



Analisi della cinetica di accumulo e di eliminazione di chlorpyrifos in *Xenopus laevis*

Marzia Castelli, Sara Villa*, Patrizia Bonfanti, Anita Colombo, Federica Orsi, Marco
Vighi

Università degli studi di Milano Bicocca, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Piazza della Scienza 1, 20126 Milano Italy

Riassunto

Negli ultimi anni numerose pubblicazioni hanno descritto un aumento nella frequenza delle malformazioni ed un declino nelle popolazioni di anfibi. Tra le possibili cause, viene riportata l'esposizione a prodotti fitosanitari usati in agricoltura. È noto infatti che gli organofosfati, tra cui chlorpyrifos (CPF), provocano effetti tossici negli organismi non bersaglio come per esempio l'inibizione dell'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi (AChE) che causa una continua stimolazione dei recettori colinergici con conseguente alterazione della contrazione muscolare. La valutazione del bioaccumulo e della capacità detossificante, in termini di clearance, negli stadi larvali di *Xenopus laevis* esposti a CPF, è uno degli scopi del progetto di ricerca attualmente in corso. I risultati ottenuti dai saggi ecotossicologici effettuati hanno permesso di evidenziare tre fasi distinte nella cinetica di uptake e clearance, ciascuna delle quali caratterizzata da una peculiare cinetica di reazione. Queste risultano essere tutte correlate alle proprietà chimico-fisiche della molecola in studio e alle proprietà biologiche dell'organismo saggiato. Le differenze delle reazioni individuate nei vari stadi di sviluppo hanno una grande rilevanza ecologica nell'ambito di una stima del rischio ecotossicologico per anfibi in seguito ad esposizione a xenobiotici.

© 2004 SItE. All rights reserved

Keywords: *Xenopus laevis*, chlorpyrifos, accumulo, eliminazione, sviluppo embrionale

1. Introduzione

Nel 1963 R. Carson con il suo libro "Primavera silenziosa" denunciò il potenziale rischio ambientale per la fauna selvatica legato all'utilizzo di pesticidi organoclorurati (DDT in particolare) dando così il via ad una nuova sensibilità nell'opinione pubblica, nella comunità scientifica e giuridica verso questa problematica. Da allora sono stati effettuati

molteplici studi per riuscire ad individuare gli effetti negativi, sia sull'ambiente che sugli organismi, derivanti dall'utilizzo di sostanze xenobiotiche. Tra gli organismi non target più sensibili alla contaminazione da fitofarmaci, compaiono gli anfibi (Blaustein and Wake, 1995).

Recentemente infatti è stato documentato un aumento nella frequenza delle malformazioni e un declino nella popolazione di anfibi, la cui causa può essere ricercata, oltre che in fattori quali per esempio piogge acide, riduzione degli habitat, presenza di

* Corresponding author. Tel.: +39.02.6448.2735; fax: +39.02.6448.2795; e-mail: sara.villa@unimib.it.

specie non indigene, incremento di radiazioni ultraviolette, malattie e presenza di specie fungine, anche nell'utilizzo di prodotti fitosanitari in agricoltura (Linder et al., 2003). Gli anfibi, per le loro caratteristiche biologiche e il loro ciclo di sviluppo, sono tra gli organismi maggiormente vulnerabili alla contaminazione da fitofarmaci. Le uova per l'assenza di guscio protettivo e per la presenza di una discreta quantità di tuorlo accumulano facilmente sostanze xenobiotiche con caratteristiche lipofile. Inoltre in ambiente lo sviluppo degli embrioni coincide con il periodo di maggior utilizzo di prodotti fitosanitari in agricoltura. In seguito a tale utilizzo concentrazioni apprezzabili di queste sostanze possono arrivare fino alle acque superficiali, habitat naturale degli anfibi e delle loro larve.

Una classe importate tra i prodotti fitosanitari è rappresentata dagli insetticidi organofosforici. Tra questi il chlorpyrifos (CPF), insetticida che agisce per contatto, ingestione ed inalazione, viene utilizzato in ambito domestico, industriale ed agricolo.

