

CAPÍTULO 3

Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes

Pedro Carriquiriborde

En el capítulo previo, se han identificado las principales familias de contaminantes ambientales y los factores que determinan su distribución y destino en el ambiente. Una vez en él, dichos contaminantes pueden ser incorporados por los seres vivos, acumularse y alcanzar concentraciones internas en sitios blanco desencadenando así su acción tóxica. Según McCarty (1990), la toxicidad de un contaminante es la resultante de tres fases de acción (Figura 3.1.). Una primera fase de **exposición**, dada por los factores físicos químicos y biológicos que determinan su biodisponibilidad, o sea, en que grado un contaminante puede ser incorporado por el organismo. Luego una segunda fase de **partición**, dada por los factores que condicionan la absorción, distribución, metabolización y excreción, que determina la toxicocinética y por tanto la bioacumulación del contaminante. Finalmente, una tercera fase de **potencia**, dada por la concentración interna del contaminante que, según su mecanismo de acción, interaccionará con las biomoléculas en el sitio blanco, y sumado a los mecanismos de reparación/compensación que posea el organismo, determinará la toxicodinámica y consecuentemente la toxicidad del contaminante.

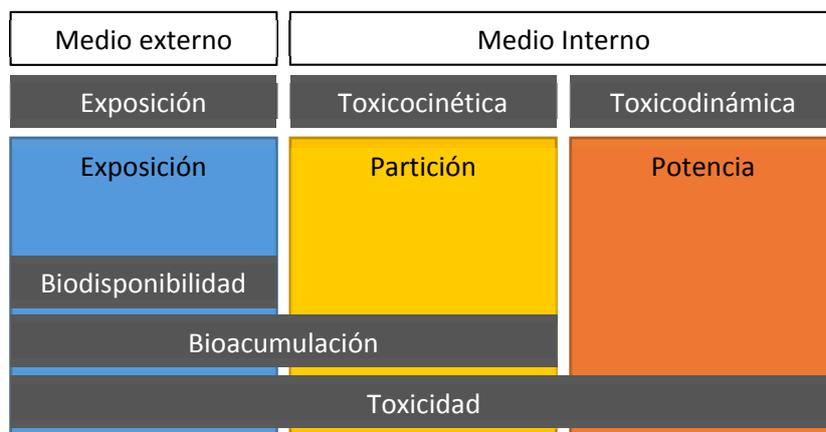


Figura 3.1: Las tres fases de la acción tóxica propuesta por McCarty (1990)

En el presente capítulo se tratarán las dos primeras fases, identificando los principales factores que afectan la incorporación y los procesos que determinan la acumulación de los contaminantes en los seres vivos y en los próximos capítulos se tratarán los efectos tóxicos que inducen.

Factores ambientales que condicionan la acumulación de los contaminantes en la biota

Una vez que los contaminantes ingresan al ambiente y se distribuyen en los diferentes compartimientos ambientales, no todas las moléculas del mismo allí presentes son capaces de ingresar a los organismos y producir efectos adversos. Por consiguiente, se define como **biodisponibilidad ambiental** a la proporción del total de la masa de un contaminante hallada en un compartimiento ambiental que se encuentra en una forma química (biodisponible) capaz de ser absorbida por los organismos vivos y producir un efecto biológico adverso. Este concepto puede diferenciarse del concepto de **biodisponibilidad farmacológica** al cual se refiere a la proporción de la dosis administrada que alcanza su sitio blanco dentro del organismo.

Como fuera mencionado en el capítulo anterior, en todos los compartimientos ambientales se pueden encontrar las cuatro fases: sólida, acuosa, gaseosa y biota, por tanto uno de los factores que influirá sobre la biodisponibilidad de los contaminantes es su afinidad diferencial por cada una de las diferentes fases, y que puede ser descrito por las constantes de reparto entre cada fase o alternativamente por su fugacidad. Los factores que determinan la biodisponibilidad ambiental de una sustancia difieren si se trata de compuestos orgánicos o inorgánicos.

La biodisponibilidad de los **metales y metaloides** desde la fase acuosa se ven afectados por las características fisicoquímica del agua. El pH es un factor muy importante que modifica el equilibrio químico entre diferentes especies químicas de sustancias como el amonio ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$) y el cianuro ($\text{H}^+ + \text{CN}^- \leftrightarrow \text{HCN}$), afectando así su biodisponibilidad ya que la especie neutra es la que atraviesa con mayor facilidad las membranas. La biodisponibilidad de los metales y metaloides también son afectados por la especiación química. Los cationes metálicos compiten por otros cationes por ligandos disueltos, es decir aniones con los que pueden formar compuestos de coordinación o complejos. Tales ligandos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Entre los orgánicos se encuentra la materia orgánica disuelta natural conformada por los ácidos húmicos y fúlvicos, que poseen una amplia variedad de grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos y fenólicos. Entre los ligandos inorgánicos relevantes en agua salada, se pueden enumerar el: BOH , BOH_4^- , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , NH_3 , OH^- , $\text{Si}(\text{OH})_4$ y SO_4^{2-} . En agua dulce, los ligandos inorgánicos más relevantes son: Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^- , OH^- y SO_4^{2-} . En condiciones anóxicas también resultan importantes el NH_3 , HS^- , S^{2-} . El agua también es un importante ligando que forma esferas de hidratación alrededor de los cationes metálicos.

Es posible calcular el equilibrio termodinámico de las diferentes especies de un catión metálico en función del pH, Eh, concentración de diferentes ligandos, temperatura y fuerza iónica del medio. De tal forma se puede utilizar la concentración del catión libre estimada para normalizar

la concentración de un metal en cuerpos de agua con diferentes características fisicoquímicas. Ello es importante dado que la biodisponibilidad, y por ende la toxicidad, de un metal correlaciona con la concentración del catión libre y ha dado origen al “**modelo de actividad del ion libre**” (FIAM). Sin embargo, no siempre el catión libre es la especie que posee mayor biodisponibilidad. Algunos complejos de metales de la clase B (ej. HgCl_2) pueden ser más lipofílicos que el catión (Hg^{+2}) y tales complejos neutros del cloro en ambientes marinos pueden incrementar la biodisponibilidad del metal. Los metales del grupo del platino (Pt, Pd, Rh), de importancia ambiental por su utilización en los catalizadores de los autos, pueden formar complejos con ligandos orgánicos que incrementan su biodisponibilidad.

La fisicoquímica del agua también afecta la competencia entre cationes por los sitios de unión en las membranas modificando la biodisponibilidad. Cationes monovalentes como Ag^+ compiten con H^+ por los sitios de unión en las superficies biológicas. En el caso del Cu^{+2} , por su radio iónico semejante, compite particularmente con el Na^+ . Por otro lado, los cationes bivalentes como el Cd competirán con el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , por consiguiente, la dureza del agua es un parámetro importante para predecir su biodisponibilidad.

La microcapa estancada que recubre las superficies biológicas posee un papel muy importante ya que puede modificar drásticamente la fisicoquímica del medio más próximo a la membrana. La excreción de NH_4^+ , NH_3 , HCO_3^- y CO_2 desde las superficies respiratorias puede modificar rápidamente las condiciones del medio que fluye sobre la membrana.

En el caso de los **compuestos orgánicos**, la biodisponibilidad desde la fase acuosa puede ser predicha de forma cuantitativa en función de las relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSARs) que utiliza parámetros moleculares para predecir actividades biológicas tales como la biodisponibilidad y toxicidad.

Sin embargo, en ecotoxicología, la biodisponibilidad de un compuesto orgánicos se estima más comúnmente mediante la constante de reparto octanol/agua, K_{ow} . En esta aproximación simple, el organismo es considerado como una esfera lipídica recubierta por una bicapa lipídica y se considera que el contaminante ingresa y sale por difusión pasiva alcanzándose, en un tiempo dado, un equilibrio termodinámico entre las ambas fases. La constante se obtiene a partir de un reparto líquido/líquido de acuerdo a la solubilidad diferencial del soluto en el octanol y el agua. La expresión matemática de dicha relación está dada como:

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}}$$

En términos de la fugacidad (f), “tendencia de escape”, de cada sustancia, cuando se alcance tal equilibrio, por definición, éstas serán iguales para ambas fases según:

$$f_{octanol} = f_{agua}$$

La fugacidad se encuentra relacionada con la concentración (C ; mol/m^3) de la sustancia en la fase a través de la capacidad de fugacidad (Z ; $\text{mol}/\text{m}^3 \times Pa$) de acuerdo a la expresión:

$$Z_i \times f_i = C_i$$

Por consiguiente, dada la fugacidad de ambas fases en el equilibrio termodinámico, se puede relacionar K_{ow} tanto con las concentraciones y las capacidades de fugacidad de ambas fases según la ecuación:

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}} = \frac{Z_{octanol}}{Z_{agua}}$$

La constante de partición K_{ow} correlaciona linealmente con la acumulación de contaminantes orgánicos que poseen valores de $\log K_{ow}$ entre 3 y 6. Sin embargo, la predicción no es buena para compuestos con $\log K_{ow} < 3$ o > 6 . En el primer caso se debe a que las membranas imponen una restricción para la incorporación y eliminación de sustancias más hidrofílicas disminuyendo su acumulación respecto a la predicha por el K_{ow} . En el otro extremo, las sustancias superhidrofóbicas, suelen además poseer un tamaño molecular demasiado grande que por un lado reduce su difusión a través de las membranas y por otro su solubilidad en los lípidos se desvía de la predicha por el K_{ow} . En la [Figura 3.2](#), se muestra la relación entre el logaritmo de la constante de incorporación ($\log K_u$) y eliminación ($\log K_e^{-1}$) y el factor de bioacumulación con el $\log K_{ow}$.

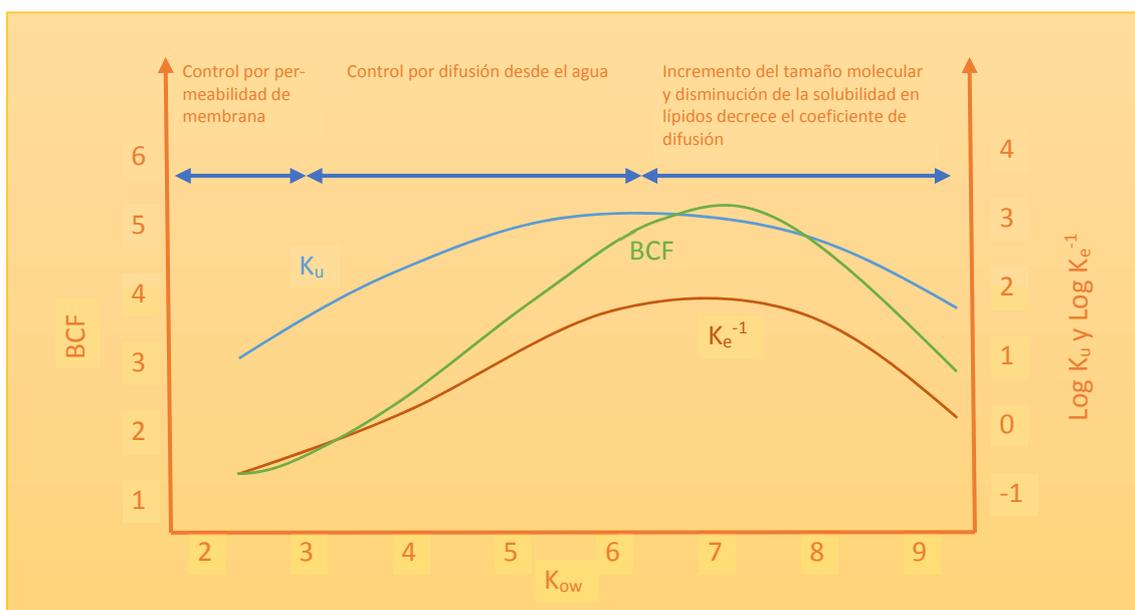


Figura 3.2: Relación entre el K_{ow} y el factor de bioconcentración y constantes de incorporación y eliminación

En el caso de la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el agua resulta también importante considerar si los mismo son ionizables o no ya que el pH del medio puede modificar su estado de ionización y por consiguiente su biodisponibilidad, dado que, de acuerdo con la “hipótesis de partición-pH” la mayor biodisponibilidad está dada por la difusión de la especie no ionizada a través de la membrana. Recordemos que el pK_a se define como $-\log$ de la constante de ionización (K_a) para un ácido débil de Brønsted calculada como:

$$K_a = \frac{[H^{=+}] \times [X^-]}{[HX]}$$

A su vez, la proporción de un ácido monobásico y una base monoácida puede estimarse según la relación de Henderson-Hasselbalch de acuerdo a las siguientes expresiones, respectivamente:

$$f_u = \frac{1}{1 + 10^{pH-pK_a}}$$

$$f_u = \frac{1}{1 + 10^{pK_a-pH}}$$

Sin embargo, en algunos casos la especie ionizada también puede contribuir a la biodisponibilidad total del contaminante orgánico, y desde ya, la hipótesis de partición-pH no es válida para aquellos contaminantes que son incorporados a través de transportadores específicos.

