

**EFFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL FURADAN EN
MERISTEMOS RADICULARES DE *Allium cepa***

MARIA ANDREA CANDELA SOLANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
AREA DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA
POPAYÁN
2005**

**EFFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL FURADAN EN
MERISTEMOS RADICULARES DE *Allium cepa***

MARIA ANDREA CANDELA SOLANO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bióloga**

**Director
Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL VARONA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ÁREA DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA
POPAYÁN
2005**

Nota de aceptación

DIRECTOR _____
Silvio Marino Carvajal Varona. Mg.

JURADO _____
Edna Lourdes Orozco Calambas

JURADO _____
Nelson Rojas Martinez. Mg.

Fecha de sustentación: 5, de septiembre de 2.005

AGRADECIMIENTOS

Elevo mi gratitud al Creador por darme licencia en todas mis acciones.

Sentidos agradecimientos a mis padres, ANA SONY SOLANO DE C. Y ALFONSO Ma. CANDELA L. por ser mi primera guía, apoyo, compañía y por solventar mis estudios.

De manera muy especial a mi compañero incondicional, GUSTAVO A. CASAS y a mi hijo, DANIEL ESTEBAN CASAS CANDELA que es la razón de todo lo que hago.

Todos mis sentimientos de gratitud, para el Mg. SILVIO CARVAJAL, mi director y asesor, educador y buen amigo.

A LUZ ESTELLA HOYOS, gran educadora, amiga, investigadora, e impulsadora de nuevos talentos.

A PATRICIA MOSQUERA, de la unidad de microscopía de la Universidad del Cauca, por su amistad y especial colaboración para la toma de microfotografías.

A todos los compañeros, que en alguna forma me apoyaron para llevar a buen termino mi proyecto.

A la Unidad de Genética citogenética y toxicología, por todas las nociones recibidas, sus instalaciones y su calor humano.

Gracias, a la Universidad del Cauca, a la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, y a toda la plana de educadores que me asistieron inicialmente.

DEDICATORIA

A Dios todas mis satisfacciones.

Dedico estos esfuerzos con todo mi amor y ternura a mi hijo DANIEL ESTEBAN CASAS CANDELA: que es ahora el motorcito de mi vida, quien con su existencia me fortalece y me anima a lograrlo todo.

Este trabajo también va dedicado a todas las personas que me han colaborado y me han acompañado para que todo me salga bien.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS.	14
2. ANTECEDENTES	16
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL.	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
5. MARCO TEÓRICO.	22
5.1. LOS PLAGUICIDAS.	22
5.2 LOS CARBAMATOS.	24
5.3 FURADAN.	25
5.3.1 Identificación del material.	25
5.3.2 Información toxicológica.	27
5.3.2.1 Toxicidad.	29
5.3.3 Modo de acción.	29
5.4 SISTEMA BIOLÓGICO.	30
5.4.1 ÍNDICE MITÓTICO.	32
5.4.2 ÍNDICE DE FASE.	33
5.4.3 CICLO CELULAR.	33
6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	35
6.1 PROTOCOLOS.	35
6.1.1 Duración del ciclo celular.	35
6.1.2 Toxicidad del FURADAN.	36
6.1.3 Citotoxicidad y genotoxicidad del FURADAN.	37
6.1.4 Preparación, fijación y tinción de merist. Radicula. de <i>A. cepa</i> .	38
6.1.5 Determinación de dosis para evaluación de daño genotóxico	39
7. RESULTADOS	40
7.1 DURACIÓN DEL CICLO CELULAR	40
7.2 TOXICIDAD DEL FURADAN	41
7.3 EFECTO CITOTÓXICO DEL FURADAN	46
7.4 ANÁLISIS DE ÍNDICE DE FASES	49
7.5 GENOTÓXICIDAD DEL FURADAN	54
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	62
10. IMPACTO	64
11. RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Investigaciones en <i>Allium cepa</i> , para evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico de algunos plaguicidas.	18
Tabla 2. Algunos estudios realizados para identificar el efecto del Furadan	19
Tabla 3. Modelo para registro de datos de genotoxicidad en laboratorio.	37
Tabla 4. Modelo para registro de datos de AC/ fases visualizadas.	38
Tabla 5. Variables para efecto tóxico.	41
Tabla 6. Toxicidad identificada por disminución del crecimiento radicul.	41
Tabla 7. Prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov para Toxicidad.	42
Tabla 8. Variables utilizadas para analizar el efecto citotóxico.	46
Tabla 9. IM de cél. meristemáticas de <i>Allium cepa</i> .	47
Tabla 10. Análisis correlación de Spermean para asociar variables.	48
Tabla 11. IF de células mitóticas radiculares de <i>Allium cepa</i> .	51
Tabla 12. Variables para análisis de genotoxicidad.	54
Tabla 13. Frecuencia de AC por cuatro concentraciones de Furadan.	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Células bifásicas por tratamiento con cafeína (0.1%). 40X.	41
Figura 2. Longitud radicular, dos días después del tratamiento .	42
Figura 3. Longitud radicular, cuatro días después de la siembra.	43
Figura 4. Longitud radicular, seis días después del tratamiento.	43
Figura 5. Longitud radicular, ocho días después del tratamiento.	44
Figura 6. Comportamiento radicular de <i>Allium cepa</i> al cabo de diez días experimentales.	44
Figura 7. Microfotografía de un extendido celular de meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> , teñidas con Orceína acética. 40X.	46
Figura 8. Relación entre IM y concentración del Furadan.	48
Figura 9. Asociación entre la concentración del Furadan y la duración del tratamiento.	49
Figura 10. Comportamiento del IM vs. Concentración del Furadan con respecto al tiempo experimental.	50
Figura 11. Panorámica celular de <i>Allium cepa</i> , bajo microscopio óptico 40X. Teñidas con técnica Orceína acética.	50
Figura 12. Análisis de asociación entre Índice de fases y concentración del Furadan.	52
Figura 13. Análisis de asociación entre los Índice de Fases y el tiempo de tratamiento con Furadan.	53
Figura 14. Frecuencia de ACV durante el tiempo experimental.	56
Figura 15. Puente cromatínico observado en una telofase. 40X.	56
Figura 16. Cromosoma resagado en anafase.	57

- Figura 17.** Fragmento de un cromosoma resagado, en telofase. 40X. 57
- Figura 18.** Micronúcleos visibles en interfase. 40X. 58
- Figura 19.** Cromosoma resagado, observado en una profase tardía. 40X . 58

RESUMEN

El Furadan, está catalogado en la categoría I – altamente tóxico. Es uno de los carbamatos de uso sistémico más utilizado para control de nemátodos e insectos, se puede encontrar en el mercado bajo otros nombres ocultando el verdadero principio activo del carbofuran y/o sus metabolitos, poniéndolo al servicio de los consumidores. En Colombia no se han reportado estudios acerca del Furadan y sus efectos; sin embargo, los estudios en otros países han comprobado que este plaguicida es un inhibidor de la colinesterasa en los seres vivos y un gran contaminante de aguas.

Para evaluar el plaguicida se implementó un modelo clásico experimental *in vivo* para analizar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico sobre meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*), trabajando bajo un tipo de estudio de bloques aleatorizados, se colocaron a germinar los bulbos en siete tratamientos de Furadan disuelto en agua de corriente, así: [0.976 - 1.953 - 3.906 -7.812 -15.625 - 31.250 - 62.500 g/L] y un control negativo utilizando agua corriente (0.0 g/L) se evaluó la toxicidad midiendo la longitud de las raíces encontrando que a mayor concentración menor crecimiento radicular; De acuerdo con el análisis de datos bajo el programa SPSS, se encontraron las dosis que reducían el crecimiento en forma baja, media y alta y se evaluó el efecto citotóxico con estas concentraciones de Furadan [1.953 - 11.00 – 31.25 g/L] y el control negativo [0.0], hallando que el plaguicida tiene efecto citotóxico para las células de los meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*), expresada como un bloqueo premitótico (disminución del IM), a medida que aumentaba la concentración de la sustancia, la evaluación de índice de fases sugirió que el Furadan actuaba influyendo sobre todo el ciclo mitótico y deprimiéndolo completamente sin dejar células estancadas en alguna de las fases, y por último, se encontraron aberraciones cromosómicas (AC), (puentes citoplasmáticos y cromatínicos, cromosomas resagados, entre otros) en los meristemas sometidos a los tratamientos con el plaguicida encontrando sin duda el efecto genotóxico de este pesticida.

INTRODUCCION

La agricultura moderna no se concibe actualmente sin el uso de los plaguicidas, sin embargo, la gran mayoría de sus componentes químicos tienen efectos colaterales indeseables. Actualmente, son muchas las personas expuestas a ellos y generalmente no usan la adecuada protección para el manejo de los diferentes productos. Por esta razón, crece la necesidad de implementar técnicas que aporten al conocimiento de la acción, acumulación y posibles efectos nocivos en los humanos, causados por los plaguicidas. En Colombia, no existen suficientes estudios acerca de los daños producidos por los plaguicidas que se venden sin mayor restricción para fumigar cultivos. El manejo lo realizan generalmente por personas de escasos recursos que no tienen acceso a seguridad social y ni siquiera a revisiones periódicas de su estado de salud, esta situación podría ocasionar que los posibles efectos nocivos de los plaguicidas pasen desapercibidos en la población expuesta y afecten generaciones futuras.

Los carbamatos son insecticidas ampliamente utilizados en la industria de la agricultura (Mahgoub, A.A,2001; El-Medany, A.H, 2001). En este estudio, se evaluó el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del insecticida Furadan en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa*), determinando la capacidad de este plaguicida para interactuar y alterar el material genético de *Allium cepa*. Es probable que este estudio *in vivo* pueda asociarse con el posible efecto en otros organismos e inclusive extrapolar los resultados a humanos.

El Furadan es uno de los plaguicidas carbamatos más ampliamente usados en el mundo para el control de insectos y nemátodos (Ion, JY; et al, 2001). Según su toxicidad pertenece a la categoría I, se trata de un insecticida – nematicida N – metil sistémico (Baligar, PN; Kaliwal BB, 2002). La presentación de este producto puede ser sólida (granulada o en polvo) y líquida; en la primera forma es absorbido por las raíces y, por su acción sistémica, controla las plagas del follaje; en la segunda forma es sistémico de contacto e ingestión cuando es aplicado al follaje (Inquiport, 2000). El Furadan pertenece al grupo de los carbamatos, utilizado para el control de invasión por insectos en diferentes cultivos y comúnmente implementado en plantaciones de papa, al norte del departamento del Cauca, en zonas como Totoró y Paletará, sectores de amplia producción agrícola de este producto, en donde es utilizada, además, una variedad de plaguicidas (IBID, 2000).

La prueba de aberraciones cromosómicas, biomarcador de efecto reconocido y validado mundialmente, permite analizar las alteraciones en el ADN, inducidas por exposición a diferentes mutágenos (Aitio, 1999). Esta técnica citogenética

detecta quiebres y otros rearrreglos, que permiten predecir el potencial riesgo a la salud por exposición ocupacional o por estilo de vida (Au, 1991). La prueba de aberraciones cromosómicas ha sido uno de los biomarcadores empleado extensivamente en el monitoreo de poblaciones; además, se ha asociado al cáncer y otras alteraciones de la salud (IBID, 1996). La sensibilidad hace que esta prueba sea significativa en el estudio de efectos a dosis bajas y posibilite datos más acertados. Las aberraciones cromosómicas serán utilizadas en este estudio para evaluar el efecto que causa el insecticida – nematicida **Furadan**, en *Allium sepa*.

El sistema biológico escogido para el estudio resulta ser un material citogenético apropiado y sensible para la detección de contaminantes medioambientales, y lo han utilizado varios autores desde hace 25 años en diversos estudios (Ma, TH; et al, 1995), facilitando los análisis por medio de diversos biomarcadores aplicables al sistema.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

El uso extensivo de los plaguicidas en el sector agrario ha sido un problema de gran magnitud (Mahgoub, 2001), pues cada vez, nuevos y más poderosos productos de esta clase son manufacturados para satisfacer la necesidad de una amplia economía agraria que tiene que cubrir el consumo de toda la población (Niño, 2000); el verdadero peligro y los efectos secundarios de su uso, son la mayoría de veces pasados por alto con tal de contribuir a la economía de un país. En Colombia se introduce una gran cantidad de productos químicos y plaguicidas sin que antes sean sometidos a un control exhaustivo sobre sus efectos colaterales, llegando fácilmente a manos de los usuarios a través de las casas comerciales.

En el departamento del Cauca un amplio sector se dedica a la agricultura y el uso de los plaguicidas se incrementa, como “protección” para los sembrados (<http://gobant.gov.co>, 2004). Las personas que realizan las labores de fumigación rara vez, por no decir que nunca, se acondicionan adecuadamente para protegerse de los químicos, esta falta de protección, sumada al bajo nivel de escolaridad, hacen que las personas no tomen las precauciones necesarias y suficientes al hacer uso de los plaguicidas.

Se han realizado una gran cantidad de investigaciones *in vivo* e *in situ* sobre el efecto de sustancias dañinas como plaguicidas, insecticidas, funguicidas, entre otros, en diferentes sistemas biológicos y en personas expuestas (Ralph y Petras 1998), revelando que estos productos no son tan inofensivos y que, en cambio, se deben tomar todas las precauciones en su manejo.

El **Furadan** es uno de los insecticidas más usados por los productores de papa del Departamento del Cauca (Anuario Estadístico del Sector Agropecuario, 2003), a pesar de ser un plaguicida altamente tóxico. Se han realizado estudios que reportan datos acerca de su toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad, utilizando para ello bacterias, peces, ratones, ratas, conejos y humanos (Mahgoub, AA, 2001; Ruangyuttikarn, W, 2001; Wei Shen Yan Jiu, 2003; Baligar, 2002; *et al*). Sin embargo, estos informes de toxicidad que reporta la literatura, ni siquiera son nacionales, son datos de estudios que se han hecho en los Estados Unidos donde fue utilizado inicialmente, en el que aparece este plaguicida clasificado en la categoría I (los más tóxicos) (<http://pmep.cce.cornell.edu>, 2003); no obstante, este plaguicida ha sido introducido en Colombia sin mayor inconveniente. Los expendedores conocen la peligrosidad del producto, aún así, es vendido libremente y, lo más importante, sin advertirle al campesino consumidor de los perjuicios y/o riesgos potenciales a su salud y al ambiente.

En ninguna de las casas comerciales del municipio de Popayán, ofrecen propaganda a usuarios de este producto, ni presentan la ficha técnica respectiva al

cliente. Se desconocen los efectos en la salud a largo plazo por exposición continua, y la habilidad de éste para alterar el ADN (<http://pubmed>). El análisis del estudio sobre *Allium cepa*, puede hacer extrapolables los resultados a humanos, si *A. cepa* resulta alterado por la acción del plaguicida, es factible que cause daños similares en el ADN humano, y esto permita que en estudios posteriores afines, se implementen políticas de prevención acerca del uso adecuado de este producto.

El verdadero problema es que este plaguicida muy probablemente, seguirá usándose en la fumigación de los cultivos, por eso es necesario hacer un análisis de los efectos del Furadan que permitan resolver los siguientes interrogantes:

¿El Furadan tiene efecto tóxico, alterando el crecimiento radicular de *Allium cepa*, en cultivos controlados?

¿El Furadan es capaz de ocasionar citotóxicidad sobre los meristemas radiculares de la cebolla (*Allium cepa*) provocando alteraciones en su ciclo celular, u originar desordenes a nivel de las fases del ciclo celular?

¿Este plaguicida tiene efecto genotóxico para las células mitóticas de *Allium cepa*, dando lugar a aberraciones cromosómicas (AC)?.

2. ANTECEDENTES

Se han realizado estudios sobre *A. cepa* para obtener información acerca de las implicaciones que tiene la exposición y el efecto de diversos químicos que hacen parte de los plaguicidas (Clayton & Lloyd, 1984; Ma, et al., 1995; Rank, 1997; Ateeq, et al., 2002).

Precisamente, este sistema biológico fue escogido para el estudio, ya que resulta ser un apropiado y sensible material citogenético para la detección de contaminantes medioambientales (Ateeq, B, 2002) y ha sido utilizado por varios autores desde hace 25 años (Ma, TH; et al, 1995), facilitando los análisis por medio de diversos biomarcadores aplicables al sistema.

Allium cepa ha sido empleada también en pruebas de micronúcleos (MN), como un primer sistema de alarma de contaminación por mutágenos de aguas dulces, con resultados analíticos mostrando un amplio espectro de daños mutagénicos ocasionados por químicos con relación dosis – efecto (Degrassi & Rizzoni, 1981).

Por poseer cromosomas grandes y en pequeño número ($2n= 16$) (Stevenson, M, 2001), y por el fácil crecimiento de las raíces bajo las condiciones proporcionadas en el laboratorio, ha resultado ser un buen y confiable material de estudio (Somashekar, 1983); además, ésta planta, importante en términos de agricultura, también es relevante a nivel investigativo donde su genoma ha sido estudiado extensivamente y planteado como un análisis citogenético convencional para análisis moleculares (Suzuki, G, et al,2001).

