO ₂ están bajo las siguientes condiciones experimentales: TiO ₂ 2%, Metamidofos 1ppm, todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.....	45
Figura 9. Cinética de la degradación fotocatalítica del Metamidofos. A) Irradiación UV con perlas de arcilla y TiO ₂ y B) Irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO ₂	50

Figura 10. Durabilidad de las perlas de arcilla recubiertas con TiO ₂ para la fotoinactivación del Metamidofo, se muestra el porcentaje de degradación.	51
Figura 11. Resultados de la prueba de Ames del eMetamidofo. A) TA 98 y B) TA100. Se contó el número de colonias revertidas por placa. En estos experimentos se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de Salmonella typhimurium. Los valores se expresan como la media ± SD. Diferencias significativas determinada por Dunn Test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.	55
Figura 12. Tipos de aberraciones cromosomales encontradas en los tratamientos efectuados a el pesticida Metamidofo. A) puente cromosómico en la telofase, B) c-mitosis, C) cromosoma rezagado, D) pérdida de cromosoma, E) cromosoma vagabundo, F) cromosomas pegajosos, G) cromosomas fragmentados, H) cromosomas agrupados.	59
Figura 13. Resultados de Test de Allium A) Índice mitótico. B) Total de Aberraciones Cromosomales. Tratamientos usados: Control + (MMS 100mg/L), control – (agua destilada), irradiación solar, irradiación solar con TiO ₂ , irradiación UV e irradiación UV con TiO ₂ . La diferencia significativa con el test de Dunn p<0.05, las barras representan la desviación estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001	60
Figura 14. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO ₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO ₂), SOL, SOL+TiO ₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO ₂), índice mitótico, mutagenicidad TA98 (medio=6-9, bajo= 2-5, alto>9 y no mutagénico <2 de índice de mutagenicidad).....	64
Figura 15. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO ₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO ₂), SOL, SOL+TiO ₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO ₂), índice mitótico, mutagenicidad TA100 (Alto= 1-1.77, Medio= 0.51-0.74 y Bajo= 0.09-0.29).	65

Figura 16. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂), SOL, SOL+TiO₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO₂), aberraciones cromosomales, mutagenicidad TA98 (medio=6-9, bajo= 2-5, alto>9 y no mutagénico <2 de índice de mutagenicidad).67

Figura 17. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂), SOL, SOL+TiO₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO₂), índice mitótico, mutagenicidad TA100 (Alto= 1-1.77, Medio= 0.51-0.74 y Bajo= 0.09-0.29).68

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1. Curva de crecimiento para la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i>	89
Anexo 2. Curva de crecimiento para la cepa TA100 de <i>S. typhimurium</i>	89
Anexo 3. Peso de la arcilla antes y después de la impregnación con TiO ₂	90
Anexo 4. Resultados de la fotoinactivación por ocho horas, del pesticida Metamidofo .	91
Anexo 5. Análisis estadístico.....	90

Tabla de abreviaciones

TiO ₂	Oxido de titanio
IM	Índice de mutagenicidad
MI	Índice de mitosis
UV	Radiación ultravioleta
ONG	Organización no Gubernamental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
SENASAG	Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria
OP	Organofosforado
ADN	<i>ácido desoxirribonucleico</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FSH	hormona estimuladora del folículo
LH	hormona luteinizante
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
e ⁻	Electrón
h ⁺	Protón
AB	Aberraciones cromosomales

Resumen

En este trabajo, se investigó la fotoinactivación del Metamidofo, un pesticida organofosforado que es común contaminante en el ambiente, que además tiene propiedades tóxicas, mutagénicas y genotóxicas. La fotoinactivación se estudió en diferentes condiciones de irradiación, como tratamiento con irradiación UV artificial, irradiación UV solar, además en ambos casos se añadió TiO₂ como catalizador, inmovilizado en un soporte ecológico como son las perlas de arcilla. Para verificar su fotoinactivación se usaron métodos de mutagenicidad (Test de Ames) y genotoxicidad (Test de *Allium*). Los efectos mutagénicos y genotóxicos se determinaron mediante las aberraciones cromosomales (AC) y el índice mitótico (MI). Para la prueba de Ames, se utilizaron las cepas TA98 y TA100.

Después de los tratamientos de irradiación, el metamidofo no presentó actividad mutagénica con la cepa TA100, pero se determinó que era mutagénico con la cepa TA98 en los tratamientos con irradiación UV artificial y solar durante las cuatro horas de irradiación, además en todos los tratamientos de fotoinactivación del metamidofo, se presentó un incremento de concentración en la primera y segunda hora de irradiación. La degradación del metamidofo por irradiación UV artificial dio lugar a un aumento de concentración en la segunda hora, también aumentó la genotoxicidad y las aberraciones cromosomales, de igual manera sucedió en los demás tratamientos de irradiación UV artificial con perlas de arcilla y TiO₂, irradiación UV solar e irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂ pero el aumento de concentración, aberraciones cromosómicas y mutagenicidad se dio en la primera hora de irradiación, probablemente debido a la formación de sub-productos de transformación tóxicos. El potencial de genotoxicidad y

mutagenicidad disminuyó gradualmente con el tiempo en los tratamientos de irradiación UV artificial y solar, acompañados de las perlas de arcilla y TiO₂, posiblemente debido a la fotoinactivación del Metamidofo. Este estudio proporciona información sobre la fotoinactivación del compuesto original y los cambios en la mutagenicidad y genotoxicidad debidos a los productos de transformación después de cuatro horas de irradiación.

Palabras clave

Pesticida, TiO₂, Fotoinactivación, Metamidofo.

Abstract

In this work, the photoinactivation of Metamidophos, an organophosphate pesticide that is a common pollutant in the environment, which also has toxic, mutagenic and genotoxic properties, was investigated. The photoinactivation was studied under different irradiation conditions, such as treatment with artificial UV irradiation, solar UV irradiation, and in both cases TiO₂ was added as a catalyst, immobilized on an ecological support such as clay beads. To verify their photoinactivation, mutagenicity (Ames test) and genotoxicity (Allium test) methods were used. Mutagenic and genotoxic effects were determined by chromosomal aberrations (CA) and mitotic index (MI). For the Ames test, strains TA98 and TA100 were used.

After irradiation treatments, metamidophos did not present mutagenic activity with strain TA100, but it was determined to be mutagenic with strain TA98 in the treatments with artificial UV and solar irradiation during the four hours of irradiation, in addition, in all the photoinactivation treatments of metamidophos, an increase in concentration was presented in the first and second hour of irradiation. The degradation of metamidophos by artificial UV irradiation resulted in an increase in concentration in the second hour, also increased genotoxicity and chromosomal aberrations, as well as in the other artificial UV irradiation treatments with clay beads and TiO₂, solar UV irradiation and solar UV irradiation with clay beads and TiO₂ but the increase in concentration, chromosomal aberrations and mutagenicity occurred in the first hour of irradiation, probably due to the formation of toxic transformation by-products. The potential for genotoxicity and mutagenicity gradually decreased with time in the artificial and solar UV irradiation treatments accompanied by the clay beads and TiO₂, possibly due to the photoinactivation

of Metamidophos. This study provides information on the photoinactivation of the parent compound and the changes in mutagenicity and genotoxicity due to the transformation products after four hours of irradiation.

Key words

Pesticide, TiO₂, Photoinactivation, Metamidophos.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento en la población y el incremento de la demanda de alimentos ejerce una gran presión para el desarrollo de la producción agrícola, por tanto, favorece el uso excesivo de pesticidas. En consecuencia, los pesticidas son ahora el segundo mayor contaminante del agua potable y uno de los principales culpables de la toxicidad humana y animal (Sraw et al., 2018). El pesticida Metamidofos es muy utilizado en Bolivia, puesto que es eficaz contra una gran variedad de insectos, sin embargo, está clasificado según la OMS y la EPA, como un producto químico de clase I, considerado como un compuesto altamente tóxico (Amalraj & Pius, 2015).

Los pesticidas organofosforados son altamente tóxicos para la salud humana por ser un potente inhibidor de acetil colinesterasa, el pesticida Metamidofos usado en Bolivia causa contaminación ambiental en agua y alimentos, el metamidofos según un estudio de Barrón Cuenca et al., (2020) en Bolivia, los agricultores llegan a tener problemas de salud como dolores de cabeza, dificultades de respiración, problema digestivo y además se reportó contrariedades en el embarazo, abortos espontáneos y también estrés oxidativo, daño genotóxico y mutagénico.

Debido a daños en la salud por posible bio-acumulación en organismos acuáticos y humanos es de vital importancia usar nuevas tecnologías, como la fotocatalisis con dióxido de titanio (TiO_2) para remediar dicha contaminación. La fotoactivación utilizando dióxido de titanio se ha establecido como un medio eficiente y razonable para la eliminación de una gran variedad de contaminantes del agua (Duranoğlu, 2016). La característica más llamativa de este proceso es la generación de fuertes radicales

oxidantes, debido a su baja brecha de banda y su gran superficie específica, además de su comportamiento estable e inerte, su naturaleza no tóxica y su larga vida útil que resulta en la destrucción del sustrato químico (Han et al., 2009).

Entre los sistemas procarióticos, el Test de Ames es uno de los más usados para evaluar el posible potencial mutagenico de sustancias químicas tóxicas, (Mortelmans & Zeiger, 2000). Las plantas, al ser receptoras directas de los pesticidas se convierten en un material importante para la prueba genotóxica, por ello el uso del Test de *Allium* ha sido considerado como el mejor sistema de ensayo para indicar la presencia de sustancias químicas debido a una dinámica sensible del crecimiento de las raíces, una fase mitótica clara y número de cromosomas estable (Ranjan & Mandal, 2019).

2. ANTECEDENTES

Las principales fuentes de contaminación por pesticidas en aguas superficiales y subterráneas, son los flujos de retorno de los campos agrícolas y la lixiviación (Affam & Chaudhuri, 2013). Las concentraciones de los pesticida organofosforados en el medio ambiente se debe a que no existe la degradación e inactivación completa en el ambiente como ocurre en China, India, Francia, Estados Unidos, Brasil y Bolivia (Dhananjayan et al., 2020; Olisah & Adams, 2020; Skovgaard et al., 2017; Xu et al., 2019). Otro problema es la alta solubilidad en agua del pesticida Metamidofos (2000 g/L a 25 °C), por lo que los residuos y el destino de este pesticida en el medio ambiente es de importancia para la salud humana y ambiental (Yen et al., 2000).

Un estudio con el pesticida clorpirifos demuestra que la concentración entre 1 y 10 ppm deprime el crecimiento del alga azul-verde *Anabaena sp.* y reduce los protozoos ciliados

en comunidad microbiana natural (Nusbaumer et al., 2021), Además la salud humana puede verse amenazada por una mezcla de pesticidas en el agua a una concentración de <50 ppm (Mattice et al., 2010).

Según un estudio realizado en Taiwán el contenido de metamidofos mayor a 0,5 ppm en verduras y cereales llega a ser tóxico y su residuo permitido en agua es menor de 0,1 ppm para que no cause ningún síntoma de toxicidad (Wu et al., 2001). Otro estudio con Metamidofos realizado en mariscos (*Litopenaeus vannamei*) para evaluar la actividad del acetil colinesterasa mostró que las concentraciones de 0.83, 1.18 y 1 ppm, inhibe la actividad de la enzima mostrando dificultad en la locomoción del marisco (García et al., 2006). El equipo de investigación de Zhang et al., (2020) realizó un estudio con el pez cebra y demostró la citotoxicidad y la mutagenicidad por la expresión alta del gen recA, ambas con el Metamidofos.

La acumulación de residuos de pesticidas en el ambiente y organismos es alarmante pues según (Ernst et al., 2018) en los ríos grandes de Sudamérica como San Javier, Río Uruguay, Río Negro, Mercedes, San Gregorio y Nuevo Berlín, se encontró que existe por lo menos 30 diferentes tipos de pesticidas bioacumulados en los peces, estas concentraciones van de 1 a 194 ppm. En Bolivia estudios relacionados a residuos de pesticidas en ríos, lagunas y acueductos, muestran restos de pesticidas en el Río Pirai aparentemente existe una concentración de 0,2 ppm (Santa Cruz), en el Río Rocha se encontró cerca de 30 pesticidas con una concentración de 0,12 ppm aproximadamente (Cochabamba), en el Lago Titicaca, una concentración de 10,287 ppm (La Paz) (Bascopé 2019; Quispe et al., 2019; D'Abzac et al., 2020).

Dado la posible mutagenicidad y genotoxicidad, las herramientas para degradar e inactivar el Metamidofo son variadas desde un enfoque microbiológico con bacterias del suelo donde se realiza el fumigado, estas bacterias llegan a tener enzimas degradadoras generalmente para pesticidas organofosforados (Jiang et al., 2019; Tang et al., 2017) pero el inconveniente surge por los costos que lleva desde el aislamiento y el medio de cultivo de uso, por tanto otra alternativa es el proceso fotoquímico, en el cual se usa la irradiación UV artificial o solar ante el pesticida (Luna et al., 2020). También se puede adicionar compuestos fotocatalíticos como el TiO₂ o ZnO₂ que son los catalizadores más usados (Abdennouri et al., 2016; Soltani-nezhad et al., 2019). Asimismo existen diferentes superficies para contener estos catalizadores, puesto que al ser compuestos químicos en polvo se hace difícil la separación del medio acuoso, entre las superficies están el vidrio, el aluminio, en las cuales la impregnación del catalizador es costosa en cuanto al método sol-gel (Adamek et al., 2019; Malakootian et al., 2019). Un método novedoso es el uso de arcilla para la impregnación de TiO₂, pues es un material que no contamina el medio ambiente y es de bajo costo, además el método de impregnación solo es solo calor (Kaur et al., 2018; Sraw et al., 2018). El TiO₂ en arcilla se ha utilizado en algunas investigaciones y, por ejemplo, se ha observado que los monocrotofos se eliminan en un 73,75% (Sraw et al., 2018) el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (pesticida) se elimina en un 92% (Balakrishnan et al., 2020).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pesticidas químicos son sustancias que sirven para la protección de cultivos de diferentes tipos de plagas.

En Bolivia el uso de pesticidas está en aumento, según datos presentados por la ONG Probioma (Productividad Biósfera y Medio Ambiente) se evidencia que entre 1999 y 2017, la importación legal de agroquímicos se incrementó de 25 millones a 152 millones de kilos anuales. Adicionalmente, el equivalente del 30% de la cantidad entra por contrabando (Chuquimia, 2018).

La contaminación en suelo, ríos, lagos y alimentos, también va en aumento, porque muchos de los pesticidas tardan en degradarse en su totalidad. La alimentación y el consumo de agua contaminada es una fuente importante de exposición humana a los pesticidas, en este contexto, los pesticidas químicos son un producto de especial interés, debido a que se aplican intencionalmente en los cultivos agrícolas y por lixiviación y lluvias llegan a las cuencas de los ríos, lagos y acuíferos.

Los pesticidas tienen por diseño, propiedades tóxicas, y existe la preocupación de efectos crónicos en la salud, derivados de la exposición a bajos niveles de pesticidas en alimentos y agua (Fantke& Jolliet, 2016).

La clase de pesticidas más usada en Bolivia es la de los organofosforados, sub-clase metamidofos, que derivan del ácido fosfórico, este inhibe la acción de la acetilcolinesterasa, produciendo la acumulación de la acetilcolina, en consecuencia, existe alteraciones en el sistema nervioso central. Los organofosforados ingresan al organismo a través de diferentes vías como la respiratoria, digestiva y a través de la piel, debido a que son altamente liposolubles y rápidamente absorbidos (Ramirez, 2019).

Estudios realizados en Bolivia demuestran que existe un uso común del pesticida Metamidofos en varios tipos de cultivos, como tomate, maíz, apio, frutas y hoja de coca.

Además, que la eliminación del desecho de pesticida se lleva a cabo en los ríos, que luego son fuentes de agua no solo para el riego, sino también para el consumo diario (Cuenca et al., 2019). Por otra parte, varias de las trazas de pesticidas encontradas en lechuga, tomate, cebolla y papa sobrepasan los límites de ingesta aceptable de pesticidas en alimentos según el Codex alimentario (Skovgaard et al., 2017).

Los daños genéticos que provocan los pesticidas son varios desde la formación de aductos en el DNA, inserción, deleción, translocación y aberraciones cromosómicas, también existe la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan el ADN, causan peroxidación lipídica y disfunción mitocondrial (Sabarwal et al., 2018). Se ha relacionado el estrés oxidativo con polimorfismo de enzimas que están relacionadas específicamente con la desintoxicación de pesticidas como la paraoxonasa (PON1) y otras enzimas implicadas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Ramírez et al., 2015), por lo cual estas sustancias tienen un gran potencial cancerígeno, mutagénico, además de implicaciones con otras enfermedades del sistema nervioso (Espinoza & Bustos, 2015).

Debido a los riesgos en la salud que implica las trazas de pesticidas tanto en alimentos como en el agua es de importancia considerar protocolos de remediación para la degradación de estas sustancias, un método eficaz es la fotoactivación química que con ayuda de catalizadores como el óxido de titanio (TiO_2) y la absorción de radiación UV, aceleran la reacción de fotoactivación, generando el hidroxilo que mineraliza los compuestos orgánicos como los pesticidas (M'Bra et al., 2019) estos compuestos pueden llegar a inactivar las propiedades mutagénicas y genotóxicas que tiene el pesticida Metamidofó.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de pesticidas en diferentes superficies como alimentos, agua, tierra, es lamentable en nuestro ámbito, porque generalmente muchos pesticidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en degradarse por completo.

Debido a la mala manipulación de los pesticidas, como fumigar con altas concentraciones, las mezclas de pesticidas y falta de uso del equipo de bioseguridad para el agricultor, se incrementa el riesgo porque, aunque pase mucho tiempo desde la última aplicación, el pesticida seguirá presente en el alimento y agua por la bio-acumulación. Por otra parte, las trazas de pesticidas que se encuentran en los alimentos y agua pueden llegar a ser potencialmente mutagénicos para el consumidor.

En Bolivia el uso indiscriminado de pesticidas es preocupante, si bien los países desarrollados cuentan con sistemas para registrar las concentraciones de plaguicidas en los alimentos y agua, esto no siempre sucede en países en vías de desarrollo. Lo cual compromete también a la salud de los consumidores de productos agrícolas porque en general los pesticidas utilizados inhiben de manera aguda la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, induciendo la neurotoxicidad y la muerte celular (Terry, 2012) y posiblemente la neurodegeneración crónica de bajo nivel a largo plazo, además se observó que los pesticidas influyen en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Paul et al., 2016).

Entonces se debe realizar la eliminación adecuada de restos de pesticidas, un método eficiente para la degradación del pesticida en agua es la fotoactivación química, que usa

la luz UV o solar con diferentes tipos de catalizadores para acelerar la reacción de degradación del pesticida (Akbari & Shokri, 2017).

A través de este trabajo se evaluó la fotoinactivación del pesticida Metamidofo con la irradiación UV artificial y solar con el uso del catalizador dióxido de titanio en un soporte de arcilla para evitar la contaminación del medio acuoso, consiguientemente se evaluó la mutagenicidad y genotoxicidad antes y después de la fotoinactivación, mediante el test de Ames y Test de Allium, respectivamente.

4. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Evaluar la fotoinactivación del pesticida Metamidofo producida por la irradiación UV artificial y solar, mediante la determinación de la mutagenicidad y genotoxicidad.

b. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de mutagenicidad y genotoxicidad del pesticida Metamidofo mediante Test de Ames y Test de Allium.
- Inactivar la capacidad de mutagenicidad y genotoxicidad del pesticida Metamidofo con la exposición a luz UV artificial y solar con y sin el coadyuvante desactivador.
- Verificar la pérdida de la capacidad mutagénica y genotóxica del pesticida después del tratamiento.

5. DISEÑO TEORICO

5.1. MARCO REFERENCIAL

La Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) define un pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o animales, especies no deseadas de plantas y animales que causan daño a los cultivos (FAO/OMS, 2020).

Según datos del SENASAG, la importación de pesticidas en Bolivia va en aumento, se encontró que durante 2017 se decomisaron 35 toneladas de agroquímicos que no cumplían con la normativa sanitaria, muchos estaban vencidos, falsificados o sin registro sanitario (Chuquimia,2018).

Se estima que cada persona consume 1,5 mg/día de pesticidas en los alimentos debido a la bio-acumulación según un estudio realizado en China y Francia (Hayatsu & Taylor & Francis., 2018) y en el agua, los parámetros de concentración de pesticidas se encuentran fuera de lo normal a nivel internacional y más aún en países en desarrollo. La contaminación ambiental y alimentaria por la presencia de residuos de pesticidas producen efectos negativos en la salud humana, como la aparición de diversos tipos de cáncer, leucemias (Jors, 2018), diabetes, daño fetal y problemas neurológicos. (Grewal et al., 2017). Dos estudios llevados a cabo en Bolivia concluyen que existe una alta correlación entre la diabetes y la exposición a los pesticidas (Hansen et al., 2014) y con una alta exposición a tebuconazol, 2,4-D o ciflutrina que son pesticidas, se observa daño genotóxico con roturas de la cadena de ADN (Barrón Cuenca et al., 2019).

En Bolivia no existe una forma adecuada de la eliminación de pesticidas, por ello se puede encontrar restos en el agua y alimentos. La dinámica de pesticidas en el ambiente tiene un proceso de adsorción por el suelo, entonces existe una interacción entre estos compuestos y las partículas del suelo. Este proceso tiene lugar en fase líquida, debido a que el pesticida es transportado disuelto en el agua hasta la superficie de las partículas del suelo, las cuales se encuentran a su vez recubiertas por una película de agua (Nicolopoulou et al., 2016). Luego la lixiviación provoca un movimiento vertical de los pesticidas a través del suelo originado por el agua de lluvia o del riego de los cultivos. El proceso de lixiviación es el principal responsable de la contaminación de las aguas subterráneas. Este proceso está asociado a dos fenómenos: Flujo preferencial, que permite el movimiento rápido de las moléculas de pesticidas en el agua a través de los macro-poros del suelo (favorece el movimiento vertical de los pesticidas en el suelo) y flujo matricial que permite el movimiento lento de moléculas de pesticidas en el agua a través de los micro-poros del suelo y por tanto mayor tiempo de contacto con las partículas del mismo, facilitando la difusión en el medio ((Álvarez Martín, 2016)

Se demostró que existe trazas de pesticidas en los ríos como se muestra en un estudio realizado en Cochabamba donde se encontró 30 tipos diferentes de pesticidas en los acueductos que conectan al Rio Rocha, (D'Abzac et al., 2020) esta agua de rio contaminada luego es consumida por los pobladores aledaños al rio o también usada para regar cultivos, sin embargo los tratamientos para la eliminación de los pesticidas no está en uso en ningún lugar en Bolivia.



Fuente:(Sal&Roca, 2018)

Existen muchos estudios que apuntan que la mejor forma de eliminación de pesticidas es la fotoinactivación química con luz solar o luz UV, pero también esta se puede combinar con algún tipo de catalizador para acelerar la reacción y acortar el tiempo de irradiación.

Un catalizador potente es el óxido de titanio, por su producción de radical hidroxilo, que es capaz de oxidar y mineralizar casi cualquier molécula orgánica, produciendo CO_2 , H_2O e iones inorgánicos. Además, solo se necesita la irradiación solar o UV como fuente de energía que proporcione los fotones necesarios para la excitación de la molécula. (Cruz et al., 2017).

La fotoinactivación química es una tecnología de oxidación avanzada prometedora para aliviar los problemas de contaminación no solo producida por pesticidas, sino también por microorganismos y otro tipo de materia orgánica que se encuentra en el agua y los alimentos.

5.2.MARCO TEÓRICO

5.2.1. Pesticidas

“Los pesticidas son compuestos o mezcla de compuestos que se aplican sobre un terreno agrícola para destruir, mantener alejados, prevenir o limitar la acción de hongos, insectos, hierbas, plantas, animales o microorganismos que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados” (Bouaid, 2006).

5.2.2. Organofosforados

Los compuestos organofosforados (OP) son moléculas altamente tóxicas utilizadas principalmente como pesticidas. Los compuestos OP (organofosforados) también incluyen gases nerviosos, utilizados en el pasado como agentes de guerra química. Un uso intensivo y generalizado de pesticidas desde el siglo XX ha dado lugar a la aparición de un problema global, relacionado con el medio ambiente y la salud humana. (Manco et al., 2018)

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico con varias combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y nitrógeno. El átomo central del fósforo está conectado a un átomo de azufre por un doble enlace y a los grupos de alcoxi o amino por enlaces de éster y otro grupo químico como halógeno, alifático y aromático. Los insecticidas (OP) son muy tóxicos y liposolubles, su fórmula general deriva del ácido fosfórico, como se aprecia en la Figura 1 (Chesson, 2013).

