

EFECTO MUTAGENICO DE LOS HERBICIDAS PARAQUAT Y GLIFOSATO EN SALMONELLA TYPHIMURIUM

MUTAGENIC EFFECT OF THE HERBICIDES PARAQUAT AND GLYPHOSATE IN SALMONELLA TYPHIMURIUM

James Salazar G.¹
Margarita Zuleta B.²

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la mutagenicidad de los herbicidas paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium cloruro) y glifosato [N-(fosfonometil) glicina] usando el test de Ames con Salmonella typhimurium, cepas TA97, TA98, TA100, TA102, en presencia o ausencia de S-9, con y sin preincubación.

Las dosis de paraquat utilizadas fueron 0.2, 2.0 y 20.0 ug/caja y únicamente la segunda dosis produjo efecto mutagénico positivo en la cepa TA100, bajo todas las condiciones experimentales empleadas. Es posible que el mecanismo de acción mutagénica del paraquat sea similar al de los mutágenos oxidativos, ya que este herbicida genera radicales de oxígeno cuya implicación en la acción mutagénica ya ha sido demostrada. Las dosis de glifosato utilizadas fueron 0.48, 4.80 y 48.00 ug/caja. Las tres dosis resultaron positivas en las cuatro cepas, bajo todas las condiciones experimentales empleadas.

Según los resultados de este trabajo, el glifosato en su formulación comercial puede ser considerado mutágeno directo y fuerte. Parece que el glifosato en su formulación comercial tiene mayor potencialidad mutagénica que en su estado puro, aunque con los datos obtenidos en el presente trabajo no se puede concluir si dicho efecto es ocasionado por los compuestos presentes en la mezcla, o si es originado por una interacción entre el principio activo del herbicida y los componentes presentes en la formulación comercial. Es importante, por lo tanto, identificar los compuestos presentes en la formulación comercial del herbicida y evaluar el efecto mutagénico de cada uno de ellos.

ABSTRACT

In the present work the mutagenicity of herbicides paraquat (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium chloride) and glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] was investigated using Ames test with Salmonella typhimurium, strains TA97, TA98, TA100 and TA102 in the presence of metabolic activation and absence of S-9 preparation from aroclor 1254 induced rats. The tests were performed in both ways, with and without preincubation. Paraquat was used at the following doses: 0.2, 2.0 and 20.0 ug/plate. Showed mutagenic effect only on the strain TA100 under all experimental conditions. The mutagenic action of paraquat can be attributed to the oxygen radicals generated by this compound.

Glyphosate in its commercial formula was used at the following doses: 0.48, 4.80 and 48.00 ug/plate, producing positive mutagenicity on every tested concentration, strain and experimental conditions.

This study demonstrated that complex mixture of the commercial formula of glyphosate can be considered direct and strong mutagen that can cause frameshift and base substitution mutations in Salmonella typhimurium. It appears that the commercial mixture has a more potent mutagenic action than glyphosate in its pure state. From these data we can not conclude whether the mutagenic effect is due to the active principle present in the mixture or if

1 Avenida Bolívar, Nro. 1-112, Armenia, Quindío.

2 Profesora, Depto de Biología, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

a mutagenic compd was formed by interactions in the commercial formula. Therefore, it is important to make chemical analysis of the components of the formula and study its mutagenic activity separately.

INTRODUCCION

A pesar de la gran utilidad de los herbicidas en la agricultura, su uso, sin los controles adecuados, tiene desventajas para la salud, ya que algunos son fuertes tóxicos y otros pueden causar alteraciones genéticas por exposiciones crónicas que están por debajo del nivel tóxico.

Los herbicidas y sus residuos llegan al hombre a través de la cadena alimenticia a diferentes niveles. Algunos plaguicidas considerados de alta o moderada toxicidad tienen la capacidad de bioacumularse y sus residuos se han encontrado hasta en la leche materna; además, en aguas de consumo, tejidos grasos de aves, peces y mamíferos.

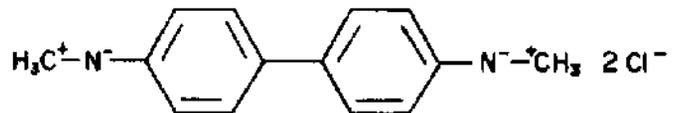
En general, la población humana corre el riesgo de entrar en contacto con los plaguicidas en forma directa o indirecta. El amplio uso de estos compuestos en la agricultura implica la exposición de los operadores, así como el efecto residual cuando los alimentos cosechados han sido rociados directamente implicando una exposición indirecta a la población que los consume (Benigni *et al.*, 1979).

Aproximadamente el 50% de la población tiene una exposición directa con los plaguicidas (fabricantes, transportadores, expendedores, agricultores, etc.) y el 100% de la población está expuesta a residuos.

En nuestro país existen aproximadamente 200 sustancias activas de plaguicidas y 600 productos comerciales, de los cuales 300 son insecticidas (50%), 180 son herbicidas (30%) y 90 son fungicidas (15%), distribuidos por 53 casas comerciales (Londoño, 1984, com. pers.). Muchos de estos compuestos se han identificado como genotóxicos potenciales. Teniendo en cuenta el peligro potencial que significa para el hombre la exposición a los herbicidas se hace necesario evaluar el daño genético que podrían causar. Debido a que estos químicos son compuestos ampliamente usados, es difícil identificar subpoblaciones expuestas que se presten a un análisis epidemiológico confiable; por lo tanto, el enfoque prioritario para buscar su potencial carcinogénico es evaluar la actividad mutagénica de estos compuestos.

Características químicas de los herbicidas paraquat y glifosato

El paraquat (fig. 1) es un herbicida de amplio espectro y acción postemergente, usado en Colombia con el nombre comercial de gramoxone y distribuido por la compañía química BASF. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ y su peso molecular es 257.2 (Wayland, 1982). El primer reporte de su actividad como herbicida fue dado por Brian en 1958.

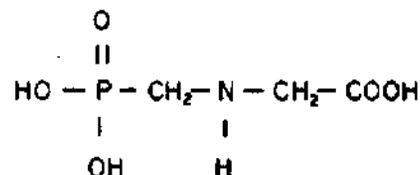


1, 1' - dimetil - 4, 4' - bipyridinium cloruro

Fig. 1. Estructura química del paraquat

Es un sólido blanco cristalino, de sabor ácido amoniacal, no volátil, higroscópico, poco soluble en alcohol, soluble en agua, y se inactiva en el suelo (Haley, 1979).

Se ha encontrado que, por su capacidad de producir superóxidos, es tóxico para el hombre y otros organismos. El punto de ataque puede ser diferente: en plantas, altera el proceso de fotosíntesis, y en los animales, como los ratones, principalmente ataca las membranas alveolares (Wayland, 1982).