Diferentes estudios han validado el uso de *Allium cepa* y otras variedades de esta planta con el fin de obtener modelos que permitan analizar la toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad de sustancias hipotéticamente dañinas (Chauhan, LK, et al, 2001). Los estudios muestran que con cebolleta (*A. cepa*), se pueden utilizar diferentes biomarcadores para identificar la habilidad del compuesto para inducir daños en el genoma (Evseeva TI, 2001). Entre los biomarcadores usados, están: Aberraciones cromosómicas (AC) (Grant, WF, 2001; Ma, TH, 1995, Ateeq, B, 2002, Rank, J, 1997) Intercambio de cromátides hermanas (ICH's) (Cortes, F, 1987) y micronúcleos (MN), además, es posible analizar disturbios ocasionados en el ciclo celular como clastogenicidad, aneugenicidad, daños a nivel de citocinesis, efectos c-mitóticos, (Dovgaliuk, AI, 2001), mediciones y análisis en índice mitótico (de Lima, DS, 2001), reparación de ADN, índices de replicación y puntos de control en el ciclo celular de meristemas radiculares (Pelayo, HR, 2001).

En cuanto al Furadan, se encuentra una amplia gama de información acerca de su composición, toxicología, manejo, cultivos donde ha sido aplicado e inclusive su restricción y requerimientos regulatorios por las directivas de Estados Unidos (OSHA, EPA, 2002).

Este plaguicida ha sido evaluado en diferentes sistemas biológicos (Ver Tabla 2), obteniendo casi en su mayoría resultados positivos que hacen alusión a su capacidad de inducir daños a nivel genómico-celular (Wei Shen; Yan Jiu, 2003; Baligar, PN, 2002; Ion JY; *et al*, 2001); pero en ninguno de los casos se han encontrado reportes que den indicios acerca de trabajos realizados con este componente sobre cebolla (*allium cepa*), y tampoco estudios a nivel nacional investigando este producto.

A continuación, (Ver Tabla 1) se presentan algunos trabajos realizados en *A. cepa* para la evaluación de plaguicidas. Diferentes investigadores han dedicado sus esfuerzos en realizar estudios sobre este sistema biológico por las facilidades y confiabilidad ya mencionadas.

Tabla 1. Investigaciones realizadas en *Allium cepa*, para evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico de algunos plaguicidas.

QUÍMICO	SISTEMA BIOLÓGICO	BIOMARCADOR	AUTOR
Butaclor	<i>Allium cepa</i>	^a AC	Ateeq et al., 2002
CIPC	<i>Allium cepa</i>	Plano de división Geometría del huso ^b IM	Clayton & Lloyd, 1984
Captan	<i>E. coli</i>	Test de Ames	Saxena S, et al, 1997
Etil- metanosulfonato	Vicia faba <i>Allium cepa</i>	^c MN AC	Degrassi & Rizzoni, 1981 Rank; Nielsen, 1997
Griseofulvin	<i>Allium cepa</i>	Plano de división Geometría del huso IM	Clayton; Lloyd, 1984
Hidrácido maleico	Vicia faba <i>Allium cepa</i>	MN AC	Ma et al., 1995 Rank & Nielsen, 1997
Metil-N- nitrosourea	<i>Allium cepa</i>	AC	Rank & Nielsen, 1997
Paraquat	<i>Allium cepa</i> Vicia faba Ratones, ratas Conejos Humanos	Mutagenicidad AC Neutrotóxicidad ^d DL50 – ^e CL50 Malformación en pulmones Exposición dérmica y respiratoria Residuos en orina	Swan, 1969 Staiff et al., 1975 Howard, 1980 Chester & Wollen, 1981 Chester et al., 1993 Senanayake et al, 1993 Salam et al., 1993 Weinbaum et al., 1995
Pentaclorofenol	<i>Allium cepa</i>	AC	Ateeq et al., 2002

Elaboró: Andrea Candela

- a. AC: Aberraciones cromosómicas.
- b. IM: Índice Mitótico
- c. MN: Micronúcleos
- d. DL50: Dosis letal media
- e. CL50: Concentración letal media.

Tabla 2. Algunos estudios realizados para identificar el efecto del **Furadan**.

Sistema biológico	Biomarcador	Autor
Células CHL	Inhibición ciclo celular, Test Ames y Apoptosis.	Ion JY, et al, 2001
Conejos: Toxi y citotoxi.	Espermatogénesis	Yousef MI et al, 1995
<i>Channa punctatus</i>	Desarrollo gonadal. Anormalidades de complejo hipotálamo-neurohipófisis. Índice gonadosómico.	Ram RN et al., 2001
<i>E. coli</i> k – 12: Genotoxicidad Mutagenicidad	Test de Ames. Habilidad para alterar DNA. Reparación de daños. Genes SOS.	Saxena S, Ashok BT, Musarrat J, 1997
Humanos: sangre y Contenidos gástricos	Concentración metabolitos.	Ameno K et al, 2001
Humanos: Estudio epidemiológico	Uso de carbamatos asociado con riesgo de Non-Hodgkinlinfoma (NHL).	Zheng T, et al 2001
Pez oro (<i>Carassius auratus</i>)	Alteración de metabolitos. Efecto neurotóxico. Actividad colinesterasa Pulmón – músculo.	Bretau S et al, 2002 IBID, 2000
Pez (<i>Clarias batrachus</i>)	Lípidos totales. Ácidos grasos libres.	Begum G, Vijayaraghavan S, 2001
Cichlasoma dimerus (pez)	Toxicidad, histopatología, alteración en branquias	Domitrovic H. A, 2000
Ratones: Médula osea Esperma	DL 50 oral. AC – MN. Anormalidad en esperma.	Chauhan et al, 2000
Ratones: Toxicidad Citotoxicidad	Células de hibridoma linea 1E6 en cultivo con (RPMI – SR3): Crecimiento en el medio.	Bertheussen K, Yousef MI, Figenschau Y, 1997
Ratones hembra	Ciclo estrógeno, alteración y cambios en órganos	Baligar PN; KaliwalBB, 2002
Ratones macho	Alteración cel T y macrofag.	Jeon, et al, 2001
Ratas: Pulmón	Metabolitos. Acción oxidativa.	Gupta RC, Milatovic D, Dettbarn WD, 2001
Ratas: Toxicidad	Toxicidad reproductiva. Anormalidades en células germinales.	Dept. Toxicol, 20003

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el **Furadan**, en Estados Unidos, es considerado como uno de los plaguicidas más tóxicos y prohibida su comercialización, es uno de los plaguicidas de mayor utilidad sobre el cultivo de la papa y otros en el departamento del Cauca y no se han realizado estudios acerca de los efectos colaterales causados por este químico en las regiones donde es utilizado.

En este estudio se evaluó el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del **Furadan**, que se usa para controlar la invasión de insectos en cultivos de diversas plantas como arroz, tomate, tabaco, papa, plátano y café, entre otros (<http://pmep.cce.cornell.edu.co>), y, aunque los cultivadores siguen un procedimiento para aplicarlo, generalmente no toman las medidas de seguridad necesarias y suficientes para su utilización.

Este estudio es relevante porque permite conocer el posible daño genotóxico que el plaguicida causa en *A. cepa*, como soporte científico para adelantar programas de prevención en salud ocupacional, o para planear investigación en estos sistemas biológicos.

El estudio se realizó en bulbos de cebolla (*Allium cepa*), debido a que esta prueba “*in vivo*” proporciona grandes ventajas por su facilidad de manejo en laboratorios con presupuestos para investigación relativamente bajos; las condiciones de esterilidad que se requieren en el uso de estos es mínima, el riesgo de contaminación es muy bajo y, además, porque la técnica es relevante y rápida. (Ateeq, B; et al 2002) (Chauhan, LK; et al, 2001).

Los bulbos tienen otras ventajas, pues su consecución en el mercado es de gran facilidad, sus condiciones de manejo en el laboratorio son sencillas y no requiere gran costo, inclusive se pueden conseguir durante todo el año sin problema, son apropiadas ya que es posible adquirirlas más o menos del mismo tamaño y casi el mismo peso de manera que se minimicen los errores experimentales.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del insecticida - nematicida **FURADAN**, en meristemas radiculares de *Allium cepa*, con el propósito de extrapolar resultados a los humanos, quienes están ocupacionalmente expuestos al plaguicida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ◆ Evaluar el efecto tóxico del plaguicida en *A. cepa*, identificando la inhibición del crecimiento de raíces y de otras alteraciones tales como: presencia de tumores, consistencia, color, entre otros.
- ◆ Evaluar el efecto citotóxico del plaguicida para las células meristemáticas de raíces de *A. cepa*, analizando el índice mitótico y el índice de fase.
- ◆ Estimar el efecto genotóxico del plaguicida, a través del examen de células en los meristemas radiculares de *A. cepa*, observando cambios microscópicos que se presenten, como frecuencia de micronúcleos en interfases, puentes citoplasmáticos en profases, quiebres y cromosomas resagados en metafases y anafases y puentes cromatínicos en telofases.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 LOS PLAGUICIDAS

Los xenobióticos, sustancias extrañas a los organismos, son principalmente introducidas por la actividad humana y su uso se ha incrementado en las últimas décadas de forma considerable. En el último siglo se han desarrollado muchos compuestos orgánicos y sintéticos que han conducido a una gran producción de compuestos químicos que finalmente van al ambiente, ya sea intencionadamente o por accidente. Un ejemplo de este tipo de sustancias son los plaguicidas los cuales son ampliamente utilizados. Según los investigadores Brock y Madigan (1991), se han comercializado más de un millar de plaguicidas en las últimas dos décadas, con fines de control químico para plagas. Se calcula que actualmente se usan más de 3500 plaguicidas orgánicos, de los cuales son destinados alrededor de 500 a las actividades de agricultura (<http://www.sagan-gea.org>, 2005).

Un plaguicida se define como una sustancia o mezcla de sustancias, cuya finalidad es la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades y, en general, tienen el objetivo de proteger al hombre y/o a los organismos de un ambiente poco propicio para su “buen desarrollo” (Estrada, 1998, Robledo, 1998 y Ortiz-Hernández, et al., 1997).

Esta definición incluye los materiales agrícolas de consumo, madera y sus derivados, forraje para animales o productos que puedan administrárseles para el control de insectos, arácnidos y/o diferentes plagas corporales (Código internacional de conducta sobre la distribución y uso de plaguicidas, 1986. citado por Estrada, 1998).

La historia de los plaguicidas se puede resumir y dividir en tres grandes etapas: la primera, a principios del siglo XIX, cuando se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas (sustancias obtenidas de los pétalos del crisantemo -*Chrysanthemum cinerariifolium*-) y fósforo; así mismo, se inició el uso de los derivados del petróleo. La segunda etapa, en 1922, cuando se emplearon diferentes aceites insecticidas y poco más tarde, los primeros productos sintéticos. La tercera etapa, en la que Müller en 1940, descubre las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano, mejor conocido como DDT (IBID 1998). A partir de esa fecha, ese nuevo compuesto se utilizó para la eliminación de algunos parásitos como el piojo que transmitían enfermedades como el tifo; es así como se origina la industria de los plaguicidas organosintéticos.

Desde entonces se han producido venenos potentes contra las diferentes plagas, básicamente de cuatro tipos:

Organoclorados, cuya principal característica es que poseen átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones, oxígeno; son muy estables en el ambiente (Cremllym, 1979).

Esto ha llevado al desarrollo de otros plaguicidas "menos tóxicos" como son **carbamatos** (Estructura química basada en un alcaloide de la planta *Physostigma venenosum*) con una persistencia intermedia entre los organoclorados y organofosfatos. Esta clase de pesticidas actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa en forma reversible (Zinkl, et al, 1987; Boequene, et al, 1995).

Los componentes **organofosforados**, que se empezaron a sintetizar en 1948, son derivados del ácido fosfórico, poseen un átomo central de fósforo en la molécula. Son los más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación con los organoclorados (Cremllyn,1979). Esta clase de compuestos, al igual que los carbamatos, afectan principalmente el sistema nervioso central, pero en este caso actúan inhibiendo la colinesterasa en forma irreversible. Los nuevos compuestos desarrollados han reemplazado gradualmente a la mayoría de los plaguicidas clorados. En el presente los carbamatos y organofosfatos son los ingredientes activos de la mayoría de los insecticidas y algunos de los herbicidas en uso (Chapalamadugu y Chaudhry, 1992).

Respecto a los tres grupos de plaguicidas mencionados, puede establecerse que su grado de toxicidad, sigue el orden:

Organofosforados > Organoclorados > Carbamatos (<http://www.mtas.es.htm>)

Los **Piretroides**, son sustancias químicas manufacturadas, de estructura muy parecida a las piretrinas, aunque son generalmente más tóxicos para los insectos y también para mamíferos; éstos permanecen por más tiempo en el ambiente que las piretrinas (compuestos naturales con propiedades insecticidas, se encuentran en el extracto de piretro de ciertas flores de crisantemos (<http://www.atsdr.cdc.gov>, 2004).

Por lo general, los plaguicidas terminan en manos de las personas menos informadas, más pobres o menos capaces de protegerse. Estas sustancias químicas están contaminando los suelos, las aguas subterráneas, el agua de riego y la potable. Así mismo, estos componentes producen susceptibilidad a la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad y este hecho ha levantado un interés público por la salud (Grant WF y Owens ET, 2001).

El problema de la contaminación por plaguicidas es cada vez más grave tanto

por, la cantidad y diversidad, como por la resistencia a ellos que adquieren algunas especies, lo que ocasiona que se requiera cada vez mayor cantidad del plaguicida para obtener el efecto deseado en las plagas. Sin embargo, la flora y fauna nativas se afecta cada vez más, destruyendo la diversidad natural de las regiones en que se usan, además, pueden ser introducidos al hombre mediante el consumo de plantas y animales que consume como alimento.

Algunos plaguicidas son cancerígenos, pero todos causan lesiones degenerativas en hígado y riñón, son estimulantes del sistema nervioso central y provocan reacciones alérgicas como vómito, dolor de cabeza, conjuntivitis, diarrea, calambres abdominales, dificultad para respirar, entre otros (Ortega, et al., 1994; Secretaria de Salubridad y Asistencia, 1974).

Los plaguicidas representan un instrumento imprescindible en la agricultura de todo el mundo para el control de plagas, por lo que no resulta una tarea sencilla el prohibir su uso, por lo que se debe pensar en alternativas para detener, aminorar o remediar la grave contaminación producida por estos productos. Algunas opciones viables podrían ser: **La biorremediación**, (desintegración de componentes orgánicos y/o desechos tóxicos por medio de microorganismos, para convertirlos en componentes más sencillos y mucho menos dañinos al ambiente) **la implementación de plaguicidas biológicos** (Virus, microorganismos o productos derivados de su metabolismo. Bacterias como *Bacillus thuringensis*, y hongos. Así mismo, productos derivados directamente de vegetales, que no se sintetizan químicamente como lo son: la estricnina, nicotina, piretrinas, rotenona, ajo, entre otros) **y la educación sobre el uso adecuado de los plaguicidas** (se refiere a acciones directas sobre la comunidad dedicada a la agricultura, significa hacer conciencia sobre el mejor aprovechamiento de los plaguicidas para una mejor eficiencia sin el desperdicio por diferentes factores) (Rodríguez L, 2000; Mahgoub AA, 2001).

5.2 LOS CARBAMATOS

El grupo de los carbamatos corresponde en su mayor parte a derivados del ácido N-metil - carbámico; son de fácil acción sistémica, su forma de acción es similar a los organofosforados, su persistencia en el ambiente y su toxicidad es intermedia entre los organoclorados y los organofosforados (Domitrovic, H. A.; 2000), con excepción del Aldicarb (Temik) y Carbofurán (Furadan) que son de toxicidad alta.

De acuerdo a su composición, sus derivados pueden tener propiedades insecticidas, fungicidas o herbicidas.

Ingresan a los mamíferos a través de la piel, conjuntiva, vía respiratoria y vía digestiva. Los carbamatos son inhibidores activos de la acetil colinesterasa pero esta inhibición es transitoria, de algunas horas solamente. No se ha demostrado aún neurotoxicidad retardada hasta el presente con ningún carbamato.

Metil Carbamatos de Acción Insecticida: Lannante, Carbofurán

Carbamatos de Acción Fungicida: Benomyl, Carbendazim

Ditiocarbamatos de Acción Fungicida: Mancozeb, Tirad

Tiocarbamatos de Acción Herbicida: Molinate, Sutan 6.7 E. Fenil

Carbamato de Acción Herbicida: Betanal CE

(<http://www.rap-al.com/Toxicidad.html>)

5.3 FURADAN

Es un insecticida-nematicida sistémico y acaricida utilizado en las prácticas de agricultura en muchas partes del mundo.(Yoon JY; et al, 2001). Es una suspensión concentrada que puede aplicarse foliarmente, con acción residual y de contacto, o aplicarse al suelo con acción sistémica ya que es absorbido por las raíces y transportado a toda la planta. Una gran variedad de plagas es controlada con ambos tratamientos. En el cultivo de la papa, que se realiza en el Departamento del Cauca, en el municipio de Totoró, se aplica principalmente contra el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*).