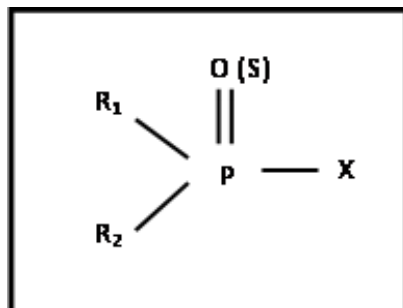


Figura 1. Estructura química de los Organofosforados.

En nuestro medio los pesticidas organofosforados son muy usados en la agricultura sobre todo el Metamidofos, este pesticida organofosforado tiene una categoría toxicológica I, (Tabla 1), debido a que causa daño neurológico, cáncer, abortos, deformaciones, hipotiroidismo y la muerte (Zanabria et al., 2018).

Tabla 1. Clasificación de organofosforados, según la Toxicología.

Categoría Toxicológica	Nombre genérico	Nombre comercial
I	Diclorvos	Diclorvos, Vapona
I	Mevinphos	Mevinfos
I	Monocrotofos	Monocrotofos 600 SL
I	Metilparation	Metilparation, Folidol
I	Paration	Parawet, Folidol
I	Metamidofos	Tamarón, Monitor
II	Coumafos	Asuntol, CoRal
II	Diazinon	Basidon
II	Fenthion	Lebaycid 500 SC
II	Profenofos	Curacron, Tambo
III	Clorpirifos	Arriero 2,5, Lorsban
III	Malathion	Malathion, Aucuafin

Fuente: Zanabria et al., (2018)

5.2.3. Metamidofos

El metamidofos, 0,S-Dimetil fosforoamidotioato (MAP) es un pesticida organofosforado (Figura 2) con una actividad de amplio espectro como insecticida-acaricida a través de la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa en los insectos y mamíferos (Dai et al., 2008).

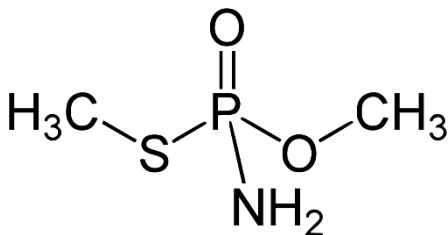


Figura 2. Estructura química de Metamidofos.

5.2.4. Toxicidad

La mayor parte de los pesticidas son liposolubles por ello facilitan su absorción en los humanos a través de la piel, vías respiratorias y vía digestiva; existe clasificaciones de los pesticidas según el nivel de toxicidad de cada pesticida por su estructura química: arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de urea, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides, tiocarbamatos y triazina, según su acción específica como ser, acaricidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas y bactericidas (Subils, 1998).

Tabla 2. Clasificación de la toxicidad de los pesticidas en la vía oral y dérmica.

OMS clase	Nivel de toxicidad	LD50 (ppm)		Ejemplo
		Oral	Dermal	
clase Ia	extremadamente peligroso	<5	<50	paration, dieldrin
Clase Ib	altamente peligroso	5 a 50	50-200	eldrin,diclorovos
Clase II	moderadamente peligroso	50-2000	200-2000	DDT, clodano
Clase III	ligeramente peligroso	>2000	>2000	Malation
Clase IV	no presenta peligro es normal	>5000		carbatimida, cycloprofin

Fuente: Chandra & Linthoingambi, (2017).

5.2.5. Enfermedades relacionadas con los pesticidas organofosforados

Los estudios han revelado posibles relaciones entre la exposición a plaguicidas organofosforados y los efectos graves a la salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares, efectos negativos sobre el sistema reproductor masculino, sistema nervioso, demencia. Además, la exposición prenatal a los organofosforados se ha correlacionado con la disminución en la duración de la gestación y los problemas neurológicos que ocurren en los niños (Nicolopoulou et al., 2016) también causan interrupción endocrina mediante la unión a los receptores hormonales presentes en la membrana celular, causando la interrupción de la señalización celular. Los pesticidas también pueden inducir señales inflamatorias o pueden generar especies reactivas de

oxígeno (ROS) que pueden causar estrés oxidativo conduciendo a la acumulación de proteínas a través de la deformación del sistema de proteasoma ubiquitina, causando modificaciones genéticas y epigenéticas que conducen a diversas enfermedades, la toxicidad del pesticida puede alterar el funcionamiento de las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Sabarwal et al., 2018).

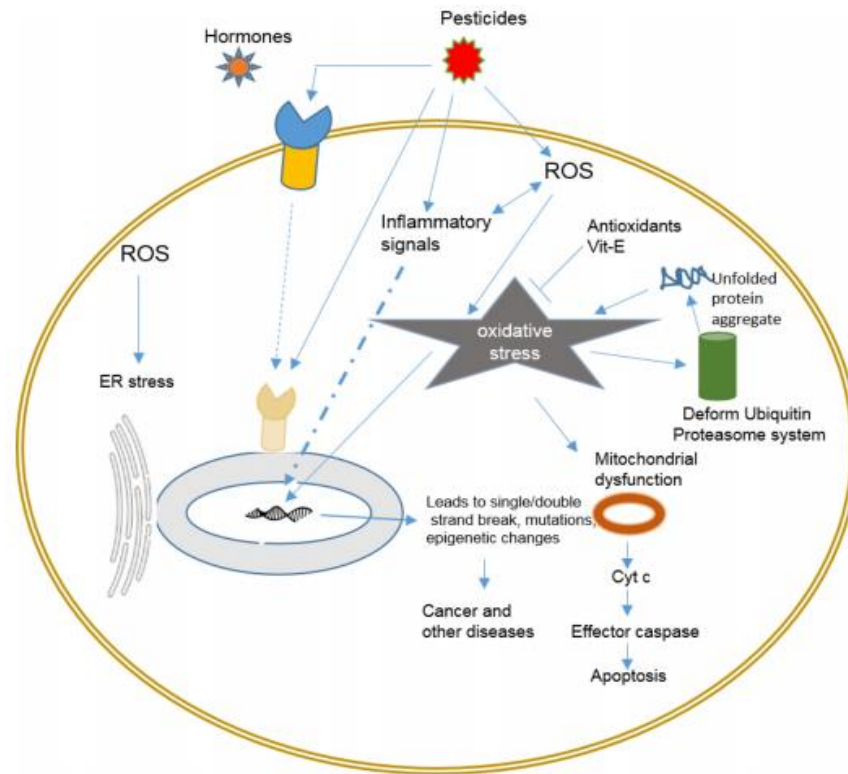


Figura 1. El pesticida al ingresar a la célula, modula varias actividades celulares y subcelulares que conducen a cambios genéticos y epigenéticos y causan diversas enfermedades o muerte celular.

Fuente: Sabarwal et al., (2018).

Los daños en el sistema nervioso provocan la inhibición irreversible de la actividad acetilcolinesterasa por sustancias como los pesticidas organofosforados, cuando existe esta inhibición conduce a la acumulación de acetilcolina en la sinapsis que luego conduce a la hiper-estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos en el sistema nervioso central y periférico, que después conducen a la iniciación del estado epiléptico, mientras

que en otras personas solo se observan signos tóxicos en los nervios periféricos (Figueiredo et al., 2018).

Varias de las enfermedades causadas a nivel nervioso por los organofosforados son por disfunción mitocondrial, degeneración axonal y estrés oxidativo.

Se han postulado mecanismos biológicamente admisibles que pueden causar la enfermedad del Parkinson por pesticidas específicos, tales como la inhibición del complejo mitocondrial I por rotenona, la inhibición del aldehído deshidrogenasa por los fungicidas ditiocarbamatoferbam, mancozeb y maneb y la inducción de estrés oxidativo por paraquat (Calvo et al., 2019).

En otro estudio se encontró que el deterioro de la memoria después de la exposición repetida al pesticida chlorpyrifos se debió a la disminución de la mielinización en las neuronas (Peris et al., 2014).

No solo existe el daño a nivel nervioso también se produce daño de otros sistemas como el sistema renal que es causa de la inducción por estrés oxidativo que conduce al desarrollo de enfermedad renal, alterando la filtración glomerular e induciendo la proteinuria. También se sugiere que el estrés oxidativo excesivo altera el citoesqueleto de los podocitos y produce albuminuria, lesión tubular y, finalmente, fibrosis túbulo intersticial (Ghosh et al., 2017).

En el sistema cardiovascular los pesticidas piretroides afectan funciones de canales de sodio, que están presentes en células neuronales y células cardíacas, inactivando los canales sodio a potenciales hiper-polarizándolos causando, riesgo de enfermedad coronaria, al igual que los organofosforados con la generación de ROS en los tejidos

cardíacos. Se encontró también que los piretroides aumentan la peroxidación de lípidos, alterando la capacidad antioxidante de las células cardíacas. La Permetrina se acumula en miocitos causando daño con un 0,1–0,2% en la ingesta dietética. Los organoclorados causan hipotensión y anomalías electrocardiográficas, infarto de miocardio y disfunción miocárdica ventricular izquierda. El lindano se acumula en el corazón y causa estrés oxidativo al modificar la actividad de enzimas scavenger, (Georgiadis et al., 2018). La atrazina inhibe la acción de la hemo-oxigenasa cardíaca y se ha encontrado que también induce el estrés oxidativo celular y aumentan la apoptosis (Chiu et al., 2019).

Para el sistema reproductor, la alteración del comportamiento por la ingestión de concentraciones sub-letales de organofosforados puede alterar los niveles de neurotransmisores en el hipotálamo, alterando las concentraciones de gonadotropina hipotalámica y la capacidad de respuesta de las células pituitarias a GnRH por acciones de esteroides gonadales, disminuyendo FSH y LH por retroalimentación. Los organofosforados también son inhibidores potentes de la producción de metabolitos del CYP3A4 y los principales metabolitos de la testosterona de manera no competitiva e irreversible (Maitra, 2018).

Para el sistema hepático, por exposición a pesticidas organofosforados se observa aumento en los biomarcadores séricos comunes de daño hepático que son: aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) y que a menudo se acompañan de aumento en el mediador inflamatorio factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Otros biomarcadores de daño hepático incluyen ácido fosfatasa (AcP) y fosfatasa alcalina (ALP). El flujo biliar deteriorado y la excreción biliar también podrían servir como indicadores indirectos de daño hepático (Somayyeh & Karami, 2017).

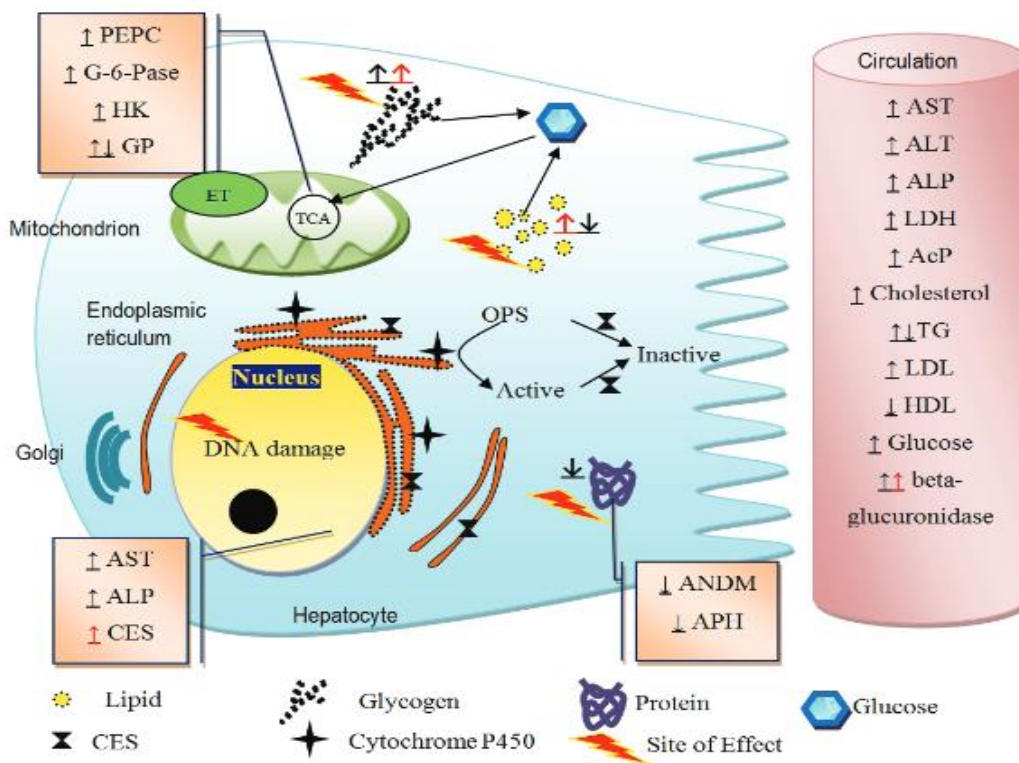


Figura 2. Posibles vías de daño hepático por pesticidas organofosforados.
Fuente: (Somayyeh Karami-Mohajeri, 2017).

5.2.6. Mutagenicidad y genotoxicidad

Los pesticidas producen alteraciones genéticas, se ha demostrado una fuerte relación entre la exposición y algunos proto-oncogenes, debido a los efectos cito-genéticos de los pesticidas. Se ha propuesto que el estrés oxidativo y la producción de radicales libres, también puede afectar la capacidad antioxidante y los mecanismos de defensa. Las exposiciones crónicas y agudas a pesticidas se evalúan por los niveles de biomarcadores como las enzimas colinesterasas (Hilgert et al., 2018). En genotoxicología, las variables citogenéticas son: aberraciones cromosómicas y presencia de micronúcleos, falla en intercambios de cromátides hermanas y fragmentación del ADN (Bianco et al., 2017; Fatma et al., 2018).

Se sabe que los pesticidas son sustancias que son reactivas a los enlaces en el ADN, lo que causa cambios y, por lo tanto, pueden ser cancerígenos. Los daños causados son: enlaces cruzados en el ADN, descomposición y aductos en el ADN, generando células defectuosas (Marcelino et al., 2019).

5.2.7. Formas de eliminar pesticidas

El desarrollo de la industria agroquímica ha aumentado drásticamente y con ello el aumento de la aplicación de pesticidas y los métodos de eliminación inadecuados de aguas residuales son preocupación para la calidad del agua dulce y alimentos. En vista de este problema es aconsejable desarrollar tecnologías para promover la fácil degradación de este tipo de compuestos.

5.2.7.1. Fotocatálisis

La degradación fotoquímica es uno de los procesos más frecuentes que afectan al destino de los pesticidas en aguas superficiales. Se sabe que muchos pesticidas experimentan varias transformaciones fotoquímicas a través de mecanismos directos y/o indirectos al exponerse a la luz solar. La fotólisis directa ocurre cuando el pesticida absorbe directamente la irradiación solar, lo que conduce a la formación de su estado excitado electrónicamente que puede sufrir reacciones químicas (Adachi et al., 2018).

5.2.7.2. Fotocatálisis heterogénea de proceso avanzado con óxido de titanio

Una forma prometedora de realizar la mineralización de este tipo de sustancias es la aplicación de catalizadores que aceleran los procesos de oxidación, estos se caracterizan por la generación de radicales libres muy reactivos y oxidantes en soluciones acuosas que logran un gran poder de destrucción (Abdennouri et al., 2016).

Existen varias formas de eliminar compuestos orgánicos como los pesticidas utilizando el peróxido de hidrogeno, un catalizador que ayuda a que la reacción foto-catalizadora sea eficaz ya que tiene dos funciones: La primera es una reacción redox con la superficie del catalizador, generando radicales libre, mientras que la segunda parte implica una cadena de reacciones que finalizan con la formación de oxígeno y agua, es decir, oxidación (Jiménez et al., 2015).

La ayuda de un catalizador como el TiO_2 proporciona vacantes de superficie en los iones de titanio formando sitios activos y formando grupos oxidrilos para la degradación catalítica de contaminantes orgánicos, el óxido de titanio es un foto-catalizador que degrada pesticidas en un 99% en condiciones adecuadas (Kanan et al., 2019) claro con ayuda de luz UV o la luz solar que excita a las moléculas de TiO_2 (Figura 4).

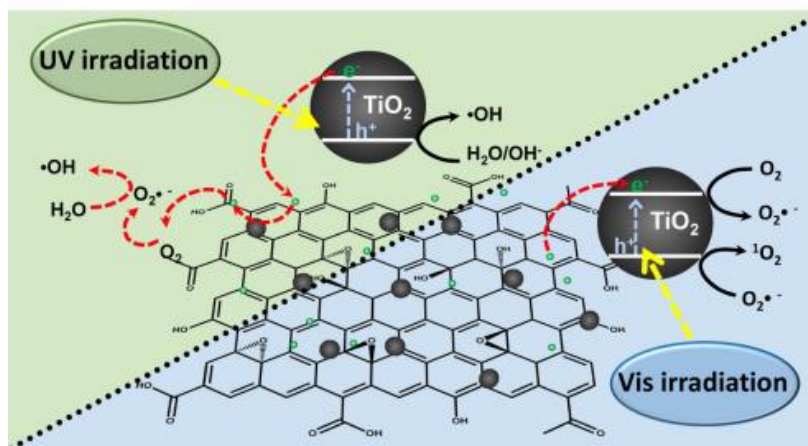


Figura 3. Mecanismo de acción del Oxido de Titanio con luz UV y luz solar ante un químico aromático complejo

Fuente: (Cruz et al., 2017b)

Cuando TiO_2 es irradiado con 390 nm aproximadamente, en el sistema acuoso, los orificios reaccionan con H_2O u OH^- adsorbidos en la superficie del semiconductor para

producir OH radicales que son las especies más oxidantes en este proceso (Szczepanik, 2017).

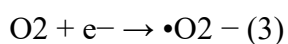
Una metodología reciente, aplica el reciclaje de catalizadores de TiO₂ con la intercalación de titanio en arcillas, existe ya el uso de láminas de vidrio, sílica y carbón activo, pero estas llegan a ser caras a comparación del uso de arcilla (Kaur et al., 2018).

La reacción que sigue el tratamiento con TiO₂, empieza con la actividad fotocatalítica que se origina en la superficie del TiO₂ cuando existe la absorción de fotones de energía, para superar los umbrales de la banda de brecha, se ilumina con una energía de luz mayor que su energía de separación de banda (3.2 electrón Voltio) y se generan electrones de banda de conducción (e⁻), cuando se encuentra con oxígeno y agua.

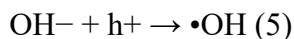
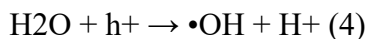
La absorción de luz por el complejo produce un electrón en estado excitado que promueve a la banda de conducción, facilitando la reducción de aceptadores de electrones como H₂ y O₂. Los electrones de la banda de conducción (e⁻) y los huecos de la banda de valencia (h⁺) se generan (ecuación 2) (Yu et al., 2019).



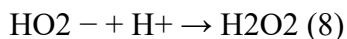
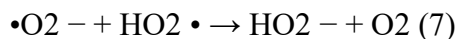
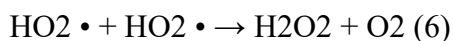
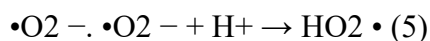
El oxígeno que es absorbido en la superficie del TiO₂, evita la recombinación de pares de electrones, atrapando electrones, así se forman iones radicales superóxido (-O₂), (ecuación 3).



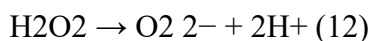
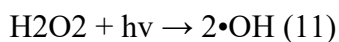
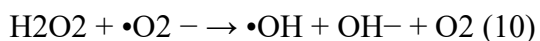
Los radicales $\cdot\text{OH}$ se forman a partir de los agujeros que reaccionan con el H_2O o el OH^- absorbidos en la superficie del TiO_2 (ecuación 4, 5).



En consecuencia, el H_2O_2 se forma:



El H_2O_2 también forma $\cdot\text{OH}$ y O_2^{2-} $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- \quad (9)$



El OH y O_2 son ampliamente aceptados como oxidantes primarios en fotocatalisis heterogénea. El poder oxidante de la $\cdot\text{OH}$ es lo suficientemente fuerte como para oxidar completamente al pesticida Metamidofos adsorbido en la superficie de TiO_2 en PO_3 , H_2O y otros minerales ácidos. (Dai et al., 2008; Kanan et al., 2020; Szczepanik, 2017; Wei et al., 2009).

En primer lugar implica la ruptura de los enlaces P-S, P-N y P-O. Cuando los enlaces P-S y P-O del metamidofos se rompen, los átomos de P reaccionan con los radicales de metilo

para formar [amino (metilsulfanilo) fosforilo] metano y [amino (metoxi) fosforilo] metano, que se oxidan a su vez a P-formilfosfonidodioato y ácido fosfino carboxílico, respectivamente. Cuando el enlace P-N del metamidofos se rompe, un dímero de O, S-dimetil dímero de fosfonato, que es más propenso a la degradación hasta a los productos intermedios 1-aminoetanol y el trimetoximetano forman los productos acetamida y dimetoximetanol, respectivamente, dando lugar a una mineralización completa, el ácido fosfórico es el principal producto final (Dai et al., 2008). En cuanto a la degradación de la estructura química del Metamidofos se tiene entendido que se puede seguir diferentes vías

Figura 4.

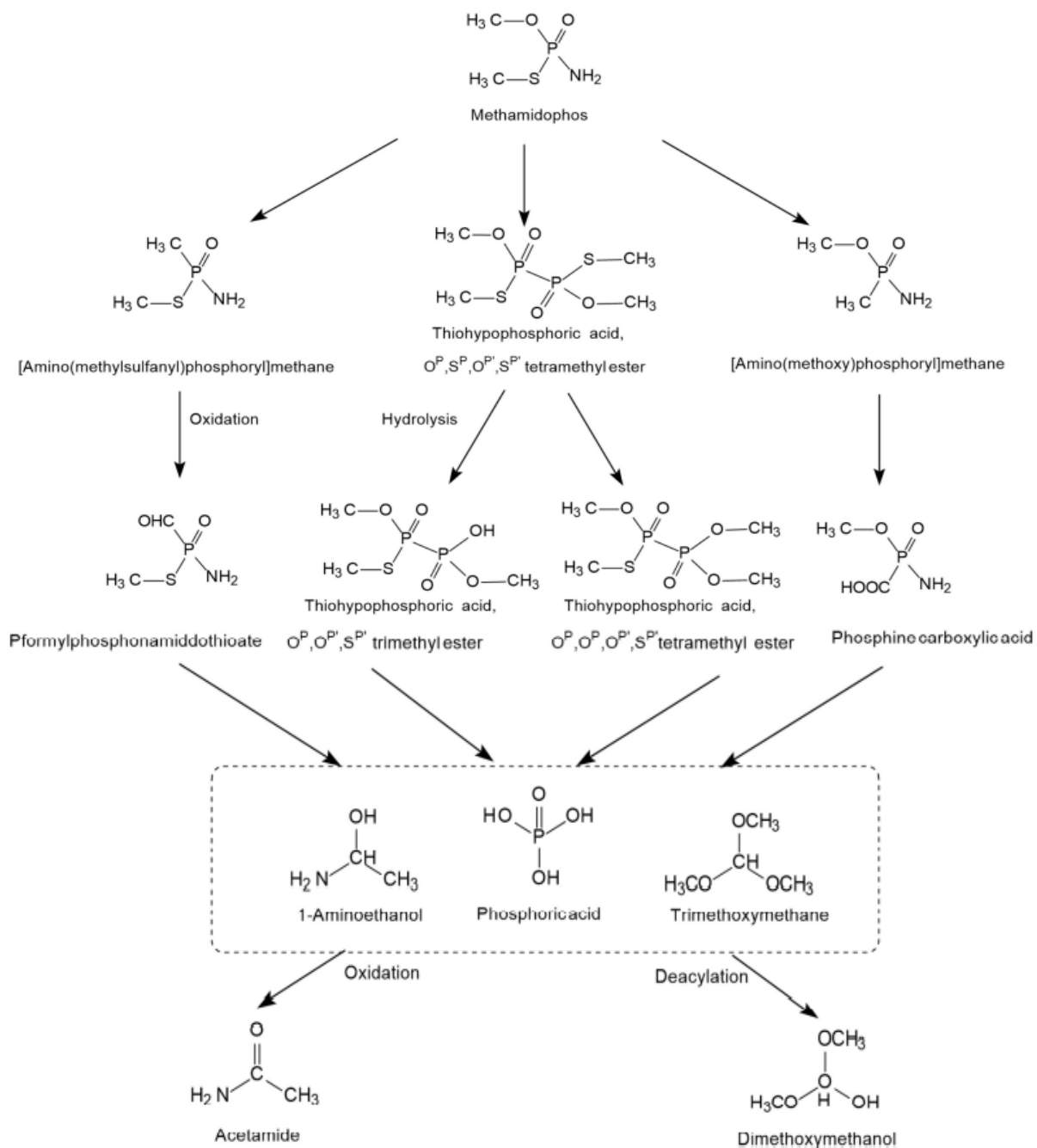


Figura 4. vías de fotoinactivación del metamidofos catalizadas por el TiO₂.