N - (fosfonometil) glicina

Fig. 2. Estructura química del glifosato

BIBLIOTECA CENTRAL
 DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
 UNIVERSIDAD NACIONAL
 DE COLOMBIA

El paraquat es considerado como un poderoso fitotóxico debido a que reduce los procesos de fotosíntesis y respiración. Los síntomas de toxicidad aguda en ratones incluyen hemorragia intraalveolar, edema pulmonar, fibrosis extensiva y cambios epiteliales. El paraquat penetra la piel intacta produciendo toxicidad dermal (Onyema y Oehme, 1984). La letalidad media (LD₅₀) en ratones es de 30 mg/kg (Wayland, 1982; Fernández y Zuleta, 1986).

El glifosato (fig. 2) es un herbicida distribuido con el nombre comercial de roundup y comercializado por la compañía Monsanto Colombiana. Su fórmula molecular es C₃H₈NO₅P y su peso molecular es 169.1 (Evans, 1972).

Esta sustancia es un sólido blanco inodoro, introducido por la compañía Monsanto en 1971 como un único producto de amplio espectro, postémergente y herbicida no selectivo (Evans, 1972).

Olorunsogo y Christian (1979) reportaron que el glifosato administrado intraperitonealmente en ratones tiene una letalidad media (LD₅₀) de 192 a 279 mg/kg. Esta baja toxicidad puede conducir a su uso incontrolado por el desconocimiento de su efecto genotóxico a dosis bajas de exposición crónica.

Los síntomas que acompañan la intoxicación por glifosato incluyen elevada temperatura rectal, convulsiones, asfixia y rigor de muerte, pero el mecanismo de acción no está exactamente determinado. Debido a la multitud de efectos que presenta es muy probable que el efecto total del herbicida involucre más de un modo de acción. Se ha establecido, sin embargo, que el principal modo de acción consiste en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Su acción herbicida (o de matamalezas) ocurre por la incapacidad de las plantas para producir proteínas.

Efectos en los ácidos nucleicos

El paraquat, al ser sometido al test de letales dominantes en ratones machos, resultó ser negativo a dosis de 4 mg/kg, administrados oralmente (Anderson *et al.*, 1976).

En concentraciones de 5×10^{-5} M, el paraquat produce 4.1% de aberraciones cromosómicas en semillas de trigo. Además, se encontró que tiene un efecto directo sobre el DNA de plantas y animales (Haley, 1979). Benigni *et al.* (1979) encontraron que produce mutaciones letales recesivas en la cepa diploide p₃ de A.

nidulans y síntesis de DNA no programado (UDS) en células epiteliales humanas.

El paraquat demostró capacidad para producir mutaciones hacia adelante ("forward mutations") en *S. typhimurium*. Por ejemplo, Benigni *et al.* (1979) encontraron un aumento significativo de mutaciones 8-AG^r, en cepas de *S. typhimurium* eficientes para reparación.

Haley (1979) reportó que en bajas concentraciones retarda la mitosis de hepatocitos cultivados, además de afectar el sistema lisosomal, induciendo un decrecimiento en las reacciones enzimáticas. El mismo autor observó al microscopio electrónico lesiones y cambios patológicos inducidos por el paraquat en hígado de rata, luego de inyectar intraperitonealmente dosis de 10 y de 20 mg/kg durante dos semanas. Las observaciones no revelaron la presencia de tumores durante 112 días de seguimiento. Tampoco se consideró teratogénico ya que no se observaron embriopatías luego de tratar las hembras con dosis máximas y mínimas durante tres generaciones.

En cuanto a la mutagenicidad y la carcinogenicidad del glifosato, existen muy pocos estudios. Vigfuson (1980) reportó que en dosis de 25 mg/ml, inhibe el crecimiento de linfocitos humanos. En cambio, una dosis 100 veces menor (0.25 mg/ml) es suficiente para interactuar con el DNA y aumentar significativamente la frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas (SCEs) en dichas células. Seiler (1977) encontró que el glifosato no produce micronúcleos en eritrocitos policromáticos de la médula ósea de ratón.

MATERIALES Y METODOS

A. Prueba de mutagenicidad

En el presente trabajo se empleó el test de Ames con *Salmonella typhimurium*, de acuerdo con el protocolo descrito por Ames *et al.* (1975) y Maron y Ames (1983).

El indicativo de mutagenicidad está dado por la reversión específica a través de la sustitución de un par de bases o de la adición o pérdida de un par de bases en un punto crítico del cistron mutado, de tal manera que la bacteria pase de his⁻ a his⁺. Las salmonelas revertantes se reconocen porque crecen en medio mínimo sin histidina.

El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: en tubos estériles de 13x100 mm (previamente codificados) se colocaron 0.1 ml de la sustancia a evaluar, 0.1 ml de cultivo fresco de la cepa bacteriana (aproximadamente 10^8 bacterias) y 0.5 ml de la mezcla S-9 con enzimas microsomales (o del buffer). Se agitaron rápidamente los tubos en un vórtex a baja velocidad y se preincubaron a 37°C, durante 25 min. Luego se les agregó 3 ml de agar blando fundido a 45°C, se agitaron rápidamente y se vertieron individualmente en cajas de agar mínimo sólido (previamente codificadas), las cuales se movieron circularmente (para lograr un extendido homogéneo). Luego se dejaron reposar unos 15 min y se incubaron a 37°C, durante 48 h. El conteo de colonias revertantes his⁺ se realizó en un cuentacolonia Spencer.

Cepas bacterianas

Se utilizaron 4 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100 y TA102) donadas gentilmente por el doctor Bruce Ames (Universidad de California, Berkeley, CA, USA). Dichas cepas se conservan en nitrógeno líquido a -170°C. Las marcas genéticas de las cepas se chequearon siguiendo la técnica de Maron y Ames (1983).

La fracción microsomal (S-9) usada para la activación metabólica, se preparó según las instrucciones de Maron y Ames (1983). El S-9 se obtuvo de homogenizado de hígado de ratas macho Sprague-Dawley, con 5 meses de edad. Para inducir las enzimas microsomales, se inyectaron las ratas intraperitonealmente con aroclor 1254 a una dosis de 500 mg/kg, disuelto en aceite de maíz estéril (200 mg/ml). Cinco días después de la inyección, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se les extrajo el hígado en condiciones asépticas. El hígado se mantuvo a 45°C. A los animales se les suspendió el alimento 14 h antes del sacrificio.