5.3.1 Identificación del material

Nombre común: Carbofuran – Furadan.

Categoría Toxicológica: I. Altamente tóxico.

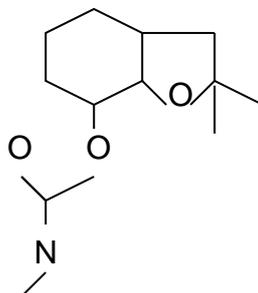
Tipo de producto: Insecticida - nematicida

Principio activo: Carbofuran.

Nombre químico: 2,3 dihidro-2,2-dimetil-7 benzofuranilmetil carbamato.

Formula química: $C_{12}H_{15}NO_3$.

Fórmula estructural:



Familia química: Carbamato (C)

Formulación: Puede ser en suspensión, pasta fluida o sólido.

Apariencia: Gránulos púrpura.

Estado: Sólido o fluido.

Olor: Ligeramente fenólico.

Densidad: 1,39 g/mL.

Peso molecular: 221,26 (carbofuran).

Peso por volúmen: 85 –89 lb/pie³. (1390 g/L).

Incompatibilidades: No es compatible con productos de naturaleza alcalina. Presenta incompatibilidad con productos a base de propanil, no se debe mezclar con fertilizantes de reacción alcalina como cal agrícola y otros similares.

Descomposición: La descomposición del producto origina óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y metil isocianato.

Polimerización peligrosa: No ocurre.

Vida media: 50 días.

Almacenamiento: En lugar fresco y seco evitando excesivo calor y fuego.

Solubilidad: En agua 700ppm, otras solubilidades incluyen: 30% en N-Metil-2pirrilidona, 25% en dimetil sulfóxido, 15% en acetona, 14% en acetonitrilo, 12% en cloruro de metileno, 9% en ciclohexanona y 4% en benceno.

Otras características: Es ligeramente combustible. Puede mantenerse en combustión a temperaturas elevadas, se degrada a temperaturas por encima de 130°C (266°F). Su descomposición térmica y quemado puede formar productos tóxicos.

En condiciones de incremento de temperatura y humedad puede ayudar a que el producto se absorba y, además, incrementar su toxicidad.

Antídoto: Sulfato de Atropina.

(<http://www.pmep.cce.cornell.edu.co>, 2003)

5.3.2. Información toxicológica del Furadan:

5.3.2.1.Toxicidad:

El carbofuran es un plaguicida que produce inhibición reversible de la colinesterasa, penetra al organismo por ingestión o a través de la absorción por la piel.

Los síntomas de sobre exposición en humanos incluyen dolores de cabeza, mareos, debilidad, calambres abdominales, náuseas, salivación excesiva, transpiración, visión borrosa, lagrimación, pupilas contraídas, tensión en el pecho, piel azulada (cianosis), convulsiones, temblor, inconsciencia y en algunos casos conlleva al coma.

La excesiva exposición a los polvos de este compuesto pueden irritar el sistema respiratorio, la piel y los ojos.

Es moderadamente tóxico para peces y organismos acuáticos. Se debe almacenar lejos de drenajes y cursos de agua (Post, 1987).

FURADAN 3F. - Categoría 1b: Altamente peligroso

DL50 oral (ratas): 53 mg/kg

FURADAN 4F. - Categoría 1b: Altamente peligroso

DL50 oral (ratas): 38 mg/kg /font

DL50 dermal (ratas): 6.800 mg/kg

(<http://www.ecuaquimica.com.ec/guias/agro/furadan.htm>).

Estudios sobre carbofuran también reportan los siguientes datos:

Toxicidad oral aguda:

Dosis oral aguda en ratas:	DL50 → 3.8 - 167 mg/Kg.
Ratón:	DL50 → 14.4 mg/Kg.
Gato:	CL50 → 2.5 – 3.5 mg/Kg.
Perro:	DL50: → 15 – 18.9 mg/Kg.
Aves:	DL50 → 90 – 500 mg/Kg.
Invertebrados:	CL50 → 9.8 – 38.6 ppb.
Peces de agua dulce:	CL50 → 94 – 2859 ppb.
Toxicidad dietaria subaguda en aves:	DL50 → 16 – 1104 ppm.

Toxicidad dermal aguda:

Dosis dermal aguda en conejos:	DL50 → >2000 – 3400 mg/kg.
Dilución en isopropanol:	DL50 → <46.4
Dilución en agua:	DL50 → >10.250

Toxicidad por inhalación aguda (polvos):

Dosis por inhalación aguda en ratas:	CL50 → 1,18 mg/Kg.
Rata 1h DL50 → 0.8 - 0.108 mg/L.	
Rata 4h DL50 → 0.075 – 0.108 mg/L.	
Rata 1h CL50 → 0.026 mg/L.	
Rata 4h CL50 → 0.017 – 0.047 mg/L.	

Para Furadan 3G:

CL50 valorada en (Pez oro aga. azules) → 1.75 mg/L (moderadamente tóxico).

DL50 oral en pájaros grandes → 0.7 – 8 mg/Kg (Altamente tóxico).

(<http://www.knowledgebank.im.org>).

En revisión bibliográfica no se encuentran datos disponibles sobre efectos crónicos de sobre – exposición para Furadan 3G (Gr).

Los estudios disponibles de evaluación de riesgos a la vida salvaje y organismos acuáticos dicen que el carbofuran es caracterizado como muy altamente tóxico para aves y peces de aguas frías y calientes, además, altamente tóxico para invertebrados de aguas dulces. Se requieren estudios de monitoreo para una mejor evaluación de los efectos actuales del carbofuran usado sobre organismos blanco bajo condiciones de campo.

En ensayos de laboratorio con animales, se ha encontrado que el carbofuran no causa toxicidad reproductiva, teratogenicidad o carcinogenicidad; sin embargo, exposiciones crónicas de animales de laboratorio al carbofuran, ha ocasionado disminuciones en la actividad de la enzima colinesterasa (eritrocitos, plasma, cerebro) (<http://www.pnep.cce.cornell.edu.co>).

5.3.3. MODO DE ACCIÓN:

El **FURADAN**, (Insecticida-Nematicida) controla los insectos interfiriendo con el funcionamiento de su sistema nervioso. Inhibe la acción de la enzima acetilcolinesterasa que regula los impulsos nerviosos a los músculos y glándulas. Cuando se inhibe la enzima, los músculos y glándulas del insecto permanecen estimulados y éste no puede relajarse. El insecto continúa en un estado de constante agitación que eventualmente lo mata. Además de su actividad sistémica, **FURADAN** controla los insectos y nemátodos de varias maneras:

- Mata por contacto insectos comedores del follaje y algunos nemátodos que habitan en el suelo.
- Repele algunos nemátodos que habitan en el suelo.
- Envenena por ingestión a los insectos que se alimentan del follaje y de la raíz (Inquiport, 2000)

El plaguicida inhibe la colinesterasa después del contacto con superficies o sólidos y/o ingestión de tejidos de plantas tratadas.

El metabolismo en plantas y animales es similar. El carbofuran es sistémico en plantas y como otros carbamatos, este es metabolizado rápidamente en animales, disminuyendo gradualmente, y al final, sus metabolitos no son tóxicos

Antidoto y tratamiento: Atropina, no usar oximas, como 2 PAM.

(<http://www.ecuaquimica.com.ec/guias/agro/furadan.htm>)

6.4 SISTEMA BIOLÓGICO

Allium cepa, como sistema biológico para evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico, fue desarrollado y mejorado por Levans entre 1938 – 1949. Con el tiempo, la atracción por esta técnica fue aumentando gracias a las ventajas que ofrecía: reducción de costos para investigación, muy baja contaminación, fácil germinación, fácil adquisición de los bulbos durante todo el año y resultados confiables (Somashekar. Op. Cit., p. 13)

Un gran acercamiento fue el descubrimiento del cariotipo de las distintas variedades de cebolla, cuyo pionero fué Mensinkai en 1939; esto facilitó estudios posteriores en cebollas, como por ejemplo, el ensayo de aberraciones cromosómicas después de haber sometido los bulbos a un tratamiento químico, para conocer los efectos clastogénicos y/o mitoclásticos en células de plantas. (Rank & Nielsen, 1997)

La utilización de la técnica de germinación de cebollas para el estudio del efecto citotóxico y genotóxico de diversos químicos, ha sido ampliamente usada por los excelentes resultados obtenidos en este sistema biológico; es una prueba clásica excelente para la lectura de aberraciones cromosómicas después de un tratamiento químico (Grant, WF, 2001). En el Centro de Información Medio ambiental de Mutágenos, en Estados Unidos, se realizó hace algunos años un estudio importante del efecto de 148 químicos en cebollas y los análisis derivados de estos trabajos permitieron concluir que las cebollas son sensibles al sometimiento de diversos químicos, presentando diferentes efectos mitoclásticos y/o clastogénicos. Los datos son confiables en estos trabajos y por ello han sido de gran utilidad para estudios posteriores en

otros sistemas biológicos, se pretende que las pruebas en cebollas puedan incluirse, sin ningún problema, entre las pruebas de evaluación de daños por

químicos, ya que las anomalías cromosómicas e intercambios ocasionados son fácilmente detectables al microscopio.

La técnica utiliza comúnmente cebollas de la especie *Allium cepa*; sin embargo, se han efectuado estudios en otras variedades como *A. Cepa var. Proliferum*, *A. carinatum*, *A. fistulosum* y *A. sativum*. Para observar no sólo efectos clastogénicos (alteraciones a nivel del huso mitótico) sino también, para optimizar técnicas de tinción, evaluar exposición a radiaciones, analizar composición genómica y evaluar efectos de diversos químicos (Peffley & Vries, 1993; Ricoch & Brown, 2001; Vaijapurkar et al., 2001; Marcano et al., 2002).

La función primordial de la raíz es absorber del suelo el agua con las materias que esta lleva en disolución: Sólidas, líquidas o gases.

La absorción de gas se realiza principalmente por medio de la respiración; por otra parte, la absorción de líquidos está a cargo de los pelos radicales; igualmente los sólidos, generalmente sales minerales, se disuelven y penetran en la raíz, mediante los pelos radicales, por un proceso llamado difusión; algunos elementos sólidos son insolubles, de manera que la absorción se dificulta, y por esta razón, es necesario que se realice primero un proceso de dilución, como ocurre en este estudio donde el tratamiento que se aplica necesita diluirse en agua para que pueda ser absorbido por las raíces de los bulbos de cebolla (*A. cepa*) (Peter, HJ. Et al, 2002).

El crecimiento en un organismo es cuidadosamente controlado regulando el ciclo celular. En las plantas, las raíces continúan creciendo mientras buscan agua y nutrientes. Estas regiones de crecimiento sirven para estudiar el ciclo celular porque en cualquier momento se pueden encontrar células atravesando por mitosis, que pueden analizarse para evaluar el efecto de una sustancia en particular.

El proceso de reproducción celular conocido con el nombre de mitosis, puede ser estudiado eligiendo un material constituido por células que se hallen en continua división. Esta condición la reúnen los meristemos terminales o primarios, tales como los que se encuentran en el ápice de las raíces. Un bulbo de cebolla, cuya región radicular se mantenga en contacto con el agua durante 4 ó 5 días, proporciona abundante cantidad de raicillas jóvenes, muy apropiadas para obtener muestras destinadas a observar células en mitosis (Feldman LJ, 1984).

Aunque el corte de la raíz de cebolla captura muchas células en diferentes fases del ciclo celular, se debe tener presente que el ciclo celular es un proceso continuo. Los científicos han dividido el proceso en 5 fases, cada una caracterizada por importantes eventos, pero estas divisiones son arbitrarias.

Para establecer cuanto tarda en cumplirse un ciclo completo de división celular se puede aplicar un alcaloide llamado cafeína, el cual ha sido ampliamente utilizado porque es un inhibidor de la formación de la placa ecuatorial que permite la división celular en células metafásicas de vegetales. Este tratamiento permite que se formen células con más de un núcleo; así, un ciclo entero será fácilmente

reconocido entre una célula mono – telofásica y la primera célula bi – telofásica que aparezca.

También han sido analizados los efectos de la cafeína en post – tratamientos aplicando mutágenos, en donde se ha visto inducción de muerte celular y daños cromosómicos, estas alteraciones fueron descubiertas hace unas tres décadas y los efectos han sido extensivamente estudiados en muchos laboratorios (Kihlman; et al, 1982)

5.4.1 Índice Mitótico

El índice mitótico (IM), es la relación entre las células en división celular (mitóticas) y el número total de células en cultivo o en crecimiento natural, se utiliza cuando se quiere medir el efecto citotóxico producido por una sustancia exógena en el ciclo celular de un sistema biológico (Chauhan, et al, 1986).

Cuando se aplica la técnica de IM para evaluar una sustancia, con efecto bloqueador pre-mitótico se espera que el índice de células en mitosis disminuya significativamente con respecto al grupo control tratado con el solvente puro. Si el IM disminuye a medida que se incrementa la concentración de la sustancia, se infiere que hay efecto de dosis o relación de dosis-efecto. Una de las etapas pre-mitóticas más sensibles a la acción de una sustancia es la S o etapa de síntesis de ADN, en este caso es probable que el agente esté interfiriendo con esta etapa o bloqueando el ciclo (Hoyos, Luz Stella y Carvajal, Silvio, 1998).

El índice mitótico evalúa la proliferación de células que sufren el proceso mitótico (células que se encuentren en profase, metafase, anafase o telofase), como en el caso de *Allium cepa*, registrando cuantas células mitóticas se encuentran en una población de 1000 células; en los humanos también puede medirse el índice mitótico teniendo en cuenta células metafásicas, como ocurre en el caso de estudios en linfocitos, donde el registro se hace observando cuantas metafases se encuentran en una población de 2000 células.

Cuando se aplica la técnica de IM para determinar efecto citotóxico, se recomienda evaluar ocho concentraciones de la sustancia e incluir un control negativo (el solvente puro) y un control positivo (Ej. Mitomicina-C [MMC]). Es decir, un total de 10 tratamientos (10 cultivos), con repetición del experimento dos veces más (IBID. p: 26).

Para efectos de este estudio el Índice Mitótico se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \text{No. total de células en mitosis} / \text{No. Total células}$$

5.4.2 Índice de Fase

El índice de fase mide la cantidad de profases, metafases, anafases y telofases que se encuentran en una población celular en relación al número total de células en mitosis.

El índice de fase le proporciona al observador información acerca del desarrollo mitótico que se está llevando a cabo dentro del organismo y/o sistema biológico, y si la sustancia a que está sometido éste, logra influir en el proceso continuo y equilibrado en estado normal del ciclo celular.

Para calcular el índice de fase en las células de meristemos radicales de cebolla, se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{IFp} = \frac{\text{No. profases}}{\text{No. total mitosis}}$$

$$\text{IFa} = \frac{\text{No. anafases}}{\text{No. total mitosis}}$$

$$\text{IFm} = \frac{\text{No. metafases}}{\text{No. total mitosis}}$$

$$\text{IFt} = \frac{\text{No. telofases}}{\text{No. total mitosis}}$$

5.4.3 Ciclo celular

El ciclo de vida de la célula típicamente se divide en 5 fases mayores. Las fases se describen mas abajo, junto con los eventos principales que ocurren durante cada fase.

Interfase. La célula esta ocupada con la actividad metabólica y realizando sus tareas como parte de un tejido. El ADN se duplica durante la interfase para prepararse para la mitosis (las cuatro próximas fases que conducen a el incluyen la división nuclear). Los cromosomas no están visibles en el núcleo, sin embargo, se distingue un punto oscuro llamado nucleolo.

Profase. La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible en el microscopio óptico como cromosomas. La membrana nuclear se disuelve, marcando el comienzo de la prometafase. Proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse.

Metafase. Fibras del huso alinean los cromosomas a lo largo del medio del núcleo celular. Esta línea es referida como el plato de metafase. Esta organización ayuda

a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.

Anafase. Los cromosomas apareados se separan en los cinetocoros y se mueven a lados opuestos de la célula. El movimiento resulta de una combinación de movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtúbulos del huso y de interacción física de microtúbulos polares.

Telofase. Nuevas membranas se forman alrededor de los núcleos hijos mientras los cromosomas se dispersan y ya no son más visibles con el microscopio óptico. La citocinesis o la partición de la célula puede también comenzar durante este estadio.

6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de este estudio se desarrolló una investigación de tipo experimental con un diseño de bloques aleatorizados. Esencialmente, se trabajó sobre un primer ensayo para estimar el tiempo del ciclo celular y tres ensayos posteriores para evaluar el efecto del Furadan, para esto se desarrollaron los protocolos y técnicas que se mencionan a continuación.