I suoi effetti tossici su organismi non bersaglio si manifestano con inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinaesterasi a livello del sistema nervoso centrale e periferico.

Inoltre CPF causa severe malformazioni a carico della struttura assile in embrioni di varie specie di anfibi (Richard and Kendall, 2002; Bonfanti et al., 2004).

In tale ambito è stato osservato un danno a carico della muscolatura scheletrica della coda in larve di *Xenopus laevis* esposte a CPF per 120 h, a partire dallo stadio di blastula (8 h post fecondazione), (Bonfanti et al., 2004).

Poiché, gli effetti tossici, spesso molteplici, sono conseguenze dirette delle concentrazioni delle sostanze potenzialmente pericolose negli organismi o nei tessuti bersaglio, è importante in campo ecotossicologico capire e prevedere il fenomeno del bioaccumulo. Infatti la tossicità è funzione della dose interna di una sostanza e della sua permanenza (media) a livello del bersaglio.

Nel presente lavoro è stato allestito un saggio ecotossicologico al fine di valutare il bioaccumulo e la clearance di CPF in larve di *Xenopus laevis* esposte per un breve periodo al pesticida in studio.

2. Materiali e metodi

In tabella 1 vengono riportate le proprietà chimico-fisiche ed ecotossicologiche della molecola in studio.

Tabella 1. Proprietà chimico-fisico ed ecotossicologiche del chlorpyrifos

Nome chimico (IUPAC)	O,O-diethylO-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Formula chimica	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
CAS No.	2921-88-2
Peso molecolare	350,6 (Finizio, 1998)
Solubilità in acqua (mg/L) (25 °C)	7,3E -01 (Finizio, 1998)
Tensione di vapore (Pa) (25 °C)	2,50E-03 (Finizio, 1998)
Log Kow	5,26 (Finizio, 1998)
Coefficiente di ripartizione su carbonio organico (log Koc)	4,13 (Finizio, 1998)
Costante di Henry (Pa m ³ /moli)	4,06E-03 (Finizio, 1998)

2.1. Svolgimento del saggio ecotossicologico

Embrioni di *Xenopus laevis* ottenuti mediante fecondazione *in vitro* (Vismara et al., 1993) sono stati suddivisi in 12 pool da 600 e posti in capsule Petri del volume di 500 ml. A partire dallo stadio di blastula (8 ore post fecondazione) gli embrioni sono stati esposti, per 24 h, a tre concentrazioni di CPF (50 µg/L, 100 µg/L e 250µg/L) (3 Petri per ogni concentrazione) o mantenuti in soluzione salina (Fetax) (3 Petri controllo) e incubate in termostato a 23 ±1°C.

L'esperimento ha avuto una durata complessiva di 264 ore (12 giorni): durante i primi 6 giorni sono stati effettuati campionamenti ogni 24 ore sia della matrice biologica che acquosa, mentre per i successivi 6 giorni ogni 48 ore.

2.1.1. Metodi

Ogni campione di soluzione acquosa (100 mL) è stato estratto tramite l'utilizzo di cartucce OASIS HLB (Waters). Il condizionamento delle cartucce è stato eseguito utilizzando 6 mL di etilacetato, 6 mL di metanolo e 6 mL d'acqua milli-Q. Dopo questi tre passaggi, il campione è stato fatto passare sulla

cartuccia ad un flusso costante di 1 mL/min tramite una pompa da vuoto. Al termine, previa asciugatura, la cartuccia è stata eluita con 6 mL di etilacetato.

Le larve, triturate in un mortaio di ceramica con solfato anidro, sono state trasferite in ditali di cellulosa all'interno di vials in cui vengono aggiunti 25 mL di n-esano e sonicate alla temperatura di 40°C per tre/quattro cicli di ultrasuoni da 15 minuti ciascuno.