El hígado se lavó con KCl 0.15 M y se homogenizó en tres volúmenes de la misma solución (KCl 0.15 M). Luego se centrifugó a 9000 g y a 45°C durante 10 min. El sobrenadante se guardó en nitrógeno líquido a -170°C hasta el momento de usarlo. Unos minutos antes de usar el S-9, se le agregaron a dicha fracción los cofactores, de tal manera que 1 ml de mezcla (S-9) queda con la siguiente composición: 0.1 ml de homogenizado (S-9), 0.02 ml de solución de sales MgCl₂-KCl (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl₂), 0.04 ml de NADP (0.1 M), 0.005 ml de glucosa 6-fosfato (0.1 M), 0.5 ml de buffer fosfato pH 7.4 (0.2 M: NaH₂PO₄.H₂O-Na₂HPO₄) y 0.335 ml de agua destilada.

Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado, con y sin preincubación, con y sin activación metabólica (mezcla S-9). En cada uno de los experimentos se realizaron simultáneamente controles positivos y negativos. Con el fin de detectar reproducibilidad de los resultados todo el grupo de pruebas experimentales se repitió en diferentes épocas.

Compuestos químicos

El trabajo se realizó con las formulaciones comerciales de los herbicidas paraquat (gramoxone) y glifosato (roundup) adquiridos en una de las casas distribuidoras de agroquímicos. En la evaluación mutagénica de cada herbicida se usaron las siguientes dosis: gramoxone 0.2, 2.0 y 20.0 µg/caja y roundup 0.48, 4.80 y 48.00 µg/caja.

Como controles positivos se utilizaron mutágenos ampliamente reconocidos tales como mitomicina C (MMC, 0.5 g/caja), el cual es mutágeno directo, y 2-aminofluoreno (2-AF, 10 g/caja), que es mutágeno indirecto.

La mitomicina C se empleó para la cepa TA102, y el 2-AF se empleó para las cepas TA97, TA98 y TA100. Como controles negativos se utilizó agua destilada estéril y la mezcla activadora S-9.

La investigación se llevó a cabo en dos grupos experimentales realizados en épocas diferentes, pero bajo idénticas condiciones de laboratorio.

B. Prueba de toxicidad

Para la prueba de toxicidad se escogió la cepa TA100 por ser una de las más sensibles.

Se utilizaron seis dosis diferentes, a saber: glifosato 0.48, 4.80, 48.00, 480.00, 4×10^3 y 4×10^4 µg/caja, y paraquat, 0.2, 2.0, 20.0, 200.0, 2×10^3 y 2×10^4 µg/caja.

La cepa se cultivó en 15 ml de caldo nutritivo en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad, durante 14 h a 37°C. A partir del cultivo fresco se hicieron diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en solución estéril peptónica 0.1%. Para realizar la siembra se procedió de la siguiente manera: en tubos estériles de 13x100 mm (previamente codificados) se agregaron 0.4 ml de solución peptónica, 0.1 ml de bacterias y 0.1 ml de la dosis del compuesto. Los tubos se incubaron a 37°C durante 25 min. Luego se les adicionó 3 ml de agar nutritivo blando fundido a 45°C, se agitaron rápidamente en un vórtex a baja velocidad y finalmente se

vertieron individualmente en cajas de agar nutritivo sólido, las cuales se movieron circularmente (para lograr un extendido homogéneo). Posteriormente se dejaron reposar unos 15 min y se incubaron a 37°C, durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se contó el número de colonias por caja en un cuentacolonia Spencer.

El número de colonias que creció en las cajas expuestas se comparó con el número de colonias de los controles. Para cada dosis se halló el porcentaje de sobrevivencia con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{\bar{X} \text{ colonias cajas expuestas}}{\bar{X} \text{ colonias cajas control}} \times 100$$

C. Análisis estadístico

La estimación de la mutagenicidad se hizo con base en la relación de actividad mutagénica o RAM (Commer, 1976).

El compuesto se considera mutagénico si produce el doble o más de colonias revertantes en relación con las observadas en los controles negativos, o sea, si el valor RAM es mayor que 2.

$$\text{RAM} = \frac{a - b}{c}$$

en donde:

- a = promedio de colonias revertantes en las cajas expuestas
- b = promedio de colonias revertantes en las cajas del control negativo
- c = promedio de colonias revertantes del total de controles negativos

Para tener una mayor confiabilidad estadística se usó, además, el procedimiento descrito por Katz (1979), con una confiabilidad del 95% ($p < 0.05$).

$$\theta = \frac{a(M-0.5) - Kb(m+0.5)}{Kab(M+m)}$$

en donde:

- a = número de cajas del control negativo
- b = número de cajas expuestas
- m = sumatoria de colonias revertantes en las ca-

jas del control negativo

M = sumatoria de colonias revertantes en las cajas expuestas

K = sobrevivencia

Si el valor de θ es mayor que 1.64, el compuesto evaluado se considera mutagénico.

RESULTADOS

Los resultados de mutagenicidad de los diferentes grupos experimentales (controles negativos, controles positivos y herbicidas), con las cuatro cepas utilizadas, se resumen en los histogramas de las figuras 3, 4, 5 y 6.

Paraquat:

En la figura 8 se representan los promedios de reversión de las cuatro cepas de *S. typhimurium* tratadas con diferentes dosis subtóxicas de paraquat.

En la tabla 1 aparece el porcentaje de sobrevivencia y las dosis letales (LD) del paraquat en la cepa TA100. Como puede observarse en esta tabla y en la figura 7, todas las dosis de paraquat utilizadas en este trabajo produjeron efecto tóxico; a medida que aumenta la dosis, disminuye la sobrevivencia, la cual llega a cero a partir de las dosis 200 µg/caja. Así por ejemplo, la sobrevivencia con las dosis 0.2, 2.0, 20.0 y 200.0 µg/caja es de 85, 75, 65 y 25%, respectivamente.

En las tablas 2, 3, 4 y 5 aparecen los promedios de las revertantes obtenidas con glifosato y paraquat, en las pruebas de mutagenicidad. Los datos de seis cajas procedentes de los dos grupos experimentales se juntaron en un solo promedio teniendo en cuenta la similitud de los datos obtenidos en cada experimento.

En relación con la mutagenicidad del paraquat sólo se encontraron resultados positivos en la cepa TA100 bajo todas las condiciones experimentales, y alguna mutagenicidad con la dosis 0.2 µg/caja en la cepa TA98, en presencia de S-9 y con preincubación.

El análisis estadístico sobre la mutagenicidad del paraquat se hizo con base en el tratamiento formulado por Katz (1979). No se utilizó la relación de actividad mutagénica (RAM) por haberse trabajado con dosis subtóxicas y este análisis no incluye factor de corrección para tales casos. Estos resultados pueden observarse en las tablas 2, 3, 4 y 5 donde aparecen los pro-

medios de colonias revertantes por caja y el valor de θ del análisis de Katz para las cuatro cepas tratadas.