Fuente:(Lin et al., 2020)

5.2.8. Pruebas de mutagenicidad

Test de Ames o ensayo de mutación inversa bacteriana, con la *Salmonella typhimurium* de diversas cepas TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 y TA1538. En *Escherichia coli* las cepas son WP2 y WP2urvA, en ambas bacterias existe un gen defectuoso (mutante) que inhibe la expresión del aminoácido esencial en el caso de la *Salmonella typhimurium* histidina y en la *Escherichia coli* el triptófano. La prueba se basa en la inducción de mutaciones inversas en el gen defectuoso. Los agentes mutagénicos provocan una mutación inversa en el gen defectuoso que permite a las bacterias sintetizar el aminoácido esencial (histidina o el triptófano) para crecer en un medio mínimo. La alta sensibilidad del sistema permite la medición de pequeños incrementos en la frecuencia de mutación debido a las características especiales de las células (Turkez et al., 2017)

Los mutantes sobrevivientes de *E. coli* K-12 son defectuosos en SOS (*recA* , *lexA* y *polA*). La respuesta SOS depende de un represor (proteína LexA), un inductor (proteína RecA) y una molécula efectora (moléculas de ADN monocatenario, producidas como resultado de un daño). El ensayo implica la estimación del daño del ADN causado por sustancias contaminantes mostrando así su potencial mutagénico (Khan et al., 2019).

5.2.9. Pruebas de genotoxicidad

El ensayo de cometa, se utiliza para detectar daños en el ADN, en este ensayo las células se cubren de agarosa en un portaobjetos de vidrio y se lisan en sal alta y detergente para eliminar los componentes celulares solubles, es decir, las membranas. El ADN queda en forma de nucleoides, que consisten en bucles de ADN superenrollados unidos a una

matriz. Las roturas del ADN relajan el superenrollamiento, y Los bucles de ADN relajados son capaces de extenderse durante la electroforesis, formando una "cola de cometa", que luego es observada mediante microscopía de fluorescencia. La intensidad de la cola de cometa se refiere a la frecuencia de rotura (Štampar et al., 2021)

Test de Allium, es un excelente modelo de ensayo in vivo, donde es posible evaluar el daño producido por una sustancia de interés sobre el crecimiento de las raíces y el ADN vegetal. El bulbo se sumerge en la solución analito y luego se observa el crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces, pero cuando se sumerge en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células (Sardi et al., 2016).

5. MARCO CONCEPTUAL

Organofosforado: Compuesto orgánico que contiene enlaces fósforo-carbono (excepto los ésteres de fosfato y fosfito), utilizados principalmente en el control de plagas.

Oxido de titanio: Es un foto-catalizador, tanto en la forma de rutilo como la anatasa son producidos a gran escala de forma industrial y se los usa principalmente como catalizadores.

Catalizador: Es un semiconductor que puede ser excitado fácilmente, formándose de esta forma sitios donadores y captosres de electrones, dando lugar a la aparición de reacciones de oxidación-reducción.

Fotodegradación: Degradación de la superficie química de un compuesto por la acción de la radiación ultravioleta del sol.

Fotocatálisis: Es una reacción fotoquímica que convierte la energía solar en energía química en la superficie de un catalizador o sustrato, consistente en un material semiconductor que acelera la velocidad de reacción. Durante el proceso tienen lugar reacciones tanto de oxidación como de reducción.

Fotoinactivación: Inactivación de propiedades toxicológicas como ser mutagenicidad, citotoxicidad y genotoxicidad por medio de una reacción fotoquímica.

Mutagenicidad: Capacidad de ocasionar alteraciones del material genético celular (genes, cromosomas) o producir mutaciones sobre el ADN.

Genotoxicidad: Es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos.

Bio-acumulación: Es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en su medio o en los alimentos.

6. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hipótesis nula

Los pesticidas Metamidofos son compuestos mutagénicos y genotóxicos, que luego de la irradiación con luz UV o luz solar no pierden su potencial mutagénico ni genotóxico.

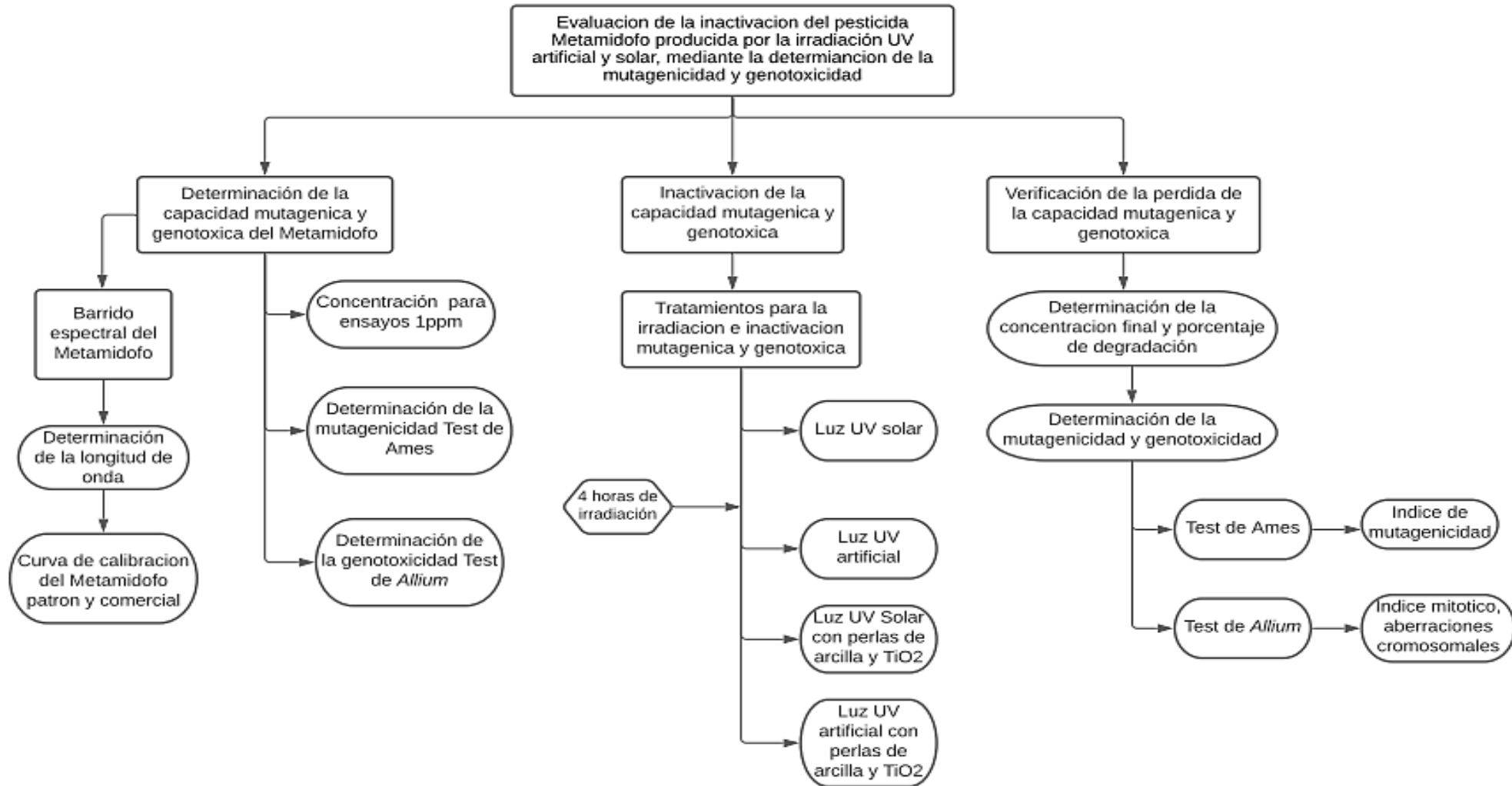
Hipótesis alterna

Los plaguicidas son compuestos mutagénicos y genotóxicos que después de la irradiación con luz UV o solar con la adición de catalizadores pierden su potencial mutagénico y genotóxico.

7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES EN ESTUDIO

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA	TIPO DE VARIABLE
Concentración de Metamidofos	Concentración del pesticida por la Absorbencia a 237 nm de longitud de onda	Relación de absorbencia con la concentración de metamidofos	Concentraciones en ppm del metamidofos.	Absorbencia	Concentración en ppm del metamidofos		Cuantitativo
Tiempo de irradiación	Diferentes tiempos de exposición a la luz solar y luz UV.	Tiempo de exposición	1, 2, 3 y 4 horas de irradiación con UV y luz solar	Tiempo de exposición	Horas		Cuantitativo
TiO ₂	Diferentes tipos de concentración de TiO ₂ para la irradiación.	Concentración de TiO ₂	Screening con absorbancia	Absorbancia	Concentración de TiO ₂		Cuantitativo
Test de <i>Allium</i>	Test para medir el índice mitótico y tipos de aberraciones cromosomales.	Se cuantifica el tipo de aberración cromosomal y el índice mitótico.	Índice mitótico Aberración cromosomal	Actividad genotóxica, aberraciones cromosomales	Índice mitótico, porcentaje de aberraciones cromosomales	Nivel de Riesgo genotóxico	Cuantitativo
Test de Ames	Test para medir el índice de mutagenicidad	Reversión de <i>Salmonella tiphimurium</i> con mutaciones puntuales.	Mutaciones en cepas TA 100 y TA 98	Actividad mutagénica	Índice de mutagenicidad	IM ≥ 2	Cuantitativo

8. DISEÑO METODOLOGICO



8.2. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación.

Para el estudio de inactivación, se usó el pesticida organofosforado Metamidofó. El estudio se realizó en el Laboratorio de la Cátedra de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, en el año 2019.

9.2. Tipo de investigación

El trabajo de investigación es de tipo experimental.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Productos agroquímicos

Los agroquímicos usados fueron los pesticidas Metamidofó comercial, que contiene 600 g/L, obtenido del mercado informal, el patrón Methamidopho grado GC con una concentración de 25000 mg/L de Sigma Aldrick.

10.2. Análisis químico por espectrofotometría

Se realizó un barrido espectral con un espectrofotómetro (BOECO, Germany, S-22 spectrophotometer), las diluciones seriadas del pesticida Metamidofó comercial fueron las siguientes: 1) 1:100, 2) 1:100, 3) 1:20, 4) 1:3 5) 1:2, 6) 1:2, 7) 1:2, 8) 1:2, 9) 1:2, 10) 1:2 y para el barrido espectral del Metamidofó patrón las diluciones seriadas fueron: 1) 1:100, 2) 1:100, 3) 1:2, 4) 1:2, 5) 1:2, 6) 1:2, 7) 1:2, 8) 1:2, la lectura se realizó con cubetas de cuarzo (VWR Spectrophotometer Cell, 10 mm). Para hallar la concentración se usó la fórmula de linealidad.

Asumiendo que existe una fotoinactivación del pesticida se usó la relación matemática para poder identificar el porcentaje de inactivación:

$$i \% = \frac{C1 - C2}{C1} \times 100$$

Donde C1 y C2 son las concentraciones del Metamidofó al inicio y después de los diversos tratamientos de inactivación, respectivamente. (Jafari et al., 2016)

10.3. Elaboración de perlas de arcilla con TiO₂

La arcilla se obtuvo del mercado popular de la ciudad de La Paz, de acuerdo a la comerciante procedente de Viacha, esta arcilla por coloración marfil aparentemente es denominada bentonita (Monica, 1997).

Se formaron perlas con un diámetro aproximado de 3,88 cm de manera manual con una superficie irregular, con un peso promedio de 23,324g, posteriormente se deshidrató las perlas a 120°C por 4 horas, luego se calcinó a 400°C por 3 horas en mufla, para obtener la dureza de la arcilla se llevó a una temperatura de 600°C por 3 horas. Seguidamente se enfrió a temperatura ambiente, para luego lavar con agua destilada, por último se deshidrató a 120°C durante 3 horas y finalmente se calcinó a 400°C por 2 horas (Smith, 2001).

Para la inmovilización de las partículas de TiO₂ en la superficie de las perlas de arcilla se usó el método de fijación por calor, se preparó una suspensión de TiO₂ (P-25, Degussa) al 2%. La suspensión de TiO₂ se colocó en agitación máxima por 2 horas seguido de 30 minutos de sonicación. Posteriormente se adicionaron las perlas de arcilla en la solución de TiO₂ por 12 horas para la absorción. Las perlas se secaron a 120°C seguidos de

calcinación a 400°C por 2 horas. Se efectuó el procedimiento de inmovilización de TiO₂ dos veces para obtener una capa consistente y uniforme (Kaur et al., 2018). Las perlas fueron pesadas antes y después del procedimiento de inmovilización de TiO₂ (Anexo 1)



Figura 5. Fotografía de las perlas de arcilla realizadas manualmente con la inmovilización del TiO₂ al 2%.

10.4. Irradiación con luz UV

La irradiación se llevó a cabo por cuatro horas con luz UV (Ulix BALLAST, 220/240 V) que emite una luz ultravioleta de aproximadamente 365nm de longitud de onda, la solución de pesticida de 50 mL fue expuesta a 10 cm de la fuente de irradiación, con una agitación moderada 500rpm (Thermo SCIENTIFIC) así mismo fue medido el pH de inicio entre 6-7 y se realizó el seguimiento de la temperatura de 19-20°C, la concentración inicial de la solución fue de 1ppm de Metamidofó.

La segunda solución a irradiar con luz UV tuvo sumergida cinco perlas de arcilla con TiO₂, se tuvieron las mismas condiciones de agitación y concentración del pesticida anteriormente mencionadas.

10.5. Irradiación solar

La irradiación solar se realizó en julio y agosto porque se tiene una mayor incidencia de radiación ultravioleta sobre todo en los horarios de 9 hasta las 14, en instalaciones del laboratorio, la solución del pesticida se irradió por cuatro horas en agitación constante con una concentración de 1ppm del pesticida (Grover et al., 2017).

De igual forma se hizo una solución de pesticida de 1ppm, se irradió con cuatro perlas de arcilla con TiO₂ en un sistema similar al descrito anteriormente.

10.6. Cinética de la fotoinactivación

Para la evaluación de la cinética de fotoinactivación del pesticida Metamidofó se usó la fórmula de cinética de pseudo-primer orden, que puede ser representada por la simple expresión como en la siguiente ecuación (Affam & Chaudhuri, 2013).

$$\ln\left(\frac{C1}{C0}\right) = k * t$$

Donde, k es una constante de velocidad de pseudo-primer orden, t es el tiempo de irradiación en horas, Co es la concentración inicial y C1 es la concentración final del Metamidofó. Posteriormente se determinó la constante de velocidad (k) a partir de la pendiente de la línea recta de los tratamientos efectuados a la solución del pesticida.

10.7. Test de Ames: prueba de mutagenicidad

Se utilizó la cepa bacteriana modificada de *Salmonella typhimurium* (MOLTOX) TA 98 para el análisis del marco de corrimiento y la cepa TA100 para la sustitución de bases (Farmacopea, 2017), las mismas fueron pre-incubadas por 16 horas a 37°C en caldo nutritivo (OXOID N°2), posteriormente fueron caracterizadas fenotípicamente con las pruebas de biotina histidina y su caracterización genotípica se realizó con la prueba de

ampicilina (0.8%), tetraciclina (0.08%) y por último, la prueba de rfa (sensibilidad al cristal violeta) de concentración 0.1%.

Para el análisis de mutagenicidad del pesticida se preparó el medio mínimo que contenía agar bacteriológico (OXOID), glucosa (OXOID) al 10% y medio salino Voget-Bonner (MgSO₄·7H₂O, ácido nítrico monohidratado, K₂HPO₄, NaNH₄HPO₄·4H₂O) 0.2M. Se añadió el agar blando (agar, NaCl) 2 mL en tubos estériles, posteriormente se añadió 0,5 mL de tampón fosfato, 0,1 mL de trazas de histidina-biotina, 0,1 mL de la muestra a ser analizada y por último 0,1 mL del cultivo de 24 horas de *S. typhimurium*.

Luego se incubó por 72 horas y se contó el número de revertantes para luego calcular el índice de mutagenicidad, con la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias revertantes inducidas}}{N^{\circ} \text{ de colonias revertantes espontaneas}}$$

Se considera mutagénico cuando el índice de mutagenicidad es igual o mayor a 2.

10.8. Test de *Allium*: prueba de genotoxicidad

10.8.1. Preparación de bulbos de cebolla

Se seleccionó bulbos de cebolla (*Allium cepa*) aproximadamente de 10 a 15 cm de diámetro, sin defectos observables, posteriormente se desechó las capas externas secas, seguidamente se cortó la zona del plato basal de la raíz, para luego remojar los bulbos cortados en un bañador con agua por aproximadamente 20 minutos (Datta et al., 2018).

En el pre-crecimiento se colocó los bulbos en agua destilada de forma que la zona basal se encuentre en contacto con el agua destilada, posteriormente se dejó crecer las raíces durante 72 horas a 20°C en oscuridad, por triplicado.

10.8.2. Evaluación de la actividad genotóxica del Metamidofó

Para la evaluación de la actividad genotóxica se colocó un volumen de 40 ml de la solución de Metamidofó (1ppm) en un vaso de vidrio y se puso los bulbos de cebolla en contacto con la solución. Posteriormente se dejaron crecer las raíces por 72 horas.

Para el control negativo se usó el agua destilada y como control positivo la solución MMS (metanosulfonato) 10 mg/L.

Luego del crecimiento de las raíces en la solución del pesticida, se procedió a realizar cortes de 1 a 3 mm de la raíz, seguidamente se lavaron con agua destilada, posteriormente se colocó el alcohol absoluto por 5 minutos, después se añadió 0,5 mL de una solución de Carnoy (6:3:1 de etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial) dejándolo por una hora (Felisbino et al., 2018).

A continuación, los cortes de la raíz se lavaron con etanol absoluto y agua destilada, consecutivamente se lo llevó a 1ml de HCl 5N por 20 minutos, se agitó para tener una exposición homogénea, posteriormente se lavó los cortes de raíz con agua destilada y por último se colocó en una solución de 400 uL de aceto-orceína 1% por 48 horas en la oscuridad. (Leme & Marin-Morales, 2009).

Los cortes de la raíz se recogieron y se posicionaron sobre el portaobjetos, después se situó el cubreobjetos, luego un trozo de papel toalla y finalmente, con ayuda de la goma, se presionó segura y rápidamente para extender el tejido de la raíz de la cebolla y posteriormente se observaron con un microscopio de luz (Olympus, BX60). Se observaron 30 campos microscópicos en cada campo se tenía alrededor de 50 a 70 células en proceso

de mitosis, haciendo una cobertura total de 1000 células por placa (Leme & Marin-Morales, 2009).

10.8.3. Interpretación de resultados de test de Allium

El índice mitótico (IM) corresponde a las células en división en cualquier fase celular y se calcula de la siguiente forma:

$$MI\% = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Las aberraciones cromosomales (AC) se registraron como: cromosomas fragmentados, cromosomas agrupados, C-mitosis, puente cromosómico, cromosoma rezagado, cromosomas pegajosos, pérdida de cromosoma y cromosoma vagabundo, todos se representaron como el total de aberraciones cromosomales sobre el número total de células observadas para obtener su porcentaje.

$$AC\% = \frac{\text{Número total de aberraciones}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

El tipo de aberraciones cromosomales (AT) se rige de acuerdo a las aberraciones reportadas anteriormente, de forma individual sobre el número de células observadas.

$$AT\% = \frac{\text{Número del tipo de anormalidad}}{\text{Número de células observadas}} \times 100$$

Para determinar el riesgo genotóxico se comparó los valores con la siguiente tabla:

Tabla 3. Comparación de niveles genotóxicos cuando se expone el pesticida en agua.

Nivel de genotoxicidad expresado en porcentaje de acuerdo a defectos cromosómicos	Nivel de amenaza	Muestras de agua potable y algunos químicos
2	Natural	Agua potable de calidad
3	Cero a bajo	5 mg NO ₃ /l
5		
9	Medio	0.1µg/L pesticida
12	Alto	0.1µg/l pesticida
15		
20	Crítico	>0.1 µg/l pesticida
23		

Fuente: Firbas P., (2016)

11. PROCESAMIENTO DE DATOS

11.1. Recolección

Todos los datos cuantitativos y cualitativos obtenidos durante el proceso de experimentación indicados anteriormente fueron colocados en una tabla formato Excel, para posteriormente realizar los análisis estadísticos correspondientes, tablas y figuras de los mismos.

11.2. Elaboración

Se elaboraron tablas y gráficas con los datos obtenidos en los experimentos realizados en la investigación, se usó el programa R studio versión 3.6.2, Excel 2016 y Google Colaboraty.

11.3.Análisis

Los datos de inicio fueron analizados para determinar la normalidad con el test de Shapiro, homogeneidad con Levenetest, posteriormente se realizó el análisis con un ANOVA de dos vías, para la comparación de grupos se usó la prueba Tukey. Cuando se observó que no se cumplían los criterios normalidad y homogeneidad se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, con la posterior prueba de Dunn para análisis comparativo de grupos.

12. RESULTADOS Y DISCUSION

12.1.Curva de calibración del Metamidofó

En un inicio se efectuó la identificación de longitud de onda apropiada mediante un barrido espectral, con el pesticida comercial, también para el patrón, la longitud de onda encontrada para la identificación del Metamidofó, en ambos casos fue de 237 nm (Figura 6).

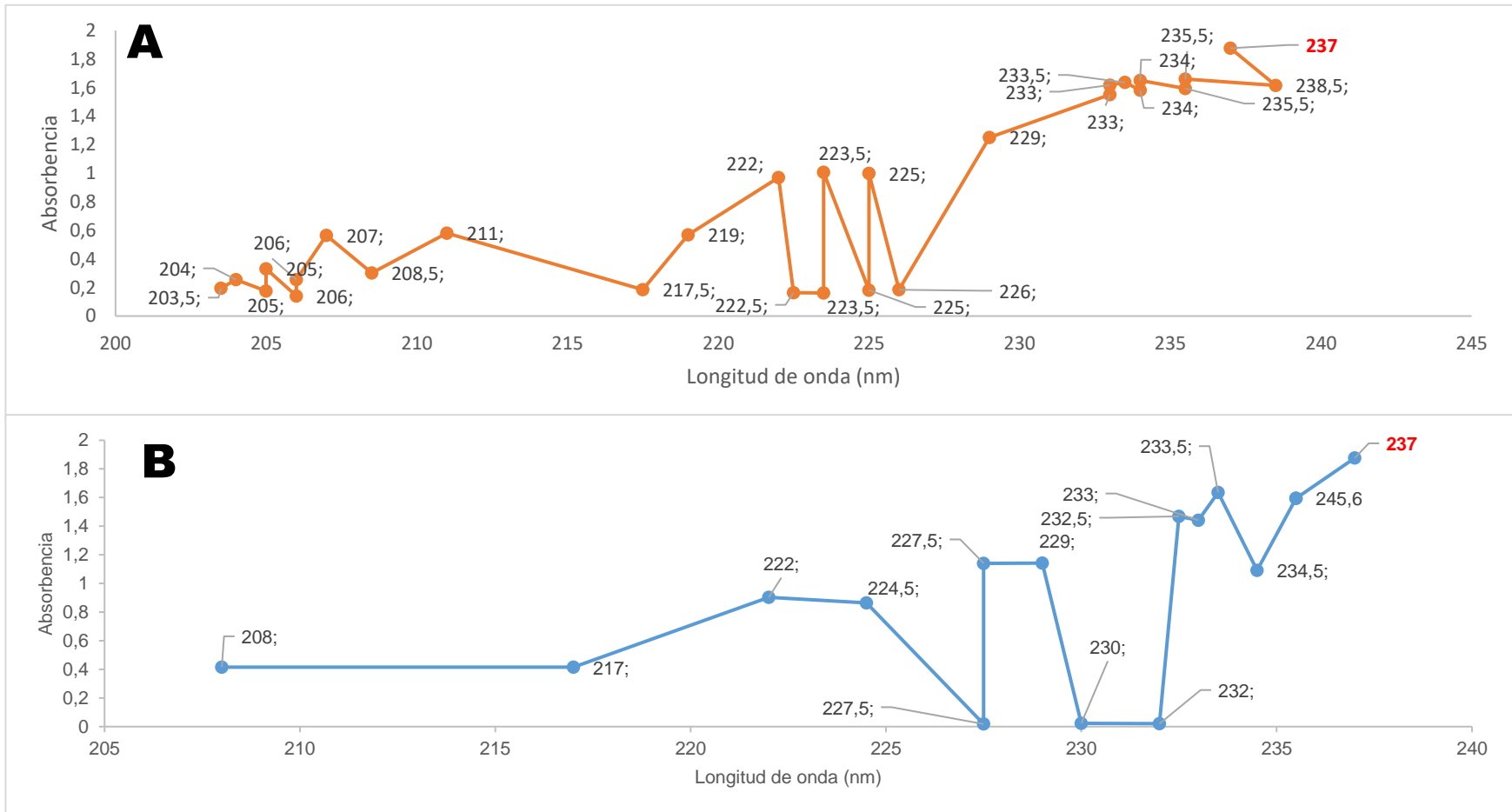


Figura 6. A) Barrido espectrofotométrico del pesticida comercial, longitud de onda 237 nm con mayor absorbencia. **B)** Barrido espectrofotométrico del patrón Metamidofo, longitud de onda 237 nm con mayor absorbencia, pruebas realizadas por triplicado.