6.1 PROTOCOLOS

6.1.1 Duración del ciclo celular

Para estimar la duración en horas de un ciclo completo de división celular, se implementó un ensayo “*in vitro*” con bulbos de *Allium cepa*, de tamaño y peso semejante, se despojaron de epidermis y raíces viejas y fueron colocados en agua de corriente hasta cuando las raicillas alcanzaron 1.5 – 2 cm. de longitud, se cambió diariamente el agua y se mantuvieron en condiciones ambientales fijas: de temperatura (25 °C) cantidad de aire circulante y relativa oscuridad dentro de una incubadora de madera que se adecuó para el crecimiento radicular de los bulbos.

A los tres días, cuando las raíces alcanzaron el crecimiento apropiado (1,5 – 2 cms.), se dispusieron dos grupos con el mismo número de unidades experimentales para cada grupo (20 bulbos), al primer grupo se le aplicó un tratamiento con cafeína al 0.1 %, diluida en agua destilada, durante una hora; posteriormente se retomó el desarrollo radicular en agua de chorro y se realizaron montajes de las raíces a diferentes tiempos (18, 19, 19.5 y 20 horas más tarde de la aplicación del tratamiento.), para encontrar en cual de estos períodos se hallaban las primeras bi – telofases y de este modo se determinó el tiempo de duración del ciclo celular. Se hizo registro teniendo en cuenta que la duración de un ciclo completo estaba comprendido entre células en telofase y la primera célula bi – telofásica que apareciera en el extendido sobre la placa.

En el segundo grupo control, solamente se dejaron germinar los bulbos (20 unidades experimentales) en agua de chorro y posteriormente se tomaron las respectivas muestras.

6.1.2 Toxicidad del Furadan.

El experimento consistió en someter los bulbos de *Allium cepa* que pesaran entre 20 y 30g., a diferentes concentraciones del plaguicida, durante diez días consecutivos. Previo al experimento, a los bulbos se les retiró la epidermis, se limpiaron y se cortaron las raíces de manera que quedara solo la cabeza de la raíz.

La proliferación radicular se llevó a cabo dentro de una incubadora de madera, en un ambiente oscuro aislado, con temperatura entre 23 y 25°C y aireadores conectados en red a todas las cubetas para mantener oxigenado el medio de crecimiento (diferentes tratamientos). Los bulbos se colocaron a germinar en cubetas de vidrio de iguales dimensiones, (25 cm. de largo por 15 cm de profundidad por 5 cm. de ancho); en cada cubeta se colocaron cinco bulbos, utilizando el mismo volumen de agua (800 mL).

Se establecieron ocho tratamientos, que consistieron en la preparación de siete concentraciones del plaguicida, (0.760; 1.953; 3.906; 7.812; 15.625; 31.250; 62.500 g/L.) cada una fue evaluada en quince unidades experimentales (15 bulbos). Además, se incluyó un control negativo (0.00 g/L), en este tratamiento se colocó agua de chorro de iguales condiciones que la utilizada para diluir el plaguicida en los diferentes tratamientos.

El diseño del experimento fue completamente aleatorio. Por cada tratamiento se realizaron quince (15) replicas, obteniendo un total de ciento veinte (120) unidades experimentales, dentro de las cuales, los tratamientos se distribuyeron al azar. Durante diez días, el muestreo se realizó de la siguiente manera: de cada tratamiento se escogió al azar un bulbo de la cubeta al que se le contaron el número de raíces, se midió su longitud con un metro y se observaron los cambios que se presentaron simultáneamente al crecimiento radicular, tales como: coloración, presencia de tumores, entre otros. posteriormente se iba descartando, este procedimiento se realizó así, hasta completar el seguimiento recolectando datos de todas las muestras. Los datos se reportan en tablas dentro de este trabajo en el capítulo de resultados.

Los datos obtenidos del experimento se procesaron mediante el programa SPSS utilizando un análisis de regresión, correlación y varianza, donde las variables fueron los tratamientos (concentraciones del plaguicida y control), tiempo (en días), y longitud de raíces (mm).

6.1.3 Citotoxicidad y genotoxicidad del Furadan.

Con el ensayo que se realizó anteriormente, no sólo se evaluó la toxicidad del Furadan, sino que permitió identificar con base en el análisis de datos, por medio del programa SPSS, las dosis que disminuyeron el crecimiento radicular de los bulbos en forma baja, media, y alta; las concentraciones del plaguicida correspondientes a estas dosis, fueron las que se utilizaron para esta prueba.

Para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad del Furadan, se trabajó con bulbos de *Allium cepa* que pesaran entre 20 y 30g., que se prepararon para el cultivo *in Vitro*, retirando la epidermis, limpiándolos y cortando las raíces de manera que quedó solo la cabeza de la raíz.

El cultivo se hizo durante diez días, con dieciseis unidades experimentales (16 repeticiones) por tratamiento incluido el control negativo (0,00 g/L.), obteniendo un total de ochenta (80) unidades experimentales, entre las cuales se asignaron aleatoriamente los cinco tratamientos. El cambio y lavado de cubetas se realizó a diario y el muestreo se hizo cada dos días, tomando al azar de cada tratamiento, un bulbo, al que se recortaron nueve (9) raíces, que fueron procesadas en 3 o 4 placas y se hizo un recuento total de aproximadamente 2000 células, para reportar Índice mitótico (IM) e Índice de fase (IF). Con este material se hizo lectura rápida y montaje permanente con hielo seco.

Para el cuarto experimento de genotoxicidad, se realizó lectura simultánea con las placas del experimento de citotoxicidad, identificando sobre 2000 células aproximadamente, las Aberraciones cromosómicas presentes.

En este caso se tomó como unidad experimental el bulbo y de cada uno de ellos se obtuvo un dato, así:

$$\text{Frec. X de AC} / \# \text{ células contadas.}$$

Los datos se analizaron mediante ANOVA para bloques aleatorizados y se registraron inicialmente en el laboratorio utilizando formatos de tablas como el que aparece a continuación:

(Ver datos analizados en capítulo de resultados)

Tabla 3. Modelo para registro de Frec. AC/ concentración Furadan, en laboratorio.

Tiempo (días)	AC por tratamiento				
	(-)	[1]	[2]	[3]	(+)
1					
Hasta					
10					

Por otro lado en laboratorio, se registraron los datos en otra tabla (ver tabla 4), que permitió mediante ANOVA bifactorial, determinar si había diferencia significativa entre tratamientos, entre fases de la mitosis y/o que se presentara algún tipo de interacción entre estos factores.

Tabla 4. Modelo para registro de datos de AC / fases, visualizadas al microscópio.

		AC por tratamiento				
		(-)	[1]	[2]	[3]	(+)
Fases de la mitosis	Interfase					
	Profase					
	Metafase					
	Anafase					
	Telofase					

6.1.4 Preparación, fijación y tinción de meristemos radiculares de *Allium cepa* con orceína acética hidroclórica.

Este protocolo de fijación y tinción se utilizó para determinar el tiempo del ciclo celular, para citotoxicidad y genotoxicidad.

Para la preparación del colorante orceína acética, se calientan, hasta ebullición, 55mL. de ácido acético, se añaden 2g. de orceína, se hierve durante 7 a 10 minutos más, se deja enfriar totalmente y posteriormente se añaden 55 mL. de agua destilada y se filtra. Finalmente, por cada nueve (9) partes de la solución anterior se agrega 1 parte de HCl.

Para la fijación de raíces, se cortan y se fijan en una solución de etanol – ácido acético 3:1, durante 30 minutos hasta un máximo de 24 horas, la fijación puede hacerse también en etanol al 70%, a una temperatura de 4°C, por 24 horas.

Una vez fijadas las raíces se cortan los meristemos apicales (1mm), se colocan en vidrio reloj y se cubren con orceína acética durante 2 – 5 minutos.

Con pinzas de madera se toma el vidrio reloj y se calientan las raíces impregnadas de orceína en un mechero de alcohol, hasta que se inicie el desprendimiento de vapores, inmediatamente se retira el vidrio reloj del mechero y se repite esta operación dos veces más.

Se extraen las raíces del vidrio reloj y se colocan sobre un portaobjetos, con un bisturí se cortan 3mm aproximadamente desde el ápice de la raíz, se añade una gota de orceína y se coloca encima un cubreobjetos. También, se puede agregar una gota de ácido acético al 45% únicamente y poner encima el cubreobjetos.

Con la punta de un lápiz se presiona encima del cubreobjetos, con cuidado de no quebrarlo, y se dan golpecitos sucesivos para extender el material (*squash*). Se observa al microscopio (4x y10x) para verificar un buen extendido.

Se retira el exceso de colorante con papel absorbente presionando suavemente sobre el cubreobjetos, sin deslizarlo.

Este tratamiento permite la lectura inmediata que las placas, pero no conservan el material por mucho tiempo, de manera que el registro de datos debe hacerse lo más pronto posible.

Para conservar el material radicular indefinidamente, se colocan las placas con el material ya extendido sobre hielo seco y el cubreobjetos hacia arriba.

Cuando el cubreobjetos se llene de escarcha, se retira la placa del hielo seco y con una cuchilla se levanta el cubreobjetos.

Las placas se pasan en orden, a través de 4 vasos, con alcohol de diferentes graduaciones (50 – 70 – 96 – absoluto), para deshidratar el material biológico y retirar el exceso de colorante, las pasadas o lavados deben efectuarse rápidamente.

Por último se aplica sobre el extendido una gota de entellan y se coloca un nuevo cubreobjetos sobre de la placa, se llevan a una estufa a 50°C y, después de 24 horas de preparación, quedan listas para observación al microscopio.

6.1.5. Determinación de dosis para evaluación de daño genotóxico.

Después de la prueba de toxicidad del Furadan en raíces de *Allium cepa*, se estimó, mediante análisis estadístico de correlación y regresión, las concentraciones que inhiben el crecimiento y/o dan origen a otras malformaciones o alteraciones de las raíces, y se identificaron las concentraciones adecuadas para el estudio de genotoxicidad.

Para la evaluación de la genotoxicidad se utilizó la prueba de Aberraciones Cromosómicas (AC), que consiste en identificar los daños producidos por el plaguicida en los meristemos radiculares de *Allium cepa* en las diferentes fases del ciclo celular así: puentes citoplasmáticos en células profásicas; quiebres y cromosomas resagados en células metafásicas y anafásicas; y puentes cromatínicos en telofases.

7. RESULTADOS

7.1. DURACIÓN DEL CICLO CELULAR

Con este primer ensayo se estableció el tiempo de duración del ciclo celular.

Después del tratamiento con cafeína al 0,1 % no se registraron células bi – telofásicas a las 18 y 19 horas; sólo a las 19.5 horas, después del tratamiento con cafeína al 0,1 %, se registró la primera célula bi-telofásica y a las 20 horas se encontraron entre 3 y 15 células bi-nucleadas por tratamiento.

En consecuencia, se concluye que el ciclo celular de *Allium cepa*, en las condiciones experimentales antes anotadas, dura alrededor de 20 horas (Ver Figura 1).

a. Célula bi - profásica



b. Célula bi - metafásica



c. Célula bi - anafásica



d. Célula bi - telofásica

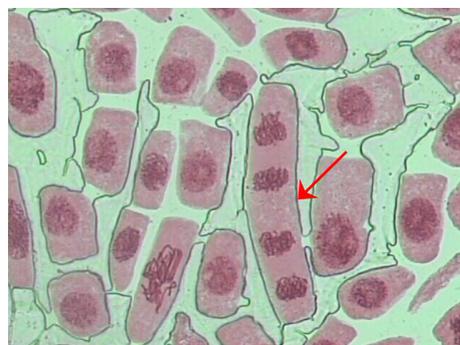


Figura 1. Células bifásicas obtenidas en el ensayo de duración de ciclo celular aplicando cafeína (0,1%) 40X.

7.2. TOXICIDAD DEL FURADAN

Las variables tenidas en cuenta para el análisis del efecto tóxico del Furadan en meristemas radiculares de *Allium cepa*, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Variables utilizadas para evaluar el efecto tóxico del Furadan.

Variable	Unidad	Naturaleza	tipo
Longitud raíces	mm	Cuantitativa continua	dependiente
Concentración Furadan	g/L	Cuantitativa continua	Independiente
Tiempo	días	Cuantitativa discreta	independiente

En la Tabla 6 se presentan las concentraciones del Furadan evaluadas en la prueba de toxicidad para *Allium cepa*, así: el control negativo (agua de chorro) que corresponde a la concentración 0,0 g/L y siete concentraciones del plaguicida Furadan: 0.98; 1.95; 3.91; 7.81; 15.63; 31.25; 62.50 g/L. La tabla muestra, además, la longitud promedio de la raíces (\bar{x}), con su respectiva desviación estándar y el número de raíces analizadas (N).

Tabla 6. Toxicidad de ocho (8) concentraciones de Furadan, identificada mediante acción retardante de la elongación radicular (longitud en mm).

Concentración (g/L)	\bar{X} (mm)	\pm	Desv. Típ	N
0.00	56.13	\pm	43.30	(88)
0.98	51.77	\pm	48.50	(79)
1.95	31.58	\pm	18.75	(73)
3.91	34.83	\pm	26.18	(63)
7.81	31.14	\pm	25.16	(58)
15.63	17.25	\pm	12.46	(91)
31.25	18.12	\pm	14.76	(82)
62.50	8.06	\pm	5.15	(66)
Total	31.54	\pm	32.68	(600)

Debido a que los datos de la longitud de la raíz (mm), no cumplen con las asunciones de normalidad (Prueba de Kolmogorov – smirnov), de homogeneidad de varianza (Prueba de Levans), el análisis se hizo mediante la prueba de correlación de Spearman (no paramétrica), complementada con la respectiva prueba de regresión. Este análisis se hizo por separado, para los datos registrados en cada época de muestreo (días).

Tabla 7. Análisis de correlación de Spermean para asociación de variables.

	Concentración (g/L)
Rho de Spermean Long. Raíz (mm)	-0.486
Coefi de correlación	.000
Sig. Bilateral	600
N	

En la tabla 7 se observa que entre la concentración del Furadan (g/L) y el crecimiento radicular de *A. cepa*, existe una asociación lineal negativa, significativa estadísticamente, ($r = -0.486$; $p = 0.0000$); en otras palabras, existe entre las dos variables una asociación negativa con respuesta dosis – efecto.

El comportamiento, en este caso, se reflejó de tal modo que a mayor concentración de Furadan, menor crecimiento radicular (Ver Figuras 2, 3, 4, 5y 6). En consecuencia, se puede concluir que el Furadan a las concentraciones evaluadas, tiene efecto tóxico para *Allium cepa*, inhibiendo el desarrollo normal de sus raíces.

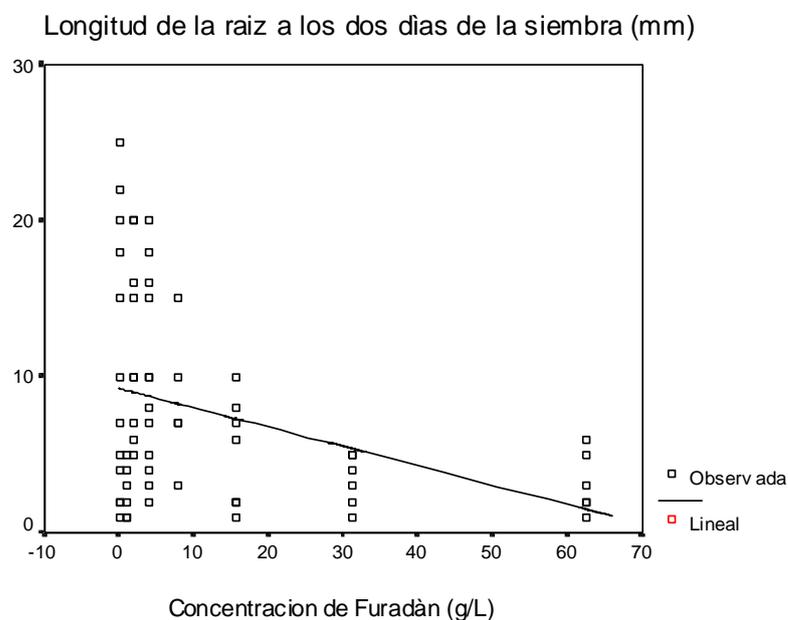


Figura 2. Longitud radicular, dos (2) días después de aplicar el tratamiento.

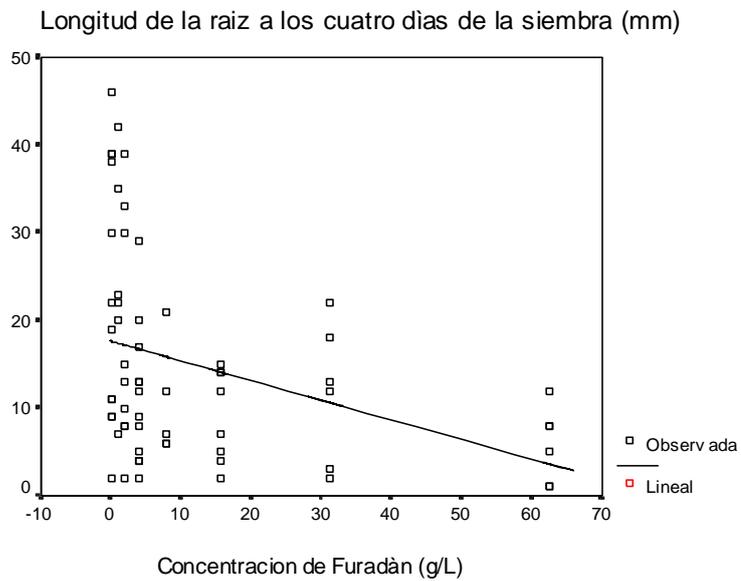


Figura 3. Longitud radicular, cuatro (4) días después de aplicar el tratamiento.

