ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION
Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición Vol. 54 N° 4, 2004

Detección de plaguicidas en vegetales de Costa Rica mediante la inhibición de colinesterasas humanas

Karl Schosinsky Nevermann y Eugenia Quintana Guzmán

Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET) y Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Mediante un método sencillo y de bajo costo basado en la inhibición de la actividad de las colinesterasas sérica y eritrocítica, se detectó la presencia de plaguicidas organofosforados y/o carbamatos en lechuga (*Lactuca sativa)*, culantro (*Coriandum santivum)* y apio (*Apium graveolens*) obtenidos de las Ferias del Agricultor del Valle Central de Costa Rica. El porcentaje de inhibición de las colinesterasas se relaciona con la cantidad de plaguicida presente en el vegetal. El 13% del total de muestras analizadas resultaron ser positivas por estos plaguicidas al utilizar colinesterasa sérica como indicador y el 33% al utilizar colinesterasa eritrocítica. El lavado y el cocinado de los vegetales para ambas colinesterasas no causan mayor efecto en la eliminación del plaguicida pero tiende a disminuir ligeramente la concentración del mismo. Se encontró evidencia estadística altamente significativa (p = 0,0001) indicando que la colinesterasa eritrocítica presenta mayor sensibilidad analítica con respecto a la sérica. Es de suma importancia determinar la presencia de plaguicidas en los productos agrícolas que consumimos, pues éstos están expuestos a contaminación por fumigación directa, contaminación de los suelos y aguas de riego, y por lo general son productos que se consumen sin un lavado adecuado y sin cocción.
Palabras clave: Colinesterasa sérica, colinesterasa eritrocítica, organofosforados, carbamatos, plaguicidas, vegetales, hortalizas.

SUMMARY. Pesticide detection in Costarican vegetables based on the inhibition of serum and erythrocytic human cholinesterases. A simple and low cost method able to detect the presence of pesticides, organophosphates and carbamates based on the inhibition of serum and erythrocytic cholinesterases, was used in lettuce (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandum santivum*) and celery (*Apium graveolens*) obtained from the Ferias del Agricultor from Valle Central of Costa Rica. The percentage inhibition of cholinesterases is related to the presence of plaguicide in the vegetable. Thirteen percent of the analyzed samples were positive for plaguicides using serum cholinesterase and 33% for erythrocytic cholinesterase. Washing and cooking the vegetables does not eliminate the presence of plaguicides but they lower slightly the concentration. Statistical evidence (p = 0,0001) indicates that erythrocytic cholinesterase has higher analytical sensitivity than serum cholinesterase. It is very important to establish the degree of contamination with pesticides in these agricultural products because they are exposed to direct contamination by fumigation, soil contamination and irrigation water, and are products that are often consumed without adequate cooking and washing.
Key words: Serum cholinesterase, erythrocytic cholinesterase, organophosphates, carbamates, pesticides, vegetables, hortalices.

INTRODUCCION

Los plaguicidas son sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Esto incluye a los vectores de enfermedades humanas o animales y a las especies no deseadas de plantas o animales que pueden causar perjuicio o interferir en la producción, elaboración, transporte o comercialización de alimentos (1-3).

Los plaguicidas son utilizados tanto en actividades agrícolas como pecuarias y de salud pública por la que se fabrican aproximadamente 1.5 millones de toneladas al año (4). Se estima que actualmente el 85% de los plaguicidas empleados en el mundo se dedican al sector agropecuario (5-8). Los plaguicidas han dado un gran aporte a la agricultura y junto a los fertilizantes son los que más han contribuido en el incremento del rendimiento agropecuario (9). Costa Rica es el país centroamericano que más agroquímicos utiliza y se calcula que casi duplica la cantidad per cápita de producto consumido con el resto de la región (10).

El uso indiscriminado de estas sustancias está ocasionando contaminación de aguas, suelo y alimentos, teniendo una incidencia negativa sobre la vida silvestre y el hombre (11). La presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos que se derivan de su uso durante las diversas fases de la producción, almacenamiento, elaboración, preparación y comercialización ha despertado gran interés por sus repercusiones en la salud y como un factor preponderante que interviene en las relaciones comerciales internacionales.