Como se puede observar en la Figura 7 A, la curva de calibración del patrón Metamidofos, tiene un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9979$ demostrando una buena linealidad. El límite de detección fue de 0,0006 ppm este valor nos permite detectar la presencia de pesticidas Metamidofos a nivel de trazas ya que de esta forma se encuentran disueltos en el agua. El límite de cuantificación es de 0,0176 ppm. La sensibilidad de cada método se tomó como la pendiente de la curva de calibración, en general la curva tiene una buena sensibilidad con un promedio de 0,0019 (absorbencia/ppm), dicha curva de calibración se usó para la cuantificación del analito (Metamidofos) cuando se procedió a irradiar el pesticida comercial bajo los diferentes tratamientos. En la Figura 7B la curva de calibración del Metamidofos comercial es $R^2 = 0,9529$.

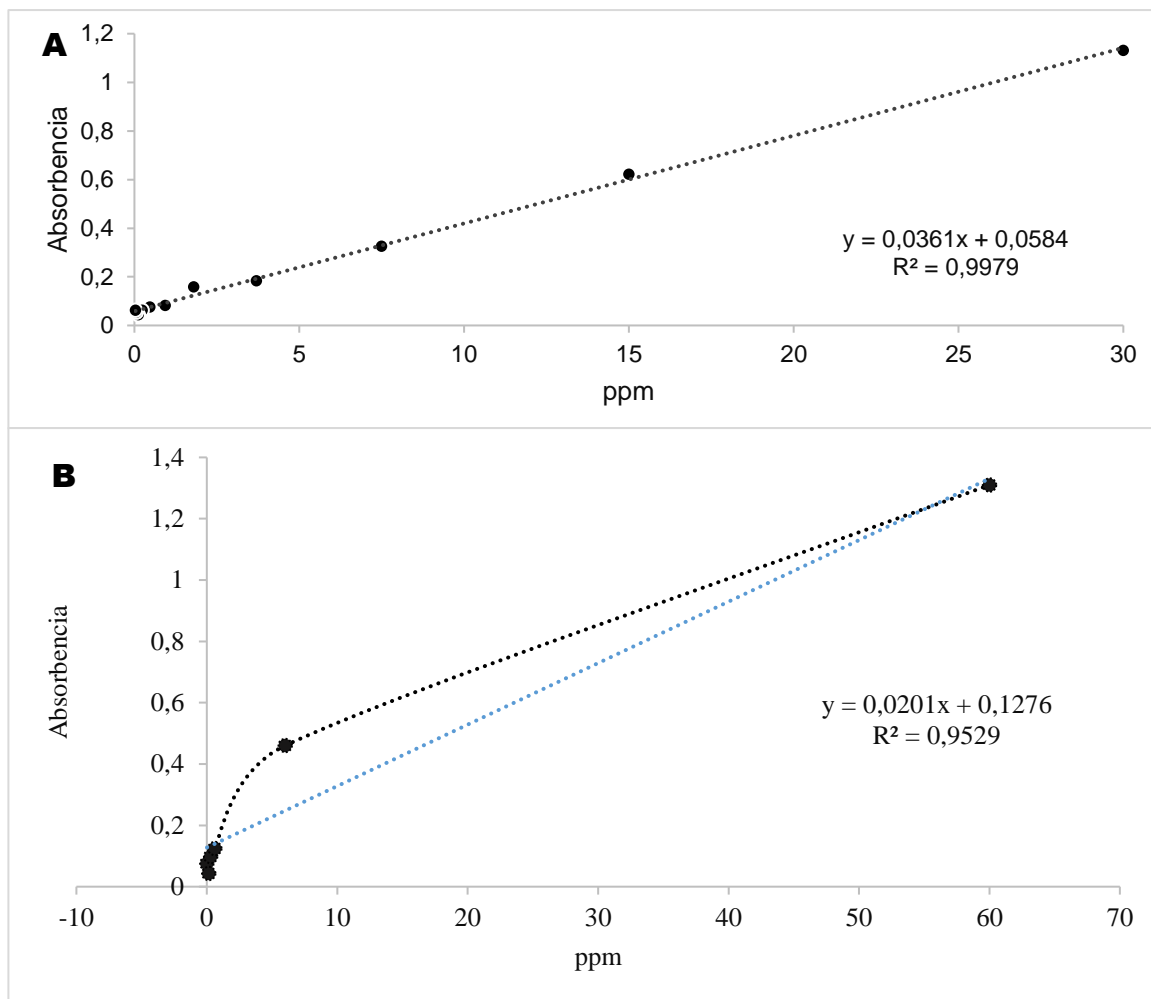


Figura 7. A) Curva de calibración del patrón Metamidof. B) Curva de calibración del Metamidof comercial, ambos a 237 nm.

12.2. Fotoinactivación del pesticida Metamidof

Se consideró el tiempo de cuatro horas en los tratamientos porque previamente se realizó un estudio con 8 horas (Anexo 4) donde se observó que a las cuatro horas existió una disminución en la concentración de 1 ppm hasta 0,007 ppm aparentemente fotoinactivados por la pérdida de absorción del compuesto, además en este experimento inicial el TiO₂ se añadió a una solución acuosa sin ningún soporte, pero los rendimientos entorpecían los procesos de análisis mutagénicos y genotóxicos por la difícil separación del catalizador

con la solución acuosa del pesticida, por ello se consideró usar un soporte como la arcilla para que no altere los metabolitos obtenidos y también se obtenga una mejor utilización del TiO₂ como se observa en el presente estudio.

12.3.Tratamiento con irradiación UV artificial

El tratamiento con irradiación UV artificial no presentó un descenso considerable de concentración, pues los resultados fueron de 1,07 ppm como inicio y 0,543 ppm como la concentración final, el porcentaje de fotoinactivación el resultado fue en un inicio de -16,7 % y finalmente 45,7% la eficacia de la eliminación del pesticida Metamidofo solo con luz UV artificial es casi la mitad del porcentaje de inactivación.

En la Figura 8 A se observa como la concentración del Metamidofo aumenta con el tratamiento UV artificial en la segunda hora, este fenómeno se observa también en los demás tratamientos, pero en la primera hora, por ello es importante mencionar que el Metamidofo comercial tiene excipientes que pueden llegar a formar subproductos, dada la excitación que sufre el compuesto inicial al estar irradiado y que provoca la capacidad de absorber luz UV, logrando así, un efecto hipercrómico, por ello también existen resultados negativos en el porcentaje de fotoinactivación por el aumento aparente del pesticida debido a la formación de sub-productos (Malato et al., 1999; Parker et al., 2017). Este fenómeno de hiper Cromía se presenta de forma tardía en la segunda hora quizás porque solo se usa una longitud de onda de irradiación y no una gama de rayos ultravioleta como en la irradiación solar.

Los resultados obtenidos se corroboran con estudios realizados acerca de la fotoinactivación de otro organofosforado llamado clorpirifo con una eliminación del 50% solo con la irradiación UV artificial (Slotkin et al., 2009) o también en la eliminación del

metilfosfonato que tardó 10 horas de irradiación con una concentración inicial de 10 ppm (Zhang & Ji 2019).

12.4. Tratamiento con irradiación UV artificial con perlas de arcilla con TiO₂

La irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂ muestra un descenso de la concentración de 1,09 ppm al inicio y 0,005 ppm al final, el porcentaje de fotoinactivación fue -9 en un inicio y 99,5% al final. También se muestra en la Figura 8 A y B como la concentración del Metamidofó va en aumento en la primera hora y de forma negativa en el porcentaje de degradación, posiblemente debido al efecto de hipercromía que sufre el Metamidofó al ser irradiado con un catalizador a comparación de la irradiación UV que tiene un efecto tardío en la segunda hora; por tanto, se podría decir que existe una aceleración de la reacción de fotoinactivación cuando se usa el catalizador TiO₂. También se observa que la concentración en la primera hora no es tan alta a comparación de la irradiación solar, tal vez porque el catalizador evita la formación de una mayor cantidad de subproductos que puedan absorberse en el espectro UV provocando un alto efecto de hipercromía.

Como resultado final al parecer en la 4ta. hora el pesticida Metamidofó es degradado casi en su totalidad, lo cual reproduce un estudio donde la fotoinactivación del Metamidofó mediante UV y TiO₂ catalizó el 95% de la degradación en 4 horas (Dai et al., 2008).

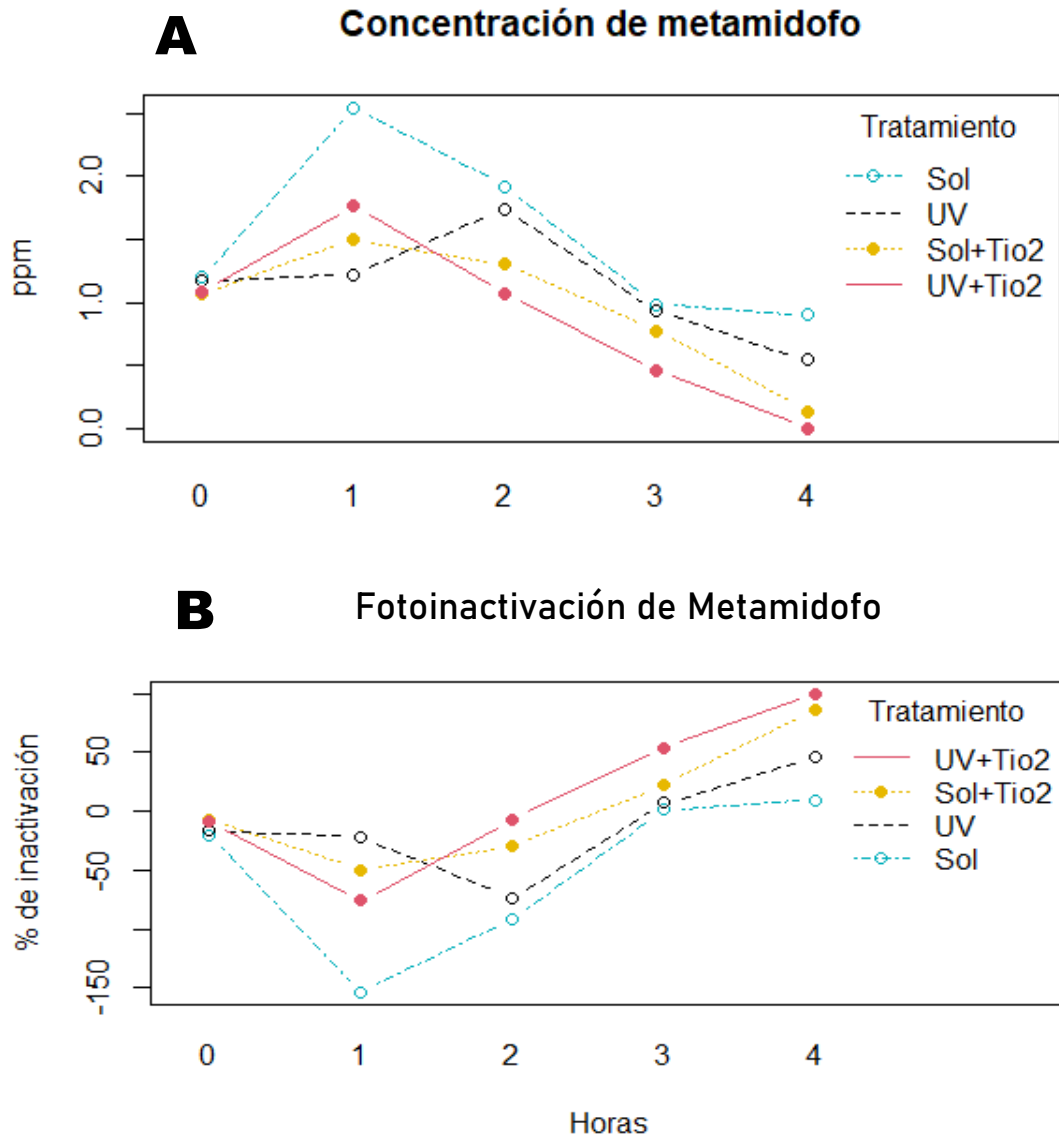


Figura 8. **A)** Concentración del pesticida Metamidofo durante cuatro horas de irradiación con los distintos tratamientos. **B)** Porcentaje de inactivación del pesticida Metamidofo durante cuatro horas con los diversos tratamientos. Todos los tratamientos con irradiación solar, irradiación solar con TiO₂, irradiación UV e irradiación UV con TiO₂ están bajo las siguientes condiciones experimentales: TiO₂ al 2%, Metamidofo 1ppm, todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

12.5.Tratamiento con irradiación UV solar

La intensidad de la radiación solar fue alta llegando a un orden de 10 UVI (intensidad de radiación UV-B solar) 1000 W/m² según WeatherOnline, (2019) lo cual garantiza la energía necesaria para la fotoinactivación del Metamidofo, también se debe recalcar que además de la radiación UV-B, también existe otros tipos de rayos como UV-A y UV-C (Arista, 2017.) La concentración en la hora cero fue de 1,02 ppm y en la 4ta. hora 0,9 ppm como se observa en la Figura 8A. En la Figura 8B el porcentaje de degradación en la hora cero fue -20 y, finalmente, 9,70 %, otra vez en la primera hora se observa la mayor absorción quizás debido por la formación de subproductos, pero la concentración es mucho más elevada en comparación con los otros tratamientos, lo que puede indicar que cuando el pesticida se encuentra en el medio ambiente luego de una hora de fumigación este puede llegar a ser mucho más reactivo que la molécula inicial, por lo cual se debe tener cuidado, además, a lo largo del tiempo el pesticida con el tratamiento de luz solar solo obtuvo un 9,70% de porcentaje de degradación.

Dado los resultados el tratamiento solo con luz solar presenta un bajo porcentaje de inactivación completa del pesticida ya que la excitación de las moléculas y producción de oxidantes en el medio no es suficiente (Vela et al., 2018), también porque no existe ningún catalizador que elimine del todo los intermediarios, por otra parte los OH y e⁻ del medio no son lo suficientemente reactivos para llevar a cabo la fotoinactivación de una manera rápida y eficiente, como observaron Gatidou & Iatrou, (2011) quienes vieron que el tratamiento solo con luz solar debe durar aproximadamente 61 días con posible formación de subproductos.

12.6. Tratamiento con irradiación UV solar acompañado con perlas de arcilla y TiO₂

Con el tratamiento con luz solar acompañado de las perlas de arcilla y TiO₂, Figura 8A, se observa la disminución de la concentración de 1,07 ppm y en la última hora 0,013 ppm, en la Figura 8B se observa como el porcentaje de degradación aumenta de -6,67 en la primera hora hasta el 86,3% en la cuarta hora. Nuevamente se observa en la primera hora el fenómeno de hipercromía, además los diferentes tipos de radiaciones solares ayudaron a la fotoinactivación del Metamidofo. Por tanto, se insinúa que este tratamiento tiene un mayor porcentaje de degradación del Metamidofo por la irradiación del sol con el catalizador TiO₂ que aumenta el porcentaje de degradación con un 86.3%, por tanto, se requiere más tiempo al sol con las perlas con TiO₂ para un porcentaje de degradación más alto, como menciona Calín et al., (2021) donde se realizó la exposición del pesticida por 3 horas obteniendo 65,5% de degradación y con más de 24 horas de exposición se obtuvo casi el 100% de degradación. Con dichos resultados se muestra que la luz solar con el catalizador es excelente para llevar a cabo la degradación en localidades que presenten problemas de contaminación con pesticidas.

La comparación de los tratamientos en la figura 9 muestra que el uso de perlas de arcilla con TiO₂ bajo ambos tipos de luz fue mejor que solo aplicar luz UV solar o luz UV artificial como muestran los análisis estadísticos de ANOVA de dos vías (Anexo 4) $p=5.62e-12$.

El tratamiento con irradiación UV artificial presenta una gran diferencia estadística según la prueba de Tukey entre la hora cero y segunda hora, atribuyéndose probablemente a la formación de subproductos con una posible hipercromía, con la misma diferencia

significativa se observa los tratamientos de irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂, como en la irradiación UV solar, pero este incremento se presenta entre la hora cero y primera, en cambio mostrando una diferencia significativa de solo p=0,01 entre la hora cero y primera se encuentra el tratamiento con irradiación UV solar acompañado perlas de arcilla y TiO₂, lo cual podría significar que en este tratamiento el incremento de formación de sub-productos no es tan elevado como en los otros tratamientos.

La diferencia estadística en la prueba Tukey entre la concentración inicial y final en los tratamientos de irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂ es p=0, con la irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂ es igual p=0 y por último la irradiación UV artificial es p=0,00016 lo cual muestra su efectividad como posibles tratamientos de fotoinactivación.

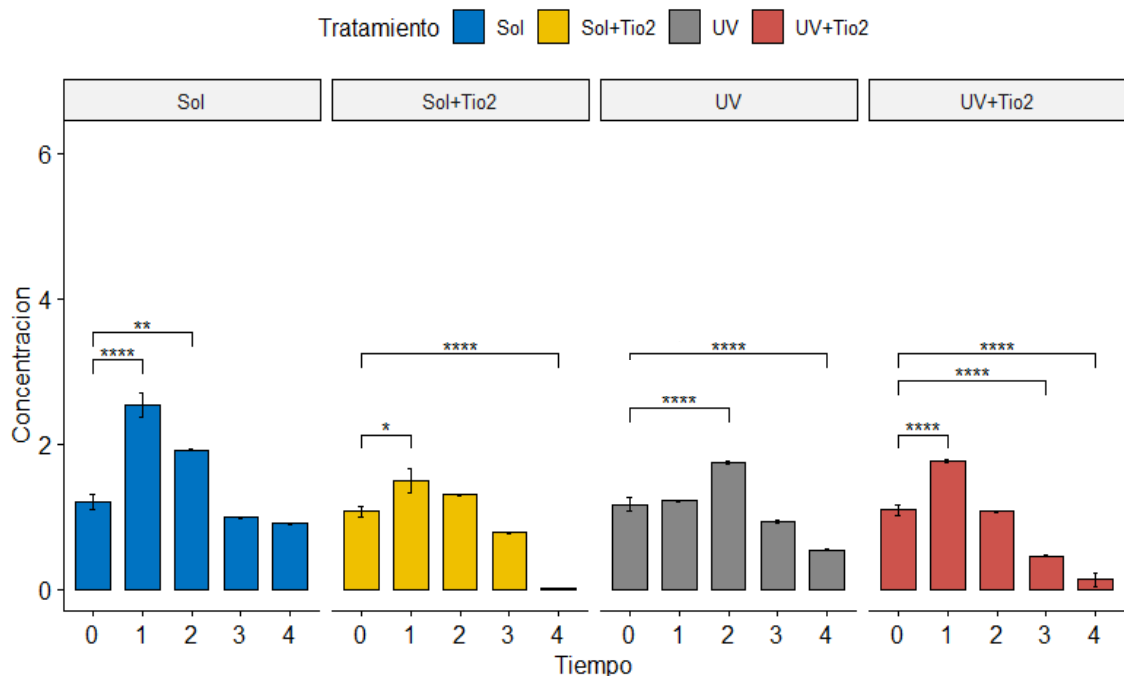


Figura 9. Fotoinactivación del Metamidofo durante cuatro horas, con todos los tratamientos con diferencias significativas.

p=0 ‘*****’ 0.001 ‘***’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘,’ 0.1 ‘,’ 1.

La diferencia estadística tan alta con los tratamientos que usaron las perlas con TiO₂ se da porque la reacción de fotoactivación se produce en la superficie del TiO₂ bajo la iluminación creando pares de electrones y un hueco donde el oxígeno es absorbido y luego impide la recombinación de pares de electrones dejando otro hueco donde se forman los -OH que reaccionan con el H₂O o el OH⁻ absorbido de la superficie (Vela et al., 2018).

Además el tratamiento con irradiación UV artificial presenta una gran diferencia estadística entre la hora cero y segunda hora, atribuyéndose probablemente a la formación de subproductos con una posible hipercromía, con la misma diferencia significativa se observa los tratamientos de irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂, como en la irradiación UV solar, pero este incremento se presenta entre la hora cero y primera, en cambio mostrando una diferencia significativa de solo 0,01 entre la hora cero y primera se encuentra el tratamiento con irradiación UV solar acompañado perlas de arcilla y TiO₂, lo cual podría significar que en este tratamiento el incremento de formación de subproductos no es tan elevado como en los otros tratamientos.

12.7. Cinética de la fotoactivación

La fotoactivación siguió una cinética de pseudo-primer orden con constantes de velocidad (k) de 1,276 min⁻¹ con la irradiación UV artificial y las perlas de arcilla con TiO₂ y 0,423 min⁻¹ con irradiación UV solar y perlas de arcilla con TiO₂ y un valor R² de 0,9039 y 0,8214 respectivamente.

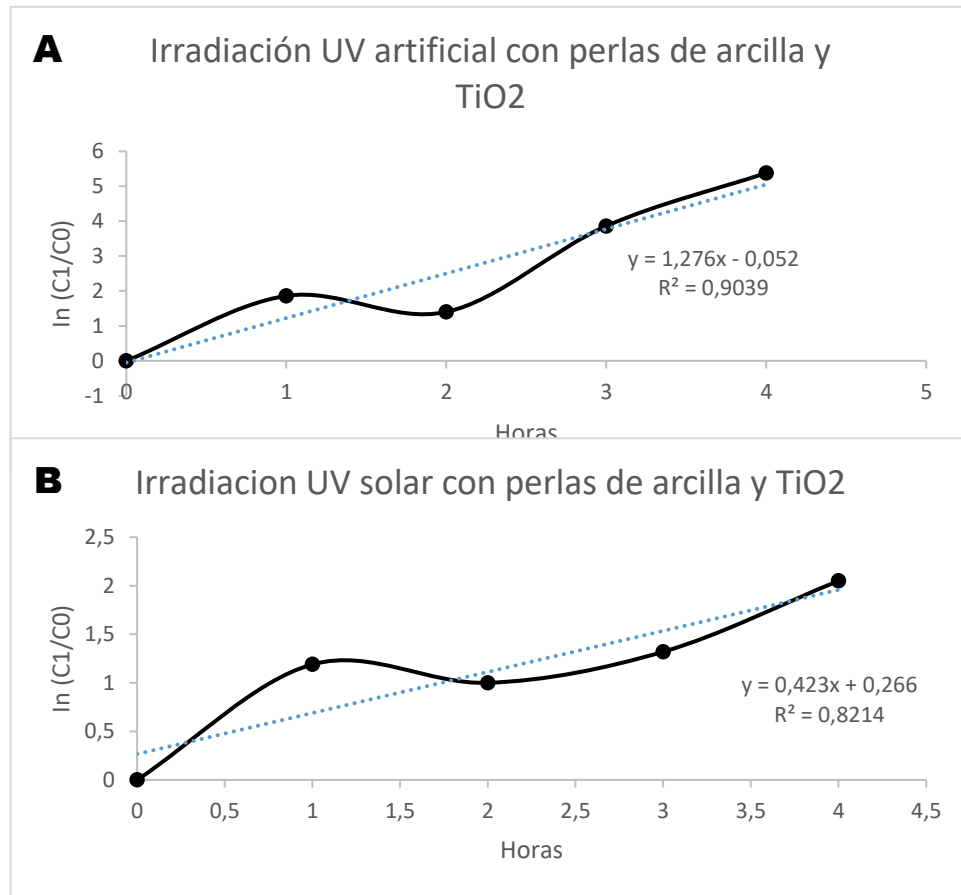


Figura 10. Cinética de la degradación fotocatalítica del Metamidofo. **A)** Irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂ y **B)** Irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂.

Luego del análisis de la velocidad de reacción en la fotoinactivación y el beneficio de los tratamientos con irradiación UV solar y artificial con las perlas de arcilla recubiertas con TiO₂, es importante tener conocimiento de la durabilidad y estabilidad de la reacción de las perlas de arcilla recubiertas con TiO₂ sin ninguna reactivación del catalizador mediante lavado, secado en horno o calcinación, para ello se realizaron 20 reciclados de 4 h bajo luz UV y luz solar. La estabilidad del catalizador inmovilizado depende sobre todo del material de soporte, en este contexto, la arcilla ha demostrado ser un excelente material de unión para la inmovilización de catalizadores, se ha comprobado en términos

de número de reciclados que las perlas recubiertas de catalizador TiO₂ degradan el metamidofo.

Como se muestra en la Figura 11, el mayor porcentaje de degradación fue del 99,5% y el más bajo de 90,4% de degradación del Metamidofo en las últimas horas de tratamiento. Esto demostró que el catalizador puede funcionar eficazmente para la degradación del Metamidofo bajo la luz solar y UV.

Además el material de las perlas es respetuoso con la naturaleza, por lo que después de una reutilización, la arcilla puede desecharse en cualquier lugar sin contaminación ambiental, en contraste con los otros soportes no biodegradables como cuarzo, perlas de vidrio, lana de vidrio, magnetita, etc. (Bansal & Verma, 2017). También el soporte de arcilla es barato y su preparación para añadir TiO₂ es más fácil que otros métodos.