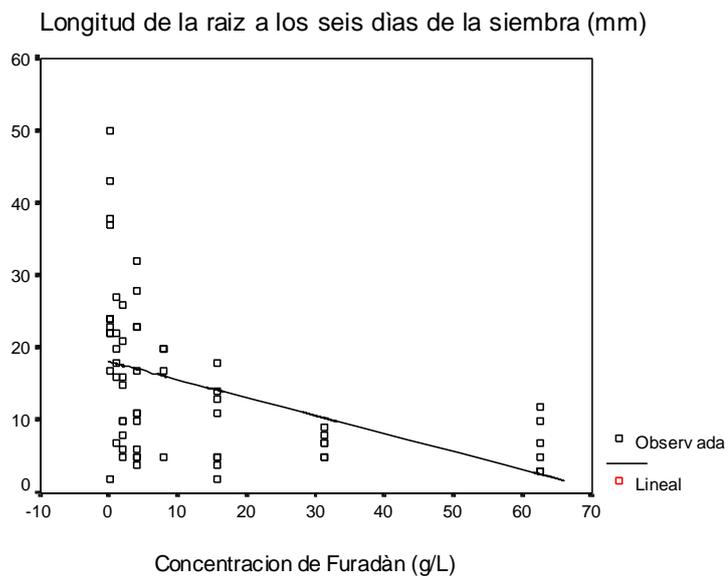


Figura 4. Longitud radicular, seis (6) días después de aplicar el tratamiento.

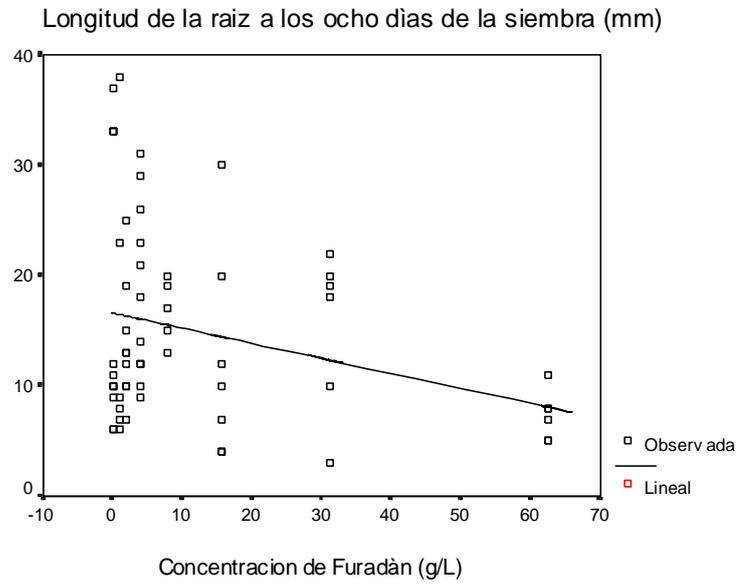


Figura 5. Longitud radicular, ocho (8) días después de aplicar el tratamiento.

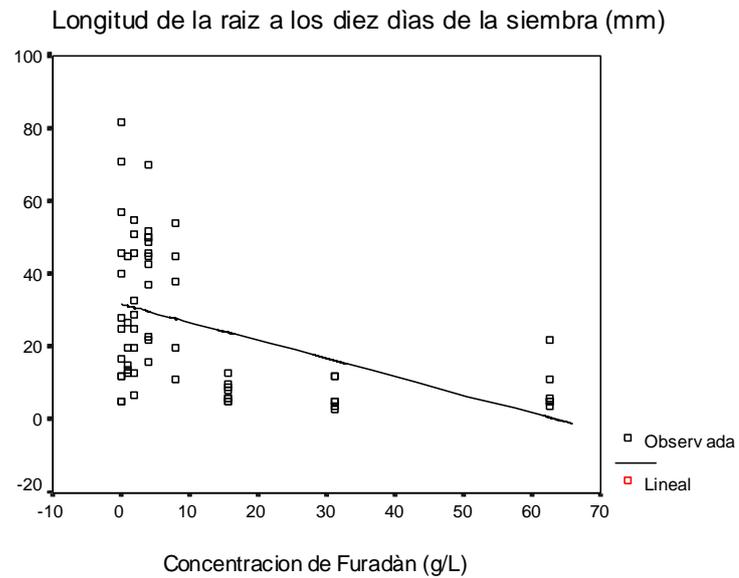


Figura 6. Longitud radicular, diez (10) días después de aplicar el tratamiento.

Además del efecto retardante del desarrollo radicular, como consecuencia del efecto tóxico del Furadan, se observaron otros cambios, relacionados con distorsiones morfológicas diferentes a las formas radiculares normales de la planta, tales como: número reducido de meristemos radiculares (5 a 8 raicillas/ bulbo) en las concentraciones mas altas (62.50 – 31.25 y 15.63 g/L), al comparar con los controles (18 a 30 raicillas/ bulbo).

Se encontraron raíces demasiado gruesas (2 – 2.5 mm de diámetro aprox.) en los tratamientos con Furadan, en comparación al control (0.025 - 0.5 mm, de diámetro aprox.). Así mismo, se observaron raíces con abultamientos notorios, como pequeños abscesos, alojados en cualquier parte del meristemo. En todas las concentraciones del Furadan se presentó un comportamiento diferente, las raíces desviaron sus ápices hacia el exterior tratando de esquivar el medio hostil del tratamiento, a diferencia del control, donde las raíces crecían normalmente hacia abajo, con raicillas delgadas y en gran número, sin ninguna distorsión en su morfología.

7.3. EFECTO CITOTÓXICO DEL FURADAN.

En la Figura 7, se muestra el tipo de extendidos celulares que se obtuvieron, mediante la técnica de tinción con orceína acética empleada para fijar los meristemos radiculares.

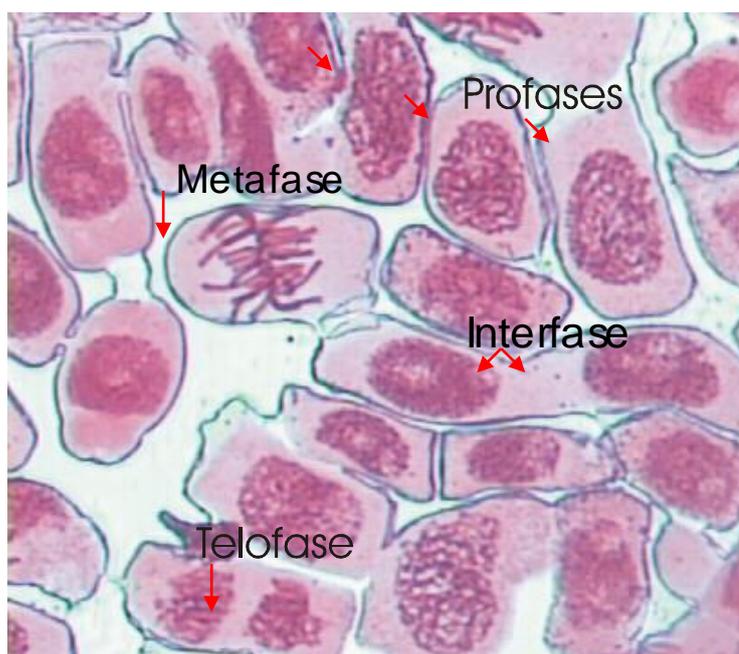


Figura 7. Microfotografía con objetivo 40X, de un extendido celular de meristemos radiculares de *A. cepa*, teñidas con Orceína acética.

Las variables incluidas en el análisis del efecto citotóxico del Furadan en meristemos radiculares de *Allium cepa* se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Variables utilizadas para analizar el efecto citotóxico.

Variable	Unidad	Naturaleza	tipo
Índice mitótico	IM	Cuantitativa continua	dependiente
Concentración Furadan	g/L	Cuantitativa continua	Independiente
Tiempo	días	Cuantitativa discreta	independiente

En la Tabla 9 se presenta el índice mitótico promedio (\bar{X}) de las células de raíz de *Allium cepa*, con su respectiva desviación estándar (DE) y número de replicas (N), correspondientes a cuatro concentraciones del Furadan y durante diferentes periodos de tiempo (días).

Tabla 9. IM de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* correspondientes a cuatro concentraciones de Furadan durante diferentes periodos de tiempo (días).

Tiempo de tratamiento (días)	Concentración (g/L)	IM X	DE	N
2,00	,00	,110000	± 0,0141	(4)
	1,77	0,0575	± 0,005	(4)
	11,00	0,0625	± 0,032	(4)
	31,00	0,0400	± 0,00816	(4)
	Total	0,0675	± 0,0313	(16)
4,00	,00	0,1025	± 0,0435	(4)
	1,77	0,0725	± 0,0330	(4)
	11,00	0,0625	± 0,0189	(4)
	31,00	0,0350	± 0,0129	(4)
	Total	0,0681	± 0,0364	(16)
6,00	,00	0,11	± 0,0216	(4)
	1,77	0,0800	± 0,0294	(4)
	11,00	0,0525	± 0,0206	(4)
	31,00	0,0575	± 0,0206	(4)
	Total	0,075	± 0,0314	(16)
8,00	,00	0,1175	± 0,00957	(4)
	1,77	0,0775	± 0,0340	(4)
	11,00	0,0550	± 0,0311	(4)
	31,00	0,0475	± 0,0126	(4)
	Total	0,0744	± 0,0356	(16)
10,00	,00	0,1150	± 0,0252	(4)
	1,77	0,0675	± 0,00957	(4)
	11,00	0,0575	± 0,005	(4)
	31,00	0,0350	± 0,0129	(4)
	Total	0,0688	± 0,0330	(16)
total	,00	0,111	± 0,0234	(20)
	1,77	0,0710	± 0,0240	(20)
	11,00	0,0580	± 0,0214	(20)
	31,00	0,0430	± 0,0153	(20)
	Total	0,0707	± 0,0329	(80)

De acuerdo a la naturaleza de las variables (cuantitativas continuas) y a que los datos de Índice mitótico (IM) no cumplen con las asunciones de distribución normal y homogeneidad de varianza, el análisis de asociación o dependencia entre el IM, la concentración del Furadan (g/L) y la duración del tratamiento (días) se hizo mediante el análisis de correlación de Spearman (Ver Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de asociación mediante la prueba de Spearman.

		Índice mitótico(IM)
Concentración (g/L)	Rho de Spearman	-0.726
	Sig. Bilateral	0,000
	N	80
Tiempo (días)	Rho de Spearman	-0.072
	Sig. Bilateral	0.524
	N	80

En la Tabla 10 se ve claramente que existe una asociación negativa significativa estadísticamente ($p = 0.000$), entre el incremento en la concentración del Furadan y la depresión o disminución del IM de las células radicales de *Allium cepa*. Es decir, se presenta una asociación negativa, con relación dosis – efecto (Ver Figura 8).

Así mismo se observa que no existe asociación lineal ($p = 0.524$), entre el IM y el tiempo de tratamiento (días), es decir, que no existe una relación dosis – efecto.

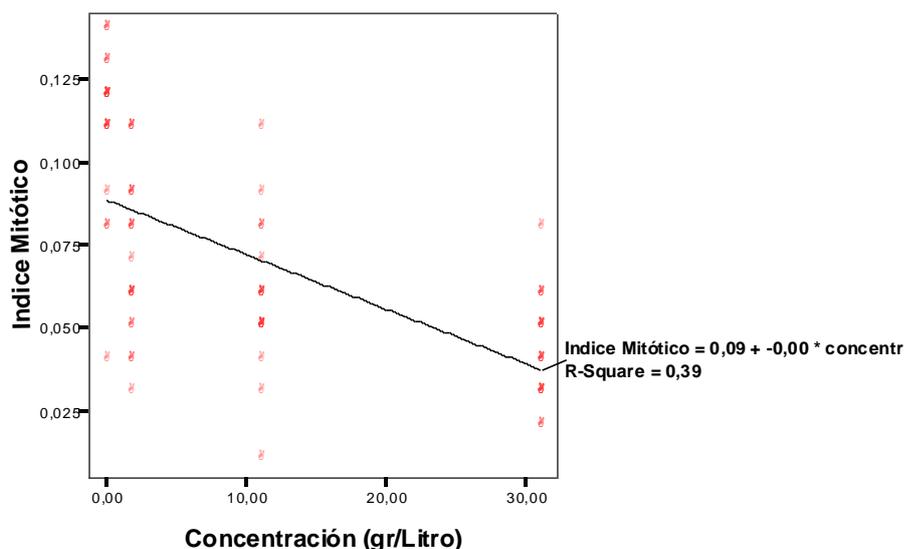


Figura 8. Relación entre IM y concentración del Furadan.

Mediante el análisis de regresión lineal, se pudo inferir que la variabilidad observada en la disminución del IM, se debe en un 39% al incremento en la concentración del Furadan, quedando un 61% sin explicar, que se debe posiblemente a factores no incluidos en el modelo experimental y/o de análisis, tales como errores manuales en la preparación del plaguicida, variabilidad de la temperatura, etc.

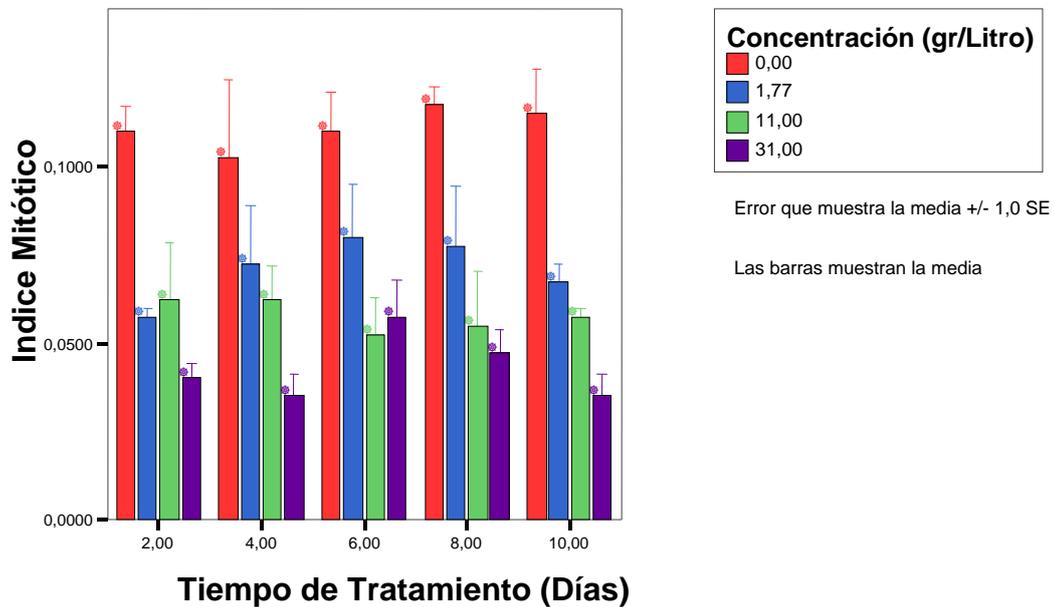


Figura 9. Asociación entre la concentración de Furadan y la duración del tratamiento.

En la figura 9 se presenta el índice mitótico respecto al tiempo de tratamiento (días), para las cuatro concentraciones de Furadan. Se observa claramente que el efecto de la concentración del Furadan en la depresión del índice mitótico es independiente del tiempo, pues la respuesta depresora del IM es prácticamente la misma para los diferentes periodos del tratamiento. El análisis de regresión lineal permitió concluir que la variabilidad del IM no se debía en ninguna forma al tiempo de tratamiento aplicado en el modelo experimental.

En consecuencia, se puede concluir que el Furadan tiene efecto citotóxico para las células de los meristemos radiculares de la cebolla (*Allium cepa*), expresada como un bloqueo premitótico (disminución del IM), a medida que aumenta la concentración del Furadan en el rango 1.77 - 31.25 g/L.

7.4. ANÁLISIS DE ÍNDICES DE FASES

En la Tabla 11, se resume la frecuencia relativa promedio o índice de fases (IF), con su respectivo error estándar, de las células en mitosis de meristemos radiculares de *Allium cepa*, correspondientes a cuatro concentraciones del Furadan

y a cinco periodos distintos (días) de tratamiento (Ver fotos de las fases mitóticas en la Figura 11).

Mediante análisis de varianza factorial y prueba no paramétrica de Kreuskal Wallis, se logró establecer que existe una diferencia significativa estadísticamente ($p=0.000$), entre la frecuencia de células en las cuatro fases de la mitosis, siendo la más frecuente la profase (0.524), seguida de la metafase (0.218) y de la anafase (0.160), la telofase fue la fase mitótica de menor frecuencia (0.095).