Tutti gli estratti sono stati raccolti in vials, concentrati sotto flusso d'azoto fino ad un volume di 0,5 mL, addizionati di standard interno ed iniettati in gas cromatografo serie 6890N (Agilent Technologies) per la quantificazione.

La determinazione del CPF è stata effettuata mediante gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MSD serie 5973N della Agilent Technologies) in modalità SIM (Selected Ion Monitoring). La quantificazione è stata effettuata secondo il metodo dello standard interno (atratone). Gli ioni selezionati per l'identificazione e la quantificazione sono il 197 e 286 per il CPF mentre per lo standard interno sono stati scelti il 196 e 211. Sul gascromatografo utilizzato è stata montata una colonna HP5-MS di 30 m, con diametro interno di 0,25 mm e spessore del film di 0,25 µm. Il flusso in colonna dell'elio, utilizzato come carrier, è stato di 1 mL/min mentre la pressione di 60 KPa a 80°C. La temperatura dell'iniettore è stata di 250°C mentre la temperatura del detector di 280°C. La rampa di risalita della temperatura del forno è stata di 15°C/min fino a 160°C e di 5°C/min fino a 280°C.

3. Risultati

I risultati ottenuti dalle analisi sulla matrice biologica e sull'acqua di allevamento sono riportati in figura 1 e 2 rispettivamente. I valori delle concentrazioni di CPF ritrovati nei campioni di matrice biologica sono stati normalizzati ai valori di peso secco.

La scarsa quantità di materiale biologico ha consentito di condurre il saggio per la concentrazione 50 µg/L solo fino alle 168 ore mentre per la concentrazione 250 µg/L fino alle 216 ore. I campioni per la concentrazione 100 µg/L sono stati rilevati sino alle 264 ore.

Le analisi relative ai campioni controllo per entrambe le matrici non hanno presentato concentrazioni di CPF apprezzabili. Pertanto sono da escludere fenomeni di contaminazione.

Per verificare l'uniformità dei risultati e la ripetitività del metodo nel saggio svolto, sono stati confrontati tra loro sia i valori sia i diversi andamenti della concentrazione di CPF relativi ad ogni singola Petri per tutte le concentrazioni testate. La similarità riscontrata tra i dati relativi alle diverse Petri, per ogni concentrazione saggiata, conferma la ripetitività del metodo. Nelle elaborazioni successive sono state utilizzate le medie aritmetiche dei valori relativi alle 3 repliche ottenute per ogni campionamento. La stessa procedura è stata applicata ai campioni della matrice acquosa.

Dall'analisi delle curve si può osservare lo stesso andamento in tutte e tre le concentrazioni testate sia nelle larve di *Xenopus laevis* (Figura 1) sia nella soluzione Fetax (Figura 2).

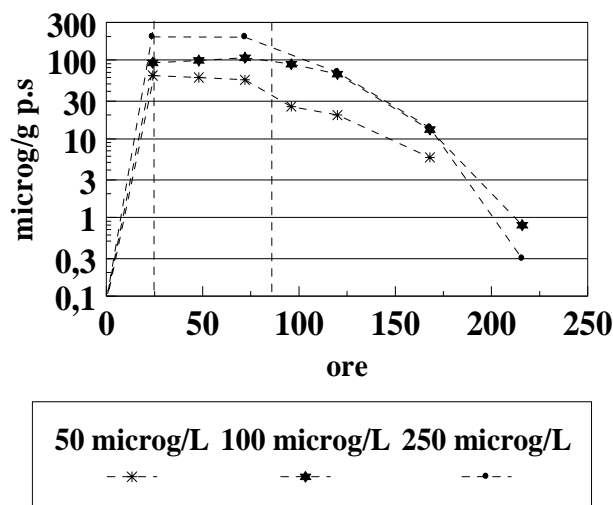


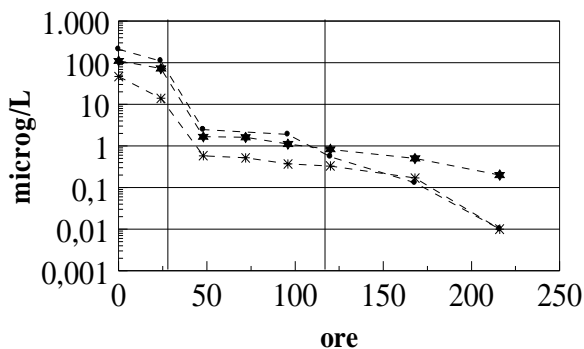
Figura 1. Trend delle concentrazioni di CPF nelle larve di *Xenopus laevis*.