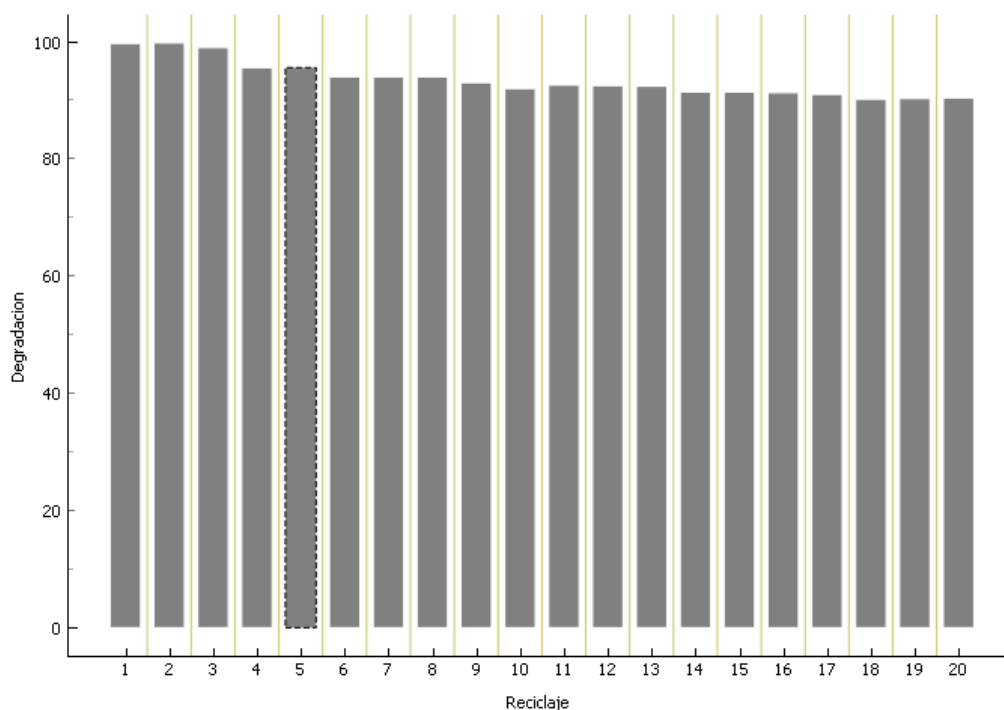


Figura 11. Durabilidad de las perlas de arcilla recubiertas con TiO₂ para la fotoinactivación del Metamidofo, se muestra el porcentaje de degradación.

12.8. Test de ames

El Test de Ames evalúa la actividad mutagénica de diferentes sustancias químicas, con una mutación inversa a la original (Akyil et al., 2017). Para la evaluación de los diferentes tratamientos se usó la cepa TA98 y TA100.

Se observó que la cepa TA98 tuvo un cambio significativo en todos los tratamientos, en todas las horas (0, 1, 2, 3 y 4), la cepa TA98 según bibliografía presenta una mutación en la secuencia –G-C- que tiene una delección -1 de desplazamiento de cuadro hisD3052, que afecta al marco de lectura de una secuencia repetitiva (Özkara et al., 2019). Con la irradiación solar el índice de mutagenicidad (IM) fue alto durante todo el tratamiento; con el tratamiento de irradiación solar con las perlas de arcilla y TiO₂ el IM fue descendiendo hasta llegar a 0,98; con la irradiación UV el IM descendió, pero no llegó a ser significativo 3,93, finalmente, el tratamiento con irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂, el IM descendió a 1,17, como se observa en la Tabla 4 donde se muestra una aparente inactivación del compuesto mutagénico.

La TA100 presenta un marcador hisG46, que resulta de una sustitución de un par de bases de una leucina (GAG/CTC) por una prolina (GGG/CCC), esta mutación se revierte con mutágenos que provocan sustituciones de pares de bases G-C (Ansari & Malik, 2009a). Esta cepa no muestra un descenso o índice mutagénico alto, lo cual se sustenta en diversos estudios donde TA98 es la cepa que tiene cambios ante los diversos tratamientos con pesticidas organofosforados metamidofos. (Ansari & Malik, 2009b; Datta et al., 2018; Zeyad et al., 2019).

Tabla 4. Análisis de mutagenicidad de Metamidofó bajo diversos tratamientos de fotoinactivación, mediante el ensayo de *S. typhimurium* con las cepas, TA98 y TA100.

Sustancia	Tiempo	N° de His + revertantes/ placa			
		TA98		TA100	
		IM	Mutagenicidad	IM	Clasificación
UV	0	8,90	Medio	1,57	no mutagénico alto
UV	1	6,43	Medio	0,71	no mutagénico medio
UV	2	6,58	Medio	0,71	no mutagénico medio
UV	3	7,29	Medio	0,73	no mutagénico medio
UV	4	3,94	Bajo	0,73	no mutagénico medio
UV+TiO2	0	10,40	Alto	1,72	no mutagénico alto
UV+TiO2	1	8,71	Medio	1,00	no mutagénico alto
UV+TiO2	2	7,25	Medio	0,72	no mutagénico medio
UV+TiO2	3	3,67	Bajo	0,22	no mutagénico bajo
UV+TiO2	4	1,17	no mutagénico	0,10	no mutagénico bajo
SOL	0	9,15	Alto	1,78	no mutagénico alto
SOL	1	6,66	Medio	0,73	no mutagénico medio
SOL	2	5,68	Medio	0,75	no mutagénico medio
SOL	3	7,46	Medio	0,72	no mutagénico medio
SOL	4	8,04	Medio	0,74	no mutagénico medio
SOL+TiO2	0	8,76	Medio	1,78	no mutagénico alto
SOL+TiO2	1	6,93	Medio	0,75	no mutagénico medio
SOL+TiO2	2	4,14	Bajo	0,72	no mutagénico medio
SOL+TiO2	3	2,85	Bajo	0,52	no mutagénico bajo
SOL+TiO2	4	0,98	no mutagénico	0,30	no mutagénico bajo
H2O (d)		1,00	no mutagénico	1,00	no mutagénico alto
SA				3,53	mutagénico bajo
2AF-2		6,16	medio		

IM= índice de mutagenicidad

TA98, mutagenicidad. bajo= 2-5, medio= 6-9, alto >9

TA100, no mutagénico bajo= 0,091-0,29; no mutagenico medio= 0,51-0,74; no mutagenico alto= 1-1,77

En la Figura 12 se compara la mutagenicidad del Metamidofó entre la hora cero, la última hora y el control negativo, la prueba de Dunn Test refleja que los tratamientos con irradiación solar y perlas arcilla con TiO2 junto a la irradiación UV con perlas de arcilla

con TiO₂ son tratamientos eficaces para llevar a cabo un descenso en el recuento de revertantes con la cepa TA98.

El tratamiento con irradiación solar y perlas de arcilla con TiO₂ en la hora 0 comparada con la hora 4 tiene un $p=0,014$ y en el tratamiento de UV perlas de arcilla con TiO₂ es de $p=0,012$.

La cepa TA100 no tiene ninguna significancia estadística en comparación entre la hora cero y la última hora.

El pesticida Metamidofos es un organofosforado que actúa como inhibidor directo de la acetilcolinesterasa. En su composición química tiene P=S que adquiere propiedades inhibitorias tras su conversión en forma oxo P=O. Por lo tanto, las sustancias químicas que contienen enlaces tioéster deben convertirse en la forma oxo para su activación (Maroni et al. 2000).

Los posibles mecanismos que pueden inducir a la mutagenicidad son: 1) La metilación del fragmento de guanina N7, los pesticidas organofosforados tienen al menos dos grupos ésteres de metilo en su estructura molecular que inducen la actividad mutagénica con el 7-metilguanina como principal aducto de metilación según pruebas en Ames (Datta et al., 2018). 2) La alquilación directa de la guanina N7, los nucleófilos atacan el átomo de carbono del metileno de carbono R al átomo de oxígeno del éster, desplazando el anión del ácido sulfónico. La reacción puede producirse por un mecanismo SN1 con carbocationes electrofílicos intermedios, o por una ruta SN2 que implica un desplazamiento concertado (Benigni & Bossa, 2011). Además, las propiedades fosforilantes se han asociado con su genotoxicidad y se ha informado recientemente

que estas sustancias pueden inducir estrés oxidativo en humanos y animales (Abaukaka et al., 2020).

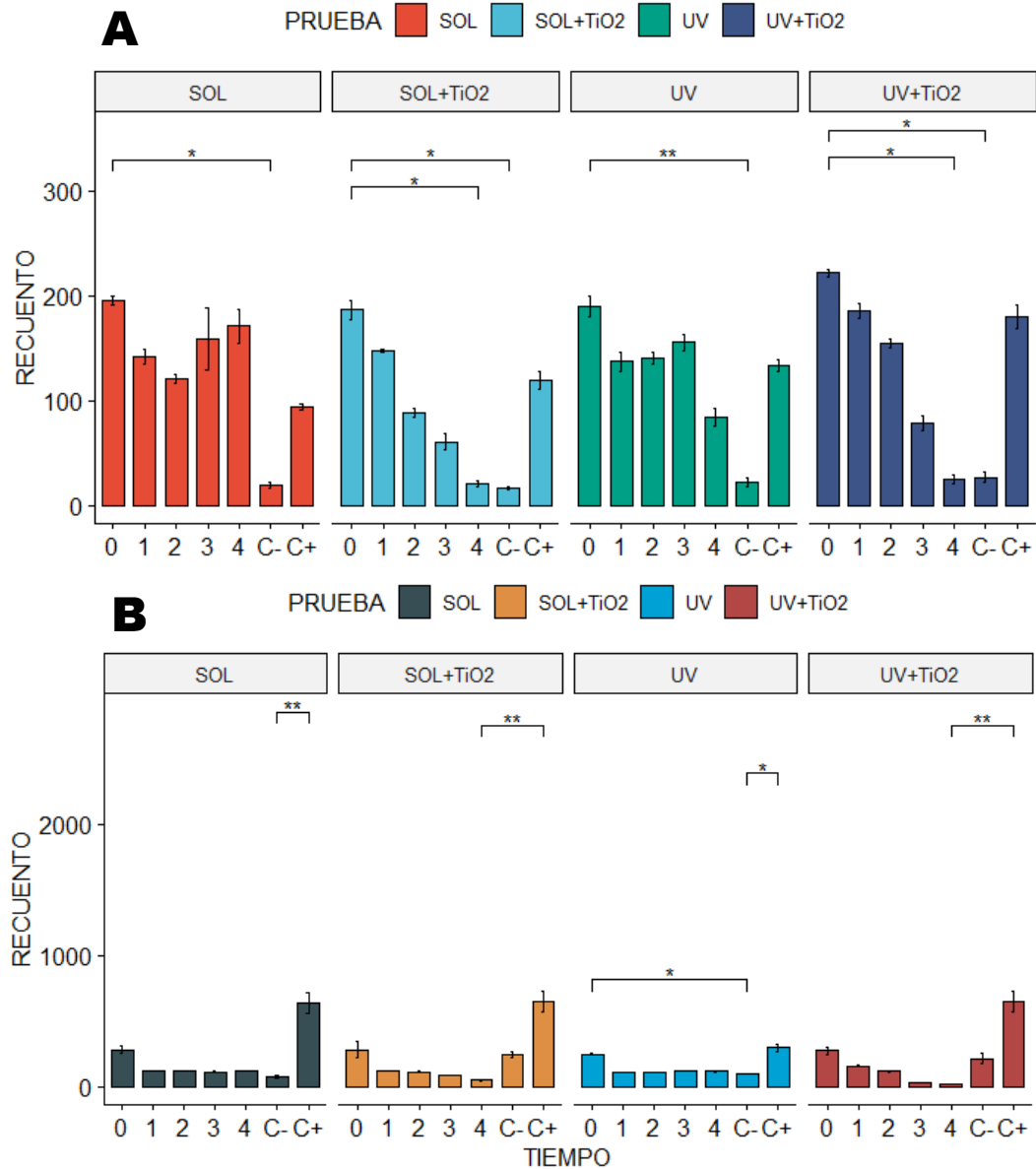


Figura 12. Pérdida de la actividad mutagénica del metamidofol evaluada por la prueba de Ames: A) TA 98 y B) TA 100. Se contó el número de colonias revertidas por placa. En estos experimentos se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Los valores se expresan como la media del recuento de bacterias revertantes \pm SD. Diferencias significativas determinadas por Dunn Test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

12.9. Test de *Allium*

En el presente estudio, (Tabla 5, Figura 13) se observa diferentes tipos de aberraciones cromosómicas que fueron inducidas por el pesticida Metamidofó: a) cromosomas fragmentados, b) cromosomas agrupados, c) C-mitosis, d) puente cromosómico, e) cromosoma rezagado, f) cromosomas pegajosos, g) pérdida de cromosoma e i) cromosoma vagabundo.

Las anomalías cromosómicas observadas con mayor incidencia en las raíces tratadas con Metamidofó, fueron: cromosomas fragmentados 12%, puente cromosómico 3,33%, rotura cromosómica 2,93% y c-mitosis 2,73%. Estas aberraciones se observan en la hora cero, luego de los diversos tratamientos de irradiación existe una disminución de aberraciones mitóticas, especialmente en los tratamientos con irradiación solar y UV acompañados con las perlas de TiO₂.

Después de la cuarta hora de tratamiento con luz solar con perlas de arcilla y TiO₂ la fragmentación cromosómica es 1,67%, el puente cromosómico 0,13%, rotura cromosómica 0% y c-mitosis 1,53%, con un total de aberraciones de 4,07%. Después del tratamiento con luz UV, con las perlas de arcilla y TiO₂ la fragmentación cromosómica es de 2%, puente cromosómico 1,53%, rotura cromosómica 0,27% y c-mitosis 0,20%, el total de aberraciones es de 4,80%.

Los tipos de tratamientos mencionados son los idóneos para la eliminación de diversos tipos de aberraciones en comparación con el tratamiento con luz solar, con el cual se vieron los siguientes resultados: las fragmentaciones cromosómicas están en aumento con

un 25,33% de fragmentación cromosómica, mayor que a la hora cero y un 0,80% de puente cromosómico, otro aumento relevante son los cromosomas agrupados con un 2,33%, el total de aberraciones es de 32,37% mayor al de la hora cero. El tratamiento con luz UV presenta los siguientes tipos de aberraciones: fragmentación cromosómica 10,67% y 2,73% con cromosomas agrupados, el total es de 19,57%, mejor que a la hora cero, pero no tan buenos como con los primeros tratamientos mencionados.

Tabla 5. Aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas de la raíz de *Allium* cepa expuestas a diferentes tratamientos para la fotoinactivación de Metamidofo.

Tratamiento	Horas	N° de células en división	Tipos de aberraciones								Total de células con aberraciones (%)
			clu	fr	C-met	bri	la	bre	lo	va	
Metamidofo	0	5,1 ± 0,72	1,23	12,00	2,73	3,33	2,63	2,93	2,37	1,63	28,87
I.S.	1	3,67 ± 0,57	3,00	18,33	1,43	1,97	1,37	1,20	1,17	0,60	29,07
I.S.	2	3,77 ± 0,98	1,50	15,67	1,37	1,37	2,07	1,43	1,37	1,23	26,00
I.S.	3	4,03 ± 1,1	2,30	12,33	2,20	1,20	1,00	1,00	0,37	0,20	20,60
I.S.	4	4,9 ± 1,6	2,33	25,33	1,53	0,80	1,47	0,50	0,27	0,13	32,37
I.S. con TiO2	1	4,2 ± 1,35	2,90	23,33	1,97	1,50	0,90	1,50	1,40	0,60	34,10
I.S. con TiO2	2	5,33 ± 1,41	2,40	22,67	1,60	1,70	1,43	1,60	1,57	1,07	34,03
I.S. con TiO2	3	7,5 ± 0,1	1,97	3,00	0,43	0,20	0,63	0,23	0,00	0,00	6,47
I.S. con TiO2	4	15 ± 0,28	0,37	1,67	1,53	0,13	0,37	0,00	0,00	0,00	4,07
I.UV	1	1,2 ± 1,56	1,57	5,67	1,77	0,97	2,23	1,17	1,17	0,07	14,60
I.UV	2	6,63 ± 0,11	2,27	3,67	1,20	1,10	2,00	1,67	0,73	0,00	12,63
I.UV	3	3,13 ± 0,5	2,97	7,67	1,57	1,13	1,30	1,43	0,40	0,00	16,47
I.UV	4	5,37 ± 0,77	2,73	10,67	2,07	1,33	0,90	1,27	0,60	0,00	19,57
I.UV con TiO2	1	2,53 ± 1,68	3,00	13,33	1,13	1,40	1,47	1,07	0,13	0,07	21,60
I.UV con TiO2	2	3,47 ± 0,11	1,27	16,67	0,77	1,97	1,47	1,50	1,10	0,00	24,73
I.UV con TiO2	3	7,33 ± 0,2	1,43	14,67	1,00	0,43	0,67	0,10	0,30	0,13	18,73
I.UV con TiO2	4	19,53 ± 0,32	0,50	2,00	0,20	1,53	0,30	0,27	0,00	0,00	4,80
H2O (d)		18,9 ± 0,72	0,20	4,33	0,50	0,27	0,27	0,20	0,13	0,00	5,90
MMS		5,33 ± 0,8	1,03	16,00	3,17	3,47	1,73	1,90	1,37	0,43	29,10

SD= desviación estandar, fr= cromosomas fragmentados, clu= cromosomas agrupados, C-met = C-mitosis, bri= puente cromosómico, la= cromosoma rezagado, bre=cromosomas pegajosos, lo= perdida de cromosoma, va= cromosoma vagabundo

Se observaron varios tipos de anomalías cromosómicas en las raíces tratadas con Metamidofó: cromosomas fragmentados, puente cromosómico, rotura cromosómica y c-mitosis fueron las principales aberraciones cromosómicas, estas pueden surgir por la formación anormal del huso mitótico debido al efecto del Metamidofó en la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas como explica Fatma et al. (2018) con los pesticidas organofosforados.

Los puentes cromosómicos son provocados por el efecto clastogénico causado por la agrupación, el intercambio desigual de cromátidas y la rotura de cromosomas (EROĞLU et al., 2020). La c-mitosis puede deberse a la deformación estructural del huso mitótico en los microtúbulos alterados (Abaukaka et al., 2020; Zeyad et al., 2019).

Los fragmentos cromosómicos surgen de los cromosomas acéntricos o de la inversión de los cromosomas o cuando las cromátidas no se separan hacia los polos (A. Khan et al., 2021) y por último la pegajosidad de los cromosomas observada en este estudio puede producirse como resultado de la adhesión física de las proteínas no histónicas y periféricas de los cromosomas (material de la cromatina) (Mercado & Caleño, 2020; Verma & Srivastava, 2018). Estos hallazgos están de acuerdo con los informes de otros pesticidas como imazali (Álvarez Martín, 2016), glifosfato (Mercado & Caleño, 2020), amitraz (Adesuyi et al., 2019), carbendazim (Verma & Srivastava, 2018).

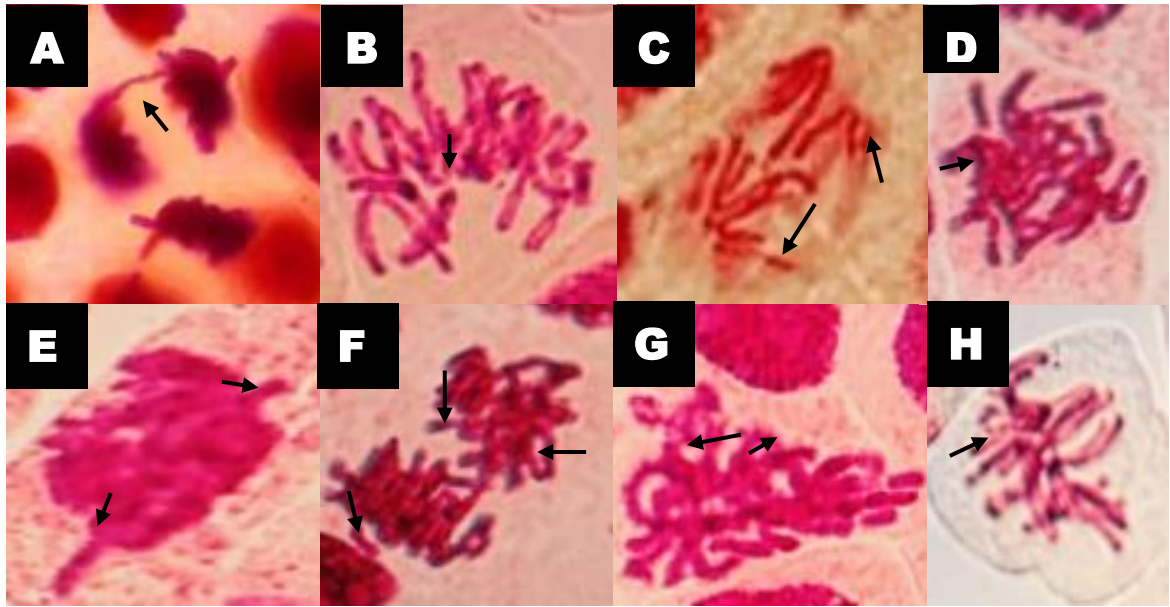


Figura 13. Tipos de aberraciones cromosomales encontradas en los tratamientos efectuados al pesticida Metamidofo. **A)** puente cromosómico en la telofase, **B)** c-mitosis, **C)** cromosoma rezagado, **D)** pérdida de cromosoma, **E)** cromosoma vagabundo, **F)** cromosomas pegajosos, **G)** cromosomas fragmentados, **H)** cromosomas agrupados.

Después de realizar la irradiación con luz UV y solar acompañada con las perlas de óxido de titanio, se vio que existe diferencia significativa en cuanto a la hora cero y última hora, aumentando el índice mitótico a lo largo del tiempo, siendo el mejor tratamiento la irradiación con luz UV y perlas de arcilla con óxido de titanio con un p de 0,0016 en comparación del tratamiento con luz solar y perlas de TiO₂ con un p de 0,0012. Los tratamientos solo con luz solar y UV no presentan significancia estadística en comparación de la hora inicial y final.

Los resultados en la hora cero con la reducción del IM indican la interferencia del pesticida en el proceso de regulación de la división celular; sin embargo, las inhibiciones mitóticas por el pesticida, están notablemente asociadas a la inhibición de la síntesis de proteínas y síntesis de ADN (Singh & Roy, 2017).

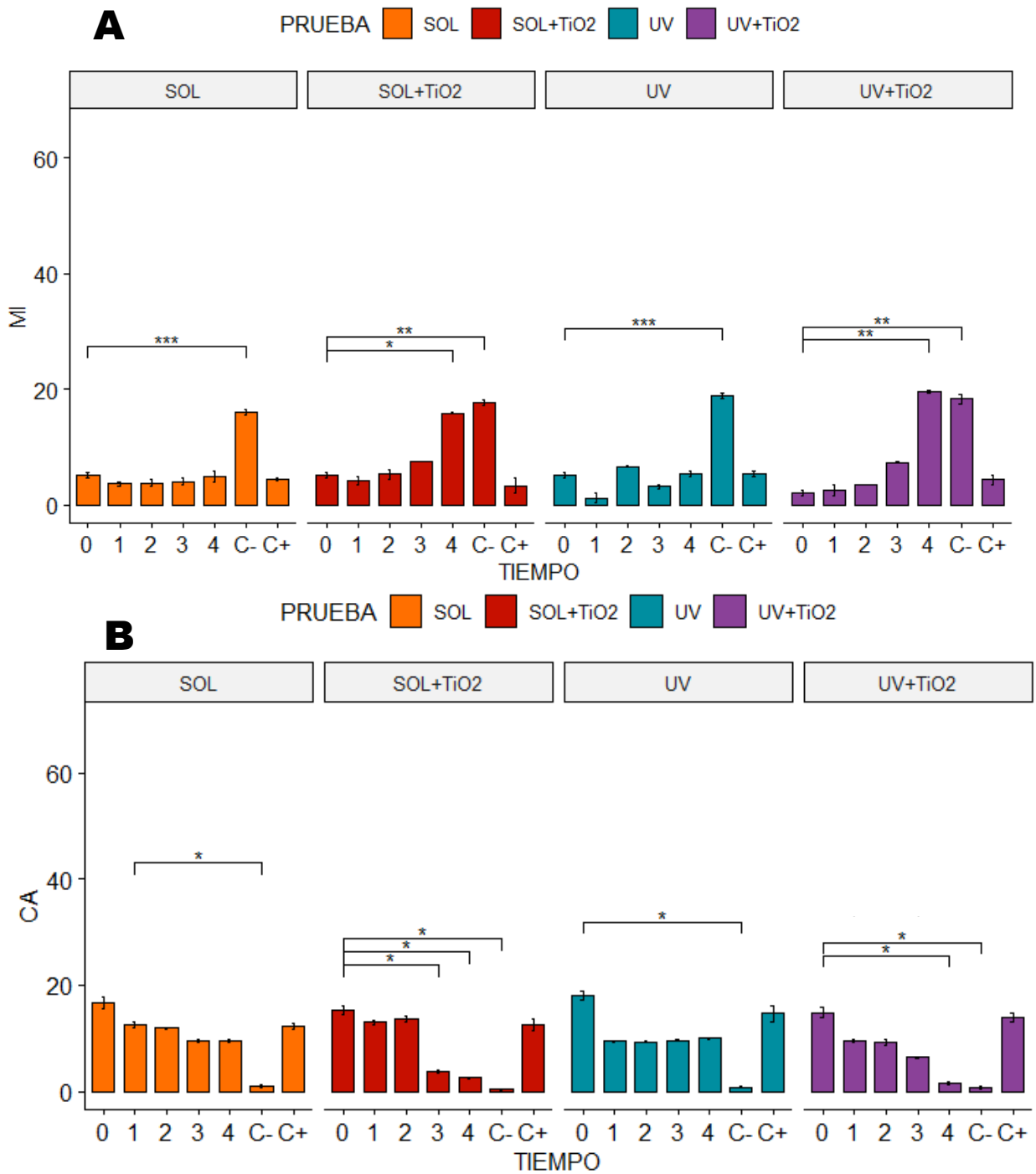


Figura 14. Resultados de Test de *Allium* **A)** Índice mitótico. **B)** Total de Aberraciones Cromosomales. Tratamientos usados: Control + (MMS 100mg/L), control – (agua destilada), irradiación solar, irradiación solar con TiO₂, irradiación UV e irradiación UV con TiO₂. La diferencia es significativa con el test de Dunn $p < 0.05$, las barras representan la desviación estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

El índice mitótico es un criterio predecible para enumerar la frecuencia de la división celular. La inhibición dependiente del tratamiento y del tiempo y el IM describe la potencialidad citotóxica del Metamidof. Parece que la reducción del IM fue un efecto del pesticida Metamidof. Los tratamientos presentan un IM diverso según el tratamiento, por ejemplo, con luz solar el IM a las 0 h fue de 5,1% y a las 4 h, de 4,9%; por otro lado, el tratamiento con luz UV a 0 h fue de 5,1% y a 4 h fue de 5,37% mostrando que no existe eficiencia de ambos, además de no existir una significancia estadística (Figura 13 A).