En los ambientes acuáticos, no sólo es de relevancia la fase acuosa, sino también el material particulado en suspensión que puede afectar drásticamente la biodisponibilidad de los contaminantes. Dado que en general se asume que la fracción soluble del contaminante es la que posee mayor biodisponibilidad, una aproximación para estimar dicha fracción es mediante la constante de reparto entre la fase sólida (partícula) y la fase acuosa (K_{pw}) según la expresión:

$$K_{pw} = \frac{C_p}{C_w}$$

Donde, C_p es la concentración del contaminante adsorbido en la partícula y C_w la concentración del mismo en el agua. Para el caso de los contaminantes orgánicos, resulta particularmente relevante el contenido de carbono orgánico que compone la partícula y la constante de reparto carbono orgánico agua (K_{oc}) que posea el contaminante, calculada como:

$$K_{oc} = \frac{C_{oc}}{C_w}$$

Donde, C_{oc} es la concentración del contaminante en la fase carbono orgánico y C_w en la fase acuosa. La partición basada en el carbono orgánico resulta un buen estimador de la cantidad de contaminante adsorbido a partículas naturales. Dado que las concentraciones de los contaminantes son típicamente bajas, la relación entre la concentración del mismo y la adsorción al carbono orgánico puede considerarse lineal. A diferencia del K_{ow} , el K_{oc} puede variar con la naturaleza de la materia orgánica. Sin embargo, ambas constantes pueden ser relacionadas, de forma general, mediante la ecuación:

$$K_{oc} = \frac{K_{ow}}{d_{oc}}$$

Donde, d_{oc} es la densidad del carbono orgánico. Por tanto, para partículas con una fracción de carbono orgánico dada por f_{oc} y una densidad aproximadamente de 1, la constante de partición partícula/agua puede expresarse como:

$$K_{pw} = \frac{C_p}{C_w} = f_{oc} \times K_{oc} = f_{oc} \times K_{ow}$$

Resulta importante poder conocer cuál es la fracción disuelta del total de un contaminante presente en un ambiente acuático. Si consideramos que:

$$C_{tot} = C_w + C_p$$

Por tanto, si se reemplaza C_p por $C_w \times K_{pw}$ obtengo:

$$\frac{C_w}{C_{tot}} = \frac{1}{1 + K_{pw} \times X}$$

Donde X es la fracción volumétrica (Kg/L) de partículas, que típicamente posee un valor de 10^{-5} . Substituyendo ecuaciones se la fracción disuelta puede calcularse también como:

$$C_w = \frac{C_{tot}}{1 + f_{oc} \times K_{oc}}$$

En la [Figura 3.3](#) se muestra la relación entre los sólidos totales en suspensión (con un de contenido de carbono orgánico del 10%) y la fracción disuelta para contaminantes con diferentes K_{oc} .

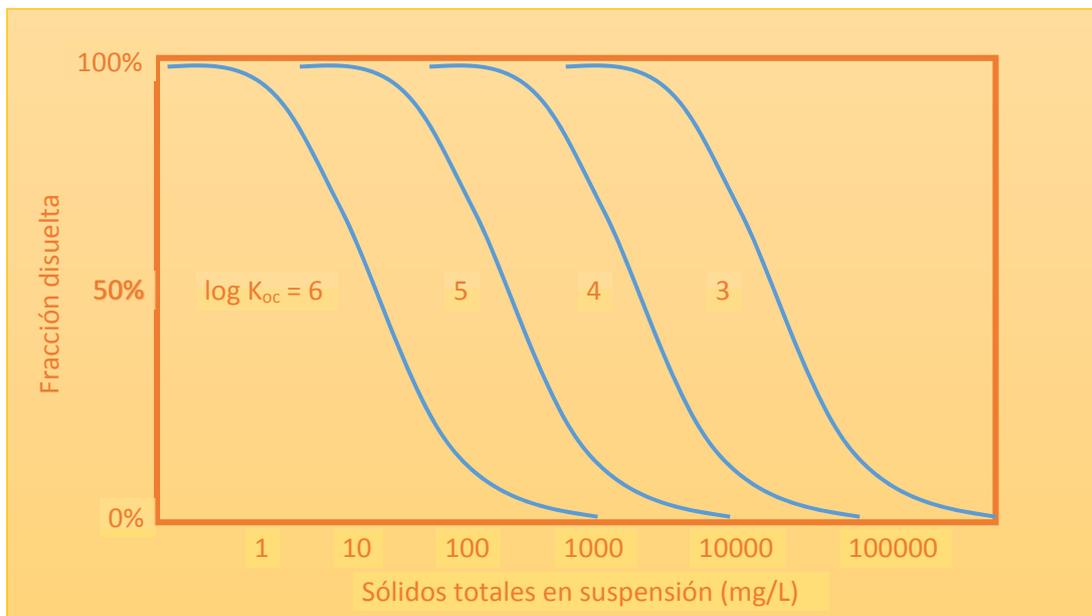


Figura 3.3: Relación entre la concentración de sólidos suspendidos en el agua y la fracción disuelta de contaminantes orgánicos con diferentes K_{oc} .

La biodisponibilidad de los contaminantes inorgánicos desde la fase sólida (aerosoles, alimentos, sedimentos, suelos, etc.) no es sencillo de predecir, aunque pueden mencionarse algunas consideraciones generales. La biodisponibilidad de los metales y metaloides desde aerosoles sólidos no sólo depende de su forma química, sino también del tamaño de las partículas sólidas. Por ejemplo, las partículas con diámetros menores a 1 μm pueden penetrar más profundamente en el sistema respiratorio llegando a depositarse en los bronquiolos, ductos alveolares y alveolos, mientras que partículas de mayor tamaño suelen quedar retenidas por los vellos nasales o en la región nasofaríngea. Se ha sugerido además que los contaminantes más hidrosolubles adsorbidos en las partículas tienden a ser más biodisponibles en el pulmón que los liposolubles. Los haluros de plomo generados en el escape del automóvil se disuelven más fácilmente en el pulmón que el sulfato de plomo adsorbido al polvo de la carretera. La distribución del contaminante en la partícula también es importante. El arsénico que se deposita sobre la superficie de las cenizas al salir por las chimeneas de las plantas termoeléctricas a carbón es más biodisponible que si estuviera distribuido homogéneamente en toda la partícula.

Estimar la biodisponibilidad de los contaminantes desde el alimento también es un tema complejo ya que depende de muchos factores. El porcentaje de asimilación de un contaminante en el alimento variará de acuerdo al tipo de alimento. Es conocido, por ejemplo, que el zinc se absorbe mejor desde las carnes que desde los cereales y deficiencias crónicas de zinc se han encontrado en poblaciones humanas de Medio Oriente con enanismo, donde no sólo la dieta es a base de cereales, sino que además se tiene la costumbre de ingerir arcilla que reduce aún más la biodisponibilidad intestinal del metal. La ingestión de municiones de plomo por las aves se ha transformado en un problema ambiental de relevancia en zonas de caza dado que la biodisponibilidad del plomo se incrementa en el estómago por el molido y disolución en el medio ácido. Para evaluar la eficiencia de la asimilación, o en otras palabras cuán biodisponible está un contaminante en diferentes alimentos, pueden realizarse estudios de laboratorio comparando la absorción del contaminante respecto a trazadores, como por ejemplo el Cr. Para ello el contaminante y el trazador se miden en el alimento y en las heces, asumiendo una asimilación despreciable del trazador. El tamaño y tipo de partícula sólida también juega un papel muy importante, por ejemplo, en organismos filtradores como los bivalvos dado que posee un sistema altamente selectivo y algunas partículas muy pequeña pueden ser incorporadas directamente como tales por los fagocitos presentes en las branquias.

La biodisponibilidad de los metales y metaloides desde el sedimento es difícil de estimar. En términos generales se asume la existencia de una relación entre la concentración del metal en el sedimento y en el agua intersticial y que ésta última es la que se encuentra biodisponible para los organismos bentónicos. Sin embargo, dicha relación no sólo depende de la concentración total del metal sino también de la naturaleza del sedimento que retendrá con mayor o menor fuerza al metal sobre su superficie y por tanto resulta más importante conocer la fracción extractable del metal (ej. con HCL 1N). En sedimentos óxicos, los óxidos de hierro y el contenido de carbono orgánico reducen la biodisponibilidad de los metales. Mientras que en sedimentos anóxicos los sulfuros poseen un papel preponderante en la reducción de la biodisponibilidad de los

metales. Por consiguiente, desde el punto de vista ecotoxicológico, suele normalizarse la concentración total del metal respecto al hierro, carbono orgánico y sulfuros ácidos volátiles. Sin embargo, tales estimaciones deben considerarse cuidadosamente dado que no siempre las relaciones son sencillas. Además, hay organismos del bentos que no sólo están expuestos a los metales disueltos en el agua intersticial por vía dérmica, sino que suelen ingerir el propio sedimento y por tanto dichas normalizaciones pueden no resultar efectivas para estimar la biodisponibilidad. Para estos casos suele utilizarse una estrategia denominada biomimética que determina los metales extractables por un jugo gástrico sintético. Esta aproximación ha sido utilizada para estimar la toxicidad de metales en el suelo para los anélidos.

En el caso de la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el alimento, es importante considerar si los mismo son ionizables o no ya que el pH del jugo gástrico puede modificar su estado de ionización y por consiguiente su biodisponibilidad. Ello es particularmente relevante para aquellos compuestos con un pKa entre 2,5 y 7,5 ya que aquellos ácidos débiles con pKa mayores a 8 permanecerán siempre no ionizados a pHs gástricos. Sin embargo, al igual que lo mencionado para la biodisponibilidad desde la fase acuosa, en algunos casos la especie ionizada también puede contribuir a la biodisponibilidad total del contaminante orgánico y la hipótesis de partición-pH no sería válida para aquellos contaminantes que son incorporados a través de transportadores específicos.

Para el caso de los compuestos orgánicos no ionizables y lipofílicos, la biodisponibilidad puede vincularse con el Kow. Estudios con peces han mostrado que la mayor biodisponibilidad desde el alimento se observa para aquellos compuestos con un log Kow de 6. Sin embargo, si se considera la biodisponibilidad desde el suelo, compuestos como PCBs con log Kow entre 4 y 7 son adsorbidos fuertemente a las partículas edáficas y no se encuentran fácilmente biodisponibles para las plantas, mientras que pesticidas como los neonicotinoides, con Kow de entre 1 y 2, resultan más biodisponibles.

La “regla de cinco” de Lipinski es una regla empírica que ha sido desarrollada para estimar cuan asimilable puede ser en humanos, por consumo oral, un medicamento que no es susceptible de transporte activo. La regla resulta también útil para estimar la biodisponibilidad de contaminantes lipofílicos neutros desde la dieta. La misma establece que para que un compuesto sea biodisponible oralmente no debe violar más de una de las siguientes consideraciones:

1. poseer menos de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con al menos un átomo de hidrógeno).
2. poseer menos de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor).
3. poseer un peso molecular < 500 uma.
4. poseer un log Kow < 5

La biodisponibilidad de contaminantes lipofílicos desde el sedimento para especies bentónicas usualmente suele decrecer al aumentar el Kow dado que en la partición partícula/agua intersticial

se reduce la concentración del contaminante en la fase acuosa. La biodisponibilidad decrece también al aumentar el contenido de carbono orgánico del sedimento y aumentar el K_{oc} del contaminante. Para compuestos organoclorados se ha observado que la mayor biodisponibilidad se encuentra para aquellas sustancias con un K_{ow} próximo a 6. Sin embargo, otros estudios indican que la lipofilicidad por sí sola no es suficiente para estimar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos desde el suelo, debiéndose considerar además el momento dipolar, el tamaño molecular y la configuración estructural.