La diferencia observada entre las frecuencias de las fases mitóticas es independiente de la concentración del Furadan y de la duración del tratamiento; ya que las interacciones respectivas (fases x concentración y fases x duración tratamiento), no fueron significativas estadísticamente (Ver Figuras 12 y 13).

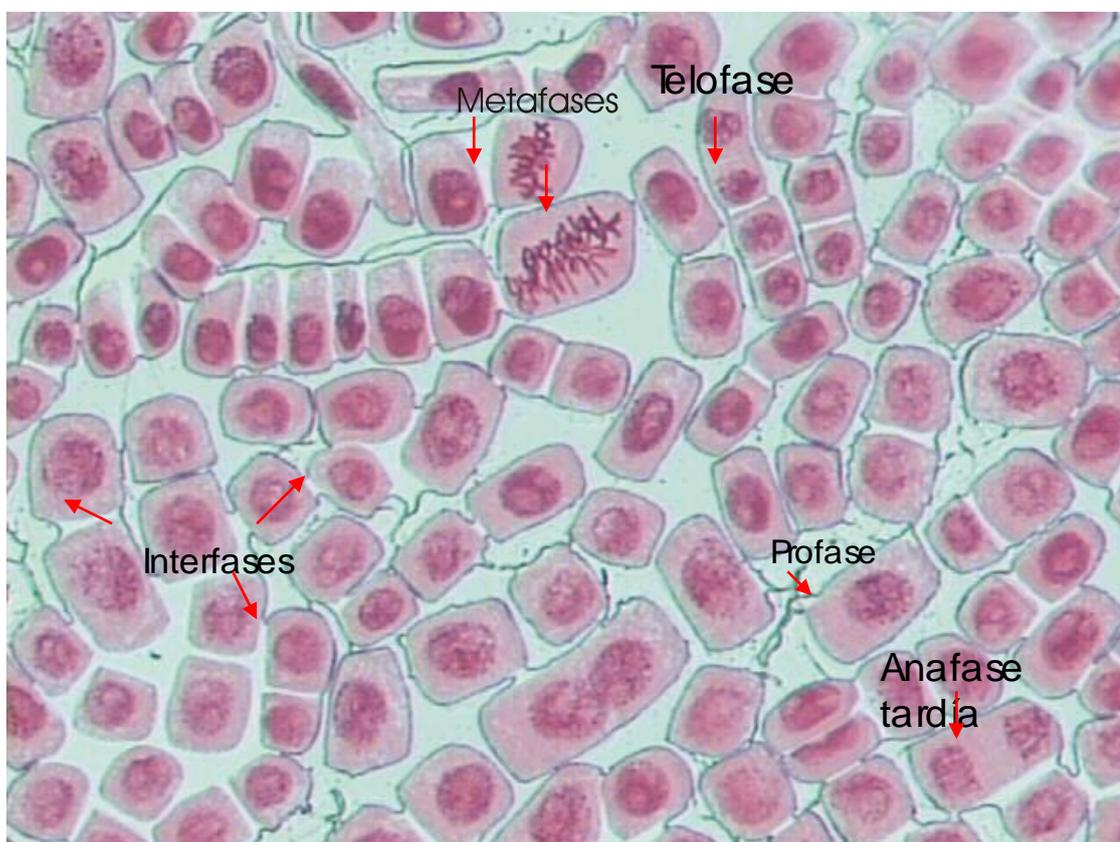


Figura 11. Panorámica celular de *Allium cepa*, bajo microscopio con objetivo 40X. teñidas con técnica Orceína acética.

En la Tabla 11 se muestra el Índice de Fases promedio (X) de células mitóticas de meristemos radiculares de *Allium cepa*, con su respectiva desviación estándar (DE), y el número de replicas (N), correspondientes a tres concentraciones del Furadan y el control durante diferentes periodos de tiempo (días).

Tabla 11. IF de células meristemáticas de *Allium cepa*, correspondientes a cuatro concentraciones de Furadan, y durante diferentes periodos de tiempo.

TIEMPO (días)	CONCENTRACIÓN (g/L)	ÍNDICE DE FASE				n
		X ± EE				
		PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE	
2	0.00	0.512 ± 0.024	0.228 ± 0.024	0.159 ± 0.024	0.101 ± 0.024	(4)
	1.77	0.489 ± 0.024	0.245 ± 0.024	0.175 ± 0.024	0.110 ± 0.024	(4)
	11.00	0.436 ± 0.024	0.262 ± 0.024	0.175 ± 0.024	0.126 ± 0.024	(4)
	31.00	0.464 ± 0.024	0.241 ± 0.024	0.177 ± 0.024	0.116 ± 0.024	(4)
	Total repeticiones					(16)
4	0.00	0.488 ± 0.024	0.233 ± 0.024	0.184 ± 0.024	0.09450 ± 0.024	(4)
	1.77	0.570 ± 0.024	0.184 ± 0.024	0.157 ± 0.024	0.08825 ± 0.024	(4)
	11.00	0.530 ± 0.024	0.215 ± 0.024	0.131 ± 0.024	0.08770 ± 0.024	(4)
	31.00	0.575 ± 0.024	0.225 ± 0.024	0.124 ± 0.024	0.07425 ± 0.024	(4)
	Total repeticiones					(16)
6	0.00	0.532 ± 0.024	0.196 ± 0.024	0.163 ± 0.024	0.09375 ± 0.024	(4)
	1.77	0.601 ± 0.024	0.165 ± 0.024	0.135 ± 0.024	0.09875 ± 0.024	(4)
	11.00	0.566 ± 0.024	0.172 ± 0.024	0.188 ± 0.024	0.72500 ± 0.024	(4)
	31.00	0.516 ± 0.024	0.227 ± 0.024	0.152 ± 0.024	0.104 ± 0.024	(4)
	Total repeticiones					(16)
8	0.00	0.552 ± 0.024	0.233 ± 0.024	0.146 ± 0.024	0.0680 ± 0.024	(4)
	1.77	0.595 ± 0.024	0.206 ± 0.024	0.136 ± 0.024	0.0975 ± 0.024	(4)
	11.00	0.544 ± 0.024	0.195 ± 0.024	0.146 ± 0.024	0.100 ± 0.024	(4)
	31.00	0.526 ± 0.024	0.204 ± 0.024	0.176 ± 0.024	0.09025 ± 0.024	(4)
	Total repeticiones					(16)
10	0.00	0.509 ± 0.024	0.246 ± 0.024	0.161 ± 0.024	0.0835 ± 0.024	(4)
	1.77	0.536 ± 0.024	0.214 ± 0.024	0.146 ± 0.024	0.0967 ± 0.024	(4)
	11.00	0.513 ± 0.024	0.235 ± 0.024	0.139 ± 0.024	0.112 ± 0.024	(4)
	31.00	0.446 ± 0.024	0.232 ± 0.024	0.230 ± 0.024	0.09100 ± 0.024	(4)
	Total repeticiones					(16)
					(80)	

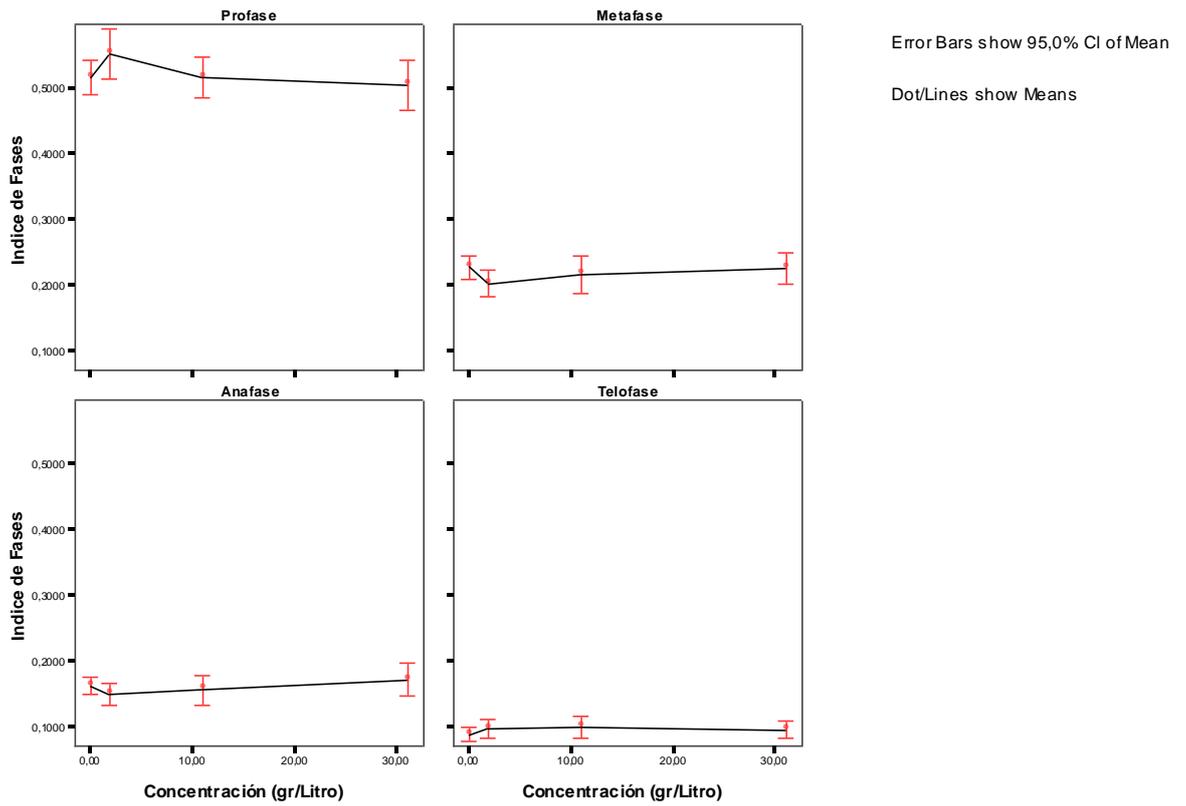
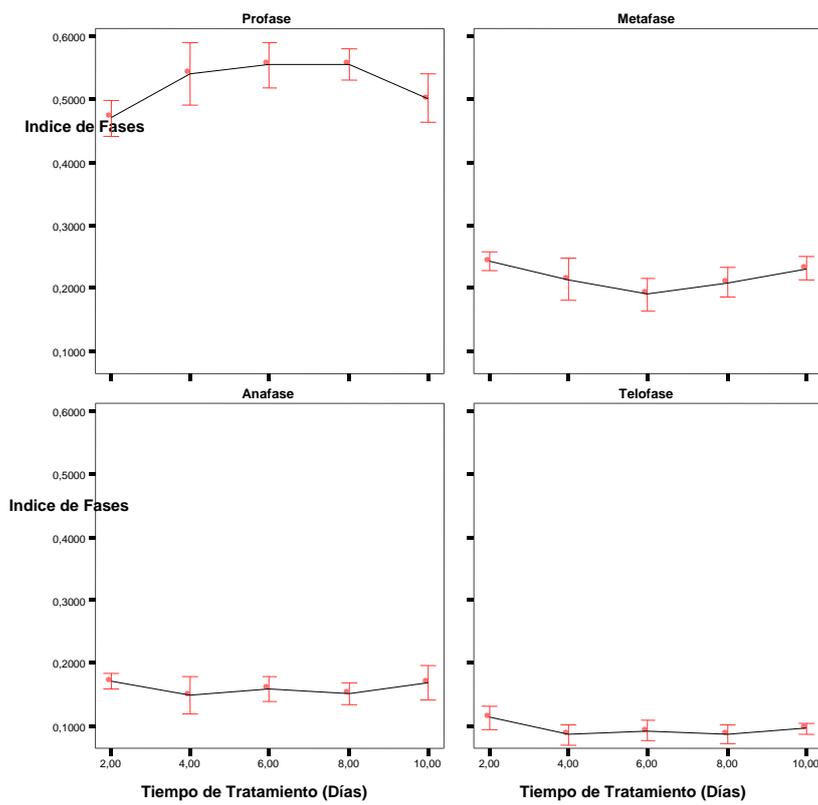


Figura 12. Análisis de asociación entre los Índice de fases y la concentración del Furadan.



Error 95,0%

Los puntos en las líneas muestran La media.

Figura 13. Análisis de asociación entre los Índices de Fase y el tiempo de tratamiento con Furadan.

7.5. ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD DEL FURADAN.

En el análisis del efecto genotóxico del Furadan se incluyeron las siguientes variables.

Tabla 12. Variables para análisis de genotoxicidad.

Variable	Unidad	Naturaleza	tipo
Aberración cromosómica	AC	Cuantitativa discreta	dependiente
Concentración Furadan	g/L	Cuantitativa continua	Independiente
Tiempo	días	Cuantitativa discreta	independiente

En la Tabla 13 se resume la frecuencia promedio de aberraciones cromosómicas (X), con su respectiva desviación estándar (DE) y repeticiones (N). La frecuencia de Aberraciones se obtuvo identificando el número de AC presentes en 2000 células por tratamiento.

Así mismo, se observa claramente que no se registraron AC en la concentración cero de Furadan (Control negativo); es decir, que las células en crecimiento normal (Sin Furadan), no muestran evidencias de daño cromosómico. También se observa un incremento significativo ($p < 0.05$), en la frecuencia de AC, respecto del grupo control, para los tres tratamientos con Furadan (Concentraciones: 1.77; 11.00 y 31.00 g/L), en especial para los primeros dos (2) días de tratamiento.

Al cuarto (4) día del tratamiento aún se registran AC para los tres tratamientos con Furadan, aunque con una frecuencia aproximada de 1/3 respecto de la registrada a los dos días.

A los seis (6) días de tratamiento solo se registran AC, para las concentraciones 1.77 y 31.00 g/L de Furadan y a los ocho (8) y diez (10) días de tratamiento, la frecuencia de AC es nula. Entre los tres tratamientos con Furadan no se halló diferencia significativa estadísticamente ($p = 0.397$) (Ver Figura 14).

En consecuencia se puede concluir que el Furadan a concentraciones entre 1.77 y 31 g/L, induce daño cromosómico dependiente de la duración del tratamiento ($p = 0.33$. Según prueba No paramétrica de Kruskal Wallis).

El incremento en la frecuencia de AC es mayor durante los dos primeros días de tratamiento, luego el efecto inductor se reduce hacia el cuarto y sexto día y desaparece por completo al octavo y décimo día (Ver daño cromosómico en las Figuras 15, 16, 17, 18 y 19)

Tabla 13. Frecuencia promedio de AC, inducida en células meristemáticas de raíz de *A. cepa*, por cuatro concentraciones de Furadan y durante cinco periodos (días) de tratamiento.

Duración de tratamiento (días)	Concentración (g/L)	AC		
		X	± DE	N
2,00	,00	0	0,00	(4)
	1,77	0,47	0,55	(4)
	11,00	0,69	0,90	(4)
	31,00	0,73	1,47	(4)
	Total	0,47	0,86	(16)
4,00	,00	0,00	0,00	(4)
	1,77	0,21	0,43	(4)
	11,00	0,21	0,43	(4)
	31,00	0,21	0,42	(4)
	Total	0,16	0,34	(16)
6,00	,00	0,00	0,00	(4)
	1,77	0,46	0,92	(4)
	11,00	0,00	0,00	(4)
	31,00	0,25	0,49	(4)
	Total	0,18	0,51	(16)
8,00	,00	0,00	0,00	(4)
	1,77	0,00	0,00	(4)
	11,00	0,00	0,00	(4)
	31,00	0,00	0,00	(4)
	Total	0,00	0,00	(16)
10,00	,00	0,00	0,00	(4)
	1,77	0,00	0,00	(4)
	11,00	0,00	0,00	(4)
	31,00	0,00	0,00	(4)
	Total	0,00	0,00	(16)
total	,00	0,00	0,00	(4)
	1,77	0,23	0,50	(4)
	11,00	0,18	0,48	(4)
	31,00	0,24	0,69	(4)
	Total	0,16	0,49	(16)

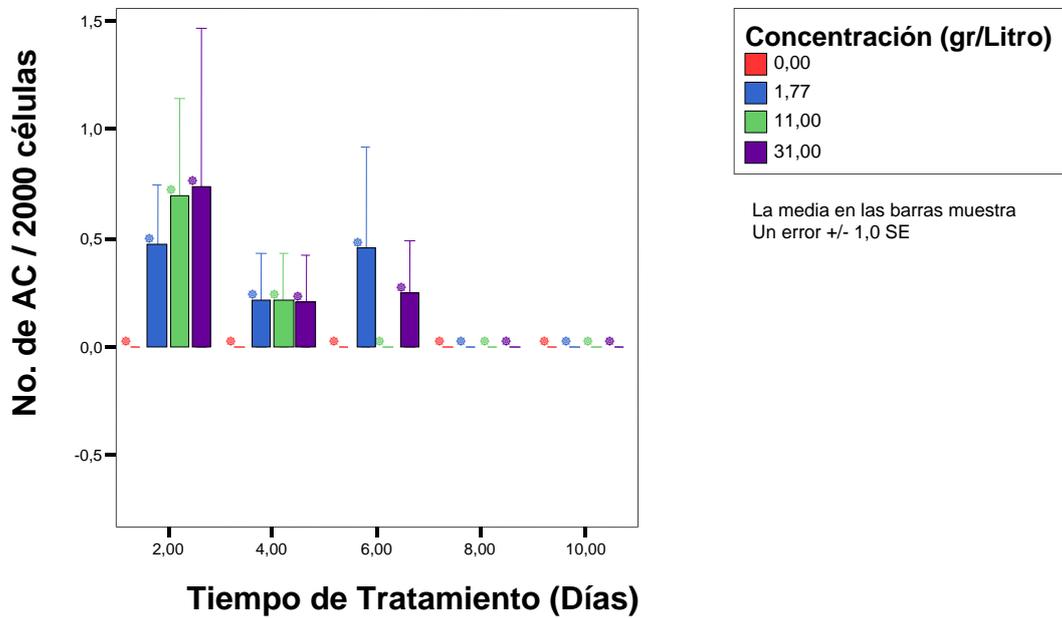


Figura 14. Frecuencia de AC durante el tiempo experimental.