Los resultados muestran que el aumento de horas de irradiación junto con el tipo de tratamiento, aumenta la actividad mitótica (Figura 14 A). El tratamiento con irradiación solar junto con perlas de arcilla y TiO₂ durante 4 h, indujo un mayor IM (14.8%) en relación a la hora cero (5.1%) y el control (16%) cercano a la 4h. El Dunn test muestra la significancia estadística entre la 4h y la 0h con (p=0,042).

El tratamiento con luz UV acompañado de perlas de arcilla y TiO₂ muestra que el IM de la 4ta. hora es de 19,5%, mayor a la 0 h (2,07%) y comparado con el control negativo (18,3%), se puede ver que existe una gran eficiencia cuando se aplica el tratamiento. La comparación de significancia entre la 4h y 0h es p=0,0016.

En relación al total de las aberraciones cromosomales (Figura 14B) se observa que, de igual manera, tienden a disminuir con el tratamiento de luz solar acompañado con perlas de arcilla y TiO₂, habiendo, a la 0 hora un AB de 15,4% y la 4ta. hora 2,57%, con un p=0.048 comparando ambas horas. El tratamiento con luz UV con perlas de arcilla y TiO₂ tiene un AB en la 0 h de 14,8% y en la 4ta hora, 1,57% con un p=0,040 comparando ambas horas.

Los tratamientos que no muestran un descenso en el total del AB son la irradiación solar en la 0 hora (16,8%), en la 4ta. hora (9,6%) y UV en la 0 h (18,1%) y 4 h (9,97%), sin significación estadística.

Dado que el Metamidofos es un pesticida organofosforado, inhibe la formación o la función del complejo ciclina B-cdk1 que inicia la condensación del material genético y activa un grupo de proteínas llamadas condensinas, responsables de inducir el ensamblaje del huso mitótico, asegurando que los cromosomas se unan y, en consecuencia, prosigan los procesos de condensación del material genético y de los microtúbulos (Fioresi et al., 2020); por ello, en los tratamientos solo con luz solar, UV y en las horas cero, el índice mitótico disminuye, pero las aberraciones cromosomales aumentan o se mantienen, probando que el tratamiento no eliminó la citotoxicidad.

12.10. Análisis de resultados

Para un análisis de los factores y variables, en la Figura 15 se muestra la concentración del pesticida a lo largo del tiempo con los tratamientos mostrados en colores, el índice mitótico se indica por tamaño del círculo y, por último, la mutagenicidad con la cepa TA98, identificado, según un signo de acuerdo a su grado de mutagenicidad.

Con el tratamiento con luz UV artificial, la concentración en la hora 2 se incrementa posiblemente debido a la formación de subproductos. Aparentemente estos sub productos mantienen la mutagenicidad en media (6-9) y con un índice mitótico de 8 en comparación de 4 en la primera hora; sin embargo, en la 4ta. hora no existe un gran descenso, por lo que el índice mitótico es 4, igual a la primera hora; en cambio la mutagenicidad se

encontró relativamente baja (3.93 IM) aunque sigue siendo igual de mutagénico ya que es mayor a 2.

La irradiación con UV artificial, acompañada con perlas de arcilla y TiO₂, produjo aumento el índice mitótico de 4% y del índice mutagénico medio (6-9), con el transcurso del tiempo, la concentración baja en la última hora, de igual manera al índice mutagénico llegando a no ser mutagénico, además el índice mitótico aumenta a 16%, lo cual aparentemente indica la inactivación de las propiedades mutagénicas y genotóxicas que tenía el Metamidofo.

Con el tratamiento con irradiación UV solar, la concentración aumenta en la primera hora, pero el índice mitótico e índice mutagénico se mantiene a lo largo del tiempo con 4% de MI y mutagenicidad media (6-9) hasta llegar a la última hora; sin embargo, la concentración desciende un poco en comparación con la inicial.

En relación a la irradiación con UV solar, con perlas de arcilla y TiO₂, la concentración en la segunda hora aumenta la mutagenicidad, el índice mitótico es de 4% en la última hora la concentración desciende, el potencial mutagénico es nulo y el índice mitótico aumenta a 12%.

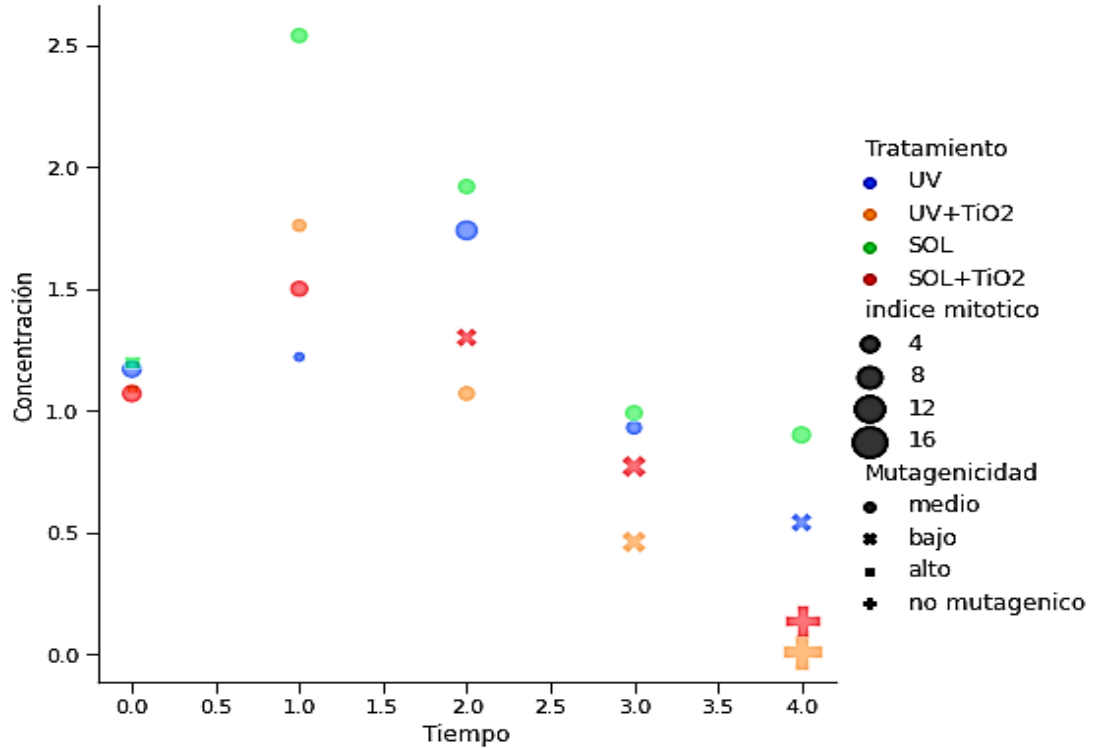


Figura 15. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO2 (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2), SOL, SOL+TiO2 (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO2), índice mitótico, mutagenicidad TA98 (bajo= 2-5, medio=6-9, alto>9 y no mutagenico <2 de índice de mutagenicidad).

En la figura 15 se muestra el parámetro de mutagenicidad con la cepa TA100. En el tratamiento con irradiación UV artificial la concentración aumenta en la segunda hora, quizás por el efecto de hiperchromía, en tanto el índice mitótico es 8% y no se presenta mutagenicidad en la cepa TA100, en este caso está como no mutagenico medio, luego a lo largo del tiempo existe un descenso en la concentración, pero no es alto; en cambio el índice mitótico e índice mutagénico siguen igual.

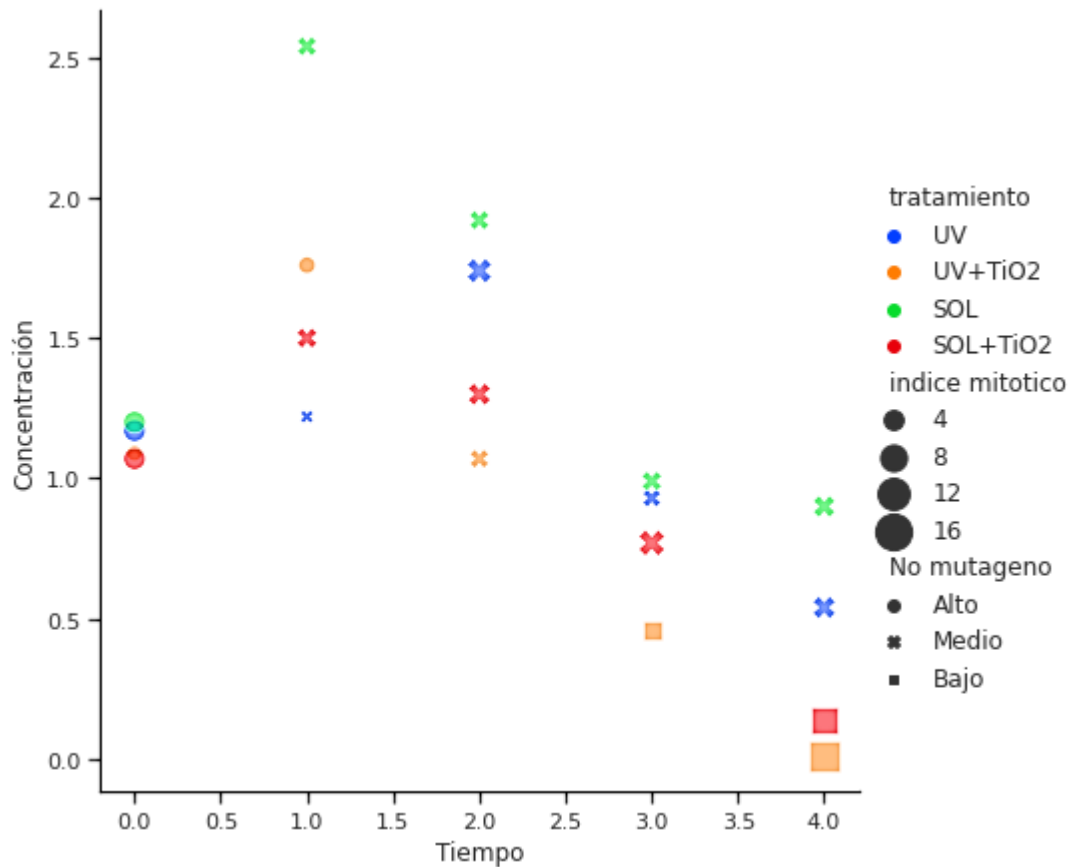


Figura 16. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO2 (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2), SOL, SOL+TiO2 (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO2), índice mitótico, mutagenicidad TA100 (Alto= 1-1.77, Medio= 0.51-0.74 y Bajo= 0.09-0.29).

En el scatterplot Figura 16, el tratamiento con irradiación UV artificial muestra como la concentración aumenta, el índice mutagénico es medio (6-9) y las aberraciones cromosomales están en un 6%, luego en las horas 3 y 4, las concentraciones descienden un poco, de igual manera el índice mutagénico, llegando a mutagenicidad baja (2-5), en cambio las aberraciones cromosomales se incrementan hasta el 12%.

Posterior en el tratamiento con irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2 se observa el incremento de la concentración, las aberraciones cromosomales son de 12% y la

mutagenicidad es media (6-9). En la segunda hora la concentración baja, pero solo existe el incremento de las aberraciones cromosomales llegando a 18%, lo cual es preocupante por su efecto genotóxico alto. Posteriormente, en la última hora, la concentración disminuye casi en su totalidad, no existe mutagenicidad y las aberraciones cromosomales son menores de 6%.

Con la irradiación UV solar en la primera hora la concentración es mayor, de igual manera las aberraciones cromosomales aumentan a 18%, muy por encima de los anteriores tratamientos, su mutagenicidad es media, a lo largo del tiempo hasta acabar el tratamiento; no así las aberraciones cromosomales pues aumentan a 24%, lo cual posiblemente indique que el compuesto no ha sido inactivado, de hecho, existe la posibilidad que el compuesto inicial haya sufrido alteraciones en su composición química, que lo volvió más genotóxico en las 4 horas, este resultado es preocupante pues es la simulación de lo que ocurre cuando se procede a fumigar en el campo agrícola, entonces luego de 4 horas el compuesto sigue en la tierra y es más genotóxico y mantiene su mutagenicidad.

El último tratamiento es la irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂, en la primera hora la concentración aumenta, las aberraciones cromosomales son mucho más altas que en los anteriores tratamientos llegando a 24%, la mutagenicidad en media y en la segunda hora es mutagenicidad baja, posteriormente en la última hora, la concentración disminuye y las aberraciones cromosomales son menores a 6%, sin mutagenicidad, aparentemente existe una fotoinactivación del Metamidofó.

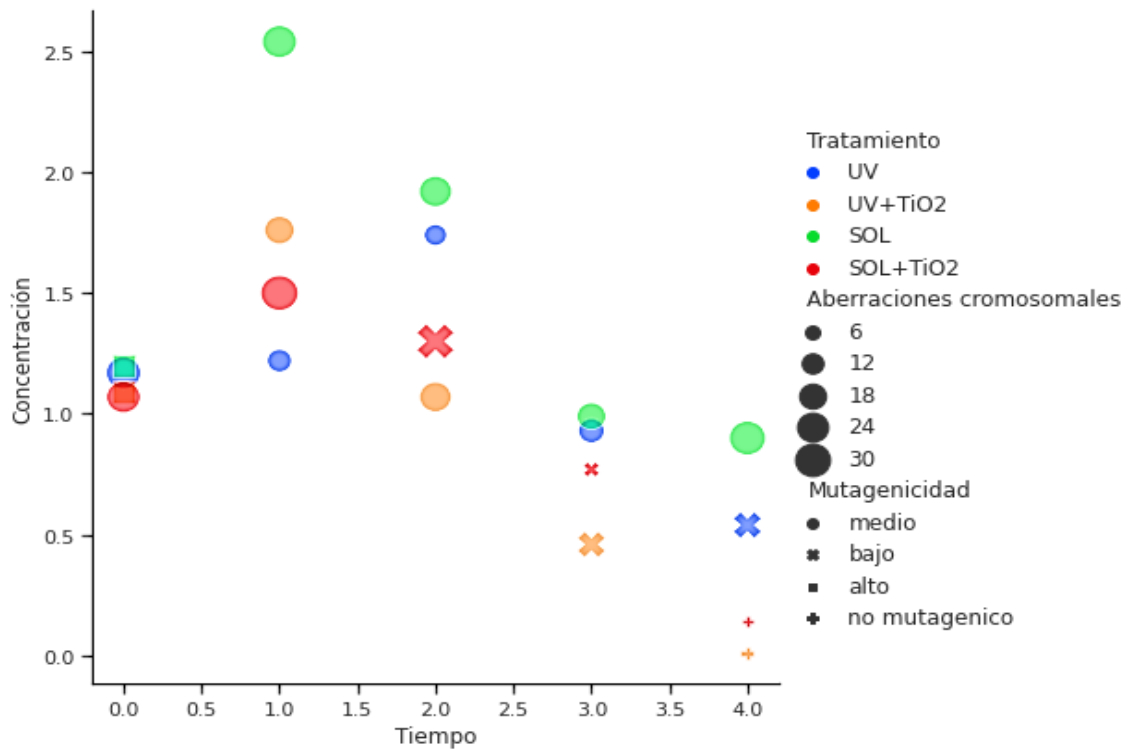


Figura 17. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂), SOL, SOL+TiO₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO₂), aberraciones cromosomales, mutagenicidad TA98 (medio=6-9, bajo= 2-5, alto>9 y no mutagénico <2 de índice de mutagenicidad).

Figura 17, el índice mutagénico es nulo en todos los tratamientos dado que se considera mutagénico cuando el índice de mutagenicidad es mayor o igual a 2, pues con la cepa TA100 ninguno supera este índice, entonces se tomó como no mutagénico bajo, medio y alto. La irradiación UV artificial presenta el incremento de concentración en la primera hora, las aberraciones cromosomales son del 6% y el índice mutagénico está como no mutagénico medio, en la última hora existe un aumento del 12% en las aberraciones cromosomales y el índice no mutagénico se mantiene.

La irradiación UV artificial con perlas de arcilla y TiO₂, muestra un incremento de concentración, las aberraciones cromosomales aumentaron a 12% y el índice no

mutagénico es medio. En la última hora desciende la concentración casi en cero y además las aberraciones cromosomales < 6% y el índice no mutagénico es bajo.

Con el tratamiento con irradiación UV solar, la concentración aumenta en la primera hora y las aberraciones cromosomales alcanzan a un 18%, el índice no mutagénico es medio y a lo largo del tiempo se mantiene. Con el tratamiento con irradiación UV solar con perlas de arcilla y TiO₂, se presenta un 24% de aberraciones cromosomales en la primera hora, el índice no mutagénico es medio y cuando llega a la hora final, este desciende siendo no mutagenico bajo y las aberraciones cromosomales menores a 6%.

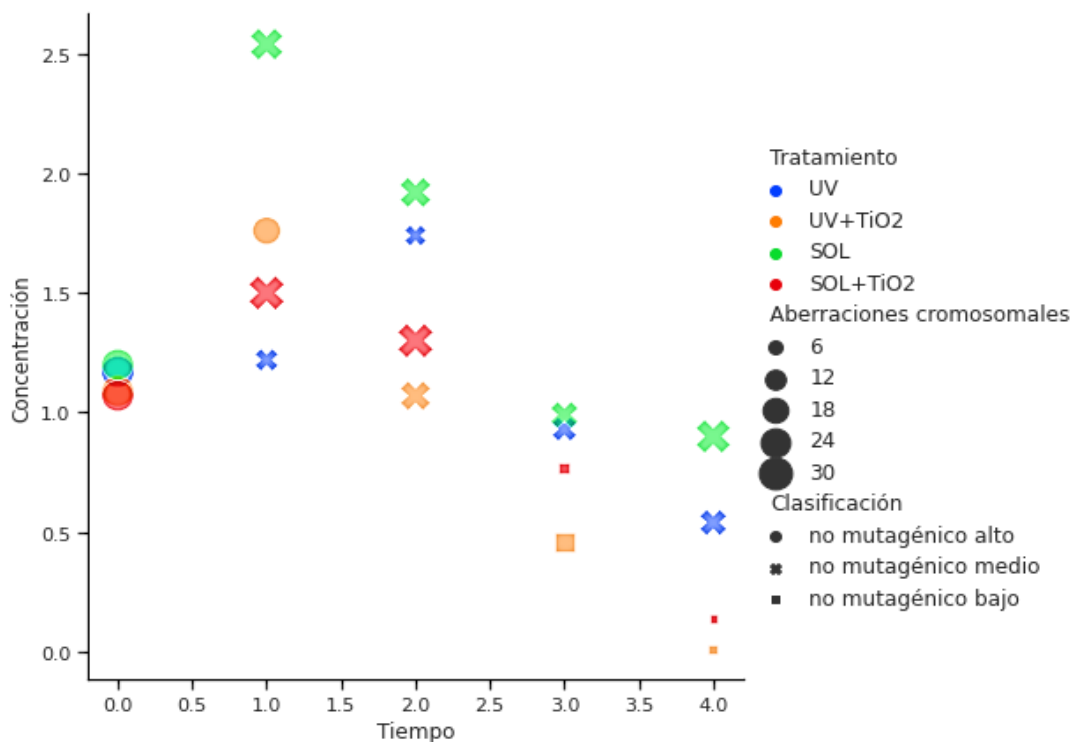


Figura 18. Scatter plot del tiempo contra concentración con los tratamientos: UV, UV+TiO₂ (irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂), SOL, SOL+TiO₂ (irradiación solar con perlas de arcilla y TiO₂), índice mitótico, mutagenicidad TA100 (Alto= 1-1.77, Medio= 0.51-0.74 y Bajo= 0.09-0.29).

Según los resultados mostrados, al parecer se debe tener un especial cuidado en la primera y segunda hora de los tratamientos debido a sus índices de mutagenicidad con la TA98 y porcentajes de aberraciones cromosomales altos, sobre todo con el tratamiento con irradiación solar dado que son varios tipos de irradiación UV que tiene la radiación solar, puede provocar una mayor concentración de subproductos que al parecer son más mutagénicos y genotóxicos a lo largo de cuatro horas de irradiación.

El aumento de la concentración en la primera hora de irradiación puede deberse a la interacción entre productos intermediarios, el índice mitótico, que representa el poder de división celular que disminuye en la hora cero, revelando que el Metamidofos es tóxico. Algunos estudios sugieren que los organofosforados son metabolizados por la enzima de la súper familia CYP450, por lo cual produce genotoxicidad clastogénica (Prabhat Kumar et al., 2020) visto también en líneas celulares hepáticas (Medina-Buelvas et al., 2019) y células germinales de ratones albinos (Bagri & Kumar, 2020). También se observa que con los tratamientos con irradiación UV y solar, el MI no disminuye, confirmando su toxicidad y baja eficiencia para la eliminación del pesticida Metamidofos, por el contrario, con los tratamientos acompañados con las perlas de arcilla y TiO₂, se observa el aumento del IM a lo largo del tiempo.

La mutagenicidad de la cepa TA 98, en la hora cero, se confirma con un estudio acerca de la degradación de metamidofos (Parker et al., 2017b) donde solo esta cepa presenta una respuesta mutagénica ante este tipo de pesticida.

En la Tabla 4 la mutagenicidad de la cepa TA100 es inexistente consolidando así que el Metamidofos no presenta mutagenicidad en sustitución por cambio de bases que afecta al operón histidina, como también se confirma en Akyil et al., (2017) donde solo TA98

presenta una reacción mutagénica con el organofosforado Anilofos, o en Sharma et al., (2018) donde se reporta que en el tratamiento con fotólisis los pesticidas organofosforados, muestran al principio y durante el tratamiento, mutación en la cepa TA98.

13. CONCLUSIONES

El pesticida organofosforado Metamidofo sin ningún tratamiento, produjo un alto índice de mutagenicidad (9.31 IM) con la cepa TA98, pero no produce mutagenicidad con la cepa TA100, además genera aberraciones cromosomales (28.87%) y un bajo porcentaje de índice mitótico (5.1%), mostrando así que es potencialmente mutagénico y citogenotóxico a una concentración de 1ppm.

El tratamiento con irradiación UV solar acompañado con perlas de arcilla y TiO₂ tiene un porcentaje de degradación de 83% y su índice mutagénico con TA 98 (0.98 IM) es alentador, de igual manera el índice mitótico (15%) se incrementa cuando pasa las horas de irradiación y baja el porcentaje de aberraciones cromosomales.

Por otro lado, el tratamiento con irradiación UV artificial con perlas de arcilla y TiO₂ tiene un porcentaje de degradación de 99,5%, superior al anterior, además la prueba de mutagenicidad con TA98 (1.17 IM), la prueba de genotoxicidad con el porcentaje de aberraciones cromosomales que va en decremento al pasar el tiempo, aunque el índice mitótico (19.53%) aumenta.