Financiamiento: Vicerrectoría de Investigación y Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Los plaguicidas organofosforados y algunos carbamatos son inhibidores de la colinesterasa, enzima humana que cataliza la hidrólisis de ésteres del neurotransmisor colina, por lo que la determinación de la actividad de esta enzima es un indicador de la exposición a estos compuestos (12). Hay dos tipos de colinesterasas, la sérica y la eritrocítica. La actividad de la enzima sérica disminuye más rápido que la eritrocítica, por lo que la determinación de la actividad sérica es un índice muy sensible para prevenir intoxicación. La determinación de la actividad de la enzima eritrocítica es de importancia en los sistemas de vigilancia para intoxicaciones crónicas ya que permanece disminuida por más tiempo que la sérica (13).

La intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos produce efectos residuales, sobre todo en el Sistema Nervioso Central y en el Periférico, así como en las funciones neuromusculares (14-16). Se ha documentado que ciertos plaguicidas están asociados con el desarrollo de cáncer, esterilidad y malformaciones congénitas y se presentan con frecuencia intoxicaciones moderadas y severas. El contacto con el plaguicida se da por aplicación directa, arrastre por el viento, por el agua o por tomarlo del suelo contaminado o de otras fuentes del ambiente (17).

El uso masivo de plaguicidas para proteger la agricultura requiere de la utilización de herramientas adecuadas para la detección de sus residuos en los alimentos y en el agua para garantizar una protección ambiental y dar seguridad al consumidor de estos productos agrícolas (18). Es de suma importancia determinar el grado de contaminación por plaguicidas de los productos agrícolas que consumimos, pues estos están expuestos a contaminación por fumigación directa, contaminación de los suelos y aguas de riego, y por lo general son productos que se consumen sin un lavado adecuado y sin cocción.

En un estudio piloto realizado por Concepción (19) en productos agrícolas de la Feria del Agricultor de Costa Rica mediante pruebas in vitro de inhibición de las colinesterasas, se encontró inhibición considerable en la colinesterasa sérica en cebolla, lechuga, apio, culantro y perejil y de colinesterasa eritrocítica en chile dulce, fresas, tomate, culantro, perejil y repollo. Basados en este principio determinamos la presencia de organofosfatos y carbamatos en lechuga, apio y culantro de las Ferias del Agricultor del Valle Central de nuestro país.

El fundamento para la determinación de la actividad enzimática de las colinesterasas se basa en la siguiente reacción (20):

Sustrato + colinesterasa ⬅ tiocolina + sal del ácido

Tiocolina + DTNB ⬅ TNB + disulfuro mixto

La formación de TNB es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Sustrato: propioniltiocolina para colinesterasa sérica y acetiltiocolina para colinesterasa eritricítica.
DTNB: ditionitrobenzoato (incoloro)
TNB: tionitrobenzoato (amarillo)

La exposición a bajos niveles de plaguicidas durante periodos prolongados puede producir en humanos efectos nocivos tales como daños en el sistema nervioso central, malformaciones congénitas, efectos mutagénicos y cáncer, daños en la piel, pulmones, ojos, sistema inmunológico y esterilidad en el hombre (21). Siendo que los organofosforados y carbamatos son los plaguicidas de mayor uso en el agro costarricense (22) y a que el método a utilizar detecta estos químicos, consideramos de suma importancia determinar el grado de contaminación por plaguicidas de los productos que consumimos mediante la utilización de una prueba de inhibición enzimática que presenta la ventaja sobre los métodos tradicionales (cromatografía líquida) en que es sencilla, de mucho menor costo y requiere de menor tiempo de análisis.

METODOS

Muestras: Se obtuvieron 50 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), 50 de culantro (*Coriandum santivum)* y 50 de apio (*Apium graveolens*) en las Ferias del Agricultor de Desamparados, Tres Ríos, Alajuela, Escazú y Guadalupe, correspondiendo a la estación lluviosa de julio a octubre y al verano de febrero a abril para un total de 150 muestras. Las Ferias del Agricultor fueron seleccionadas con una probabilidad proporcional a su tamaño, entre aquellas que se realizan en el Valle Central. Se escogieron las de tamaño mediano a las cuales llegan entre 100 y 200 vendedores. Se recogieron 5 muestras de cada vegetal en diferentes puestos de venta dentro de la misma feria. Cada producto agrícola se empacó individualmente en bolsa plástica y como muestras control se utilizaron los mismos productos agrícolas pero de origen orgánico.