Dall'analisi degli andamenti mostrati in figura 1 è possibile osservare che:

1. la concentrazione di CPF aumenta repentinamente nelle prime 24 ore dall'inizio del test, periodo in cui gli organismi rimangono esposti alla soluzione contaminata;
2. dalle 24 fino alle 96 ore circa, la concentrazione di CPF rimane pressoché costante;

3. dalle 96 fino alle 264 ore vi è diminuzione costante e continua della concentrazione fino a raggiungere valori non più rilevabili strumentalmente.

Il valore di concentrazione dell'analita quantificato nella matrice acquosa al tempo 0 (inizio test) conferma la concentrazione teorica di CPF introdotta, con una tolleranza tra il dato teorico e quello sperimentale di circa $\pm 15\%$.



50 microg/L 100 microg/L 250 microg/L

- * - - * - - * - -

Figura 2. Trend delle concentrazioni di CPF nella soluzione di allevamento (Fetax).

Parallelamente, dagli andamenti riportati in figura 2 si può osservare:

1. nelle prime 24 ore, una riduzione del 50% della concentrazione di CPF nella matrice acquosa per le concentrazioni 50 $\mu\text{g/L}$ e 250 $\mu\text{g/L}$, e del 40%

per la concentrazione 100 $\mu\text{g/L}$. La drastica riduzione di CPF è dovuta alla sostituzione della soluzione contaminata con soluzione salina fresca, operazione che è stata effettuata giornalmente;

2. una concentrazione di CPF pressoché costante dalle 24 alle 96 ore circa;

3. una diminuzione costante e continua della concentrazione dell'analita fino al raggiungimento di valori non più rilevabili strumentalmente dalle 96 alle 264 ore.

4. Discussione

La valutazione della cinetica di bioaccumulo e clearance di CPF in stadi larvali precoci dell'anfibio anuro *Xenopus laevis*, ha permesso di evidenziare 3 fasi: Fase 1, uptake; Fase 2, stabilità; Fase 3, clearance.

La fase di uptake si manifesta nelle prime 24 ore, durante le quali nella matrice biologica i livelli di CPF aumentano, per tutte le concentrazioni testate, a causa della partizione dell'analita dall'acqua verso le larve di *Xenopus laevis* e al contempo, i livelli di CPF si riducono in modo significativo nella soluzione di allevamento. Dai calcoli del bilancio di massa (Tabella 2) si può affermare che la quantità di CPF, non più rilevata nel Fetax, è stata completamente ritrovata nel comparto biologico con un recupero del 100% (tolleranza $\pm 10,6\%$) per tutte e tre le concentrazioni (Tabella 3). Ciò porta ad escludere l'influenza di significativi fenomeni degradativi e/o di volatilizzazione sulla diminuzione della concentrazione di CPF nel Fetax.

Tabella 2. Calcoli del bilancio di massa

	Conc. ($\mu\text{g/g p.s.}$)		Volumi estratti (g)		Massa (g)	
	T=0	T=24	T=0	T=24	T=0	T=24
<i>Xenopus laevis</i>						
50 $\mu\text{g/L}$	n.d.	52,84	n.d.	0,308	n.d.	16,27
100 $\mu\text{g/L}$	n.d.	92,30	n.d.	0,264	n.d.	24,37
250 $\mu\text{g/L}$	n.d.	196,52	n.d.	0,220	n.d.	43,37
	Conc. ($\mu\text{g/g p.s.}$)		Volumi estratti (L)		Massa (g)	
<i>Fetax</i>	T=0	T=24	T=0	T=24	T=0	T=24
50 $\mu\text{g/L}$	46,88	13,97	0,5	0,5	23,44	6,9
100 $\mu\text{g/L}$	110	73	0,5	0,5	55,5	36,5
250 $\mu\text{g/L}$	200,80	106,72	0,5	0,5	100,4	53,36

Tabella 3. Massa di CPF introdotta a t=0 (inizio test) e valori ritrovati al termine delle prime 24 ore.