Los tratamientos con irradiación UV artificial y solar no presentan un gran descenso en la concentración, mutagenicidad y genotoxicidad del Metamidofo, incluso con el tratamiento con irradiación UV solar se incrementa el porcentaje de aberraciones cromosomales.

Además, se debe recalcar que existe un posible aumento de la concentración del pesticida en la primera y segunda hora de los tratamientos debido a un aparente efecto de hipercromía por la generación de subproductos.

14. RECOMENDACIONES

- Se sugiere aumentar el tiempo de irradiación en el tratamiento con irradiación solar acompañado con perlas de arcilla y TiO₂, para su eliminación total.
- Se propone realizar un análisis químico con un cromatógrafo de gases durante los tratamientos para observar qué tipo de químicos se forman y cuáles pueden ser potencialmente mutagénicos o genotóxicos.
- Se opina que es necesario realizar ensayos para saber hasta cuantas repeticiones de irradiación se pueden usar las perlas de arcilla y TiO₂.

15. ANÁLISIS PROSPECTIVO DEL IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

Los pesticidas organofosforados Metamidofos es uno de los más usados en Bolivia según PLAGBOL además el aumento por vía legal y de contrabando aumenta desde 25 millones a 152 millones de kilos anuales siendo el 30 % de ingreso ilegal desde el 2017 (Chuquimia, 2018). Las diversas plagas que azotan a nuestro país hacen que el agricultor use más pesticidas en sus cultivos, por ello cuando se fumiga existe el riesgo que cantidades del pesticida se quede en el medio ambiente y que no se elimine por completo pues en nuestro país no existe una manera eficiente o normativa que diga como eliminar el pesticida, por lo que en general la eliminación del recipiente se quema o bota cerca de los cultivos o ríos, otra manera de contaminación es que las personas lavan sus mochilas de fumigado en los ríos, de esta manera se contaminan diferentes fuentes de agua como ríos, lagos y acuífero. Al tener estas fuentes de agua contaminada el riesgo que se corre es la bioacumulación en peces que luego llegan a nuestra dieta, también está la acumulación en

los alimentos de consumo regados con este tipo de agua y con el mismo pesticida.

Los tratamientos para la eliminación de pesticidas van desde la biorremediación, que usa bacterias para la eliminación del pesticida, pero su alto costo en medios de cultivo no lo hace tan óptimo para su uso, la eliminación por métodos físico no eliminan ni en un 50%, dejando restos más tóxicos que la molécula inicial, sin embargo la eliminación usando la fotoinactivación con un catalizador como es el TiO₂ tienen grandes perspectivas pues la eliminación llega casi a un 99% de eliminación del pesticida en un medio acuoso, por ello los costos de producción con una estimación básica con una superficie como es la arcilla es de 5bs con 1kg, el catalizador TiO₂ 500bs con 500g el costo final de una perla de arcilla es de 1,4 bs esta estimación incluye materia prima como arcilla, óxido de titanio, ácido clorhídrico y el costo de mano de obra, otros insumos como mufla, material de vidrio, sonicador y agitador están excluidos del costo final. Sin embargo, es importante mencionar que el empleo de perlas de arcilla con TiO₂ es rentable pues es un método innovador y reutilizable. En la tabla 6 se muestra el costo de producción por perlas de arcilla desde una perla hasta 40000000 perlas de arcilla con TiO₂ para 10000000L de pesticida Metamidofó.

Tabla 6. Costo de producción de la perla de arcilla con TiO₂ para la fotoinactivación de 1L a 10000000 L de pesticida Metamidofó

Productos	precio de los productos (bs)	costo del producto por unidad (bs)	costo del producto para 1L (bs)	costo del producto para 100L (bs)	costo del producto para 1000L (bs)	costo del producto para 100000L (bs)	costo del producto para 10000000L (bs)
Oxido de titanio (P25, Degussa)	358,16	0,014	0,014	1,432	14,32	1432	1432000
Arcilla	5	0,11	0,44	44	440	44000	4400000
Ácido clorhídrico	300,27	0,60	0,60	60,05	600,54	60054,00	6005400,00
TOTAL	663,43	0,724	1,054	105,482	1054,86	105486	11837400
VENTA		1,4	5,6	560	5600	560000	56000000

Actualmente al no tener ningún método de eliminación del pesticida Metamidofo en Bolivia, se tiene como propuesta el método de perlas de arcilla con TiO₂ que tienen una fotoinactivación del pesticida de un 86,3% con irradiación solar, dado los precios en la tabla 6, el tratamiento para ríos que tuvieron presencia de pesticida Metamidofo se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Costos de tratamiento con perlas de arcilla y TiO₂ para cada río que presenta contaminación con pesticida Metamidofo

Departamento	Rio	caudal L/s	ancho (m)	Costos (bs)
Cochabamba	Rio Rocha	26,1	245	35672
	Ramis	76	3	1276,8
	Ilave	39	8	1747,2
La Paz (Lago Titicaca)	Coata	42	3	705,6
	Catari	10	4	224
	Huancané	20	4,6	515,2
	Suchez	11	3	184,8
Santa Cruz	Rio Pirai	10,6	300	17808

Datos de caudal y ancho de ríos obtenidos por los técnicos del SENAMHI

16. BIBLIOGRAFIA.

- Abaukaka, Y. A., Sanusi, S., Ozigi, K. A., & Malo, F. U. (2020). Assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of dichlorvos (DDVP) using in silico classification model; a health hazard awareness in Nigeria. *Environmental Health and Toxicology*, 35(3), 1–11. <https://doi.org/10.5620/eaht.2020016>
- Abdennouri, M., Baâlala, M., Galadi, A., El Makhfouk, M., Bensitel, M., Nohair, K., Sadiq, M., Boussaoud, A., & Barka, N. (2016). Photocatalytic degradation of pesticides by titanium dioxide and titanium pillared purified clays. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S313–S318. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.04.005>
- Adachi, T., Suzuki, Y., Nishiyama, M., Kodaka, R., Fujisawa, T., & Katagi, T. (2018). Photodegradation of Strobilurin Fungicide Mandestrobin in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(32), 8514–8521. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03610>

- Adamek, E., Baran, W., Ziemiańska-Błaszczak, J., & Sobczak, A. (2019). Immobilisation of TiO₂-P25 on a glass fibre mat: Preparation, photocatalytic activity and stability. *Solar Energy*, *188*, 1232–1242. <https://doi.org/10.1016/J.SOLENER.2019.07.034>
- Adesuyi, A. ., Njoku, K. ., Ogunyebi, A. ., Dada, E. ., Adedokun, A. ., Jolaoso, A. ., & Akinola, M. . (2019). Evaluation of the Cytogenotoxic Effects of Emulsifiable Concentrate form of Amitraz Pesticide on *Allium cepa* L. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, *22*(11), 1841. <https://doi.org/10.4314/jasem.v22i11.20>
- Affam, A. C., & Chaudhuri, M. (2013). Degradation of pesticides chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil in aqueous solution by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Environmental Management*, *130*, 160–165. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2013.08.058>
- Akbari Shorgoli, A., & Shokri, M. (2017). Photocatalytic degradation of imidacloprid pesticide in aqueous solution by TiO₂ nanoparticles immobilized on the glass plate. *Chemical Engineering Communications*, *204*(9), 1061–1069. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1337005>
- Akyil, D., Konuk, M., Eren, Y., Liman, R., & Sağlam, E. (2017a). Mutagenic and genotoxic effects of Anilofos with micronucleus, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and Ames test. *Cytotechnology*, *69*(6), 865–874. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0099-y>
- Akyil, D., Konuk, M., Eren, Y., Liman, R., & Sağlam, E. (2017b). Mutagenic and genotoxic effects of Anilofos with micronucleus, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and Ames test. *Cytotechnology*, *69*(6), 865–874. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0099-y>
- Álvarez Martín, A. (2016). *ESTRATEGIAS FÍSICOQUÍMICAS DE PREVENCIÓN Y/O CONTROL*.
- Amalraj, A., & Pius, A. (2015). Photocatalytic degradation of monocrotophos and chlorpyrifos in aqueous solution using TiO₂ under UV radiation. *Journal of Water Process Engineering*, *7*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2015.06.002>

- Ansari, M. I., & Malik, A. (2009a). Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673(2), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.12.006>
- Ansari, M. I., & Malik, A. (2009b). Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673(2), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.12.006>
- Arista Sur. (n.d.). *Qué son las radiaciones solares*. Retrieved August 18, 2021, from <https://www.aristasur.com/contenido/que-son-las-radiaciones-solares>
- Bagri, P., & Kumar, V. (2020). Assessment of anilofos-induced mutagenicity in bone marrow and germ cells of Swiss albino mice. *Toxicology and Industrial Health*, 36(2), 110–118. <https://doi.org/10.1177/0748233720913757>
- Balakrishnan, A., Appunni, S., & Gopalram, K. (2020). Immobilized TiO₂/chitosan beads for photocatalytic degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 282–291. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.204>
- Bansal, P., & Verma, A. (2017). Synergistic effect of dual process (photocatalysis and photo-Fenton) for the degradation of Cephalexin using TiO₂ immobilized novel clay beads with waste fly ash/foundry sand. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 342(342), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.04.010>
- Barrón Cuenca, J., Tirado, N., Barral, J., Ali, I., Levi, M., Stenius, U., Berglund, M., & Dreij, K. (2019). Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. *Science of the Total Environment*, 695, 133942. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133942>
- Bascope Roberto Zanabria1, U. B. y J. J. (2019). *Plaguicidas químicos usados en el cultivo de soya en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia: riesgos para la salud humana y toxicidad ambiental*. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1683-07892019000300005&script=sci_arttext

- Belizario Quispe, G., Capacoila Coila, J., Huaquisto Ramos, E., Cornejo Olarte, D. A., & Chui Betancur, H. N. (2019). *Determinación del contenido de Fósforo y Arsénico, y de otros metales contaminantes de las aguas superficiales del Río Coata, afluente del lago Titicaca, Perú*. 35.
- Benigni, R., & Bossa, C. (2011). Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. In *Chemical Reviews* (Vol. 111, Issue 4, pp. 2507–2536). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr100222q>
- Bianco, G. E., Suarez, E., Cazon, L., de la Puente, T. B., Ahrendts, M. R. B., & De Luca, J. C. (2017). Prevalence of chromosomal aberrations in Argentinean agricultural workers. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(26), 21146–21152. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9664-3>
- Bouaid, A. (n.d.). *Nuevos métodos de tratamiento de muestra para la preconcentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases* [Universidad Complutense de Madrid]. Retrieved January 9, 2020, from <https://eprints.ucm.es/7081/1/T25168.pdf>
- Calín Mora Carmen, Vela de Oro Nuria, F. S. J. (2021). *Remediation of endocrine disruptor in contaminated water through advanced oxidation processes*.
- Calvo- Trujillo M, M.-G. L., Espiñeira, M. G.-, & E., R.-C. (2019). *Exposición a pesticidas como factor de riesgo para enfermedad de Parkinson: un estudio caso-control en el municipio de San Juan Nepomuceno (Bolívar)*.
- Chandra Yadav, I., & Linthoingambi Devi, N. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment Development of pesticide runoff model for controlling risk of pesticides loss in upland field View project 7 Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. In *Environ. Sci. & Engg* (Vol. 6). <https://www.researchgate.net/publication/313445102>
- Chesson, A. L. (2013). Classification of Sleep Disorders. In *Encyclopedia of Sleep* (Vol. 26, pp. 27–31). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378610-4.00008-5>

- Chiu, Y. H., Sandoval-Insausti, H., Ley, S. H., Bhupathiraju, S. N., Hauser, R., Rimm, E. B., Manson, J. A. E., Sun, Q., & Chavarro, J. E. (2019). Association between intake of fruits and vegetables by pesticide residue status and coronary heart disease risk. *Environment International*, *132*, 105113. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105113>
- Cruz, M., Gomez, C., Duran-Valle, C. J., Pastrana-Martínez, L. M., Faria, J. L., Silva, A. M. T., Faraldos, M., & Bahamonde, A. (2017a). Bare TiO₂ and graphene oxide TiO₂ photocatalysts on the degradation of selected pesticides and influence of the water matrix. *Applied Surface Science*, *416*, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.09.268>
- Cruz, M., Gomez, C., Duran-Valle, C. J., Pastrana-Martínez, L. M., Faria, J. L., Silva, A. M. T., Faraldos, M., & Bahamonde, A. (2017b). Bare TiO₂ and graphene oxide TiO₂ photocatalysts on the degradation of selected pesticides and influence of the water matrix. *Applied Surface Science*, *416*, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2015.09.268>
- Cuenca, J. B., Tirado, N., Vikström, M., Lindh, C. H., Stenius, U., Leander, K., Berglund, M., & Dreij, K. (2019). Pesticide exposure among Bolivian farmers: associations between worker protection and exposure biomarkers. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0128-3>
- D'Abzac, P., Mercado, R. F., Miguel, N. G.-U. S., Lazarte, W. A. S., María L. Pinedo Maraz, G. G., Buzier, R., Fondanèche, P., Guibal, R., & Lissalde, S. (2020). *Diagnostico Ecotoxicologico de la Biodisponibilidad de los Polutantes en el Río Rocha, Cochabamba*. <https://cba.ucb.edu.bo/wp-content/uploads/2020/06/2020-06-01-informe-rio-rocha-diagnostico-ecotox-s.pdf>
- Dai, K., Peng, T., Chen, H., Zhang, R., & Zhang, Y. (2008a). Photocatalytic Degradation and Mineralization of Commercial Methamidophos in Aqueous Titania Suspension. *Environmental Science & Technology*, *42*(5), 1505–1510. <https://doi.org/10.1021/es702268p>
- Dai, K., Peng, T., Chen, H., Zhang, R., & Zhang, Y. (2008b). Photocatalytic degradation

- and mineralization of commercial methamidophos in aqueous titania suspension. *Environmental Science and Technology*, 42(5), 1505–1510. <https://doi.org/10.1021/es702268p>
- Datta, S., Singh, J., Singh, J., Singh, S., & Singh, S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.005>
- Dhananjayan, V., Jayakumar, S., & Ravichandran, B. (2020). Conventional Methods of Pesticide Application in Agricultural Field and Fate of the Pesticides in the Environment and Human Health. *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*, 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23396-9_1
- Duranoğlu, D. (2016). Cite this: Duranoğlu D. PREPARATION OF TiO₂/PERLITE COMPOSITES BY USING 2 3-1 FRACTIONAL FACTORIAL DESIGN. *Duranoğlu, JOTCSA*, 3(3), 299–312. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.30978>
- Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Márquez, A., Errico, E., Segura, A. M., Heinzen, H., & Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of The Total Environment*, 631–632, 169–179. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.320>
- EROĞLU, H. E., GÜMÜŞ, N., GÜMÜŞ, M., YAĞCI, E., & KOCA, İ. (2020). *Allium cepa* Kök Ucu Hücrelerinde Sülfonamid-Aldehit Türevinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. <https://doi.org/10.29130/dubited.752287>
- Espinoza-Navarro, & Bustos-Obregón, &. (2015). Toxicidad y Riesgo Ambiental por Efecto de Insecticidas Organofosforados sobre Reproductor Macho de Lombriz de Tierra (*Eisenia foetida*) Environmental Risk and Toxicity Effect of Organophosphorus Insecticides on Male Red Earthworm (*Eisenia foetida*). In *Int. J. Med. Surg. Sci* (Vol. 2, Issue 4).
- Fantke, P., & Jolliet, O. (2016). Life cycle human health impacts of 875 pesticides. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 21(5), 722–733.

<https://doi.org/10.1007/s11367-015-0910-y>

FAO/OMS. (2020). *Glosario de términos | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO*.

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/es/>

Farmacopea. (2017). *Página 99 - FARMACOPEA*. 2017.

http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_IV/files/assets/basic-html/page99.html

Fatma, F., Verma, S., Kamal, A., & Srivastava, A. (2018). Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. *Chemosphere*, *195*, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.052>

Felisbino, K., Santos-Filho, R., Piancini, L. D. S., Cestari, M. M., & Leme, D. M. (2018).

Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*).

Pesticide Biochemistry and Physiology, *150*, 83–88.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.009>

Figueiredo, T. H., Apland, J. P., Braga, M. F. M., & Marini, A. M. (2018). Acute and

long-term consequences of exposure to organophosphate nerve agents in humans.

Epilepsia, *59*, 92–99. <https://doi.org/10.1111/epi.14500>

Fioresi, V. S., de Cássia Ribeiro Vieira, B., de Campos, J. M. S., & da Silva Souza, T.

(2020). Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(22),

28066–28076. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09201-5>

García-de la Parra, L. M., Bautista-Covarrubias, J. C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-

Lozano, M., & Guilhermino, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp

(*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *65*(3), 372–380.

<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2005.09.001>

Georgiadis, N., Tsarouhas, K., Tsitsimpikou, C., Vardavas, A., Rezaee, R., Germanakis,

I., Tsatsakis, A., Stagos, D., & Kouretas, D. (2018). Pesticides and cardiotoxicity.

Where do we stand? In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 353, pp. 1–14). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.06.004>

Ghosh, R., Siddarth, M., Singh, N., Tyagi, V., Kare, P. K., Banerjee, B. D., Kalra, O. P., & Tripathi, A. K. (2017). Organochlorine pesticide level in patients with chronic kidney disease of unknown etiology and its association with renal function. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0660-5>

Grewal, A. S., Singla, A., Kamboj, P., & Dua, J. S. (2017). Pesticide Residues in Food Grains, Vegetables and Fruits: A Hazard to Human Health. *Journal of Medicinal Chemistry and Toxicology*, 2(1), 40–46. <https://doi.org/10.15436/2575-808X.17.1355>

Grover, I. S., Prajapat, R. C., Singh, S., & Pal, B. (2017). Highly photoactive Au-TiO₂ nanowires for improved photo-degradation of propiconazole fungicide under UV/sunlight irradiation. *Solar Energy*, 144, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2017.02.001>

Han, F., Kambala, V. S. R., Srinivasan, M., Rajarathnam, D., & Naidu, R. (2009). Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: A review. *Applied Catalysis A: General*, 359(1–2), 25–40. <https://doi.org/10.1016/J.APCATA.2009.02.043>

Hansen, M. R., Jørs, E., Lander, F., Condarco, G., & Schlünssen, V. (2014). Is Cumulated Pyrethroid Exposure Associated With Prediabetes? A Cross-sectional Study. *Journal of Agromedicine*, 19(4), 417–426. <https://doi.org/10.1080/1059924X.2014.945708>

Hayatsu, V., & Taylor & Francis. (n.d.). *Mutagens in food*.

Hilgert Jacobsen-Pereira, C., dos Santos, C. R., Troina Maraslis, F., Pimentel, L., Feijó, A. J. L., Iomara Silva, C., de Medeiros, G. da S., Costa Zeferino, R., Curi Pedrosa, R., & Weidner Maluf, S. (2018). Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.004>

- Jafari, S. J., Moussavi, G., & Hossaini, H. (2016). Degradation and mineralization of diazinon pesticide in UVC and UVC/TiO₂ process. *Desalination and Water Treatment*, 57(8), 3782–3790. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.987171>
- Jiang, B., Zhang, N., Xing, Y., Lian, L., Chen, Y., Zhang, D., Li, G., Sun, G., & Song, Y. (2019). Microbial degradation of organophosphorus pesticides: novel degraders, kinetics, functional genes, and genotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 2019 26:21, 26(21), 21668–21681. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-05135-9>
- Jiménez-Tototzintle, M., Oller, I., Hernández-Ramírez, A., Malato, S., & Maldonado, M. I. (2015). Remediation of agro-food industry effluents by biotreatment combined with supported TiO₂/H₂O₂ solar photocatalysis. *Chemical Engineering Journal*, 273, 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.03.060>
- Jørs, E. (2018). 1659d Indiscriminate use of pesticides in agriculture and effects on health and environment examples from bolivia, uganda, nepal and cambodia! *Occupational and Environmental Medicine*, 75(Suppl 2), A469.1-A469. <https://doi.org/10.1136/oemed-2018-icoabstracts.1333>
- Kanan, S., Moyet, M. A., Arthur, R. B., & Patterson, H. H. (2019). Recent advances on TiO₂-based photocatalysts toward the degradation of pesticides and major organic pollutants from water bodies. *Catalysis Reviews*, 1–65. <https://doi.org/10.1080/01614940.2019.1613323>
- Kanan, S., Moyet, M. A., Arthur, R. B., & Patterson, H. H. (2020). Recent advances on TiO₂-based photocatalysts toward the degradation of pesticides and major organic pollutants from water bodies. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, 62(1), 1–65. <https://doi.org/10.1080/01614940.2019.1613323>
- Kaur, T., Sraw, A., Wanchoo, R. K., & Toor, A. P. (2018). Solar assisted degradation of carbendazim in water using clay beads immobilized with TiO₂ & Fe doped TiO₂. *Solar Energy*, 162, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2017.11.033>
- Khan, A., Kumar, V., Srivastava, A., Saxena, G., & Verma, P. C. (2021). Biomarker-based evaluation of cytogenotoxic potential of glyphosate in *Vigna mungo* (L.)

- Hepper genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08865-x>
- Khan, S., Anas, M., & Malik, A. (2019). Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Toxicology Reports*, 6, 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.02.002>
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 682, Issue 1, pp. 71–81). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
- Leny Chuquimia. (n.d.). *Al menos 4 agroquímicos prohibidos en el mundo aún se venden en Bolivia - Diario Pagina Siete*. Diario. Retrieved July 9, 2019, from <https://www.paginasiete.bo/sociedad/2018/6/18/al-menos-agroquimicos-prohibidos-en-el-mundo-aun-se-venden-en-bolivia-183882.html>
- Leny Chuquimia. (2018). *Al menos 4 agroquímicos prohibidos en el mundo aún se venden en Bolivia - Diario Pagina Siete*. Diario. <https://www.paginasiete.bo/sociedad/2018/6/18/al-menos-agroquimicos-prohibidos-en-el-mundo-aun-se-venden-en-bolivia-183882.html#!>
- Lin, Z., Pang, S., Zhang, W., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11, p. 2045). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02045>
- Luna-Sanguino, G., Ruíz-Delgado, A., Tolosana-Moranchel, A., Pascual, L., Malato, S., Bahamonde, A., & Faraldos, M. (2020). Solar photocatalytic degradation of pesticides over TiO₂-rGO nanocomposites at pilot plant scale. *Science of The Total Environment*, 737, 140286. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140286>
- M'Bra, I. C., García-Muñoz, P., Drogui, P., Keller, N., Trokourey, A., & Robert, D. (2019). Heterogeneous photodegradation of Pyrimethanil and its commercial formulation with TiO₂ immobilized on SiC foams. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 368, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.09.007>

- Maitra, S. K. (2018). *Reproductive Toxicity of Organophosphate Pesticides OPEN ACCESS*. <https://www.researchgate.net/publication/327052798>
- Malakootian, M., Nasiri, A., & Gharaghani, M. A. (2019). Photocatalytic degradation of ciprofloxacin antibiotic by TiO₂ nanoparticles immobilized on a glass plate. *https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1573168*, 207(1), 56–72. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1573168>
- Malato, S., Blanco, J., Richter, C., Milow, B., & Maldonado, M. I. (1999). Solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides: Methamidophos. *Chemosphere*, 38(5), 1145–1156. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00364-6)
- Manco, G., Porzio, E., & Suzumoto, Y. (2018). Enzymatic detoxification: a sustainable means of degrading toxic organophosphate pesticides and chemical warfare nerve agents. In *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Vol. 93, Issue 8, pp. 2064–2082). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jctb.5603>
- Marcelino, A., Wachtel, C., & Ghisi, N. (2019). Are Our Farm Workers in Danger? Genetic Damage in Farmers Exposed to Pesticides. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3), 358. <https://doi.org/10.3390/ijerph16030358>
- Mattice, J. D., Skulman, B. W., Norman, R. J., & Gbur, E. E. (2010). Analysis of river water for rice pesticides in eastern Arkansas from 2002 to 2008. *Journal of Soil and Water Conservation*, 65(2), 130–140. <https://doi.org/10.2489/JSWC.65.2.130>
- Medina-Buelvas, D., Estrada-Muñiz, E., Flores-Valadez, M., & Vega, L. (2019). Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 366, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.023>
- Mercado, S. A. S., & Caleño, J. D. Q. (2020). Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Science of the Total Environment*, 700, 134452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>
- Monica, D. (1997). *LAS ARCILLAS EN LA PAZ Y COCHABAMBA Y SU APLICACION*

EN LA ESCULTURA.