Glifosato

En la figura 9 se representan los promedios de reversión de las cuatro cepas de *S. typhimurium* tratadas con diferentes dosis de glifosato.

En la tabla 1 (pruebas de toxicidad) aparece el porcentaje de sobrevivencia y las dosis letales (LD) de la cepa TA100 tratadas con el glifosato. En esta tabla y en la figura 7 se observa que la toxicidad del glifosato en la cepa TA100 se inicia en dosis mayores de 0.48 $\mu\text{g}/\text{caja}$ y que dosis iguales o mayores de $4.8 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{caja}$ producen una letalidad del 100%.

Como puede observarse en las tablas 2, 3, 4 y 5, el glifosato produjo alto efecto mutagénico en las cepas TA98, TA100 y TA102, bajo todas las condiciones experimentales, o sea, en presencia o ausencia de S-9, con y sin preincubación. Los resultados fueron positivos con ambas pruebas estadísticas: RAM y Katz.

De acuerdo con la relación de actividad mutagénica (RAM) el glifosato dio resultados negativos en la cepa TA97; pero al aplicar el procedimiento estadístico de Katz, todas las dosis utilizadas del compuesto fueron positivas para la misma cepa.

La figura 9 representa la mutagenicidad del glifosato en las cuatro cepas de *S. typhimurium* en función de la dosis. En todas las cepas se observa un aumento progresivo del número de revertantes con las dosis 0.48 y 4.80 $\mu\text{g}/\text{caja}$; en cambio con la dosis 48.00 $\mu\text{g}/\text{caja}$ disminuyó notablemente el número de revertantes. (Esto puede ser causado por el efecto tóxico de dicha dosis y/o por la acumulación del daño genético).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las dosis de paraquat a partir de 0.2 $\mu\text{g}/\text{caja}$ produjeron efecto tóxico en todas las cepas pero únicamente fueron mutagénicas en la cepa TA100. Respecto al efecto tóxico se observó que éste difiere en las distintas cepas bacterianas. Lo mismo se ha evidenciado a nivel de organismos superiores, en los que aún sus propios órganos responden con diferente sensibilidad a las mismas sustancias de acuerdo con el tejido expuesto. Por lo tanto, la identificación de dosis tolerables o permisibles de compuestos químicos es cues-

tionable debido a la complejidad del comportamiento de los seres vivos. Esto es todavía más complejo cuando se refiere al efecto de dosis mutagénica y/o carcinogénica, ya que el efecto mutagénico y/o carcinogénico depende de muchos factores tales como especie, tejido expuesto, interacción genética, estado fisiológico, intensidad de la exposición, mecanismos de reparación, sexo, etc. Además, las dosis mutagénicas pueden ser mil o más veces menores que las dosis no tóxicas y por lo tanto permisibles. Con base en las anteriores consideraciones se concluye además que no es válido extrapolar los resultados toxicológicos de una cepa a otra; en consecuencia, debe realizarse una curva de toxicidad para cada una de las cepas incluidas en un trabajo experimental.

El efecto tóxico del paraquat podría ser causado a través de la formación de semiquinonas, que a su vez generan radicales superóxidos (Levin *et al.*, 1982). El efecto mutagénico del paraquat encontrado en la cepa TA100 está de acuerdo con los resultados de Maddy (1984), pero no coincide con los hallazgos de Benigni *et al.* (1979) quienes reportan que el paraquat es negativo en el test de reversión con *S. typhimurium* en las cepas TA1535, TA1538, TA98 y TA100. Sin embargo, este mismo autor demostró que el paraquat sí induce mutaciones hacia adelante en *S. typhimurium* 8-AG^r (resistente a la 8-azaguanina) y que induce mutaciones letales recesivas en *A. nidulans* y síntesis de DNA no programado (UDS) en células epiteliales humanas. Además, Haley (1979) encontró que produce aberraciones en semilla de trigo. Estos hallazgos indican claramente que el paraquat sí interactúa con el DNA y tiene acción mutagénica. Es posible que el mecanismo de acción mutagénica del paraquat sea parecido al de los mutágenos oxidativos tales como rayos X, peróxido de hidrógeno, fenilhidrazina, t-butil hidroperóxido, estreptonigrina y daunomicina, ya que todos ellos, así como el paraquat, generan radicales de oxígeno cuya implicación en la acción mutagénica se ha demostrado previamente. Uno de los efectos principales de los agentes oxidantes es la formación de timina glicol en el DNA, sobre la cual actúa la N-glicosilasa, presente en la reparación de bases específicas (Frenkel *et al.*, 1981). Esto podría causar una lesión en el DNA que a su vez fije la mutación.

Con el fin de detectar más claramente el potencial mutagénico del paraquat (formulación comercial) sería interesante trabajar en futuras investigaciones con dosis menores a las tóxicas y subtóxicas, o sea, menores que 0.2 $\mu\text{g}/\text{caja}$. Esto es importante si se tiene en cuenta que la población está expuesta a dosis muy

pequeñas, medibles en ppm, que generalmente son consideradas permisibles por no ofrecer toxicidad o efectos inmediatos.

Según los resultados de este trabajo, el glifosato en su formulación comercial puede ser considerado mutágeno directo, fuerte y capaz de producir diferentes lesiones en el DNA. Lo anterior se deduce al observar que el herbicida resultó positivo bajo todas las condiciones experimentales, es decir, en presencia o ausencia de S-9, y con y sin preincubación en las cuatro cepas evaluadas: TA97 y TA98 (que detectan desplazamiento de lectura por adición o pérdida de un par de bases), y TA100 y TA102 (que detectan sustitución de bases).

Vigfuson *et al.* (1980) también encontraron efecto positivo de la formulación comercial del glifosato. Este investigador observó un incremento significativo de intercambio entre cromátides hermanas (SCEs) en linfocitos humanos. Parece que el glifosato en su formulación comercial tiene mayor potencialidad mutagénica que en su estado puro, pues existen reportes de efectos mutagénicos negativos realizados con el glifosato puro en la prueba de reversión con *S. typhimurium*, cepas TA1535, TA1537, TA1538, TA98 y TA100 (Moriya *et al.*, 1983). También se observó efecto negativo en el test de micronúcleos (Seiler, 1977). Sin embargo, el glifosato puro también ofrece peligro. Por ejemplo, Seiler (1977) reportó efecto mutagénico en *S. typhimurium*, cepa his G46. El efecto mutagénico en la formulación comercial, pero negativo en el principio activo puro, también se ha observado con otros herbicidas tales como 2,4-D que dio resultados negativos al trabajar con el principio activo puro en *S. typhimurium* (Zeetterberg *et al.*, 1977); en cambio, la formulación comercial produjo aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos cultivados *in vitro* y mutaciones puntuales en *S. typhimurium* (Zuleta y Garcés, 1983).