Vías de exposición por las que pueden ingresar los contaminantes al organismo

En la primera fase de la acción tóxica, es importante primero identificar cuál o cuáles son las **vías de exposición** (Figura 3.4.) por las cuales el contaminante estará en contacto con el organismo e ingresará al mismo.

Uno de los eventos evolutivos que dieron origen a los organismos vivos en la tierra fue la aparición de una barrera que delimitara un medio interno donde ocurrieran reacciones metabólicas específicas e independientes del medio externo circundante. Tal barrera estuvo primeramente dada por una bicapa de fosfolípidos que dio origen a la actual membrana plasmática y que fue capaz de organizarse espontáneamente en vesículas huecas y autoselladas (liposomas). Luego, durante la evolución se sumaron otras estructuras como las paredes celulares de las bacterias, hongos y vegetales. Más tarde, con el origen de los organismos pluricelulares aparecieron sistemas de uniones intercelulares, particularmente importantes en los epitelios que recubren dichos organismos y que aíslan el medio interno del externo. En los animales la vía puede ser dérmica (por el epitelio de la piel o el tegumento), por vía respiratoria, epitelios de los pulmones o las branquias, o por vía digestiva (epitelio intestinal). En las plantas, las vías de exposición más frecuentes son la radicular (epitelio de las raíces) o la foliar (epitelio que recubre las hojas o por los estomas).

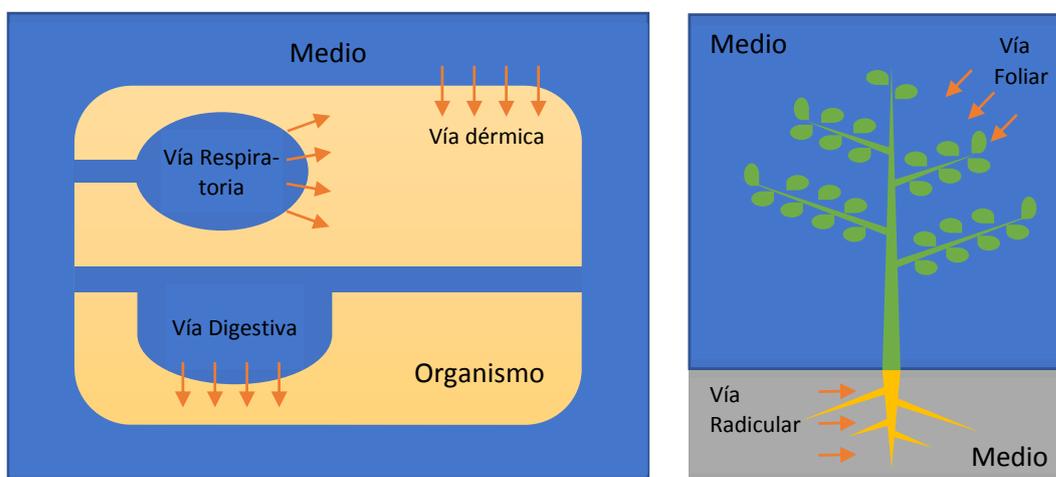


Figura 3.4: Posibles vías de exposición de los contaminantes para organismos animales y vegetales.

Incorporación de los contaminantes a través de las membranas biológicas

Por cualquiera de las vías mencionadas, los contaminantes que se encuentran en el ambiente para poder ingresar al interior de las células e interactuar con las moléculas blanco que determinan su acción tóxica deberán ser capaces de atravesar las barreras antes mencionadas. Si bien las paredes celulares pueden ser una barrera importante, suelen poseer poros que les confieren una permeabilidad selectiva menor que la de las membranas biológicas. Por tal motivo, comprender las propiedades de las sustancias que son capaces de atravesar las membranas plasmáticas y los sistemas de transporte que en ellas existen es de gran importancia a la hora de predecir la capacidad de diferentes contaminantes puedan o no ingresar al organismo (Figura 3.5.). Aquellos contaminantes hidrofóbicos, liposolubles y con K_{ow} altos, podrán atravesar libremente las membranas biológicas en favor del gradiente de concentración sin costo energético alguno por difusión simple. Dicha capacidad se irá reduciendo a medida aumente su polaridad, o sea, se trate de sustancias más hidrofílicas, hidrosolubles y con K_{ow} bajos, y aumente el tamaño de la molécula. Aquellos contaminantes que posean grupos químicos cargados a valores de pH ambientalmente relevantes, no podrán difundir libremente a través de las membranas biológicas, las cuales son impermeables a los iones. Aquellas moléculas polares, de gran tamaño o que se encuentren ionizadas sólo podrán atravesar las membranas asistidas por algún tipo de transporte mediado por proteínas de transporte o por vesículas que se formen por invaginación, o se fusionen con, la membrana plasmática por mecanismos de endocitosis y exocitosis, respectivamente. Los iones inorgánicos podrán moverse de un lado a otro a través de canales iónicos, dependientes, o no de voltaje, si lo hacen en favor del gradiente electroquímico, o a través de bombas iónicas impulsadas por ATP, si lo hacen en contra del gradiente electroquímico. Las moléculas orgánicas serán transportadas por difusión facilitada si lo hacen en favor del gradiente electroquímico a través de proteínas específicas o por transporte activo, si se mueven en contra del gradiente electroquímico utilizando proteínas que requieren de ATP u otra fuente que les provea de energía para ello. Los sistemas de transporte mencionados, pueden en algunos casos transportar simultáneamente dos sustancias (cotransporte) ya sea en el mismo sentido (simporte) o en sentidos opuestos (antiporte). En otros casos, varios transportadores pueden actuar simultáneamente conformando un sistema de transporte múltiple integrado. Algunos contaminantes podrán ser incorporados o eliminados por medio de endocitosis o exocitosis, mediante la invaginación de la membrana plasmática o la fusión de vesículas a la misma con gasto de energía.

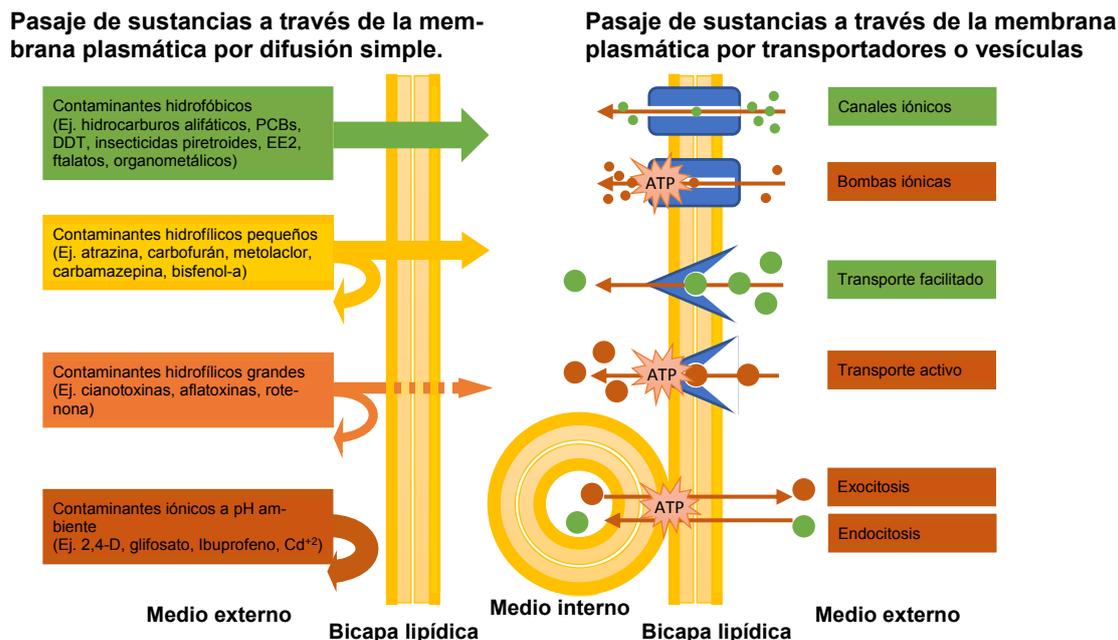


Figura 3.5: Mecanismos de ingreso y egreso de los contaminantes a través de la membrana plasmática.

Como ejemplos de canales iónicos pueden mencionarse los canales de sodio y calcio, que en las membranas plasmáticas de las branquias de los organismos acuáticos pueden ser utilizado por el Cu^+ o el Cd^{+2} , respectivamente, para ingresar a las células, provocando desbalances iónicos de Na^+ y Ca^{+2} en el plasma. Contaminantes polares o con cargas como muchos fármacos o plaguicidas, son incorporados o eliminados por transportadores específicos que se encuentran en las membranas de diferentes tejidos. Entre los transportadores más relevantes que contribuyen a la incorporación de moléculas orgánicas en mamíferos se encuentran el polipéptido de transporte de aniones orgánicos (oatp) hepático, el transportador de aniones orgánicos (oat) renal y los transportadores de cationes orgánicos (oct) hepático, renal y placentario. En el intestino son relevantes el transportador de nucleótidos (nt), el transportador de metales divalentes (dmt) y el transportador de péptidos. En la eliminación de moléculas orgánicas se pueden mencionar como relevantes la proteína de resistencia-multi-droga (mdr) o glicoproteína-p importante en la excreción biliar de xenobióticos en el hígado y reducción de absorción intestinal, en la barrera placentaria y sanguínea. Otro transportador de xenobióticos importante es la proteína de resistencia múltiple a drogas (mrp) que actúa en la excreción urinaria y hepática. Otros contaminantes como los PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos o disruptores endócrinos como el EE_2 , pueden atravesar las membranas por difusión pasiva. Es posible identificar si una sustancia dada atraviesa las membranas por difusión o con la asistencia de un transportador por la relación entre la concentración del contaminante y la velocidad de ingreso. En aquellas sustancias que lo hacen por difusión simple dicha relación es lineal, mientras que en las que lo hacen a través de un transportador la cinética sigue una función de saturación tipo Michaelis-Menten donde llega un punto que por más que aumente la concentración del contaminante, la velocidad de ingreso no

aumenta (V_{max}) y en la cual puede calcularse la constante K_m que equivale a la concentración del contaminante que corresponde con $\frac{1}{2}$ de V_{max} (Figura 3.6.).

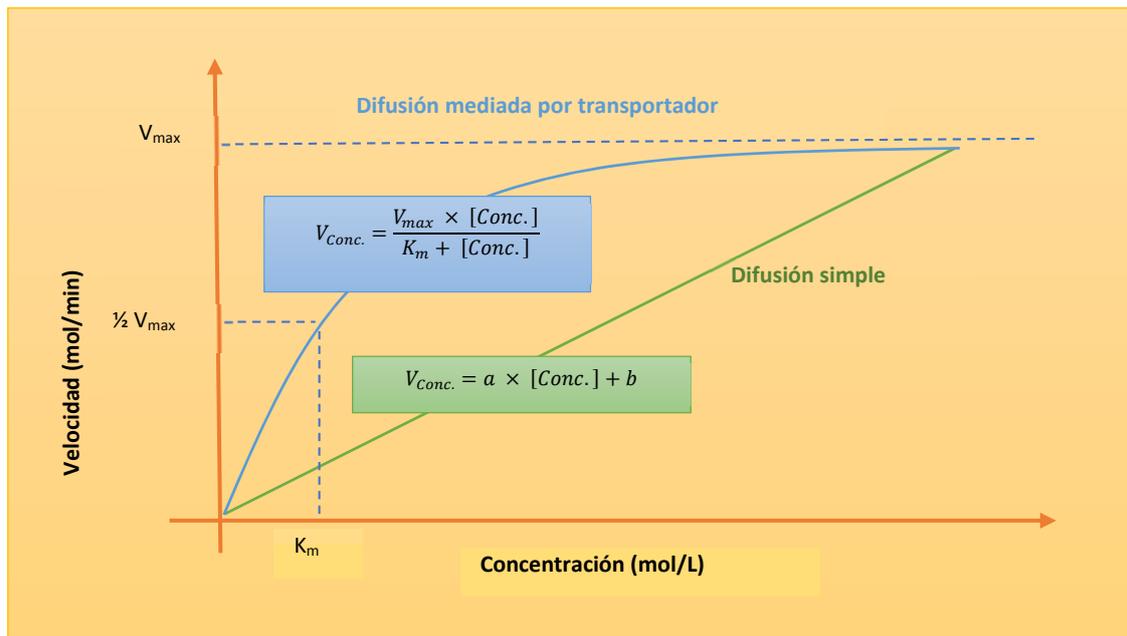


Figura 3.6. Diferencias en la cinética de acumulación entre un contaminante que atraviesa la membrana plasmática por difusión simple o por medio de un transportador.