Extractos: Se pesaron 20 g de cada muestra sin lavado previo, se procesaron en un extractor de jugos convencional. Posteriormente se analizó "in vitro" el grado de inhibición de las colinesaterasas sérica y eritrocítica de acuerdo a la metodología establecida por Concepción (19) con ligeras modificaciones, como utilizar la mitad del volumen de extracto vegetal y suero o eritrocitos y duplicar el tiempo de incubación de 30 minutos a 60 minutos. Los productos agrícolas sin lavado que dieron un porcentaje de inhibición enzimática superior al 15% se consideraron positivas por plaguicidas y fueron nuevamente analizados previo lavado con agua del tubo

y también previa cocción del mismo en baño de agua en ebullición por 10 minutos.

Métodologia: se utilizó como fuente de colinesterasa sérica una mezcla de sueros humanos a los que se les determinó su actividad por un método cinético comercial (Biotec Internacional S.A., San José, Costa Rica), peparándose alícuotas de 2,0 ml y se mantuvieron a -10°C. Como fuente de colinesterasa eritrocítica se utilizó eritrocitos lavados con solución salina isotónica por triplicado y resuspendidos con la misma solución a un volumen de glóbulos rojos al 50% y se almacenaron -10 °C en alícuotas de 1 ml.

Colinesterasa sérica: se mezclaron 100 µl de suero con 100 µl del extracto del producto agrícola y se incubaron 1 hora a 37°C. Se colocó 20µl de esta mezcla en 2,0 ml de reactivo de color y 100 µl de sustrato, se homogenizó y se determinó el A/min. a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. Para calcular el porcentaje de inhibición enzimática se analizó un control utilizando un extracto libre de plaguicidas (cultivo orgánico) de cada vegetal analizado, cuya actividad enzimática corresponde al 100% de actividad.

Colinesterasa eritrocítica: se mezclaron 100 µl de eritrocitos con 100µl del extracto del producto agrícola y se incubaron 1 hora a 37°C. Se colocaron 10 µl de esta mezcla en 2,0 ml de reactivo de color, se homogenizó e incubó por 10 min a 30°C. Se agregaron 100 µl de sustrato, se homogenizó y se determinó el ΔA/min. a una longitud de onda de 460 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. Se aplicó el mismo procedimiento para el análisis de las muestras control.

Cálculos:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\Delta A/\text{min. muestra}}{\Delta A/\text{min. control}} \quad (100) - 100$$

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se emplearon pruebas de Chi-cuadrado para proporciones con tablas de contingencia dada la naturaleza de los datos, se determinó si dos variables están relacionadas o son independientes entre sí con un 95% de confianza. Se utilizó el programa estadístico JMP de SAS.

RESULTADOS

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos con ambas colinesterasas según porcentaje de inhibición para las muestras sin lavar, lavadas y cocinadas de los vegetales analizados.

TABLA 1
Muestras positivas por colinesterasa sérica en vegetales

% de inhibición	Sin lavar			Lavada			Cocinada		
	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro
16-25	0	1	0	2	1	0	2	3	1
26-35	3	4	0	2	1	1	1	2	1
36-45	1	1	2	1	0	1	0	1	0
>46	4	2	2	1	2	1	4	1	1
Total	8	8	4	6	4	3	7	7	3

Total de muestras sin lavar: 150 Total de muestras lavadas: 20
Total de muestras cocinadas: 20

TABLA 2
Muestras positivas por colinesterasa eritrocítica en vegetales

% de inhibición	Sin lavar			Lavada			Cocinada		
	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro
16-25	2	6	9	2	2	9	2	2	9
26-35	2	1	7	3	1	4	3	4	2
36-45	5	1	5	4	0	4	3	3	4
>46	3	5	3	0	4	2	3	3	2
Total	12	13	24	9	7	19	11	12	17

Total de muestras sin lavar: 150 Total de muestras lavadas: 49
Total de muestras cocinadas: 49

En la Tabla 3 se comparan las muestras positivas para ambas colinesterasas, sin lavar y lavadas y en al Tabla 4 sin lavar y cocinadas. El análisis estadístico evidencia que no hay diferencias significativas (p = 0,822) entre las muestras positivas sin lavar y lavadas ni tampoco entre las positivas sin lavar y cocinadas (p = 0,918).