	µg introdotti a t=0	µg nel sistema a t=24 ore	Percentuale di recupero a t=24
50 µg/L	23,44	23,17	98,85%
100 µg/L	55,5	60,87	109,67%
250 µg/L	100,4	96,59	96,20%

La fase di stabilità si verifica dalle 24 alle 96 ore in cui le concentrazioni di CPF ritrovate nella matrice biologica e acquosa mostrano un andamento abbastanza costante poiché sono nulli i processi di uptake e di clearance. Tale stabilità suggerisce l'assenza di attività metabolica in questo periodo del ciclo vitale di *Xenopus laevis* (Bantle et al, 1999). Inoltre, come mostrato in figura 3, esiste una correlazione lineare ($R^2=0,94$) tra i valori di concentrazione ritrovati nella matrice acquosa (riportati in ascissa) e quelli ritrovati nella matrice biologica (riportati in ordinata).

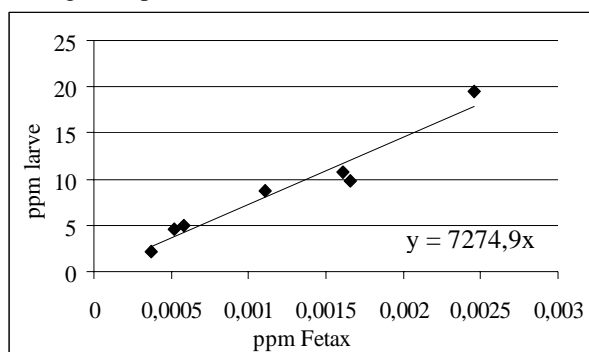


Figura 3. Regressione lineare tra le concentrazioni di CPF ritrovate in *Xenopus laevis* e in Fetax tra le 24 e le 96 ore.

Le quantità di pesticida ritrovate nel Fetax sono attribuibili al solo meccanismo di partizione dalla matrice biologica verso quella acquosa. Infatti dall'equazione di regressione di figura 3 si evince che:

$$\frac{\text{Clarve}}{\text{CFetax}} = 7274,9 = \text{BCF}$$

Il fattore di bioconcentrazione per i pesci (BCF_{pesce/acqua}) è calcolato nel modo seguente:

$$\text{BCF}_{\text{pesce/acqua}} = L * K_{ow}$$

dove L rappresenta la frazione lipidica per i pesci (pari 0.048).

Utilizzando questa equazione con il valore di frazione lipidica per larve di *Xenopus laevis* calcolato da Territo e Smits (1998), è stato possibile stimare il valore teorico di BCF_{larve/Fetax} che risulta essere pari a 7279.

Il valore sperimentale di BCF_{larve/Fetax} corrisponde sorprendentemente al valore teorico suggerendo l'importanza dei fenomeni partitivi dalle larve verso il Fetax, in funzione delle proprietà chimico-fisiche della molecola in studio e del contenuto lipidico delle larve.

La fase di clearance si evidenzia dalle 96 alle 264 ore, in cui si può notare come l'andamento della concentrazione sia progressivamente decrescente in entrambe le matrici per tutte e tre le quantità saggiate.

Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ai processi di detossificazione determinati dall'attività metabolica, che comincia a manifestarsi dopo le prime 96-120 ore di sviluppo e ai fenomeni passivi di partizione dell'analita dalle larve verso l'ambiente esterno.