La velocidad de difusión $\left(\frac{dx}{dt}\right)$ a través de las membranas puede ser estimada de acuerdo a la Ley de difusión de Fick:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{A \times D_m \times K_{mm} \times (C_o - C_i)}{d}$$

Donde, D_m es el coeficiente de difusión (cm^2/min), A el área de la membrana (cm^2), K_{mm} el coeficiente de partición membrana/medio (en general proporcional a K_{ow} y K_{oa}), C_o y C_i es la concentración (mol/L) externa (sobre la superficie de la membrana) e interna del contaminante (aproximadamente igual a la del plasma), respectivamente, y d es el grosor de la membrana (cm).

Sin embargo, la incorporación de un contaminante “in vivo” no sólo depende de la permeabilidad de la membrana, sino que puede estar limitada por la microcapa de medio estancada, por el flujo del medio externo o de la sangre, por lo que la expresión anterior puede generalizarse como:

$$\frac{dy}{dx} = P \times (C_m \times C_i)$$

Donde, P es el factor de control de difusión, C_m es la concentración en el medio y C_i la concentración interna. La expresión de P variará de acuerdo a cuál sea el factor limitante de difusión, la membrana, la microcapa de medio estancada o los flujos del medio o de la sangre de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$P = \frac{D_m \times A \times K_{mm}}{d} \text{ (difusión limitada por la membrana)}$$

$$P = \frac{D_a \times A}{h} \text{ (difusión limitada por la microcapa)}$$

$$P = K_{bl} \times V_{bl} \text{ (difusión limitada por el flujo sanguíneo)}$$

$$P = V_m \text{ (difusión limitada por la ventilación)}$$

Donde, h es el grosor de la microcapa, K_{bl} es el coeficiente de partición sangre agua, V_{bl} el flujo sanguíneo (cm^3/min) y V_m el flujo de ventilación (cm^3/min).

La mayor parte de estos estudios han sido realizado con especies acuáticas, particularmente con peces observando que para contaminantes lipofílicos ($\log K_{ow} = 3-6$) la difusión se ve limitada por el flujo de ventilación, para contaminantes hidrofílicos ($\log K_{ow} < 1$) el factor limitante es el flujo sanguíneo y para aquellos de lipoflicidad moderada ($\log K_{ow} = 1-3$) la difusión es proporcional al K_{ow} , con una eficiencia de difusión similar a la del oxígeno (60%).

Distribución y almacenamiento

En organismos pluricelulares, un contaminante luego de ser incorporado a través de alguna de las vías de exposición mencionadas previamente puede pasar al sistema circulatorio y ser redistribuido (traslocado) a diferentes partes del cuerpo. En los vegetales los contaminantes luego de ser absorbidos por las raíces o las hojas, pueden ser traslocados a otras partes de la planta a través del xilema (transporte de agua) o el floema (transporte de sabia). En los animales, la distribución se da a través de los fluidos circulatorios como la hemolinfa en moluscos y artrópodos, o el plasma sanguíneo en anélidos y diferentes grupos de cordados. La tasa de distribución a los órganos o tejidos es determinada inicialmente por el flujo del fluido circulatorio y la tasa de difusión fuera del sistema circulatorio y luego por la afinidad del contaminante con determinado tejido. Por ejemplo, los metales suelen tener mayor afinidad para unirse a las proteínas (Cu, Fe, Zn, Cd) o la matriz ósea (Pb, Sr), mientras que los compuestos orgánicos lipofílicos se acumularán en mayor grado en el tejido adiposo (Clordano, DDT, PCBs, PBDEs). Algunos tejidos como el hígado suelen expresar proteínas especiales que les brindan una mayor capacidad de acumular ciertos contaminantes como el caso de las metalotioneínas que posee una afinidad particular por los metales o la ligandina por los ácidos orgánicos. El plasma no sólo cumple un papel importante en la distribución de los contaminantes, sino que, además las proteínas que lo componen se unen a ellos actuando como un depósito de almacenamiento. En la [Figura 3.7](#), se muestra un proteinograma (electroforesis de suero) mostrando los principales grupos de proteínas séricas y los contaminantes que suelen transportarse unidas a cada una de dichas fracciones.

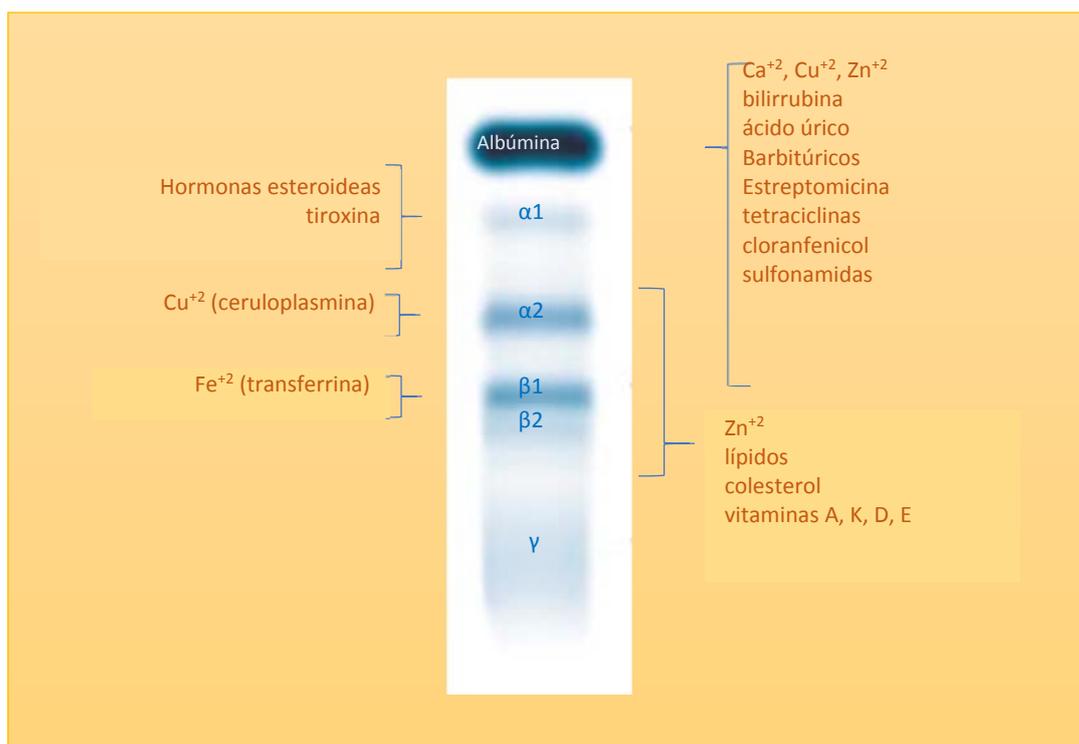


Figura 3.7: Proteinograma mostrando los principales grupos de proteínas séricas y los contaminantes a los cuales se unen, almacenan y distribuyen por el cuerpo de los vertebrados.

Un parámetro útil a tener en cuenta cuando se considera la distribución y almacenamiento de los contaminantes es el volumen de distribución (o volumen aparente de distribución, V_D) que se ha adoptado de la farmacología, donde es definido como el volumen teórico que contendría la masa de un contaminante equivalente a la concentración que se observa en el fluido circulante (ej. plasma). El V_D de un contaminante representa el grado en que éste se distribuye en el tejido corporal en lugar del plasma. Por tanto, el V_D no es un valor fisiológico, sino que es más bien un reflejo de cómo un medicamento se distribuirá por todo el cuerpo dependiendo de varias propiedades fisicoquímicas (Ej. solubilidad, carga, tamaño, etc.). Su expresión matemática es:

$$V_D = \frac{\text{cantidad total de contaminante en el cuerpo}}{\text{concentración del contaminante en el plasma sanguíneo}}$$

En ecotoxicología también suele utilizarse como el volumen de medio (agua, aire, suelo, alimento) que, según su concentración, se requeriría para contener una masa total del contaminante equivalente a la de la concentración en el plasma sanguíneo. En términos generales cuanto más lipofílico el contaminante mayor será su V_D . Numéricamente el V_D es igual al factor de bioconcentración.

Biotransformación

Una vez que un contaminante ingresa al organismo, este es susceptible de ser biotransformado, esto es, ser modificado por la acción biológica de determinadas enzimas. Tal biotransformación puede contribuir a la eliminación, detoxificación, secuestro, redistribución e incluso la activación del contaminante haciéndolo más tóxico.

En el caso de los metales y metaloides, los mismos pueden ser biotransformados, secuestrados (unidos a ligandos específicos) o biomineralizados. Ciertas bacterias poseen la capacidad de metilar o etilar el metal como es el caso de la transformación del mercurio iónico a metilmercurio. Algunas plantas son capaces de metilar el arsénico (ej. lactato de trimetilarsonio), unirlos a azúcares, betaína o fosfolípidos (ej. O-fosfatidil-lactato de trimetilarsonio). Las plantas también pueden ligar el selenio a aminoácidos modificados (ej. metil-seleno-cisteína) que pueden ser incorporados a proteínas. Además de las transformaciones antes mencionadas, los metales pueden ser secuestrados por proteínas específicas como las metalotioneínas y fitoquelatinas (plantas), proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas. Finalmente, los metales pueden ser eliminados mediante la biomineralización, siendo incorporados de esta forma en el exoesqueleto calcáreo de invertebrados o en la matriz calcárea de los huesos de vertebrados. También pueden ser biomineralizados en gránulos intra (Tipo A, pirofosfatos de calcio y magnesio en matriz de lipofuscina conteniendo metales clase A e intermedios como Mn y Zn; Tipo B, ricos en sulfuros conteniendo metales clase B como Cu, Cd, Ag, Hg, y Zn y Tipo C ricos en hierro producto de la ferritina) y extracelulares (Tipo D, de carbonato de calcio). En general los gránulos suelen estar asociados con el intestino medio, glándula digestiva hepatopáncreas, túbulos de Malpighi y riñón de invertebrados u otras células especializadas de invertebrados o tejido conectivo de vertebrados e invertebrados.

En el caso de los contaminantes orgánicos, el proceso de biotransformación generalmente consiste en modificar la molécula desde una forma más lipofílica en otra más hidrofílica (a excepción de la metilación y acetilación) con el objeto de facilitar la eliminación de la misma del cuerpo. Las reacciones que intervienen en dicho proceso se dividen en aquellas de Fase I y las de Fase II. Las de **Fase I** generan, mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, un metabolito más hidrofílico y reactivo para subsecuentes transformaciones en la fase siguiente. En general ello conduce a metabolitos menos tóxicos y más fáciles de eliminar, pero en algunos casos puede generar la activación del contaminante generando un metabolito más tóxico que el compuesto parental. Ello ocurre con los pesticidas organofosforados generando un metabolito reactivo, el “oxon”, que inhibe a la enzima acetilcolinesterasa en las sinapsis colinérgicas. La oxidación del benzo(a)pireno, la aflatoxina y el cloruro de vinilo genera metabolitos reactivos que se unen al ADN. Además, la biotransformación de Fase I puede resultar en la producción de especies reactivas de oxígeno (ej. radical superóxido, O_2^-) causando estrés oxidativo en la célula y peroxidación lipídica. Los xenobióticos susceptibles de ser biotransformados por el sistema de detoxificación de Fase I suelen ser moléculas hidrofóbicas relativamente pequeñas, siendo una excepción los compuestos orgánicos fuertemente halogenados (Ej. dioxinas, PCBs) que suelen

ser refractarios a las reacciones de biotransformación de Fase I, presentando tiempos de residencia más prolongados ya que pueden ingresar a las células por difusión pasiva y ser almacenados, pero no eliminados efectivamente, siendo así, persistentes y bioacumulables.

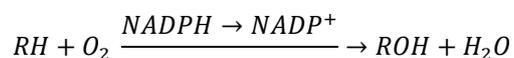
Las reacciones de **Fase II** generan, mediante reacciones de conjugación (unión covalente) con ácidos orgánicos (ej. glucurónico, sulfónico) o zwitteriones (glutación o aminoácidos como la glicina, taurina y glutamina), metabolitos más inactivos y fáciles de exportar por los sistemas de transporte activos mencionados previamente. La conjugación de metabolitos activados reduce o incluso elimina su efecto tóxico. Las reacciones de Fase II son de tipo sintética por lo que requieren de energía que es provista por la activación previa del conjugado endógeno o del propio xenobiótico. Algunos autores incluyen, además, una **Fase III** de detoxificación dada por la eliminación de los contaminantes a través de los sistemas de transportadores de membrana mencionados en la sección previa.