Con los datos obtenidos en la presente evaluación mutagénica del glifosato no se puede concluir si dicho efecto es ocasionado por el herbicida puro o por los compuestos presentes en la mezcla, o si es originado por una interacción entre el principio activo y los componentes de la formulación. Es importante, por lo tanto, identificar los componentes presentes en la formulación comercial del herbicida y evaluar el efecto mutagénico de cada uno de ellos.

Los resultados con los controles positivos utilizados, Zaminofluoreno y mitomicina C, están de acuerdo con los reportados por Ames *et al.* (1975) y Maron y Ames

(1983). Por ejemplo, el 2-AF, caracterizado por muchos investigadores como mutágeno indirecto, dio resultados positivos solamente cuando se le adicionó S-9. Esto indica la efectividad de la mezcla activadora obtenida en nuestro laboratorio.

La mitomicina C fue positiva en presencia o ausencia de S-9, lo que le confiere el carácter de mutágeno directo tal como se ha demostrado ampliamente por otros autores. Lo anterior demuestra que el presente trabajo se desarrolló bajo las condiciones técnicas y científicas exigidas.

Finalmente, debe anotarse que en los dos grupos experimentales realizados en diferentes épocas, pero bajo idénticas condiciones de laboratorio, se obtuvo reproducibilidad de los resultados, lo que confiere alta confiabilidad al presente trabajo.

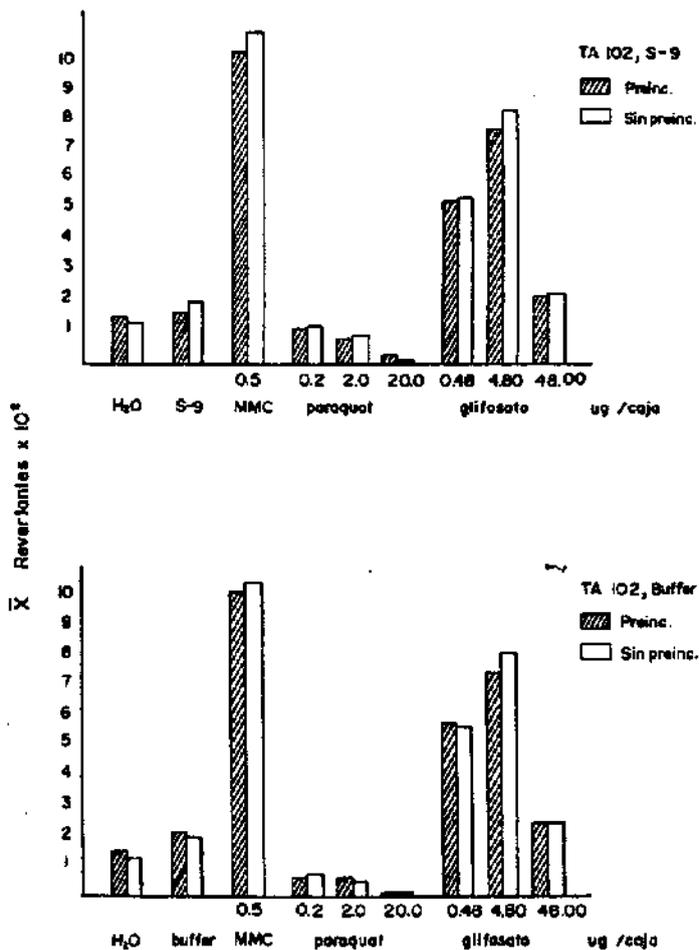


Fig. 3. Distribución de los promedios de revertantes en la cepa TA102 tratada con los compuestos: H₂O, S-9, MMC (mitomicina C), paraquat, glifosato y buffer.

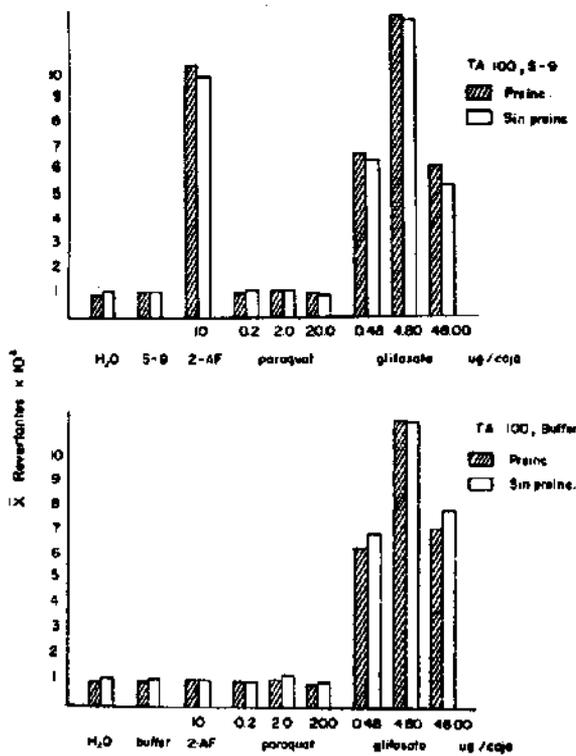


Fig. 4. Distribución de los promedios de revertantes en la cepa TA100 tratada con los compuestos: H₂O, S-9, 2-AF (aminofluoreno), paraquat, glifosato y buffer.

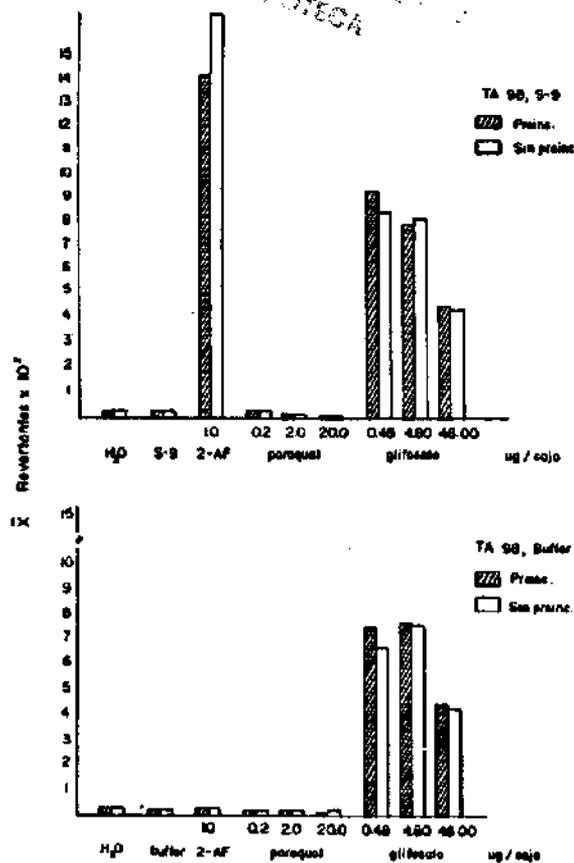


Fig. 5. Distribución de los promedios de revertantes en la cepa TA98 tratada con los compuestos: H₂O, S-9, 2-AF (aminofluoreno), paraquat, glifosato y buffer.