Le quantità che vengono ripartite sono funzione delle proprietà chimico-fisiche delle molecole e delle quantità presenti nelle due fasi. Ne consegue che maggiore è la quantità del CPF presente nel comparto biologico, maggiore è la frazione che si ripartisce nella fase acquosa. Il sistema delle monoossigenasi a funzione mista (MFO) rappresenta il principale sistema enzimatico coinvolto nella detossificazione di contaminanti ambientali di sintesi. Il suo nucleo funzionale più importante, il citocromo P450, è un'emoproteina coinvolta nella maggior parte delle reazioni di detossificazione e caratterizzata da una sistema di isoforme assai complesso (Colombo et al., 1996). Questo sistema multienzimatico è "substrato-

inducibile”, infatti la presenza di determinati composti xenobiotici stimola la sua sintesi per la detossificazione in proporzione alla quantità di contaminante presente nell’organismo. E’ ragionevole ipotizzare che negli organismi esposti alla maggiore delle concentrazioni testate l’attività enzimatica sarà più elevata rispetto alle altre.

Le differenti velocità di diminuzione delle concentrazioni di CPF nelle larve *Xenopus laevis* trovano giustificazione nella compartecipazione dei due fenomeni appena descritti.

Inoltre la fase di stabilità che precede la fase di clearance costituisce una dimostrazione sperimentale indiretta dell’assenza di attività enzimatiche coinvolte nella biotrasformazione di CPF durante le prime 96-120h di sviluppo di *Xenopus laevis*.

5. Conclusioni

I risultati ottenuti nel saggio ecotossicologico hanno consentito di delineare un preciso comportamento di CPF sia nella matrice biologica che acquosa. E’ stato possibile identificare tre specifiche fasi ognuna caratterizzata da importanti fenomeni.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Enrica Palazzi e Alessia Pavirazzi per il loro prezioso contributo.

Bibliografia

Bantle J. A., Finch R. A., Fort D. J., Stover E. L., Hull M., Kumsher-King M., Gaudet-Hull A. M., 1999. Phase III Interlaboratory Study of FETAX Part 3. FETAX Validation using 12 Compounds with and without an Exogenous Metabolic Activation System. *J. Appl. Toxicol.*, 19, 447-472.

Blaustein A.R., Wake D.B., 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Am.*, 272(4), 52-57.

Bonfanti P., Colombo A., Orsi F., Nizzetto I., Andrioletti M., Bacchetta R., Mantecchia P., Fascio R., Vailati G., Vismara C., 2004. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquat. Toxicol.*, 70, 189-200.

Carson R., 1963. Primavera silenziosa. Feltrinelli.

Colombo A., Bonfanti P., Ciccotelli M., Doldi M., Dell’Orto N., Camatini M., 1996. Induction of cytochrome P4501A isoform in *Xenopus laevis* is a valid tool for monitoring the exposure to benzo[a]pyrene. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 5, 207-211.

Finizio A., 1998. Definizione di criteri di classificazione del rischio ambientale di prodotti fitosanitari, con particolare riferimento agli effetti su organismi non bersaglio (parte II), Rapporto per l’Agenzia Nazionale Protezione dell’Ambiente (ANPA), Contratto A.N.P.A. n.ro 97/58/RC050/75/25. Pubblicato da ANPA Serie Documenti 10, 1999 parte II.

Linder G., Krest S.K., Sparling D. W.(eds), 2003. Amphibian Decline: An Integrated analysis of Multiple Stressor Effects. SETAC Press. Pensacola, Florida. pp 368.

Richards S.M., Kendall R.J., 2002. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(9), 1826-1835.

Territo P.R., Smits A.W., 1998. Whole-Body Composition of *Xenopus laevis* larvae: Implications for Lean Body Mass During Development. *J. Experim. Biol.*, 201, 1013-1022.

Vismara C., Bernardini G., Bonfanti P., Colombo A., Camatini M., 1993. The use of in vitro fertilization in the frog embryo teratogenesis assay in *Xenopus* (FETAX) and its applications to ecotoxicology. *Sci Total Environ. Part 1 (Suppl.)*, 787-790.