El sistema de biotransformación está conformado por un número limitado de enzimas con una amplia especificidad de sustrato por lo que suele presentar una gran superposición en los sustratos que metabolizan y muchas forman parte de vías normales de metabolitos endógenos, como es el caso de las enzimas del citocromo P450 en el metabolismo de los esteroides. Algunas de ellas son inducidas por la presencia de los propios xenobióticos, pero otras se expresan de forma constitutiva. Pese al amplio espectro de sustratos que son capaces de metabolizar, algunas de ellas poseen estereoselectividad, siendo capaces de diferenciar entre estereoisómeros de los contaminantes, metabolizando ciertos isómeros con mayor velocidad que otros. Además, presentan variaciones entre especies. Los peces, al poder excretar los tóxicos sin biotransformar vía branquial, poseen un sistema de biotransformación de Fase I menos eficiente que el de los organismos terrestres. Entre éstos, los insectos fitófagos lo poseen más desarrollado dado que las plantas de las que se alimentan poseen compuestos que actúan como xenobióticos. Incluso para una misma especie existen diferencias en la capacidad de detoxificación debido a polimorfismos genéticos de las enzimas del sistema de biotransformación. Se han observado, además, diferencias vinculadas con el sexo de los individuos. Los factores ambientales también pueden generar variaciones comparables a las genéticas y las interacciones entre contaminantes con acciones antagónicas o sinérgicas pueden tener un papel muy importante.

En cuanto a su localización celular, las enzimas que conforman el sistema de biotransformación pueden ser citosólicas, mitocondriales, microsomales, de membrana plasmática, hallarse en el plasma sanguíneo o incluso en la microflora bacteriana. Así mismo, estas enzimas pueden expresarse de forma diferente en los distintos tejidos de un organismo. En general, suelen hacerlo en mayor proporción en el intestino e hígado de vertebrados o el hepatopáncreas, cuerpos grasos o intestino de invertebrados. Si bien estos sistemas se hallan también en las plantas, su actividad es mucho menor que en los animales.

Existe un gran número de enzimas presentes en diferentes tejidos y compartimientos subcelulares que se hallan involucradas en los procesos de biotransformación de los xenobióticos ([Tabla 3.1.](#)). En relación a las reacciones de Fase I, uno de los principales sistemas de biotransformación es el de las enzimas **monooxigenasas del complejo citocromo P450** (posee un grupo

hemo con Fe^{+2}), a veces también referido como oxidasa de función mixta (MFO), que se encuentra localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso. En vertebrados es más abundante en el hígado y en invertebrados en el hepatopáncreas y glándula digestiva, pero puede expresarse en casi todos los tejidos. En peces expuestos a xenobióticos puede ser inducido en la branquia y el intestino, que son importantes sitios de incorporación de los xenobióticos. El sistema, no sólo biotransforma a los xenobióticos, sino que además interviene en el metabolismo de hormonas esteroideas, prostaglandinas, sales biliares y ácidos grasos. Los componentes que conforman el sistema son: el citocromo P450, la NADPH-citocromo-P450 reductasa, el citocromo b_5 y la NADH-citocromo b_5 reductasa. La especificidad de sustrato está controlada por las diferentes isoformas de P450 y para su funcionamiento necesita NADPH, O_2 y fosfolípidos. El sistema cataliza reacciones de oxidación haciendo a los xenobióticos más hidrosolubles. La principal reacción que catalizan las monooxigenasas del P450 es la hidroxilación de los xenobióticos:



Sin embargo, también intervienen en reacciones de epoxidación, desalquilación, desaminación, sulfoxidación y desulfuración.

Otra familia de proteínas **monooxigenasas** son las que contienen **flavinas**, también se encuentran en el retículo endoplásmico liso y se especializan en la oxidación de xenobióticos conteniendo grupos nitro o sulfuro como aminas aromáticas y pesticidas organofosforados y carbamatos. También requieren de NADPH y O_2 para su funcionamiento y, a veces, suele ser difícil diferenciarlas de la actividad del P450. Se cree que son más importantes en moluscos donde la actividad del P450 es más baja.

En condiciones de bajos tenores de O_2 , se ha observado que tanto las monooxigenasas del P450 como las flavin-monooxigenasas puede realizar reacciones de reducción, actuando por ende como **reductasas**. La reducción de compuestos halogenados conduce a deshalogenación (ej. conversión de p,p'-DDT a p,p'-DDD).

Otro grupo de enzimas de relevancia en la biotransformación de xenobióticos son las **epóxido-hidrolasas** que también es predominante en el retículo endoplásmico liso, aunque también hay variantes citosólicas y de membrana plasmática. La enzima cataliza la hidratación de una gran variedad de epóxidos aromáticos y alifáticos. Las epóxido-hidrolasas del retículo endoplásmico suelen biotransformar epóxidos generados por las monooxigenasas microsomales, sustancias que como se ha dicho son altamente electrofílicas y que en contacto con el DNA forman aductos con efectos carcinogénicos. Estas enzimas se han encontrado en todas las especies, siendo especialmente abundantes en el hígado de los vertebrados y el hepatopáncreas de los invertebrados.

Un grupo particularmente relevantes desde el punto de vista ambiental de enzimas de biotransformación de Fase I con las hidrolasas de la familia de las carboxilesterasas, colinesterasas y paraonoxonasas, aunque por cierto no son las únicas enzimas hidrolíticas involucradas en procesos de biotransformación. Las carboxilesterasas y colinesterasas corresponden al grupo de las serín esterases porque en su sitio catalítico poseen un residuo nucleofílico de serina. Este

sitio activo puede interactuar con el grupo fosfato de compuestos organofosforados (OP) y en base a ello Aldridge clasificó en 1953 a estas enzimas en esterasas de Tipo A, B y C, dependiendo si la enzima lo hidroliza, se ve inhibida o no interactúa de ninguna manera con el OP, respectivamente. Mientras que un grupo de Paraoxonasas pertenece al Tipo A, las carboxilesterasas y las colinesterasas pertenecen al Tipo B.

Tabla 3.1. Reacciones de biotransformación de los xenobióticos y localizaciones subcelulares

<i>Reacción</i>	<i>Enzima/Reacción específica</i>	<i>Localización celular</i>
Hidrólisis	Carboxilesterasa	Microsomas, citosol, lisosomas, sangre
	Butirilcolinesterasa	Plasma, mayoría de los tejidos
	Acetilcolinesterasa	Eritrocitos, mayoría de los tejidos
	Paraoxonasa	Plasma, microsomas, membrana mitocondrial interna
	Fosfatasa Alcalina	Membrana plasmática
	Peptidasa	Sangre, lisosomas
	β-glucuronidasa	Microsomas, lisosomas, microflora
	Epóxido hidrolasa	Microsomas, membrana plasmática, citosol
Reducción	Reducción azo y nitro	Microflora
	Reducción carbonilo (aldo/ceto)	Citosol, microsomas, sangre
	Reducción disulfuro	Citosol
	Reducción sulfóxidos	Citosol
	Reducción quinonas	Citosol, microsomas
	Dihidropirimidina deshidrogenasa	Citosol
	Deshalogenación reductiva	Microsomas
	Deshidroxilación	Mitocondria
	Deshidroxilación (aldehído oxidasa)	Citosol
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa	Citosol
	Aldehído deshidrogenasa	Mitocondria, citosol
	Aldehído oxidasa	Citosol
	Xantina oxidorreductasa	
	Amino Oxidasas (Clase I)	Membrana mitocondrial externa, plaquetas
	MAO-A and B	Citosol, peroxisomas, plasma
	PAO	Citosol, núcleo
	SMOX	Citosólica, formas asociadas a membrana
	Amino Oxidasas (CuAOs) (Clase II)	Microsomas, matriz extracelular
	SSAOs (ej. AOC3)	Matriz extracelular
	DAOs	Microsomas, lisosomas, saliva
	LOs	Microsomas
	Peroxidasas	Microsomas, mitocondria
	Flavin-monooxigenasas	
	Citocromo P450	
	Conjugación	UDP-glucuronosiltransferasa
Acil-CoA sintetasa		Mitocondria
Sulfotransferasa		Citosol
Glutación transferasa		Citosol, microsomas, mitocondria
Amino acido transferasa		Mitocondria, microsomas
N-acetiltransferasa		Mitocondria, citosol
Metiltransferasa		Citosol, microsomas, sangre

Las **carboxilesterasas** son predominantemente microsomales y se encuentran en una gran variedad de tejidos entre los que se halla el hígado, intestino y riñón. Las carboxilesterasas intervienen, por ejemplo, en la hidrólisis de los insecticidas piretroides (ej. trans-permetrina). La hidrólisis de los xenobióticos por carboxilesterasas no siempre conduce a la detoxificación, si no que puede convertir al compuesto en una sustancia carcinogénica. Entre las **colinesterasas** se pueden distinguir dos tipos, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa (BCHE). Ambas pueden ser encontradas en diversos tejidos y BCHE suele ser más abundante que AChE (ej. en plasma), salvo en cerebro y músculo donde AChE interviene en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. BCHE es menos específica en cuanto los sustratos y por ende posee un papel más importante que AChE en la biotransformación de xenobióticos. La BCHE plasmática es de relevancia en limitar la cantidad de neurotoxinas colinérgicas, como los insecticidas OP (ej. clorpirifós) que han sido transformados a oxon por el citocromo P450, los insecticidas carbamatos o incluso toxinas naturales como la anatoxina producida por las cianobacterias, que puedan alcanzar la AChE en el cerebro. Por último, las **paraoxonasas**, esterases del tipo Tipo A dependientes de Ca^{+2} , catalizan la hidrólisis de un gran número de organofosforados, ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos, carbonatos cíclicos, lactonas y fosfolípidos oxidados. Poseen un grupo sulfhidrilo que puede ser inhibido por Cu^{+2} y compuestos mercurícos. Puede hallarse en los microsomas hepáticos o en el plasma y una de sus variantes posee una importante actividad arilesterasa que le permite hidrolizar eficientemente el metabolito oxón de los insecticidas OP (Ej. paratión, diazinón, clorpirifós). Existe una gran diferencia entre especies en los tipos de esterases que expresan en los diferentes tejidos. En particular los humanos no expresan carboxilesterasas en plasma, contrariamente las aves poseen poca o nula expresión de paraoxonasas en dicho biofluido y algunos insectos directamente no presentan niveles mesurables de tales enzimas.

En cuanto a las reacciones de Fase II, las **UDP-glucuronosil-transferasas** microsomales cumplen una importante función en la conjugación del ácido glucurónico (grupo polar) a una molécula lipofílica (endógena o metabolito de un xenobiótico biotransformado por reacciones de Fase I) y que presenta un átomo de hidrógeno lábil (ej. oxidrilo). El ácido glucurónico es provisto por un cofactor nucleotídico, el difosfato de uridina que es sintetizado en el citosol. Los glucurónidos formados se encuentran mayormente en el citoplasma (pH 7,4) como aniones que pueden ser exportados a los canalículos biliares o a los vasos sanguíneos por los transportadores mencionados previamente (ej. MRD, MRP). Los glucurónidos eliminados por la bilis al intestino pueden ser allí desconjugados por encima glucuronidasas y, en cierto grado, pueden ser reabsorbidos.

Otro grupo importante de enzimas del sistema de biotransformación de Fase II son las sulfotransferasas. Estas enzimas citosólicas catalizan la transferencia de un grupo sulfo desde una molécula donadora, en general la fosfoadenosina-fosfosulfato (PAPS) a un grupo alcohol o amina del xenobiótico formando un sulfato o una sulfoamina, respectivamente.

Tanto el cofactor PAPS como el metabolito sulfatado se encuentran en citoplasma, éste último como anión soluble. De forma similar a los glucurónidos, los conjugados sulfatados pueden ser hidrolizados por sulfatasas.