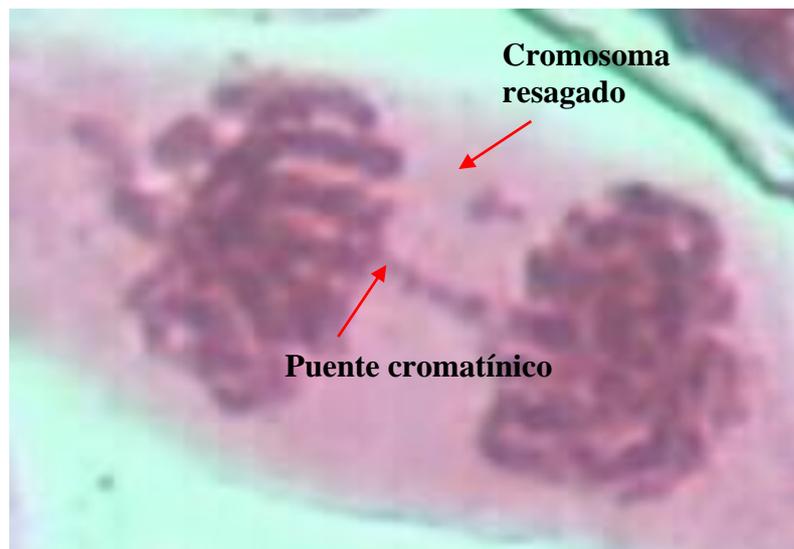


Figura 15. Puente cromatínico y cromosoma resagado, observados en una telofase tratada con 31.25 g/L de Furadan 40 X.



Figura 16. Cromosoma resagado en anafase registrado en células de un bulbo sometido a 15.625 g/L de Furadan 40X.



Figura 17. Un fragmento de un cromosoma resagado. Daño observado en anafase tardía, en una concentración de 31.25 g/L de Furadan. 40X.

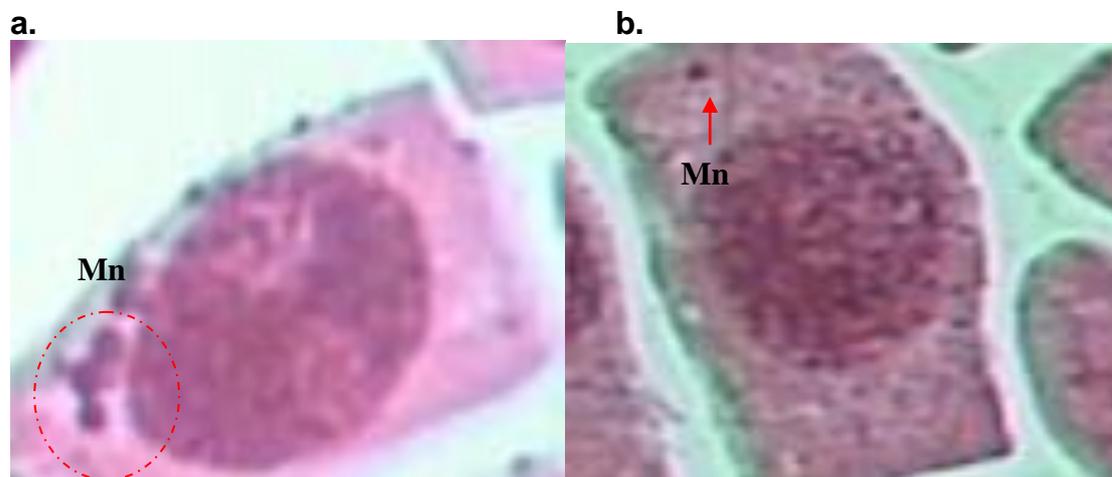


Figura 18. Micronúcleos (Mn) visibles en Interfase:
a. Ocasionado por acción del Furadan a una concentración de 31.25 g/L. 40X.
b. Daño inducido en una concentración de 11 g/L.



Figura 19. Cromosoma resagado observado en una profase tardía, ocasionado por el plaguicida en la concentración 11g/L

9. DISCUSIÓN

A pesar de la recomendación que, por diferentes medios, la gente recibe sobre los cuidados, manejos adecuados y prevenciones que se debe tener al manipular toda clase de sustancias, el empirismo y uso indiscriminado es más fuerte, ocasionando desde intoxicaciones leves hasta la muerte y contaminando el medio ambiente y dañando a otras especies (Mahgoub,2001). Surge la pregunta, ¿Que está haciendo el ser humano que discierne y es inteligente a la hora de buscar soluciones?; esta investigación hace parte del compendio de análisis y evaluaciones que se han realizado en torno a uno de los plaguicidas carbamatos más ampliamente utilizado en el mercado, de los entre comillas “ayudadores de la agricultura”; investigando sus efectos, es como se puede hacerse una aproximación al daño específico que esta sustancia y otras, pueden estar causando al ambiente.

En primera instancia se debe tener en cuenta que los estudios realizados son todos extranjeros y que hasta el momento, la revisión bibliográfica, no arroja ningún estudio que haya sido publicado, sobre los efectos dañinos del Furadan en territorio Colombiano. Se desconoce si la falta de estudios se deba a la carencia de documentación acerca del producto, a la falta de interés, a la ausencia de casos por envenenamiento con este plaguicida, falta de datos o datos incompletos al presentar pacientes en centros asistenciales por envenenamientos con plaguicidas, entre otros, que motiven o promuevan interés sobre el tema, y que conduzcan a la erradicación de este peligroso producto del mercado.

En la revisión bibliográfica se pudo encontrar que el Furadan ha sido evaluado en diversos sistemas biológicos, tales como peces, ratones, ratas, conejos, perros, gatos y algunos casos de monitoreo de personas envenenadas, de los cuales se han tomado los síntomas generales ocasionados por Furadan (Domitrovic, 2000), encontrando en todos y cada uno de ellos, daños de diferentes clases. Sin embargo, existen resultados contradictorios dentro de los estudios, porque, en algunos, el Furadan resulta tóxico como en el caso de envenenamientos humanos, asociación con el incremento de ciertas enfermedades y supresión de enzimas importantes para el metabolismo, (Kinoshita, H, *et al*, 2001; Gomes Do Espirito Santo, ME, 2002; Zhen, T, 2001; Jeon, SD, 2001); en otros trabajos, los autores aseguran que el Furadan ha resultado no tener efectos adversos en cuanto a toxicidad reproductiva, teratogenicidad, carcinogenicidad y/o que la respuesta se da por espacio de algún tiempo y posteriormente el sistema biológico se repone a la intoxicación por este carbamato durante el tiempo experimental (OSHA Hazard Communication Standard, 2000; Domitrovic, HA, 2000).

Revisando antecedentes sobre el Furadan, no se encontraron análisis sobre *Allium cepa* o en otras plantas, de manera que los resultados arrojados en este estudio no han podido correlacionarse con otros previos, realizados en sistemas biológicos similares; sin embargo, esta técnica confiable por las características mencionadas a lo largo del trabajo y por la correlación hecha con otros sistemas, permite concluir que en realidad, el plaguicida evaluado tiene la capacidad de ocasionar toxicidad en plantas.

En los ensayos realizados en esta investigación con cebolla (*Allium cepa*), para evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del Furadan, se estableció que en efecto este plaguicida ocasiona daños a estos tres niveles.

En el ensayo de toxicidad realizado durante diez días, se observó inducción de cambios morfológicos en la raíz, e inhibición del crecimiento radicular de *A. cepa*, al incrementar la concentración del plaguicida; es decir que, a concentraciones más altas del Furadan, el daño era mayor. Se demostró que este producto genera efectos dañinos; estos resultados se asemejan a estudios realizados por otros autores, donde se ha hallado toxicidad de este plaguicida en otros sistemas biológicos, tales como peces, ratas, ratones y conejos, entre otros, encontrando en estos diferentes niveles de tolerancia al compuesto y posterior intoxicación (Honrubia, *et al*, 1993; Domitrovic, HA, 2000; Baligar, PN; Kaliwal, BB, 2002; Wei Shen, YJ, 2003).

Hasta donde se tiene analizado, este compuesto es metabolizado en forma similar, tanto en plantas como en animales, donde el carbofuran actúa sistémicamente en plantas y, como otros carbamatos, éste se metaboliza rápidamente en animales hasta llegar a metabolitos “menos tóxicos” (Cornell University, 2002).

En la evaluación del efecto citotóxico, se estableció que existe una relación dosis – efecto. La variabilidad observada en la depresión del IM se debió en un 39% al incremento de la concentración del Furadan que se expresó como un bloqueo premitótico, sin importar significativamente la duración del tratamiento.

Esto se infirió por que el comportamiento que sostuvo *A. cepa* fue similar en las diferentes concentraciones de Furadan a través del tiempo de experimentación; este estudio se respalda con los resultados encontrados en otro análisis donde el ciclo de células CHL era alterado y disminuido con respecto a los niveles normales de células sin tratamiento (Ion, JY, 2001).

El análisis de los efectos genotóxicos producidos por el carbofuran en *A. cepa* demostró que éste plaguicida es capaz de interactuar con el ADN de esta planta ocasionando aberraciones cromosómicas (AC), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos con Furadan. Dicha inducción fue más alta al segundo día de tratamiento y posteriormente decreció desapareciendo por completo al octavo y décimo día tratamiento. Esta observación se correlaciona con estudios previos en peces (*Cichlasoma dimerus*), donde la máxima intensidad de efectos histopatológicos producidos por acción del carbofuran en el medio, se originaron

hacia las 48 horas de exposición y luego se presentó recuperación de tejidos y retorno a la actividad de la colinesterasa (Domitrovic, HA 2000).

Sin embargo, un estudio realizado mediante la administración de carbofuran por vía oral, para analizar efectos en gónadas de ratón mostró que los daños inducidos por el compuesto a diferentes concentraciones, se producían en forma ascendente hasta los 77 días de exposición, afectando la actividad de 3 enzimas diferentes asociadas a la reproducción en estos animales (Mei Sheng, YJ; 2003).

Los resultados obtenidos en este estudio en el sistema biológico en que fue evaluado (*A. cepa*), indica que es tóxico, citotóxico y genotóxico, para las células meristemáticas de la raíz. En consecuencia, deben incrementarse los estudios a nivel de otros sistemas "*in vitro*" e "*in vivo*" con el fin de obtener resultados extrapolables a humanos que sirvan como base científica para promover mejores medidas de precaución en su uso; e incluso, buscar su retiro definitivo del mercado.

9. CONCLUSIONES

1. Después de evaluar una temperatura apta y clave para el crecimiento radicular de los bulbos, se determinó por medio de ensayos, que la temperatura adecuada a la que debían ser sometidas las cebollas dentro de la incubadora debía estar entre los 23 y 25°C. Además, se realizaron las pruebas sin luz artificial (bombillo), de esta manera, el crecimiento radicular fue mas rápido y favorable.
2. En el ensayo para medir el tiempo del ciclo celular, se estimó que el periodo en que los bulbos cumplían un ciclo completo era al cabo de 20 horas.
3. En la prueba realizada para evaluar la toxicidad del Furadan, se hallaron cambios morfológicos, que revelaron signos dañinos de este plaguicida sobre *Allium cepa*, refiriéndonos en este caso a cambios visibles en las raíces con respecto a grosor, número, longitud, consistencia, apariencia y dirección de los ápices de las raíces. lo que indicó, mediante el análisis de datos, que este plaguicida resulta tener actividad **tóxica**.
4. En cuanto al grosor, las raicillas mas afectadas fueron las sometidas a los tratamientos con mayores concentraciones de Furadan: 62.50; 31.250 y 15.625 g/L, este tipo de alteración se reflejó durante todo el tiempo experimental, las raicillas no recuperaron su forma habitual y en cambio se hicieron más robustas. El número de raíces fue notablemente reducido en todas las concentraciones de Furadan comparado con los controles, este efecto fue marcado al comienzo del experimento. La consistencia de las raíces, se torno más dura y resistente al final del ensayo (décimo día), al realizar *squash*, se pudo observar estructuras celulares con paredes gruesas y mucho más reforzadas, comparadas con los controles. Se observo, además, el cambio de dirección de los ápices de raíces que salían de las cubetas tratando de esquivar el químico del medio de crecimiento. Este cambio fue bastante pronunciado en los tratamientos más concentrados de Furadan: 62.500 ; 31.250 ; 15.625 g/L.
5. La elongación de raíces fue el componente mejor estudiado para estimar la toxicidad del Furadan sobre *Allium cepa*, y que dio aún más indicios del efecto dañino de esta sustancia. El crecimiento radicular se vio afectado con respecto a la dosis aplicada, es decir, que a mayor concentración del compuesto los meristemas radiculares crecían menos.

6. En el segundo ensayo para evaluar citotoxicidad, se estableció que el Furadan tiene efecto **citotóxico** sobre las células de *Allium cepa*, expresándose como un efecto premitótico (disminución del IM) a medida que aumenta la concentración. Se pudo inferir igualmente, que el tiempo experimental no era influyente en la disminución del IM por efectos del Furadan; así, el IM se deprimía, conservando un patrón de comportamiento constante durante el experimento.

7. Al realizar un análisis a nivel de Índice de fases, se encontró que la concentración del Furadan, en los tratamientos y el tiempo experimental, no tenía influencia estadísticamente significativa sobre las células radiculares de *A. cepa*, sin embargo, si se encontraron diferencias entre las fases. A medida que transcurría el tiempo experimental, se observó disminución en todos los índices de fase, en forma similar, conservando el patrón de comportamiento de un ciclo normal, pero con promedios de índice de fases (IF) mas bajos que los de una distribución normal (profase>metafase>anafase>telofase). Esto permite concluir que el Furadan no alteró significativamente el IF del ciclo de células radiculares de *Allium cepa*.

8. En la prueba para evaluar la genotoxicidad del Furadan, se determinó que a concentraciones entre 1.77 y 31 g/L, se provocó daño cromosómico dependiente de la duración del tiempo ($p= 0.033$), en especial para los primeros dos días de tratamiento, a diferencia del control (concentración 0.0 de Furadan), donde no se evidenciaron daños.

El comportamiento de las AC, con relación a las diferentes concentraciones se presentó en forma similar en todos los tratamientos. Esto permite concluir que el Furadan es capaz de interactuar con el ADN de *A. cepa*, permitiendo inferir que esta sustancia causa daño **genotóxico**.

9. Por último, con respecto a los efectos en general del Furadan, se puede deducir que esta sustancia utilizada por los agricultores Caucanos, es un producto con efectos tóxicos y citotóxicos y que en cierta manera puede llegar a causar alteraciones al interactuar con el ADN, por este motivo debe ser manipulado con sumo cuidado y con las precauciones necesarias, mientras este producto siga en el mercado.

10. IMPACTO

Se espera que este informe motive a realizar evaluaciones posteriores sobre el Furadan, que permitan establecer más adelante daños específicos o puntuales ocasionados a nivel genotóxico en este sistema biológico o en cualquier otro, que develen mayor información de la acción de este peligroso plaguicida. Lo cierto, es que esta clase de estudios tengan incidencia positiva y su socialización logre establecer políticas de educación, prevención, biorremediación y/o uso adecuado de los plaguicidas.

11. RECOMENDACIONES

En cuanto a la técnica, se recomienda estandarizar en cada caso los protocolos sujetándolos a las nuevas condiciones de trabajo, ya que estas tienen relevancia para obtener resultados veraces en el estudio.

La temperatura de germinación, los cambios de medio periódicos, la circulación de aire y CO₂, la luz, los mecanismos de tinción, fijación y correcta lectura de placas, entre otros, son factores importantes que ejercen condiciones favorables o desfavorables para el desarrollo radicular de *Allium cepa*, inclusive pueden llegar a tergiversar los resultados si no se regulan adecuadamente en los ensayos.