TABLA 3
Total de muestras positivas sin lavar y lavadas por colinesterasa sérica y eritrocítica

Colinesterasa	Sin lavar	Lavadas
Sérica	20	13
Eritrocítica	49	35
Total	69*	48*

Total de muestras para cada colinesterasa: 150. *p= 0,822

TABLA 4
Total de muestras positivas sin lavar y cocinadas por colinesterasa sérica y eritrocítica

Colinesterasa	Sin lavar	Cocinadas
Sérica	20	17
Eritrocítica	49	40
Total	69*	57*

Total de muestras para cada colinesterasa: 150.
*p = 0,918

La Tabla 5 muestra los resultados de ambas colinesterasas según el vegetal analizado (lechuga, apio y culantro), donde se observa diferencia significativa en la proporción de muestras positivas (p = 0,01789) en la colinesterasa eritrocítica sin que se obtenga con la colinesterasa sérica (p = 0,3973).

TABLA 5
Total de muestras positivas por colinesterasa sérica y eritrocítica según el vegetal

Colinesterasa	Lechuga	Apio	Culantro
Sérica*	8	8	4
Eritrocítica†	12	13	24
Total	20	21	28

Total de muestras para cada colinesterasa: 150.
*p = 0,3973
†p = 0,01789

En la Tabla 6 se anota el número de muestras positivas según el vegetal y el origen de la enzima utilizada, donde hay evidencia estadística (p<0,0001) para considerar que la proporción de muestras positivas es diferente para las dos colinesterasas.

TABLA 6
Total de muestras positivas por colinesterasa sérica y eritrocítica

Vegetal	Sérica		Eritrocítica	
	N°	%	N°	%
Lechuga	8	5	12	8
Apio	8	5	13	9
Culantro	4	3	24	16
Total	20*	13	49*	33

Total de muestras para cada colinesterasa: 150 (cincuenta de cada vegetal).
*p < 0.0001

DISCUSION

Se analiza mediante los datos de la Tabla 1 que 20 (13%) de 150 muestras dieron positivas por plaguicidas al utilizar colinesterasa sérica como marcador. De éstas 19 (12,5%) presentaron porcentajes de inhibición superiores al 25%, lo que consideramos que indica contaminación importante. La Tabla 2 muestra que 49 (33%) de 150 muestras analizadas con colinesterasa eritrocítica resultaron ser positivas, de las cuales el 32 (21%) mostró porcentajes de inhibición superiores al 25% indicando también un alto grado de contaminación por plaguicidas.

Es importante destacar que si bien el lavado convencional con agua potable y el cocinado de los vegetales en agua a ebullición por 10 minutos, tanto para la colinesterasa sérica como para la eritrocítica, no causa mayor efecto en la eliminación del plaguicida, si tiende a disminuir la cantidad del mismo ya que los porcentajes de inhibición disminuyen.

En la Tabla 3 se comparan las muestras positivas sin lavar con la muestras positivas lavadas evidenciando que no hay diferencia significativa (p = 0,822) entre las muestras positivas tanto para la colinesterasa sérica como para la eritrocítica. Es decir que el lavado de estos vegetales no elimina la presencia del plaguicida.

En la Tabla 4 también se observa que no hay diferencia significativa (p = 0,918) entre las muestras positivas sin lavar y las cocinadas al utilizar como marcadores ambas colinesterasas. Esto demuestra que la cocción tampoco elimina la presencia del agente tóxico en los vegetales.

Con respecto a los tres vegetales utilizados (lechuga, apio y culantro) se observa diferencia significativa en la proporción de muestras positivas (p = 0,01789) cuando se utiliza colinesterasa eritrocítica. Es decir que la cantidad de muestras positivas varía según el tipo de vegetal, dando mayor número de positivos el culantro con un 48% del total de los culantros analizados, mientras que para lechuga y apio un 25% mostraron positividad. Por otro lado no hay diferencia en la cantidad de muestras positivas cuando se utiliza la colinesterasa sérica (p = 0,3973) y el tipo de vegetal utilizado. Sin embargo, el 16% del total de lechugas y apios analizados mostraron positividad al igual que un 82% del total de culantros (Tabla 5). Se observa con estos resultados un mayor porcentaje de positividad al utilizar colinesterasa eritrocítica.

El Tabla 6 muestra evidencia estadística altamente significativa (p = 0,0001) indicando que la proporción de muestras con un porcentaje de inhibición positivo es diferente entre ambas colinesterasas, presentando mayor sensibilidad la eritrocítica. Esto se debe probablemente a que la colinesterasa sérica requiere mayor tiempo de incubación con el plaguicida presente en el vegetal para que aumente la sensibilidad del método.

Con respecto a la estación del año se observa diferencia significativa (p = 0,0039) para la colinesterasa sérica, indicando que el número de muestras positivas en invierno es menor que en verano. De lo contrario, con la colinesterasa eritrocítica no hay diferencia significativa (p = 0,384) entre las dos estaciones del año.