Quizá una de las más versátiles enzimas del sistema de Fase II es la **glutación-s-transferasa (GST)**. Esta enzima, es mayormente citosólicas, pero también pueden encontrarse en retículo o mitocondria. Si bien se encuentra distribuida en casi todos los tejidos, como en los casos anteriores, suele ser más abundante en el hígado de vertebrados y el hepatopáncreas de los invertebrados. Esta enzima catalizan la conjugación del glutatión reducido con una gran variedad de metabolitos electrofílicos, como los epóxidos formados por el P450, sin la necesidad de contar con un grupo hidroxilo. El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Las reacciones catalizadas por la GST no sólo incluyen las de epóxido-transferasas si no también arilo y alquilo transferasas. Las conjugaciones con glutatión suelen sufrir metabolizaciones subsiguientes previo a la eliminación, por ejemplo, siendo el en el riñón de vertebrados transformado a ácido mercaptúrico previo a la excreción en la orina. Por otra parte, la GST, no sólo cataliza la conjugación del glutatión, sino que también interviene en el transporte de metabolitos lipofílicos (endógenos o exógenos) a través del citoplasma hacia el sitio de acción de las enzimas de Fase I o en la formación de uniones covalentes con los epóxidos formados por el metabolismo de Fase I, previniendo así su interacción con el ADN u otras macromoléculas.

Eliminación

Una vez que los contaminantes ingresan al organismo, se distribuyen por el cuerpo, se acumulan en diferentes órganos y eventualmente se biotransforman, una parte de ellos será finalmente eliminada por diferentes vías y mecanismos dependiendo del contaminante y del tipo de organismo. En organismos unicelulares los contaminantes dependiendo de su peso molecular, lipofilicidad, estado de ionización y vía de biotransformación, serán eliminados por difusión pasiva o mediado a través de transportadores específicos ya sea de forma activa o pasiva. En las plantas la eliminación de los contaminantes podrá darse también por difusión a través de las raíces o las hojas, incluso aquellos con alta presión de vapor podrán difundir en forma gaseosa por los estomas. Sin embargo, por lo general los sistemas de eliminación de las plantas suelen estar limitados por la pared celular y muchos contaminantes son acumulados en las vacuolas y luego eliminados al perderse las hojas o incluso por acción de la herbivoría.

En los organismos acuáticos las branquias y el tegumento pueden tener un papel importante en la excreción. En los peces la eliminación de contaminantes de baja lipofilicidad ($\log K_{ow}$ 1-3) por la branquia suele ser rápida mientras que, más lentamente, también resulta una vía de excreción importante para compuestos más lipofílicos que no son fácilmente biotransformados tales como DDT, di-etil-ftalatos, fenol y pentaclorofenol. En artrópodos ciertos metales pueden ser excretados a través de la muda y en moluscos a través de los gránulos que

forman los caparazones. En los anfibios los contaminantes pueden difundir a través de la piel. En los animales terrestres el intercambio a través de la piel es más difícil ya que suelen estar recubiertos por elementos tegumentarios (escamas, plumas, pelos) que reducen el intercambio. Sin embargo, en las aves las plumas pueden ser una vía de eliminación de metales como el Pb y el Hg. En los mamíferos ciertos metaloides y metales como (ej. Hg) pueden ser eliminados en el pelo. En los animales terrestres los contaminantes volátiles pueden exhalados por las vías respiratorias durante el intercambio gaseoso. Las secreciones también pueden ser una vía de eliminación de contaminantes. En los mamíferos, los contaminantes lipofílicos (ej. DDT) o metales análogos del calcio (ej. Sr) pueden ser eliminados a través de la leche. Los desoves o partos pueden ser también vías de eliminación de contaminantes que se asocian al vitelo (ej. peces aves y anfibios) o que forman parte de las propias crías (mamíferos y otros organismos vivíparos) que pueden acumular contaminantes lipofílicos como los PCBs o el DDT.

Si bien no se trata estrictamente de un mecanismo de eliminación, un factor a tener en cuenta al evaluar la acumulación de un contaminante es la **dilución por crecimiento**. Este fenómeno es especialmente importante para aquellos organismos que crecen muy rápido y contaminantes que poseen altos pesos moleculares y K_{ow} muy elevados que suelen requerir de tiempo muy prolongados para alcanzar el equilibrio.

En los vertebrados, fundamentalmente en los terrestres, las principales vías de eliminación de los contaminantes suelen ser la urinaria y la biliar. Aquí el peso molecular del contaminante ha demostrado ser de relevancia ya que aquellas moléculas con pesos moleculares <300 Da suelen ser excretados por vía renal, mientras que las >600 Da lo hacen por vía biliar. El contaminante que ha ingresado al organismo por alguna de las vías descritas (epidérmica, respiratoria o digestiva), se ha distribuido a través del sistema circulatorio (sanguíneo, linfático), generalmente unido a proteínas de transporte, y se ha almacenado en diferentes tejidos donde puede ser biotransformado de forma tal de hacerlos más hidrosolubles y que puedan ser eliminados de las células mediante sistemas de transporte activo como las MRD (P-gp) o MRP nuevamente al sistema circulatorio (no unidos a proteínas) para finalmente ser excretados en órganos específicos, como el hígado y el riñón. En el **riñón**, el proceso de excreción involucra tres procesos, i) la filtración glomerular que se produce a través de los poros de los capilares sanguíneos (aproximadamente 70 nm) que dejan pasar moléculas hasta 60 kDa (más pequeña que la albúmina) y por tanto contaminantes unidos a proteínas plasmáticas no serán filtrados y sólo pasarán a través de los capilares aquellos solubilizados en el plasma o unidos a proteínas de menor tamaño; ii) el transporte pasivo que ocurre a través de los túbulos, un mecanismo menos relevante que la filtración del glomérulo, y iii) la secreción por transporte activo a través de los túbulos proximales a nivel de los transportadores mencionados previamente que se expresan selectivamente en las membranas basolaterales y apicales de las células epiteliales de los túbulos y regulan no sólo la excreción de xenobióticos desde la sangre (ej. OAT/OATP/OCT basolaterales y MRD/MRP/MATE apicales) si no también su reabsorción

desde la orina (ej. OAT/URAT/OCTN/PEPT apicales y MRP basolateral). La recaptación de Cd unido a metalotioneínas en los túbulos proximales ha sido asociado a la nefrotoxicidad de dicho metal. La otra vía importante de excreción es a través de la **bilis** que se produce en el hígado debido a que dicho órgano posee un papel importante en la detoxificación de contaminantes que ingresaron por la vía digestiva, dado que a través del sistema de circulación portal las sustancias absorbidas desde el intestino a la sangre pasan por el hígado siendo allí incorporadas por los hepatocitos, biotransformadas y excretadas a la bilis antes de que puedan distribuirse y alcanzar otros órganos blanco en lo que se denomina “efecto de primer-paso”. En los hepatocitos, la incorporación de aquellos contaminantes que no ingresan por difusión pasiva se da a través de transporte activo en el que intervienen diversos transportadores como OATP, OAT, OCT y NTCP mientras que en la excreción hacia la bilis intervienen transportadores como MRP en el transporte de aniones orgánicos (ej. conjugados con ácido glucurónico y glutatión), MRD para bases orgánicas, MATE especialmente para cationes orgánicos y BCRP para conjugados sulfatados.

Bioacumulación de los contaminantes.

Es importante comprender y poder predecir la acumulación de los contaminantes en la biota porque finalmente los efectos que estos causan son consecuencia de las concentraciones efectivas presentes en los órganos o tejidos blanco. Además, conocer como los diferentes contaminantes se acumulan en aquellos organismos de interés para el consumo permite prevenir potenciales riesgos para la salud humana.

Resulta importante distinguir entre los términos bioacumulación y bioconcentración. La **bioacumulación** refiere a la acumulación de un contaminante en un organismo desde cualquier fuente de exposición incluyendo aire, agua y alimento. El término **bioconcentración**, más restringido, proviene de la toxicología acuática y hace alusión a la acumulación sólo desde el medio (ej. agua).

La bioacumulación debe ser entendida como la consecuencia neta de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación dentro de un individuo (Figura 3.8.).

Diferentes modelos pueden utilizarse para representar la acumulación de los contaminantes en la biota. Una de las aproximaciones más simples utilizadas para contaminantes orgánicos es un modelo que considera el reparto, en el equilibrio, del contaminante entre la biota y el medio dado por la siguiente expresión:

$$K_b = \frac{C_{org}}{C_w}$$

Donde, K_b es el factor de bioconcentración, C_{org} la concentración del contaminante en el organismo y C_w la concentración del contaminante en el agua (o el medio externo). Para contami-

En organismos orgánicos se ha observado una relación directa entre K_b y K_{ow} (constante de reparto octanol/agua), siendo una de las regresiones lineales más utilizadas entre ambas variables la de Mackay (1982):

$$K_{org} = 0,048 \times K_{ow}$$

En dicho modelo el organismo se considera como un único compartimiento homogéneo englobado por una membrana lipídica y conteniendo una mezcla de agua lípidos con propiedades semejantes a las del octanol y asume que el tóxico es no reactivo ni metabolizable. Dicha regresión ha sido apropiada para describir la acumulación de contaminantes con un $\log K_{ow}$ entre 3 y 6, como se discutiera en una de las secciones precedentes, y para organismos como peces pequeños con un contenido de lípidos del 7,6%.

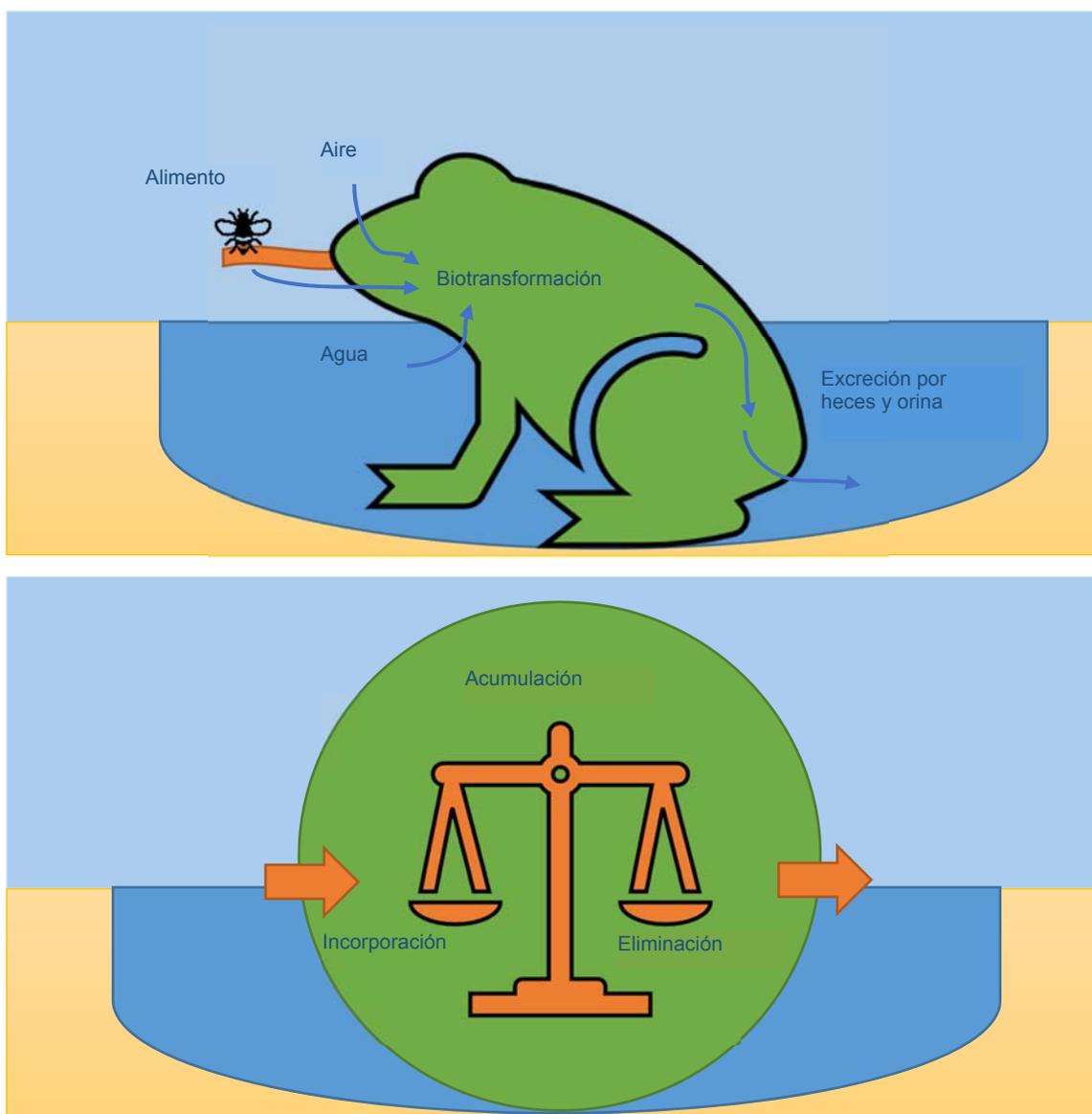


Figura 3.8. Esquema conceptual simplificado de los procesos que determinan la acumulación de los contaminantes en la biota