- Mortelmans, & Zeiger. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1–2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Nusbaumer, D., Marques da Cunha, L., & Wedekind, C. (2021). Testing for population differences in evolutionary responses to pesticide pollution in brown trout (*Salmo trutta*). *Evolutionary Applications*, 14(2), 462–475. <https://doi.org/10.1111/EVA.13132>
- Olisah, C., & Adams, J. B. (2020). Systematic mapping of organophosphate contaminant (OPC) research trends between 1990 and 2018. *Environmental Geochemistry and Health* 2020 42:11, 42(11), 3481–3505. <https://doi.org/10.1007/S10653-020-00594-3>
- Özkara, A., Akyıl, D., Feyza Erdoğan, S., Eren, Y., & Konuk, M. (2019). Mutagenic and cytotoxic activity of Alloxidim sodium with Allium and Ames tests. In *Research Journal of Biotechnology* (Vol. 14, Issue 7). <https://www.worldresearchersassociations.com/biotechcurrissue/2.pdf>
- Parker, A. M., Lester, Y., Spangler, E. K., von Gunten, U., & Linden, K. G. (2017a). UV/H₂O₂ advanced oxidation for abatement of organophosphorous pesticides and the effects on various toxicity screening assays. *Chemosphere*, 182, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.150>
- Parker, A. M., Lester, Y., Spangler, E. K., von Gunten, U., & Linden, K. G. (2017b). UV/H₂O₂ advanced oxidation for abatement of organophosphorous pesticides and the effects on various toxicity screening assays. *Chemosphere*, 182, 477–482. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.04.150>

- Prabhat Kumar Srivastava, Vijay Pratap Singh, Anita Singh, D. K. T., & Samiksha Singh, Sheo Mohan Prasad, and D. K. C. (2020). Pesticides in Crop Production. In *Pesticides in Crop Production*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119432241>
- RAMÍREZ-VARGAS, Marco Antonio*†, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo, F.-A., & Eugenia, MORENO-GODINEZ, M. E. (2015). El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica. *ECOFAR*, 2, 92. www.ecorfan.org,
- Ramirez Ana. (2019). “*Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano*” . <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/741/RAGANN08T.pdf?sequence=1>
- Ranjan, & Mandal. (2019). Environmental risk appraisalment of disinfection by-products (DBPs) in plant model system: *Allium cepa*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(9), 8609–8622. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-04262-7>
- Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- SAL&ROCA. (2018). *Así afectan los plaguicidas al medio ambiente y sus consecuencias sobre el agua*. 22 de Marzo. <https://www.salyroca.es/articulo/lyfestyle/asi-afectan-plaguicidas-medio-ambiente-consecuencias-agua/20180322130257004599.html>
- Sardi, E. M. L., García, B. N., Larroudé, V., Picicelli, R., Reynoso, C. Y., & Martínez, E. R. (2016). Uso de *Allium Cepa* test como indicador de eficacia para el tratamiento de efluentes. *Ciencia y Tecnología*, 1(16), 81–89. <https://doi.org/10.18682/CYT.V1I16.558>
- Sharma, A., Ahmad, J., & Flora, S. J. S. (2018). Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products. In *Environmental Research* (Vol. 167, pp. 223–233). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.010>

- Singh, D., & Roy, B. K. (2017). Evaluation of malathion-induced cytogenetical effects and oxidative stress in plants using *Allium* test. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2391-z>
- Skovgaard, M., Renjel Encinas, S., Jensen, O. C., Andersen, J. H., Condarco, G., & Jørs, E. (2017). Pesticide Residues in Commercial Lettuce, Onion, and Potato Samples From Bolivia—A Threat to Public Health? *Environmental Health Insights*, 11. <https://doi.org/10.1177/1178630217704194>
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Wu, C., MacKillop, E. A., & Linden, K. G. (2009). Ultraviolet photolysis of chlorpyrifos: Developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. *Environmental Health Perspectives*, 117(3), 338–343. <https://doi.org/10.1289/EHP.11592>
- Smith, A. L. (2001). Bonfire II: The Return of Pottery Firing Temperatures. *Journal of Archaeological Science*, 28, 991–1003. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0713>
- Soltani-nezhad, F., Saljooqi, A., Shamspur, T., & Mostafavi, A. (2019). Photocatalytic degradation of imidacloprid using GO/Fe₃O₄/TiO₂-NiO under visible radiation: Optimization by response level method. *Polyhedron*, 165, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.POLY.2019.02.012>
- Somayyeh Karami-Mohajeri, A. A. , H.-R. R. y M. A. (2017). *Efectos adversos de los pesticidas organofosforados en el hígado: un breve resumen de cuatro décadas de investigación | Kopernio*. https://kopernio.com/viewer?doi=10.1515/aiht-2017-68-2989&token=WzQyMDk3MiwMTAuMTUxNS9haWh0LTIwMTctNjgtMjk4OSJd.LUarLRuPq_IJE7Sw1nH9KD1NiaU
- Sraw, A., Kaur, T., Pandey, Y., Sobti, A., Wanchoo, R. K., & Toor, A. P. (2018). Fixed bed recirculation type photocatalytic reactor with TiO₂ immobilized clay beads for the degradation of pesticide polluted water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(6), 7035–7043. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.062>
- Štampar, M., Sedighi Frandsen, H., Rogowska-Wrzesinska, A., Wrzesinski, K., Filipič, M., & Žegura, B. (2021). Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. *Science of The Total Environment*, 755,

143255. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143255>

Subils, B. S. y M. J. B. (1998). *NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales Pesticides: Classification and hazards Pesticides: Classification et risques Redactores.*

Szczepanik, B. (2017). Photocatalytic degradation of organic contaminants over clay-TiO₂ nanocomposites: A review. In *Applied Clay Science* (Vol. 141, pp. 227–239). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.02.029>

Tang, W., Ji, H., & Hou, X. (2017). Research Progress of Microbial Degradation of Organophosphorus Pesticides. *Progress in Applied Microbiology*.

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>, *13*(10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>

Vela, N., Calín, M., Yáñez-Gascón, M. J., Garrido, I., Pérez-Lucas, G., Fenoll, J., & Navarro, S. (2018). Photocatalytic oxidation of six pesticides listed as endocrine disruptor chemicals from wastewater using two different TiO₂ samples at pilot plant scale under sunlight irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *353*, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.11.040>

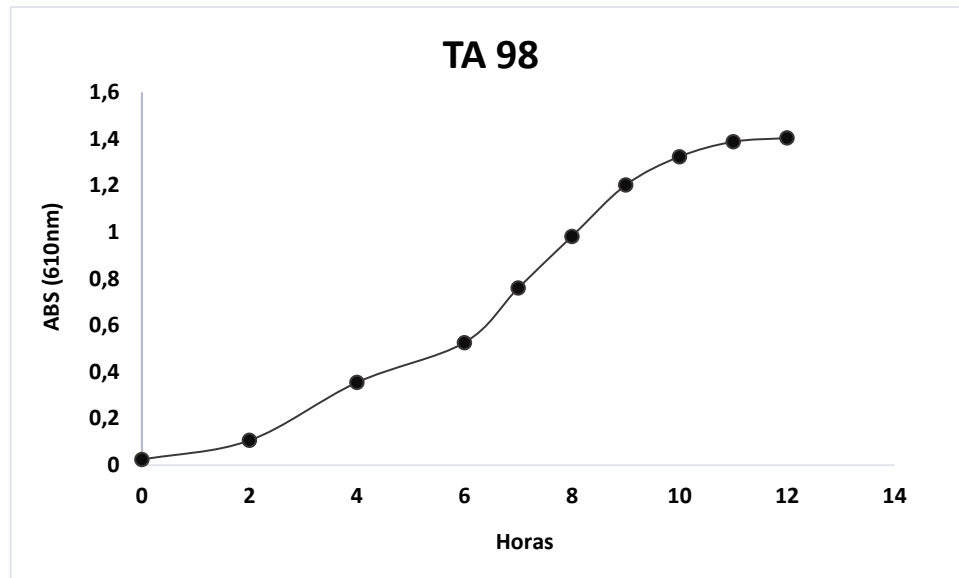
Verma, S., & Srivastava, A. (2018). Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6616-4>

WeatherOnline. (2019). *Índice UV Bolivia - Mapas de pronósticos - previsión del tiempo.* <https://www.woespana.es/weather/maps/forecastmaps?LANG=es&UP=1&R=0&MORE=1®ION=0021&MAPS=uvin&CONT=samk&LAND=BO&DAY=0>

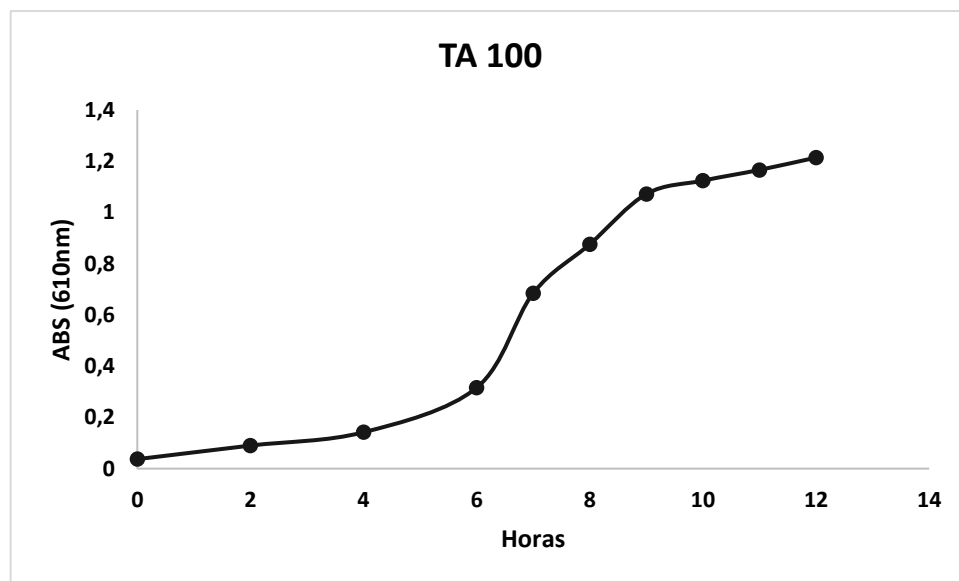
Wei, L., Shifu, C., Wei, Z., & Sujuan, Z. (2009). Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of methamidophos in aqueous phase. *Journal of Hazardous Materials*, *164*(1), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.140>

- Wu, D. M.-L., Deng, J.-F., Tsai, W.-J., Ger, J., Wong, S.-S., & Li, H.-P. (2001). Food Poisoning Due to Methamidophos-Contaminated Vegetables. *Http://Dx.Doi.Org/10.1081/CLT-100105150*, 39(4), 333–336. <https://doi.org/10.1081/CLT-100105150>
- Xu, M., Huang, H., Li, N., Li, F., Wang, D., & Luo, Q. (2019). Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and pesticides in typical surface watersheds, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 289–298. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.01.131>
- Yen, J. H., Lin, K. H., & Wang, Y. S. (2000). Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(1), 79–86. <https://doi.org/10.1006/EESA.1999.1846>
- Yu, X., Yin, H., Ye, J. S., Peng, H., Lu, G., & Dang, Z. (2019). Degradation of tris-(2-chloroisopropyl) phosphate via UV/TiO₂ photocatalysis: kinetic, pathway, and security risk assessment of degradation intermediates using proteomic analyses. *Chemical Engineering Journal*, 374, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.193>
- Zanabria, R. B., Bickel, U., Jacobi, J., & Delgado, F. (2018). *Diálogos Textos breves sobre desarrollo rural solicitados por el IPDRS I Documento preliminar: PLAGUICIDAS ALTAMENTE TÓXICOS EN BOLIVIA*. www.sudamericarural.org
- Zeyad, M. T., Kumar, M., & Malik, A. (2019). Mutagenicity, genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Biotechnology Reports*, 24, e00389. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00389>
- Zhang, C.-J. (n.d.). *EFFECTS OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS ON THE ULTRAVIOLET DEGRADATION OF METHYLPHOSPHONATE*. https://doi.org/10.15666/aer/1704_94739482
- Zhang, Y., Xu, Z., Chen, Z., & Wang, G. (2020). Simultaneous degradation of triazophos, methamidophos and carbofuran pesticides in wastewater using an Enterobacter bacterial bioreactor and analysis of toxicity and biosafety. *Chemosphere*, 261, 128054. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128054>

17. ANEXOS



Anexo 1. Curva de crescimento para a cepa TA98 de *S. typhimurium*



Anexo 2. Curva de crescimento para a cepa TA100 de *S. typhimurium*

Anexo 3. Peso de la arcilla antes y después de la impregnación con TiO₂.

Replica	Perlas de arcilla	de peso de la arcilla con TiO ₂
1	23,325	25,456
2	23	25,002
3	23,324	25,876
4	23,325	25,865
5	23,326	24,876
6	23,325	25,034
7	23,325	25
8	23,326	25
9	23,326	24,47
10	23,325	25,073
11	23	25
12	23	24
13	23	24
14	23	25
15	23	24
Promedio	23,324	24,925

Anexo 4. Resultados de la fotoinactivación por ocho horas, del pesticida Metamidofó

sustancia	Horas	1	2	3	4	5	6	7	8
	concentración								
TiO₂	0,50%	1,367	1,326	1,280	1,367	0,525	0,529	0,493	0,675
	2%	1,440	1,007	0,079	0,007	0,006	0,006	0,006	0,006
	10%	1,147	0,973	0,940	0,171	0,906	0,897	0,854	0,840

Los resultados de la fotoinactivación presentan las concentraciones que se obtuvieron durante las ocho horas de tratamiento, además el porcentaje de diferentes concentraciones de TiO₂ que se usó, donde la concentración del 2% presenta un resultado eficiente en cuanto a la inactivación del Metamidofó, por ello en la impregnación de las perlas de arcilla se usó la concentración de 2%, por otro lado, también se observa que a las cuatro horas este tiene una concentración baja, entonces igualmente se tomó como tiempo referencia para llevar a cabo el diseño metodológico de cuatro horas de irradiación.

Anexo 5. Análisis estadístico

1. Análisis de la concentración del Metamidofo durante las cuatro horas de irradiación por los distintos tratamientos.

Para evaluar la concentración del Metamidofo durante el tiempo por los tratamientos se recurrió a una two way ANOVA dado que se tienen dos factores (concentración y Tratamiento), para resultados paramétricos, porque se cumplen los supuestos de normalidad (Shapiro Test) y supuestos de homogeneidad (Levenet test).

```
shapiro.test(ster$Concentracion)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: ster\$Concentracion

W = 0.96418, p-value = 0.07548

```
shapiro.test(UV$Concentracion)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: c\$Concentracion

W = 0.92789, p-value = 0.2537

```
shapiro.test(UVTIO2$Concentracion)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: b\$Concentracion

W = 0.91913, p-value = 0.1869

```
shapiro.test(SOL$Concentracion)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: m\$Concentracion

W = 0.84687, p-value = 0.01569

shapiro.test(UVTIO2\$Concentracion)

Shapiro-Wilk normality test

data: n\$Concentracion

W = 0.8962, p-value = 0.08329

leveneTest(Concentracion ~ Tiempo*Tratamiento,data=ster) #todo es homogenio

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

Df F value Pr(>F)

group 19 1.3971 0.1832

40

Los resultados de la prueba ANOVA TWO WAY muestran que existe diferencia significativa entre la concentración a lo largo del tiempo y tratamiento (F12.40=16.76, p=5.62e-12)

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

Tiempo 4 14.216 3.554 255.56 < 2e-16 ***

Tratamiento 3 3.523 1.174 84.44 < 2e-16 ***

Tiempo:Tratamiento 12 2.796 0.233 16.76 5.62e-12 ***

Residuals 40 0.556 0.014

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Las pruebas post hoc muestran que los tratamientos con irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2 y la irradiación solar con perlas de arcilla con TiO2 presentan una diferencia significativa a comparación de la hora inicial y final. Además, que cuando se compara entre tratamientos en las horas finales los tratamientos con eficacia UV-TiO2.

PRUEBA DE TUKEY

	diff	lwr	upr	p adj
1:Sol-0:Sol	1.337396122	0.97263362	1.702158624	0.0000000
2:Sol-0:Sol	0.718744229	0.35398173	1.083506731	0.0000007
4:Sol+Tio2-4:Sol	-0.898047091	-1.26280959	-0.533284590	0.0000000
4:UV-4:Sol	-0.360110803	-0.72487331	0.004651699	0.0563851
4:UV+Tio2-4:Sol	-0.766389658	-1.13115216	-0.401627156	0.0000002
1:Sol+Tio2-0:Sol+Tio2	0.429824561	0.06506206	0.794587063	0.0081035
4:Sol+Tio2-0:Sol+Tio2	-1.061666667	-1.42642917	-0.696904165	0.0000000
4:UV-4:Sol+Tio2	0.406278855	0.04151635	0.771041357	0.0160732
2:UV-0:UV	0.576638966	0.21187646	0.941401468	0.0000783
3:UV-0:UV	-0.235918744	-0.60068125	0.128843758	0.6243787
4:UV-0:UV	-0.623730379	-0.98849288	-0.258967877	0.0000167
4:UV+Tio2-4:UV	-0.537936288	-0.90269879	-0.173173786	0.0002764
1:UV+Tio2-0:UV+Tio2	0.671772853	0.30701035	1.036535355	0.0000034
3:UV+Tio2-0:UV+Tio2	-0.630166205	-0.99492871	-0.265403703	0.0000135
4:UV+Tio2-0:UV+Tio2	-0.953342567	-1.31810507	-0.588580065	0.0000000
4:UV+Tio2-4:Sol+Tio2	-0.131657433	-0.49641993	0.233105069	0.9969547

2. Análisis de la cepa TA98 con el índice de mutagenicidad durante las cuatro horas de irradiación por los distintos tratamientos.

Para analizar la mutagenicidad de la cepa TA98 para los distintos tratamientos de irradiación, se recurrió a una prueba de Kruskal-Wallis debido a que la variable no cumplía con los supuestos de la prueba de ANOVA (normalidad y homogeneidad). Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, muestran que existe diferencia significativa en la mutagenicidad de la cepa TA98 ante los diversos tratamientos ($\chi^2_4 = 77.814$, $p=8.06e-07$)

Kruskal-Wallis rank sum test

data: RECUENTO by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

Kruskal-Wallis chi-squared = 77.814, df = 27, p-value = 8.063e-07

Las pruebas post hoc con Dunn test muestran que los tratamientos con irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂ y la irradiación solar con perlas de arcilla con TiO₂ en la última hora con relación a la hora cero y el control negativo, ellos presentan una diferencia significativa. Los tratamientos con luz solar y UV solo presentan significancia entre la hora cero y los controles negativos.

PRUEBA DE COMPARACION NO PARAMETRICO DUNN TEST

Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple
comparisons of independent samples

data: RECUENTO by interaction (TIEMPO, PRUEBA)

	0.SOL	1.SOL	2.SOL	3.SOL	4.SOL	C-.SOL	C+.SOL	0.SOL+TiO2	1.SOL+TiO2
C-.SOL	0.012	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-
4.SOL+TiO2	0.439	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.014	1.000
C-.SOL+TiO2	0.160	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.012	1.000
	2.SOL+TiO2	3.SOL+TiO2	4.SOL+TiO2	C-.SOL+TiO2	C+.SOL+TiO2	0.UV	1.UV	2.UV	3.UV
C-.UV	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.508	0.001	1.000	1.000
	2.UV	3.UV	4.UV	C-.UV	C+.UV	0.UV+TiO2	1.UV+TiO2	2.UV+TiO2	3.UV+TiO2
4.UV+TiO2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.012	1.000	1.000	1.000
C-.UV+TiO2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.018	1.000	1.000	1.000

P value adjustment method: bonferroni

3. Análisis de la cepa TA100 con el índice de mutagenicidad durante las cuatro horas de irradiación por los distintos tratamientos.

Análisis de la cepa TA100 para los distintos tratamientos de irradiación, contra el tiempo, para ello se recurrió a la prueba de Kruskal-Wallis porque no se cumplía con los supuestos de normalidad y homogeneidad. Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, muestran que existe diferencia significativa en la mutagenicidad de la cepa TA100 ante los diversos tratamientos:Tiempo ($\chi^2 = 79.776$, $p=4.084e-07$)

Kruskal-Wallis rank sum test

data: RECUENTO by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

Kruskal-Wallis chi-squared = 79.776, df = 27, p-value = 4.084e-07

El post hoc con Dunn test muestra que los tratamientos con irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2 y la irradiación solar con perlas de arcilla con TiO2 en la ultima hora con relación a la hora cero y el control negativo, presentan una diferencia significativa. Los tratamientos con luz solar y UV solo presentan significancia entre la hora cero y los controles negativos.

Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent samples

data: RECUENTO by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

	0.SOL	1.SOL	2.SOL	3.SOL	4.SOL	C-.SOL	C+.SOL	0.SOL+TiO2	1.SOL+TiO2
C+.SOL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0028	-	-	-
	2.SOL+TiO2	3.SOL+TiO2	4.SOL+TiO2	C-.SOL+TiO2	C+.SOL+TiO2	0.UV			
C+.SOL+TiO2	1.000	0.240	0.120	0.001	-	-	-		

	2.UV	3.UV	4.UV	C-.UV	C+.UV	0.UV+TiO2	1.UV+TiO2	2.UV+TiO2
3.UV+TiO2								

C+.UV	1.000	1.000	1.000	0.010	-	-	-	-
-------	-------	-------	-------	-------	---	---	---	---

	4.UV+TiO2	C-.UV+TiO2
--	-----------	------------

C+.UV+TiO2	0.0034	1.000
------------	--------	-------

P value adjustment method: bonferroni

4. Análisis del Test de Allium con las aberraciones cromosomales durante las cuatro horas de irradiación por los distintos tratamientos.

Para analizar el total de aberraciones cromosomales, se recurrió a una prueba de Kruskal-Wallis, debido a que la variable no cumplía con los supuestos de (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas). Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, muestran que si existe diferencia significativa entre el total de las aberraciones cromosomales y tiempo:tratamiento ($\chi^2 = 79.194$, $p=5e-07$)

Kruskal-Wallis rank sum test

data: CA by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

Kruskal-Wallis chi-squared = 79.194, df = 27, p-value = 5e-07

Las pruebas post hoc muestran que el total de aberraciones cromosomales muestra una diferencia estadística en los tratamientos de irradiación solar con perlas de arcilla y TiO2 y la irradiación UV con perlas de arcilla y TiO2.

Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple

comparisons of independent samples

data: CA by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

	0.SOL	1.SOL	2.SOL	3.SOL	4.SOL	C-.SOL	C+.SOL	0.SOL+TiO2	1.SOL+TiO2
--	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	------------	------------

C-.SOL	0.043	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-
--------	-------	-------	-------	-------	-------	---	---	---	---

	2.SOL+TiO2	3.SOL+TiO2	4.SOL+TiO2	C-.SOL+TiO2	C+.SOL+TiO2	0.UV
--	------------	------------	------------	-------------	-------------	------

0.SOL+TiO2	-	0.045	0.048	0.046	-	-	1.000
------------	---	-------	-------	-------	---	---	-------

C-.UV	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.069	0.042
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

0.UV+TiO2 1. UV+TiO2

4.UV+TiO2 0.040 -

C-.UV+TiO2 0.049 -

P value adjustment method: bonferroni

5. Análisis del Test de Allium con el índice mitótico durante las cuatro horas de irradiación por los distintos tratamientos.

La prueba de Kruskal Wallis muestra que si existe diferencia significativa entre la hora cero y ultima con los tratamientos de irradiación solar con perlas de arcilla TiO2 y la irradiación UV con perlas de arcilla TiO2, sin embargo solo se observa que los tratamientos con irradiación UV y solar presentan significancia estadística entre el control negativo y la hora cero.

Kruskal-Wallis rank sum test

data: MI by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

Kruskal-Wallis chi-squared = 71.924, df = 27, p-value = 5.938e-06

DUNN TEST

Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple

comparisons of independent samples

data: MI by interaction(TIEMPO, PRUEBA)

	0.SOL	1.SOL	2.SOL	3.SOL	4.SOL	C-.SOL	C+.SOL	0.SOL+TiO2	1.SOL+TiO2
C-.SOL	0.001	0.200	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-
4.SOL+TiO2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.042	1.000
C-.SOL+TiO2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0012	0.309
	2.UV	3.UV	4.UV	C-.UV	C+.UV	0.UV+TiO2	1.UV+TiO2	2.UV+TiO2	
3.UV+TiO2									
0.UV	-	-	-	0.0008	-	-	-	-	
	2.UV	3.UV	4.UV	C-.UV	C+.UV	0.UV+TiO2	1.UV+TiO2	2.UV+TiO2	
3.UV+TiO2									
4.UV+TiO2	1.000	0.347	1.000	1.000	1.000	0.0016	0.317	0.899	1.000

C-.UV+TiO2 1.000 0.678 1.000 1.000 1.000 0.0018 0.623 1.000 1.000

Conclusión final

- El orden de los tratamientos para la eliminación efectiva del Metamidofo es:
Irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂> Irradiación solar con perlas de arcilla y TiO₂> irradiación UV> irradiación solar.
- La cepa TA100 no presenta ningún tipo de significancia estadística en ninguno de los tratamientos.
- La concentración, mutagenicidad y genotoxicidad disminuye notablemente en el tratamiento de irradiación UV con perlas de arcilla y TiO₂