Se concluye que este método basado en la inhibición de las colinesterasas es altamente prometedor para determinar mediante estudios de escrutinio la presencia de organofosforados o carbamatos en vegetales. Tiene la ventaja sobre los métodos convencionales (cromatografía líquida de alta resolución e inmunoenzimáticos) su bajo costo y rapidez de análisis sin que se requiera de equipo sofisticado de alto costo y poca versatilidad. Sin embargo este método no identifica ni cuantifica el tipo de pesticida pero sí permite establecer el grado de toxicidad que puede producir al ser humano, ya que utiliza colinesterasas humanas como indicadores. Este estudio piloto es el primero que se realiza en Costa Rica y probablemente en Latinoamérica utilizando la inhibición enzimática, consideramos que la metodología debe optimizarse para lograr sensibilidad y exactitud óptimas.

REFERENCIAS

1. FAO. International Code of Conduct on the Distribution and use of Pesticides. Rome: Food Agriculture Organization of the United Nations; 1986.
2. International Programme of Chemical Safety (IPCS). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 1990-1991. Geneve: WHO/IPCS/91
3. Anonymous. Questions and answers about pesticides. Grounds Maintenance 2002; (37): 1-10.2
4. Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R. Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticide list. The Lancet 2002 Oct 12; 360(9340):1163-1167.
5. Edwards C.A. Agrochemicals as Enviromental Pollutants. En: VanHofsten B and Ekstrom G. editores. Control of Pesticide Applications and Residues in Food. A guide and directory 1986. Yppsala, Suecia: Science Press; 1986. p. 1-9.
6. World Bank. World Development Report. New York, USA: Worl Bank; 1982.
7. Food and Agriculture Organization. Agriculture: toward 2000. Roma, Italia: FAO; 1981.
8. Situación epidemiológica de las intoxicaciones agudas por plaguicidas en Centroamérica, 1992-2000. Boletín Epidemiológico OPS 2002; 23(3): 5-9.
9. Barquero M, Constenla M. Determinación de plaguicidas organoclorados en tejido adiposo en Costa Rica. Biol Trop 1986; 34(1): 7-12.
10. Mora S. Plaguicidas. Balance de un problema. Aportes 1997;115: 18-21.
11. Carazo E, Fuentes G, Constenla M. Residuos de insecticidas organofosforados en repollo. Turrialba 1976; 26:321-325.
12. Hunter D, Padilla S. Influence of storage conditions on the stability of cholinesterase activity in plasma and brain tissue taken from carbamate or organophosphorus pesticide-treated rats. Tox Meth 1999; 9:189-199.
13. Moss D, Henderson A, Kachman J. En: C Burtis. editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994. p.877-882.
14. Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. ECO/OPSIMS; 1991.
15. O"Malley M. Clinical evaluation of pesticida exposure and poisonings. The Lancet 1997; 249: 1161-1166.
16. Marquardt S. Pesticidas, parakeets, and unions in the Costa Rica banana industry, 1938-1962. Lat Amer Res Rev 2002; 37(2):3-36.
17. Fernández L. Manejo seguro de plaguicidas. Agroindustria. San José, Costa Rica: Leuper S.A; 1983.
18. Shulze H, Schmid R, Bachmann T. Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction. Anal Bioanal Chem 2002; 372: 268-272.
19. Concepción M. Detección "in vitro" del grado de inhibición en las colinesterasas humanas, sérica y eritrocítica, por plaguicidas organofosforados y carbamatos de mayor uso en Costa Rica. Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica para optar por el grado de Magister Scientae. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología; 2000.
20. Henderson A, Moss D. Enzymes. En: Burtis C A, Ashwood E R, editors. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5 ed. New York: W. B. Saunders Company; 2002. p 385-387.
21. Vaquerazo B. Establecimiento de controles normativos (restricciones y prohibiciones) a los plaguicidas sintéticos. Memoria: El uso de plaguicidas y su relación con el desarrollo en Costa Rica, OPS/OMS Proyecto PLAGSALUD, San José, Costa Rica. 2001.
22. Chavarri E. Situación general del uso de agroquímicos en Costa Rica, su impacto en la salud y el ambiente. Memoria: El uso de plaguicidas y su relación con el desarrollo en Costa Rica, OPS/OMS Proyecto PLAGSALUD, San José, Costa Rica. 2001.

Recibido: 11-03-2004
Aceptado: 18-10-2004