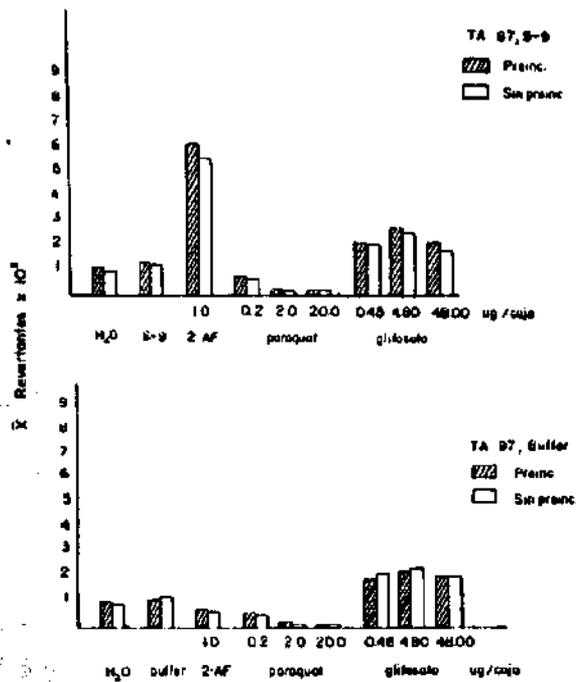


Fig. 6. Distribución de los promedios de revertantes en la cepa TA97 tratada con los compuestos: H₂O, S-9, 2-AF (aminofluoreno), paraquat, glifosato y buffer.

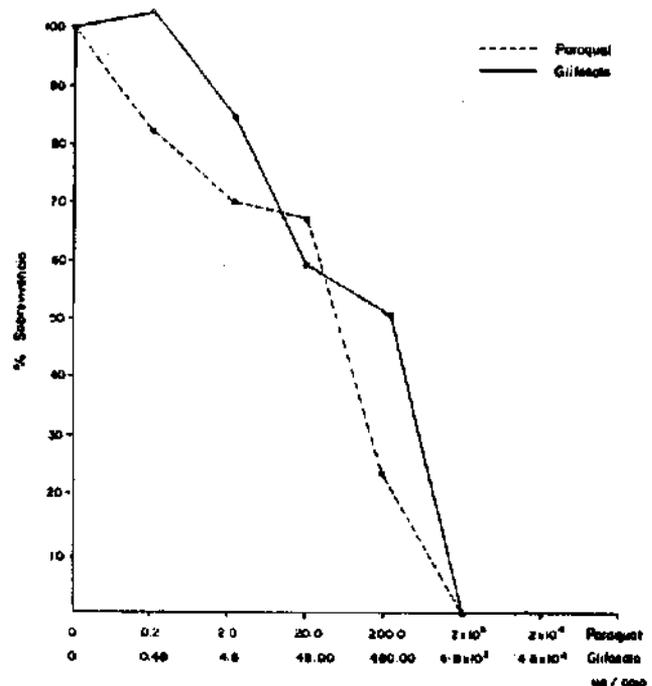


Fig. 7. Supervivencia de la cepa TA100 tratada con diferentes dosis de paraquat o glifosato.

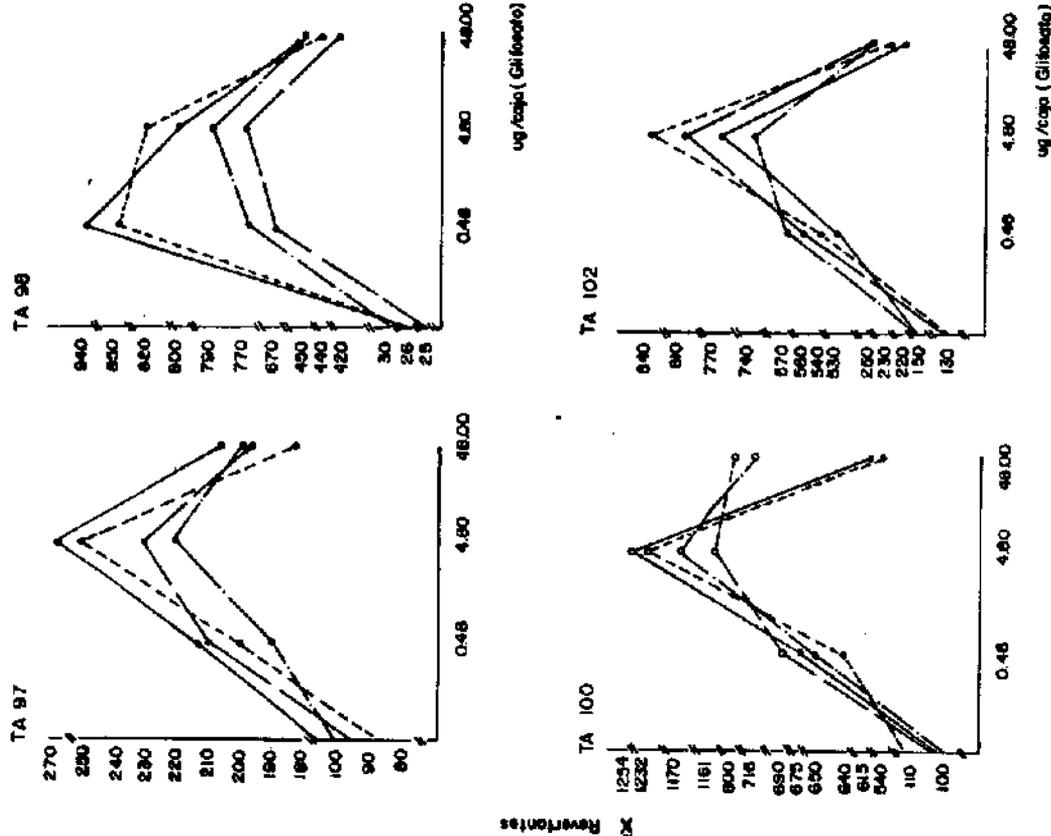


Fig. 9. Mutagenicidad en cuatro cepas de *S. typhimurium* tratadas con diferentes dosis de glicolato. Con S-9 y preincubación (—), con S-9 sin preincubación (---), con buffer y preincubación (—) y con buffer sin preincubación (---).