Es recomendable realizar la medición de longitud de las raíces con metro plástico y no cambiar de sistema de medida a lo largo del ensayo para evitar error en la medición y análisis de datos.

Durante todos los procedimientos se aconseja utilizar la bioseguridad (monogafas, tapabocas y guantes), tanto en los procesos de preparado de medio con Furadan, como en los procesos de manipulación de bulbos con tratamiento, corte de raíces y fijación con orceína acética.

Para conseguir una mejor fijación de meristemos radiculares se recomienda no pasar las 24 horas de fijación en la mezcla de etanol : Ácido acético (3:1) y, en tal caso, mantener los meristemos a una temperatura de 4°C.

Por último se sugiere efectuar estudios para evaluar más a fondo el Furadan, con el objetivo de esclarecer ampliamente los efectos de un compuesto utilizado masivamente en el entorno.

BIBLIOGRAFÍA

AITIO, A. Biomarkers and their use in occupational medicine. En: Environ Health. No. 6 (1999); p. 521 – 523

AMENO, K; *et al.* Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. En: Forensic Sci. Int. Vol. 116. No. 1. (Feb. 2001); p. 59

ATEEQ, B; ABUL, F. M; NIAMAT, A. M; AHMAD W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. En: Mutat. Res. No. 514 (Feb - 2002); pp. 105 – 13

AU, W.W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. En: Ocup. Medicine. No.4 (1991); p. 598

AU, W.W; WILKINSON, G; TYRING, S; LEGATOR, M; EL ZEIN, R; HALBERG, L; HEO, M. Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility. En: Environ. Health Perspec. Supplem 3 (1996); p. 579

BALIGAR, P. N; KALIWAL, B. B. Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. En: Ind Health. Vol 40. No. 4. (Oct – 2002); p. 345

BEGUM, G; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbofuran toxicity on total lipids and free fatty acidas in air breathing fish during exposure and cessation of exposure – in vivo. En: Environ Monit Assess. Vol. 70. No. 3. (Sep. 2001); p. 233

BERTHEUSSEN, K; YOUSEF, MI; FIGENSCHAU, Y. Anew sensitive cell culture test for the assessment of pesticide toxicity. En: J Environ Sci Health B. Vol. 32. No. 2. (Mar. 1997); p. 195

BOCQUENE, G; *et al.* Joint actino of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. En: Ecotoxicology. No. 4. (1995); p. 266 - 279

BRETAUD, S; SAGLIO, P; SALIGAUT, C; AUPERIN, B. Biochemical and behavioral effects of carburant in goldfish (*Carassius auratus*). En: Environ Toxicol Chem. Vol. 21. No. 1. (Jan. 2002); p. 175

(-----). Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). En: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 47. No. 2. (Oct. 2000); p. 117

BROCK, T; MANDIGAN, M. *Microbiología*. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México: 1991

CLAYTON, L. and LLOYD, C.W. The relationship between the division plane and spindle geometry in *Allium* cells treated with CIPC and griseofulvin: an anti-tubulin study. En: *Eur. J. Cell Biol.* . Vol. 34 No. 2 (Jul - 1984); p. 248

Codigo Internacional de Conducta sobre la Distribución y usos de Plaguicidas. (1986). Citado por: ESTRADA, M. Uso moderado de Plaguicidas en México. En: *Memorias Ciclo de conferencias "Hacia una renovación ambiental en México"*. (1998). Facultad de ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México.

CORTES, F; *et al.* Effects of the fungicide tridemorph on mitosis in *Allium cepa*. En: *Cytobios.* Vol. 34. (1982); p. 181 - 190

CREMLYN, R. *Pesticides, preparation and mode of action*. N.Y., EUA: 1979. p. 360

CHAPALAMADUGU, S; CHAUDRY, G. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamate and organophosphate. En: *Critical Reviews in Biotech.* Vol. 12. No. 5-6. (1992); p. 357 – 389

CHAUHAN, LK; *et al.* Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure. En: *Mutat. Res.* Vol. 465. No. 1 – 2. (Feb. 2000); p. 123

CHAUHAN, L.K.S; DIKSHITH, T.S.S and SUDARARAMAN, V. Efecto of deltamethrin on plant cells. I Cytological effect on the root meristems of *Allium cepa*. En: *Mutation Research.* No. 171 (1986); p. 25

(-----); DIKSHITH, T.S.S and SUDARARAMAN, V. Efecto of deltamethrin on plant cells. I Cytological effect on the root meristems of *Allium cepa*. En: *Mutation Research.* No. 171 (1986); p. 25

(-----);SAXENA, P.N; GUPTA, S.K. Evaluation of cytogenetic effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium sativum*. En: *Biomed Environ Sci.* Vol. 14. No. 3. (sep – 2001); p. 214

DE LIMA MORAES, D.S; JORDAO, B.Q. Evaluation of genotoxic potential of municipal waste water discharged into the Paraguay River during periods of flood and drought. En: *Environ Toxicol.* Vol. 16 No. 2. (2001); p. 113

DEGRASSI, F and RIZZONI, M. Micronucleus test in *Vicia faba* roots tips to detect mutagen damage in fresh – water pollution. En: Mut. Res. June (1981).

DEPARTAMENT OF TOXICOLOGY. Dynamic observation of carbofuran on symbolic enzymes in testis of rats. En: Wei Sheng Yan Jiu. Vol 32. No. 1. (Ene – 2003); p. 8 - 9

DOMITROVIC, H. A. Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pises, Cichlidae) expuestos a carbofuran en ensayos de toxicidad aguda y ensayos subletales. En: Comunic Cientif. Y Tecnológicas. (2000); p. 13 - 16

DOVAGLIUK, A.I; KALINIYAK, T.B; BLIUM, Ia.B. Assesment of phyto and cytotoxic effects of heavy metals and aluminium compounds using onion apical root meristem. En: Tsiol Genet. Vol. 35. No. 1. (ene – Feb 2001); p. 3

(-----). Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium cepa* L. seed roots. En: Tsiol Genet. Vol. 35. No. 2. (Mar – abr – 2001); p. 3

ESTRADA, M. Uso moderado de Plaguicidas en México. En: Memorias, Ciclo de conferencias “Hacia una renovación ambiental en México”. (1998). Facultad de ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México.

EVSEEVA, T.I; GERAS´KIN, S.A; KHRAMOVA, E.S. Cytogenetic effects of separate and combined actino of 232 and Cd nitrates on allium cepa root meristem cells. En: Tsiologia. Vol. 43. No. 8. (2001);p. 803

(-----). Genotoxicity an toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium* – test. En: J Environ Radioact. Vol. 68. No. 3. (2003); p. 235

FELDMAND, L.J. The development and dynamics of the root apical meristem. En: Am. J. Bot. Vol. 9. Nº. 71. (oct – 1984); pp: 1308 – 14.

FISKESJO, G; LASSEN, C; RENBERG, L. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. En: Chem Biol Interact. Vol 34 No. 3. (15 Mar – 1981); p. 333

GOMES DO ESPIRITO SANTO, M. E; *et al.* Investigation of deaths in an area of groundnut plantations in Casamance, South of Senegal after exposure to carbofuran En: Expo Anal Environ Epidimiol. Vol 12. No. 5. (Sep – 2002); p. 381

GRANT, W.F; OWENS, E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. En: *Mutat Res.* Vol. 488. No. 8. (May – 2001); p. 93

GUPTA, RC; MILATOVIC, D; DETTBARN, WD. Nitric oxide modulates high – energy phosphates in brain regions of rats intoxicated with diisopropylphosphorofluoridate or carbofuran: prevention by N-tert-butyl-alpha-phenylnitronone or vitamin E. En: *Arch. Toxicol.* Vol 75. No. 6. (Aug. 2001); p. 346

HONRUBIA, M.P.; HERRAEZ, M.P. y ALVAREZ, R. The carbamate insecticide ZZ-Aphox® induced structural changes of gills, liver, gall-blader, heart, and notochord of *Rana perezii* tadpoles. En: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol 25. (1993); pág. 184 – 191.

HOYOS, G. L. Monitoreo, susceptibilidad y cancer. Cauca – Colombia: 1998. pp:7 –9

JEON, S.D; LIMJ.S; MOON, C.K. Carbofuran suppresses T-cell-mediated immune responses by the suppression of t-cell responsiveness, the differential inhibition of cytokine production, and NO production in macrophages. En: *Toxicol Lett.* Vol. 119. No. 2. (Feb – 2001); pág. 143

KINOSHITA, H; HIROSE, Y; *et al.* A case of carbamate poisoning in which GCMS was useful to identify causal substance and to decide the appropriate treatment. En: *Chudoku Kenkyu.* Vol 14. No. 4. (Oct – 2001); p. 343

LOPEZ, M.E; GIORDANO, O.S; LOPEZ, L.A. Sesquiterpeno lactona dehydroleucodine selectively induces transient arrest in G2 in *Allium cepa* root meristematic cells. En: *Protoplasma.* N0. 219 (Feb. 2002);p. 82
MA, T.H.; *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. En: *Mutat. Res.* No. 334 (1995); p. 185

MA, T. H; *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. En: *Mutat Res.* Vol 334. No. 2. (abr – 1995); p. 185

MAHGOUB, A.A; EL – MEDANY, A.H. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. En: *Pharmacol Res.* Vol 44. No. 2. (Ago – 2001); p. 73 - 80

MARCANO, L.; CARRUYO I.; DEL CAMPO A.; MONTIEL X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. En: *Environ Res.* Vol. 88. No. 1. (Ene - 2002); p. 30

NIÑO, L; ACEVEDO, E; BECERRA, F. control de adultos del gusano blanco de la papa con trampas de follaja. En: FONAIAP Divulga. Vol. 67. (2.000); p.41-43.

ORTEGA, C; ESPINOSA, T; LÓPEZ, C. El control de riesgos para la salud generados por plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el tratado de libre comercio. Salud Pública de México INSP. Vol. 36. No. 6. (1994); p. 624 – 632

ORTIZ, M. H; *et al.* Plaguicidas organofosforados y ambiente. En: Biotecnología. Vol. 3. No. 2. (1997); p. 129 – 151

PANT, N; *et al.* Effect of oral administration of carbofuran on male reproductive system of rat. En: Hum Exp Toxicol. Vol. 14. No. 11. (Nov. 1995); p. 889

PANZERA, F; *et al.* Competence for nuclear replication and the NOR – chromosomes of *Allium cepa* L. En: Eur J Cell Biol. Vol 72. No. 1. (Ene-1997); p. 9

PEFFLEY, E.B.and VRIES, J.N. Giemsa G-banding in *Allium*. En: Biotech Histochem. Vol. 68 No. 2. (Mar - 1993); p. 83

PELAYO H. R; LASTRES, P; DE LA TORRE, C. Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. En: Planta. Vol. 212. No. 3. (Feb – 2001); p. 444

PETER, H. J. The role of root system architecture and root hairs in promoting anchorage against uprooting forces in *allium cepa* and root mutants of *Arabidopsis thaliana*. En:Journal of Exp. Botany. Vol. 53. No. 367. (Feb – 2002); pp.333 - 340

POGACNIK, L; FRANKO ,M. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor. En: Biosens Bioelectron. Vol 18. No. 1. (Ene – 2003); p. 1 - 9

POST,G. Textbook of fish health. T.F.H. publications; USA: 1987. p. 288

RALPH, S; PETRAS, M. Caged amphibian and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. En: Mutation research. No. 413 (1998); p. 236

RAM, RN; SINGH IJ; SINGH, DV.Carbofuran induced impairment in the hypothalamo-neurohypophyseal-gonadal complex in the teleost, *Channa punctatus* (Bloch). En: Environ Biol. Vol. 22. No.3, (Jul. 2001); p. 193

RANK, J. and NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. En: Mutat. Res. No. 390 (Abr - 1997); p. 121

(-----); *et al.* Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. En: Hereditas. Vol 136. No. 1. (2002); p. 13

RICROCH, A; and BROWN, S.C. DNA base composition of *Allium* genomes with different chromosome numbers. En: Elsevier Science (2001)

ROBLEDO, N. Análisis de residuos de plaguicidas en hortalizas. En: Memorias, Ciclo de conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México: 1998

RODRIGUEZ, H.H. Determinación de toxicidad y bioactividad de cuatro insecticidas orgánicos recomendados para el control de plagas en cultivos hortícolas. En: Benson Institute. 2001

RODRIGUEZ, L. (2000). Biodegradación y Persistencia del Paratión Metílico en Suelos, por *Flavobacterium* ATCC 27551. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. p. 62

RUANGYUTTIKARN, W. Children's plasma cholinesterase activity and fatal methomyl poisoning. En: J. Med. Assoc. Thai. Vol. 9. Nº. 84. -(sep - 2001); pp: 1344 - 50

SALAM, E.A; HUSSEIN, A. The mutagenicity of gramaxone (paraquat) on different eukariotic systems. En: Mutat. Res. No. 19 (1993); p. 89

SAXENA, S; ASHOK, BT; MUSARRAT, J. Mutagenic and genotoxic activities of four pesticides: captan, foltaf, phosphamidon and furadan. En: Biochem. Mol. Biol. Int. Vol. 41. No. 6. (May. 1997); p 1125

SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA. El tratamiento de las intoxicaciones por plaguicidas. Parte I. Consejo Nacional de Prevención de Accidentes. México: p. 18

SHARDEIN, J. L.; SCHWETZ, B. A., and KENEL, M. F.. Species sensitives and prediction of tetratogenic potencial: Environmental health perspectives. McGraw-Hill. EE.UU.: (1985).

SOMASHEKAR, R.K; PRABHAKAR, G.H. and GOVINDEGOWDA, M.T.
Mitodepressive and clastogenic effects of piperidine in *Allium cepa*. En: Mut. Res. No. 118 (1983); p.289

STEVENSON, M; *et al.* Comparative analysis of crossover exchanges and chiasmata in *Allium cepa* x *Fistulosum* after genomic in situ hybridization (GISH). En: Chromosome Res. Vol 6. No. 7. (Nov – 1998); p. 567 – 74.

SUZUKI, G; *et al.* BAC FISH análisis in *Allium cepa*. En: Genes Gent Syst. No. 76 (Ago. 2001); p. 251

VAIJAPURKAR; *et al.* Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose. En: Radiat Meas Vol. 33 No. 5. (Oct - 2001); p. 833

YOON, J. Y; *et al.* N – nitrosocarbofuran, but not carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells. En: Toxicology. Vol. 169. No. 2. (Dic – 2001); p. 153

YOON, JY. Nitrosocarbofuran, but no carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells. En: Toxicology. Vol. 2. N°. 139. (Dic – 2001); pp: 153 – 61

YOUSEF, MI; *et al.* Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. En: J Environ Sci Health B. Vol. 30. No. 4. (Jul. 1995); p. 513

YI, H; MENG, Z. Genotoxicity of hydrates sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *vicia faba*. En: Mutat Res. Vol 537. No. 1. (May – 2003); p. 109

ZHENG, T; ZAHM, SH; *et al.* Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodking lymphoma. En: J. Occup. Environ Med. Vol 43. No. 7. (Jul – 2001); pág. 641

ZINKL, J. G; *et al.* Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. Bull. En: Environ Contam. Toxicol. Vol 38. (1987); p. 29 - 35

Documentos en línea

Información obtenida de Internet

Carbofuran (Furaddan) Chemical Fact Sheet 6/84. comstock Hall Cornell University. [On line] Ithaca, New York (2001). 14853-0901 (607)-255-186
Ultima modificación 03/01/2001. [citado 01/04/2003]. Disponible en Internet:
<<http://www.pmp.cce.cornell.edu.knowledgebank.im.org>>

Carbofuran. Canola Council of Canada: [online]. Winnipeg (Canada):1999. Última modificación 19 julio/2001. [citado 9 octubre/2003]. Disponible en internet: <<http://www.canola-council.org/production/furadan.html>>

Clasificación de pesticidas. Comisión nacional de seguridad y salud en el trabajo [on line]. Torrelaguna 73, 28027 –Madrid (España):2004. Última modificación mayo/2004. [citado 9 febrero/2005]. Disponible en internet: <<http://www.mats.es/insht/principal/mapa.htm>>

Clasificación de plaguicidas. [on line]. Responsable del sitio: Biol. Ma. Guadalupe Lomelí (Colombia): 2003. Última modificación noviembre /2004. . [Citado 3 febrero/ 2003]. Disponible en internet: <[http://www. Sagan-.org](http://www.Sagan-.org)>

Gráfica carbofuran. Michael W. Davison and The Florida State University. (EUA): 1995-2003. Última modificación 4 marzo/2003. [Citado 13 octubre 2003]. Disponible en internet: < <http://www.micro.magnet.fsu.edu/pesticides/pages/carbofuran.html>. >

ToxFAQS™ para Piretrinas y Piretroides (*Pyrethrins and Pyrethroids*). Registro de enfermedades División de Toxicología 1600 Clifton Road NE, MS F Atlanta, GA 30333. (2.003). Creada septiembre/2003. Última modificación 25 octubre/2.004. [citado 3 febrero/2005]. Disponible en internet: <<http://www.atsdr.cdc.gov.html>. >