El factor de bioconcentración también puede expresarse en términos de la fugacidad (f), un concepto termodinámico que puede entenderse como la presión parcial o tendencia a escapar de una fase de una sustancia. La relación entre la concentración de una sustancia en una fase y la fugacidad viene dada por:

$$C = f \times Z$$

Donde, C es la concentración (mol/m^3), f la fugacidad (P_a) y Z la capacidad de fugacidad ($\text{mol}/\text{m}^3 \times P_a$). En el equilibrio, la fugacidad de una sustancia en dos fases diferentes es equivalente: $f_{org} = f_w$ y, por lo tanto:

$$\frac{C_{org}}{C_w} = \frac{Z_{org}}{Z_w}$$

Otra aproximación es a través de un modelo de cinética de transferencia de masas o toxicocinético. Desde la ecotoxicología, se puede definir a la **toxicocinética** como el análisis cuantitativo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los contaminantes mediante la medición y modelado de las concentraciones en el organismo (o sus tejidos) en función del tiempo. En los modelos toxicocinéticos, se considera que cuando la distribución del contaminante entre las dos fases no se encuentra en equilibrio termodinámico, existirá una transferencia de masas en favor del gradiente de concentración en favor de alcanzar el equilibrio. En el modelo más simple con las características previamente mencionadas, un único compartimiento mezcla de agua y lípido similar al octanol, la tasa de cambio en la concentración del contaminante en el organismo estará dada por la resultante entre la tasa de ingreso menos la tasa de eliminación según la expresión:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = K_u \times C_w - K_e \times C_{org}$$

Donde, K_u es la constante de ingreso ($\text{Kg} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), C_w la concentración del contaminante en el agua (o el medio externo), K_e es la constante de eliminación (h^{-1}) y C_{org} la concentración del contaminante en el organismo. De aquí puede verse que la tasa de incorporación del contaminante depende de la concentración del contaminante en el agua:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = K_u \times C_w$$

mientras que la tasa de eliminación depende de la concentración en el tejido:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = -K_e \times C_{org}$$

Según esta ecuación, la velocidad de eliminación se estima de un modo análogo a la velocidad de salida del agua por un orificio inferior de un tanque de almacenamiento, la cual depende del volumen de agua dentro del tanque. La concentración del contaminante en un momento dado estará dada la integral de dicha función, que es una exponencial negativa:

$$C_{org} = C_{org(t_0)} \times e^{-K_e \times t} \therefore \ln C_{org} = \ln C_{org(t_0)} - K_e \times t$$

El tiempo para que la concentración en el tejido alcance la mitad será $t_{1/2} = \ln \frac{2}{K_2} = 0.693 \times K_e$. Si se consideran simultáneamente ambas fases, la de incorporación y eliminación la concentración del contaminante en el organismo en un momento dado puede estimarse como:

$$C_{org} = \frac{K_u}{K_e} \times C_w \times (1 - e^{-K_e \times t})$$

Una representación de como varía la concentración en el organismo en las fases de acumulación y eliminación en función del tiempo de exposición pueden apreciarse en la [Figura 3.9](#). Según el modelo la velocidad de ingreso y egreso del contaminante se equiparán a tiempo infinito (C_{max} en el equilibrio) y donde $e^{-K_e t} = 0$ y por tanto de la relación entre K_u y K_w se obtiene el factor de bioconcentración:

$$\frac{C_{org}}{C_w} = \frac{K_u}{K_e} = K_b$$

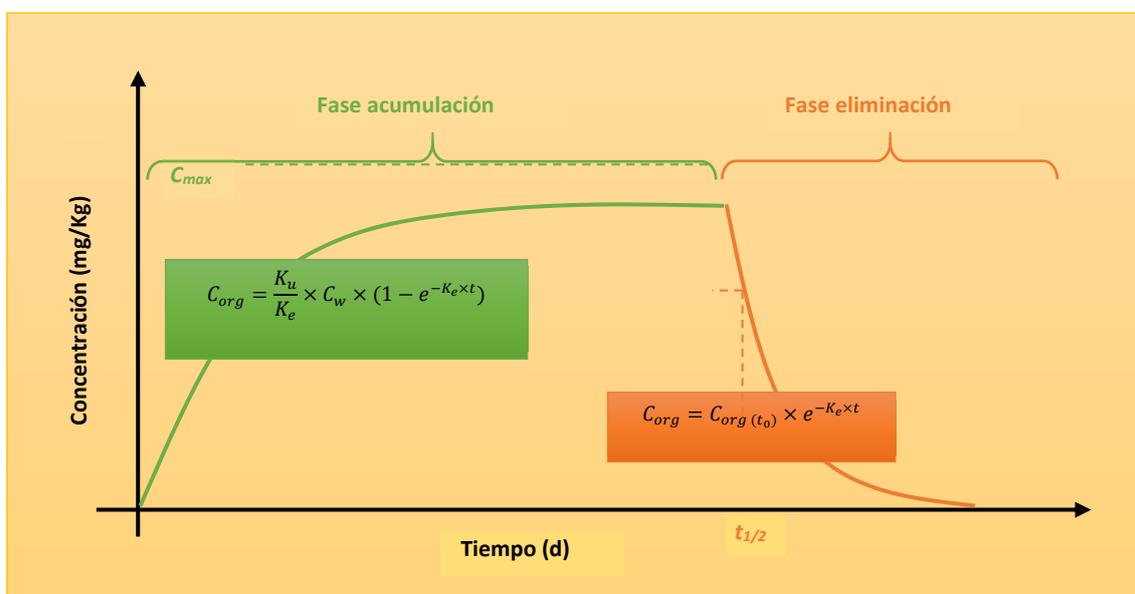


Figura 3.9: Modelo toxicocinético de acumulación de los contaminantes en la biota

Al modelo pueden incorporarse más de una fuente de exposición y más de un compartimiento de eliminación como sigue:

$$C_{org} = \frac{K_u \times C_w + \alpha R \times C_f}{K_{e1} + K_{e2}} \times (1 - e^{-(K_{e1} + K_{e2}) \times t})$$

Donde α =porcentaje de asimilación, R cantidad de alimento ingerido, C_f concentración en el alimento, K_{e1} y K_{e2} las constantes de eliminación de cada compartimiento. La ecuación generalizada estaría dada por:

$$C_{org} = \frac{\sum_{j=1}^m C_j \times K_{uj}}{\sum_{i=1}^n k_{ei}} \times (1 - e^{-\sum_{i=1}^n K_{ei} \times t}) + C_{org(t_0)} \times e^{-\sum_{i=1}^n K_{ei} \times t}$$

Donde además se agrega una $C_{org(t_0)}$ como una concentración inicial del contaminante diferente de 0. A medida que los modelos se complejizan se requiere mayor información para satisfacer sus parámetros y por tanto la utilidad de estos modelos será un compromiso entre su capacidad de predicción y su simpleza.

Desde un punto de vista regulatorio, existen diferentes criterios para establecer si una sustancia es bioacumulable o no. En el marco del control de sustancias peligrosas, para establecer el perfil PBT (Persistencia-Bioacumulación-Toxicidad) de una sustancia en relación con la Ley de Control de Sustancias Tóxicas (Toxic Substances Control Act) de Estados Unidos, la USEPA (United States Environmental Protection Agency) establece como criterios que una sustancia no es bioacumulable si su valor de K_b es <1000, es bioacumulable si el valor de K_b se encuentra entre 1000 y 5000 y es muy bioacumulable si el valor de K_b es > 5000. En el marco del Reglamento para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH), la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA) establece que una sustancia es bioacumulable si K_b es > 2000 (criterio B) y muy bioacumulable cuando K_b es > 5000 (criterio vB).

Relación entre acumulación y toxicidad

La relación entre la concentración de un contaminante en su sitio blanco suele ser difícil de obtener y por tanto la concentración total de la sustancia en el organismo suele ser utilizada como una estimación substituta. El **residuo corporal crítico** (CRB) o **concentración efectiva interna** (IEC) ha sido definido por McCarthy como la concentración molar por peso corporal del organismo que provoca un punto final tóxico definido. Si ese punto final es la letalidad se lo conoce como **residuo corporal letal** (LBR), **concentración letal interna** (ILC)

o **carga corporal letal** (LBB). Para compuestos orgánicos lipofílicos ($K_{ow} > 2$) la concentración interna asociada a una mortalidad del 50% se puede relacionar, en el equilibrio, con el factor de bioconcentración y la CL50 a través de la expresión:

$$ILC_{50} = FBC \times LC_{50}$$

En tanto que en el modelo cinético la relación quedaría establecida por:

$$C_{org} = ILC_{50} \times (1 - e^{-K_e t})$$

Biomagnificación de los contaminantes

En los ecosistemas, las diferentes especies de una comunidad biológica se relacionan unas con otras a través de las redes tróficas que establecen que especies se alimentan, o son alimento, de cuales otras. Sin embargo, desde el punto de vista de la acumulación de los contaminantes, no es tan relevante el concepto de red trófica (quien se come a quien) sino que resulta más importante conocer el nivel trófico en el que se encuentra un organismo determinado y como es la acumulación del contaminante en los organismos de un nivel trófico respecto a los de otro nivel trófico (Figura 3.10.). En cualquier ecosistema se reconocen los siguientes niveles tróficos: productores primarios, consumidores de primer orden, consumidores de segundo orden, consumidores de tercer orden, etc., y descomponedores. Los productores primarios (ej. plantas terrestre y acuática, algas, fitoplancton) son aquellos organismos fotoautótrofos, o sea que pueden captar la energía lumínica proveniente del sol para fijar CO₂ y sintetizar moléculas orgánicas como azúcares que posteriormente se utilizarán como fuente de energía y para generación de biomasa. Esos organismos autótrofos servirán de alimento a los consumidores de primer orden (herbívoros terrestres y acuáticos, zooplancton), estos utilizarán las moléculas orgánicas sintetizadas por los productores primarios como fuente de energía y materia para su propio crecimiento y desarrollo. Los consumidores de segundo orden se alimentarán de los de primer orden y los de tercer orden de los de segundo orden y así hasta llegar a los predadores tope, consumidores que se encuentran en la cima de la pirámide alimentaria y que no poseen otros organismos que preden sobre ellos, en estado adulto y de forma significativa.