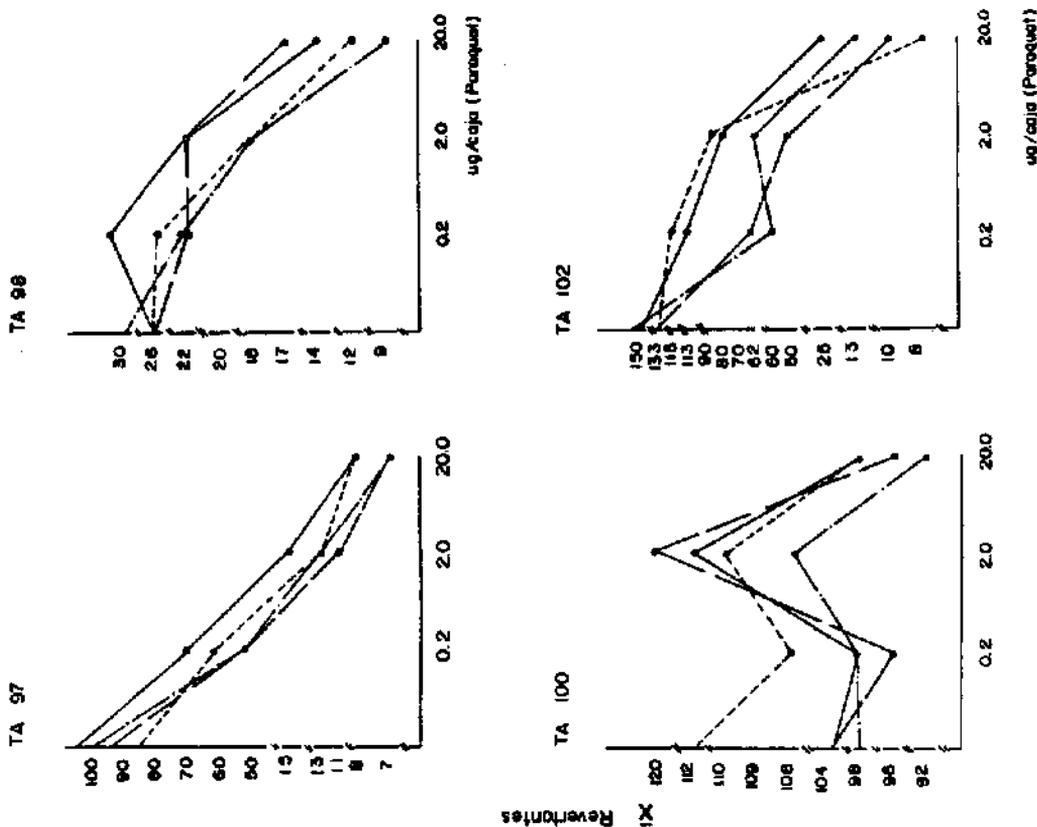


Fig. 8. Mutagenicidad en cuatro cepas de *S. typhimurium* tratadas con diferentes dosis de paraquat. Con S-9 y preincubación (—), con S-9 sin preincubación (---), con buffer y preincubación (—) y con buffer sin preincubación (---).

Tabla 1. Prueba de toxicidad. Porcentaje de sobrevivencia y dosis letal (LD) en la cepa TA100

Compuesto	Dosis/caja (μg)	% sobrevivencia	LD
Paraquat	0.2	85	15
	2.0	75	25
	20.0	65	35
	200.0	25	75
	2000.0	0	100
	20000.0	0	100
Glifosato	0.48	100	0
	4.80	85	15
	48.00	60	40
	480.00	50	50
	4×10^3	0	100
	4×10^4	0	100

Tabla 2. Actividad mutagénica del paraquat y del glifosato en la cepa TA97, con o sin preincubación y en presencia de S-9 (homogenizado de hígado) o buffer

Compuesto	Dosis/caja (μg)	S-9 (0.5 ml)								Buffer (0.5 ml)							
		Preincubación				Sin preincubación				Preincubación				Sin preincubación			
		\bar{x}	SD	RAM	θ	\bar{x}	SD	RAM	θ	\bar{x}	SD	RAM	θ	\bar{x}	SD	RAM	θ
H ₂ O	0.1 ml	106	10			86	7			100	18			94	10		
S-9	50.0 μl	126	12			121	17			110	25			119	23		
Paraquat	0.2	71	10		-4.0	62	6		-2.0	54	14		-4.0	64	14		-6.0
	2.0	15	6		-17.0	13	5		-15.0	13	8		-16.0	11	3		-17.0
	20.0	8	2		-17.0	8	2		-15.0	7	2		-17.0	7	2		-17.0
Glifosato	0.48	213	22	0.9	15.0	199	19	1.1	16.0	192	17	0.9	14.0	206	16	1.1	16.0
	4.80	268	24	1.4	24.0	249	21	1.6	25.0	221	20	1.2	20.0	230	37	1.3	22.0
	48.00	206	14	0.9	26.0	182	13	0.9	25.0	202	17	1.0	26.0	197	14	1.0	26.0
2-AF	10.0	815	28	4.4	46.4	560	31	4.6	45.7	73	7	-0.25	-5.0	64	8	-0.3	-6.0

\bar{x} = Promedio de revertantes en seis cajas, procedentes de dos experimentos; RAM = Relación de actividad mutagénica; θ = Valor obtenido en el análisis estadístico de Katz; 2-AF = 2-aminofluoreno; SD = Desviación estándar

Tabla 3. Actividad mutagénica del paraquat y del glifosato en la cepa TA98, con o sin preincubación y en presencia de S-9 (homogenizado de hígado) o buffer

Compuesto	Dosis/caja (µg)	S-9 (0.5 ml)								Buffer (0.5 ml)							
		Preincubación				Sin preincubación				Preincubación				Sin preincubación			
		\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ
H ₂ O	0.1 ml	26	8			26	8			29	8			28	3		
S-9	50.0 µl	26	8			29	9			20	2			22	3		
Paraquat	0.2	34	13		4.0	25	13		1.0	23	5		-1.0	22	2		0.2
	2.0	22	9		1.1	18	3		0.7	18	2		-2.0	22	3		1.2
	20.0	14	8		1.3	12	7		-2.0	9	5		-5.0	17	12		0.4
Glifosato	0.48	941	93	35.0	72.0	850	105	30.0	88.0	785	158	30.0	64.0	870	55	27.4	60.0
	4.80	799	55	29.7	72.0	820	59	29.0	73.0	780	94	30.8	70.0	172	112	32.0	71.0
	48.00	450	65	16.3	63.0	441	141	15.0	62.0	448	166	17.0	62.0	425	41	17.0	61.0
2-AF	10.0	1417	85	53.5	90.0	1893	95	90.6	99.0	30	5	0.04	0.3	23	5	-0.1	-0.6