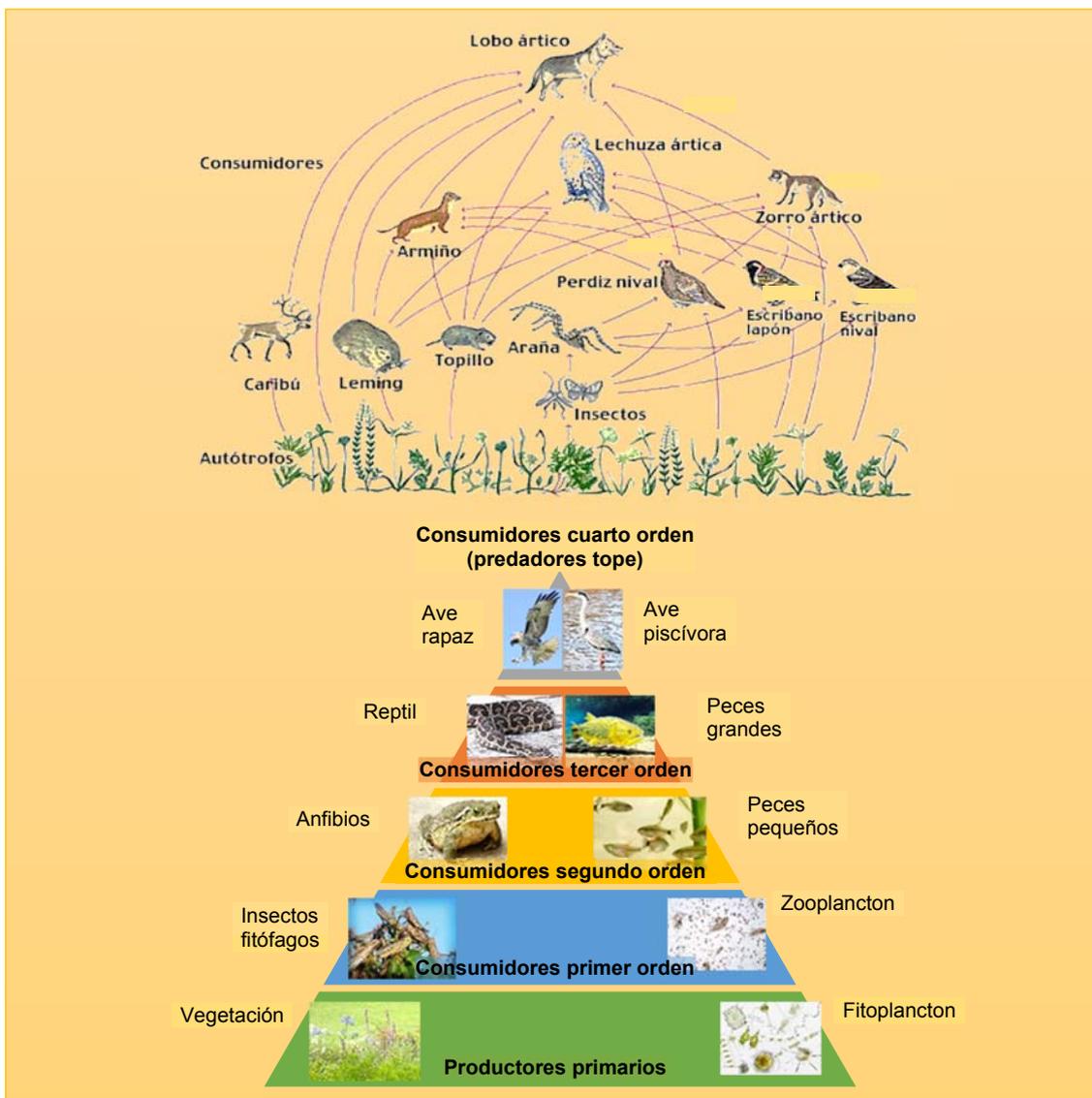


Figura 3.10: Diferencia entre red trófica (Panel superior) y niveles tróficos (Panel inferior) en los ecosistemas.

Dado que los organismos suelen alimentarse de más de una especie, que muchos son omnívoros (se alimentan tanto de plantas como de animales) y que existe cierta flexibilidad dependiendo de las características del ecosistema, no siempre resulta sencillo determinar el nivel trófico que ocupa una especie en particular y el mismo puede cambiar de un ecosistema a otro. Para posicionar a una especie en un nivel trófico, resulta de gran utilidad aprovechar la **discriminación isotópica** del C, N y S, fenómeno por el cual los isótopos pesados (^{13}C , ^{15}N , ^{34}S) se encuentran en las biomoléculas (ej. proteínas, ácidos nucleicos) se enriquecen respecto a los livianos (^{12}C , ^{14}N , ^{32}S) en cada transferencia trófica, debido a que éstos últimos son excretados del cuerpo más rápidamente. En particular la relación entre los isótopos del nitrógeno son los que mejor se adecúan como indicadores de nivel trófico empleando la variación en la concentración de ambos isótopos en un organismo respecto a dicha relación en el aire según la siguiente ecuación:

$$\delta^{15}N = 1000 \times \frac{^{15}N_{muestra} / ^{14}N_{muestra}}{^{15}N_{aire} / ^{14}N_{aire}} - 1$$

Las unidades de la variación en $\delta^{15}N$ se expresan en partes por mil. La diferencia de los valores de $\delta^{15}N$ entre niveles tróficos suelen ser muy variable, oscilando ente 1,3 ‰ y 5.3 ‰, pero en promedio se toma com o 3,4 ‰.

A partir de los valores de $\delta^{15}N$ se puede estimar el **nivel trófico** (TL) de un organismo en el ecosistema a través de la ecuación:

$$TL_{consumidor} = \frac{\delta^{15}N_{consumidor} - \delta^{15}N_{productor\ primario}}{^{15}N}$$

La diferencia de $\delta^{15}N$ entre consumidores y productores se utiliza para calcular el **factor de enriquecimiento**, que indica el incremento en de un nivel trófico a otro $\delta^{15}N$.

Los isótopos del C suelen ser un complemento útil a la hora de entender la fuente de carbono, sobre todo en ecosistemas acuáticos ya que la tasa fijación de ^{14}C y ^{13}C por las plantas C_3 y C_4 y en la disolución del CO_2 es diferente y por tanto con el $\delta^{13}N$ es posible saber si el origen de la materia orgánica es principalmente alóctono (aporte terrestre) o autóctono (fijación acuática).

La **biomagnificación** puede definirse como el incremento de la concentración de un contaminante de un nivel trófico a otro. Las razones que contribuyen a explicar porque hay contaminantes que se biomagnifican se vinculan a que los predadores suelen vivir más tiempo que las presas, que su tamaño es mayor, que poseen un mayor contenido lipídico y que su crecimiento es más lento y por tanto la dilución del contaminante por crecimiento menor.

Una forma relativamente simple de identificar rápidamente si un contaminante es capaz o no de biomagnificarse es comparar la concentración del contaminante en un organismo ubicado a un nivel trófico bajo contra la concentración en un predador tope, si las concentraciones son similares difícilmente el contaminante se esté biomagnificando, si por el contrario las concentración del contaminante son mucho mayores en el predador tope, muy probablemente estemos frente a un contaminante que tiene la capacidad de biomagnificarse. La forma de calcular de manera más precisa si un contaminante se biomagnifica o no es a través del **factor de biomagnificación** calculado del siguiente modo:

$$B = \frac{C_n}{C_{n-1}}$$

Donde, B es el fator de biomagnificación, C_n la concentración en los organismos de nivel trófico n y C_{n-1} en los organismos del nivel trófico inmediatamente anterior. El factor de biomagnificación también puede ser expresado en función de los parámetros del modelo de toxicocinética según:

$$B = \frac{\alpha R}{K_e}$$

Donde, α es la eficiencia de asimilación, R la tasa de alimento consumido (Kg/d) y K_e la constante de eliminación. Más comúnmente el factor de biomagnificación se obtiene a través de modelos de regresión lineal entre el logaritmo de la concentración del contaminante respecto a especies del ecosistema ubicadas en diferentes niveles tróficos por su $\delta^{15}N$, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\log C = \delta^{15}N \times b + a$$

Donde b , es la **pendiente de biomagnificación trófica (TMS)**.

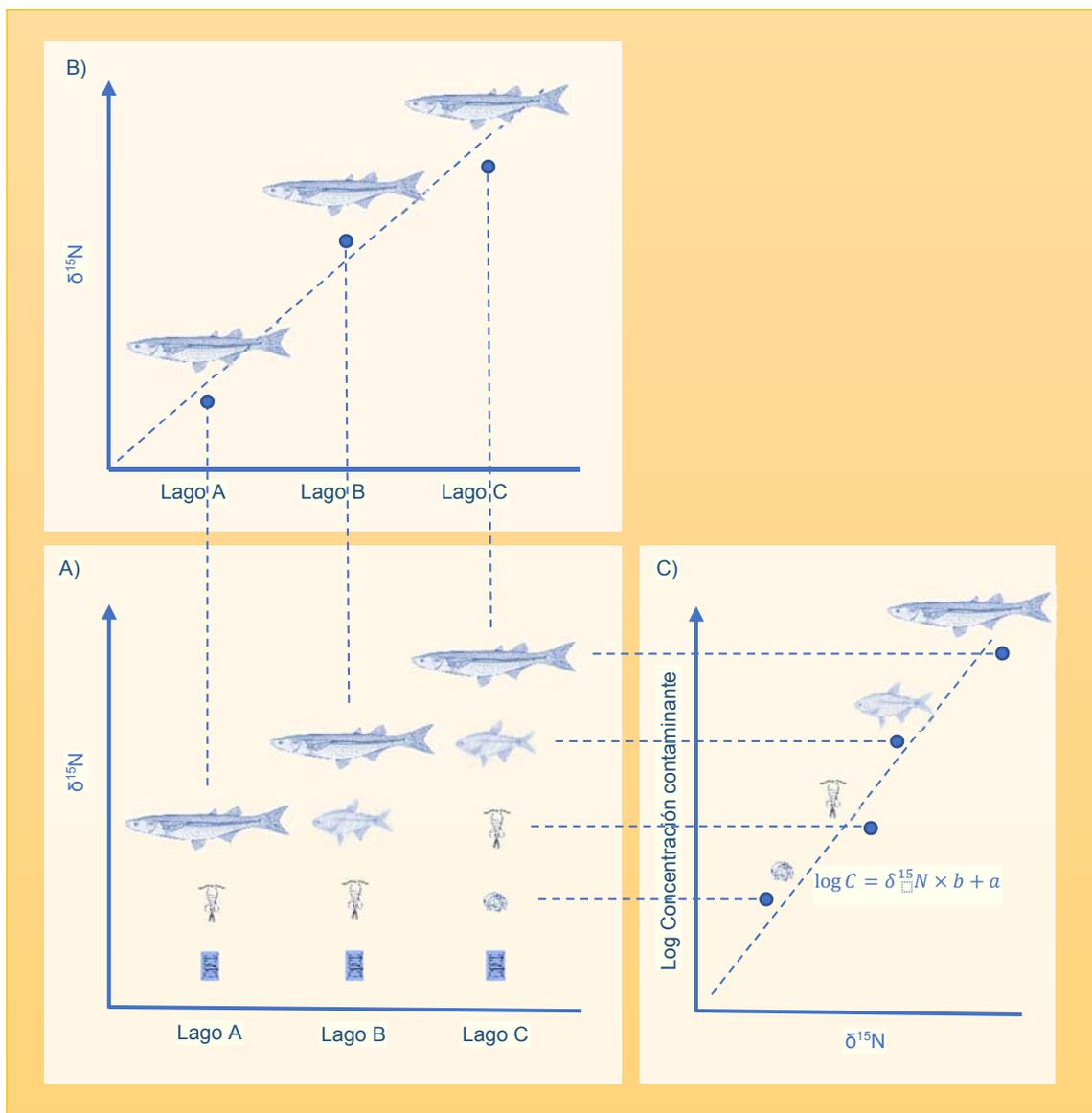


Figura 3.11: Relación entre los valores de $\delta^{15}N$ en diferentes especies que ocupan distintos niveles tróficos en tres lagos hipotéticos de la región pampeana (Panel A). Valores de $\delta^{15}N$ para una misma especie de pez (ej. *Odontesthes bonariensis*) que ocupa diferentes niveles tróficos en los distintos lagos (Panel B). Relación entre el nivel trófico dado por el valor de $\delta^{15}N$ y la acumulación de un contaminante que se biomagnifica en diferentes especies de un mismo lago (Panel C).

Si en lugar de $\delta^{15}N$ se utiliza el nivel trófico (TL), la expresión queda como sigue:

$$\log C = TL \times b + a$$

Resulta importante reconocer que el nivel trófico de una especie puede variar de un ambiente a otro, por consiguiente, su identificación a partir de los niveles de $\delta^{15}N$ contribuyen a una estimación más precisa del factor de bioconcentración (Figura 3.11.).

Cuando existe biomagnificación el valor de la pendiente será $b > 0$. En contraposición, algunos contaminantes pueden presentar dilución trófica cuando en lugar de aumentar la concentración a través de los niveles tróficos, la concentración disminuye y entonces $b < 0$. Como referencia, los valores de b para el mercurio, elemento que se biomagnifica marcadamente, encontrada en un meta análisis realizado sobre datos de las redes tróficas de 69 ecosistemas acuáticos alrededor de todo el mundo (Lavoie et al., 2013), arrojó valores promedio para el mercurio total (THg) y el metilmercurio (MeHg) de $0,16 \pm 0,11$ y $0,24 \pm 0,08$, respectivamente, siendo la pendiente claramente mayor para la especie metilada.

Bibliografía

- Carrquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68, 613-621.
- Carrquiriborde, P., Ronco, A.E., 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu(II), and Cr(VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquat. Toxicol.* 86, 313-322.
- Lavoie R.A., Jardine T.D., Chumchal M.M., Kidd K.A., Campbell L.M., 2013. Biomagnification of Mercury in Aquatic Food Webs: A Worldwide Meta-Analysis. *Environmental Science & Technology*; 47: 13385-13394.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution (4th)*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment* Taylor and Francis, Washington, D.C.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2012. *Principles of Ecotoxicology (4th)*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.