\bar{x} = Promedio de revertantes en seis cajas, procedentes de dos experimentos; RAM = Relación de actividad mutagénica; θ = Valor obtenido en el análisis estadístico de Katz; 2-AF = 2-aminofluoreno; SD = Desviación estándar

Tabla 4. Actividad mutagénica del paraquat y del glifosato en la cepa TA100, con o sin preincubación y en presencia de S-9 (homogenizado de hígado) o buffer

Compuesto	Dosis/caja (µg)	S-9 (0.5 ml)								Buffer (0.5 ml)							
		Preincubación				Sin preincubación				Preincubación				Sin preincubación			
		\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ
H ₂ O	0.1 ml	102	13			112	7			98	10			103	23		
S-9	50.0 µl	104	16			104	11			110	7			109	21		
Paraquat	0.2	99	8		2.0	108	11		2.0	99	11		3.0	98	11		2.0
	2.0	112	17		7.0	110	9		5.0	108	7		7.0	121	33		8.0
	20.0	98	13		7.0	92	12		4.0	92	9		6.0	96	17		6.0
Glifosato	0.48	675	215	5.8	50.0	642	249	5.0	47.0	648	248	5.3	49.0	680	291	5.5	48.0
	4.80	1254	34	11.2	84.0	1232	16	10.4	89.0	1173	228	10.4	75.0	1181	277	10.0	80.0
	48.00	818	391	5.0	72.0	544	325	4.0	59.0	718	398	6.0	72.0	806	394	6.6	78.0
2-AF	10.0	1053	81	9.0	89.0	988	99	8.3	85.0	105	10	0.01	1.2	105	12	0.01	0.3

\bar{x} = Promedio de revertantes en seis cajas, procedentes de dos experimentos; RAM = Relación de actividad mutagénica; θ = Valor obtenido en el análisis estadístico de Katz; 2-AF = 2-aminofluoreno; SD = Desviación estándar

Tabla 5. Actividad mutagénica del paraquat y del glifosato en la cepa TA102, con o sin preincubación y en presencia de S-9 (homogenizado de hígado) o buffer

Compuesto	Dosis/caja (µg)	S-9 (0.5 ml)								Buffer (0.5 ml)							
		Preincubación				Sin preincubación				Preincubación				Sin preincubación			
		\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ	\bar{X}	SD	RAM	θ
H ₂ O	0.1 ml	150	31			134	21			153	20			135	30		
S-9	50.0 µl	164	32			203	19			217	21			198	13		
Paraquat	0.2	113	11		-2.5	115	20		0.1	80	27		-13.0	65	15		-9.0
	2.0	80	12		-6.0	86	19		-3.0	62	24		-10.0	50	20		-11.0
	20.0	25	10		-17.0	8	3		-20.0	13	7		-21.0	10	3		-20.0
Glifosato	0.48	533	84	2.4	38.0	540	109	2.4	38.0	568	140	2.2	38.0	564	165	2.6	40.0
	4.80	768	149	3.9	56.0	840	216	4.2	62.0	743	170	3.2	54.0	614	210	4.0	60.0
	48.00	216	12	0.4	21.0	232	19	0.6	25.0	250	42	0.5	25.0	249	16	0.7	27.0
2-AF	10.00	1040	84	5.7	63.0	1124	59	5.9	68.0	1015	49	4.7	62.0	1048	57	5.5	65.0

\bar{X} = Promedio de revertantes en seis cajas, procedentes de dos experimentos; RAM = Relación de actividad mutagénica; θ = Valor obtenido en el análisis estadístico de Katz; 2-AF = 2-aminofluoreno; SD = Desviación estándar

LITERATURA CITADA

- Ames, B. N., J. McCann y E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364
- Anderson, D., D. B. McGregor y I. F. H. Purchase. 1976. Dominant lethal studies with paraquat and diquat in male CD-1 mice. *Mutat. Res.* 40: 349-358
- Bernigni, R., M. Bignami, A. Carere, G. Conti, L. Conti, R. Crebelli y E. Dogliotti. 1979. Mutational studies with diquat and paraquat *in vitro*. *Mutat. Res.* 66: 183-193
- Commoner, B. 1976. Reliability of bacterial mutagenesis techniques to distinguish carcinogenic chemicals. EPA Off. Res. Developm. Contract #68-01 2471
- Evans, S. D. 1972. Characteristics of some herbicides. *Proc. Natl. Acad. USA* 64(172)
- Fernández, N. y M. Zuleta. 1986. Evaluación del potencial mutagénico del gramoxone en la prueba de micronúcleos (sin publicar)
- Frenkel, K. y S. Dietrich. 1961. Identification of the cisthymine glycol moiety in oxidized deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 10: 618-626
- Haley, T. 1979. Review of the toxicology of paraquat. *Clin. Toxicol.* 14(1): 1-46
- Katz, A. 1979. Design and analysis of experiments on mutagenicity. II. Assays involving microorganisms. *Mutat. Res.* 64: 61-67
- Levin, D. E., M. C. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers y B. N. Ames. 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. USA* 79: 7445-7449

- Londofio, E. 1984. Coordinadora Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira (comunicación personal)
- Maddy, K. 1984. Carcinogenic potential of various pesticides. *Veterin. Human Toxicol.* 26(06)
- Maron, D. y B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 115: 173-216
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato y Y. Shrasu. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assays systems. *Mutat. Res.* 116: 185-216
- Olorunsogo, O. y T. Christian. 1979. Effect of glyphosate on the rat liver mitochondria *in vivo*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 22: 357-364
- Onyeama, H. y F. Oehme. 1984. A literature review of paraquat toxicity. *Veterin. Human Toxicol.* 26(06)
- Seller, J. 1977. Nitrosation *in vitro* and *in vivo* by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutat. Res.* 48: 225-236
- Vigfuson, N. 1980. The effect of the pesticides daxon, captan and roundup on sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 79: 53-57
- Wayland, J. 1982. Pesticides studies in man. Ed. Williams & Wilkins. London. pp. 520-577
- Zetterberg, G., L. Busk, R. Elovson, I. Stareo-Nordenhammar y H. Rytman. 1977. The influence of pH on the effect of 2,4-D on *S.cerevisiae* and *S.typhimurium*. *Mutat. Res.* 42: 3-18
- Zuleta, M. y A. Garcoés. 1983. Efecto mutagénico de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DP y 3-AT en *S.typhimurium*. Trabajo de grado. Univ. de Antioquia (sin publicar)