

Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias Ambientales

Tesis presentada para obtener el título de:
Magíster en Ciencias Ambientales

Bioacumulación de Microcistina – LR en tarariras (*Hoplías sp.*) de un embalse eutrófico (Rincón del Bonete, Uruguay) y su riesgo potencial para la salud humana.

Q.F Macarena Simoens Morandi

Orientador:

Dr. Guillermo Chalar

Asesora Técnica:

Q.F. Jacqueline Cea

2015

Montevideo, Uruguay

Para Felipe, el sol que iluminó mi vida

Agradecimientos

A mis orientadores, Guillermo y Jacqueline, por la confianza, la paciencia y el tiempo dedicado para ayudarme a mejorar y sacar adelante esta tesis.

Al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por darme la posibilidad de hacer esta Maestría.

A mis compañeros de laboratorio AGROPEC, en especial a Lucía, Ignacio, Chiemi y Ofelia por el aguante.

A mis otros compañeros del LATU, de PQAR, MAM, I+D+i, Centro de Información Técnica por sus aportes.

A Diego Nuñez y Marcelo Crossa por todo su apoyo en el muestreo y en el contacto a los pescadores.

A los pescadores del Embalse Rincón del Bonete y de los lagos de Andresito por su colaboración para obtener las tarariras y colaboración en la realización de las encuestas.

A María Cecilia Glisenti, por facilitarme los datos del censo 2012 sobre la comunidad de pescadores artesanales de San Gregorio de Polanco.

A Soc. Msc. Vanesa Olivero, por su ayuda en la elaboración y procesamiento de las encuestas.

Al Dr Xie, por enviarme los insumos para probar su metodología.

A mi mamá, por su apoyo incondicional.

A mi familia, por estar siempre.

A Felipe, por entender que “mamá tiene que estudiar”.

A Seba, por todo.

A Maggy, una compañera inseparable.

A Gisella, por su apoyo permanente y sus buenos consejos.

A Rosario y Jorge por ayudarme en momentos difíciles.

Al portal timbó por existir.

INDICE

1. Introducción	
1.1 Generalidades sobre eutrofización , cianobacterias y cianotoxinas.....	6
1.2 Toxicidad de las cianotoxinas.....	7
1.3 Bioacumulación de microcistina en peces.....	8
1.4 Métodos para la detección y cuantificación de microcistina en peces.....	9
1.5 Antecedentes en Uruguay.....	7
1.6 Justificación del estudio	10
2. Hipótesis, predicciones y objetivos.....	12
2.1 Hipotesis	12
2.2 Predicciones	
2.3 Objetivos	
Objetivo General.....	12
Objetivos específicos.....	12
3. Materiales y métodos	
3.1 Descripción del área de estudio.....	13
3.2 Muestreo.....	15
3.3 Metodología analítica	
3.3.1 Aspectos generales.....	18
3.3.2 Puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras	18
3.3.3 MC-LR en músculo de tarariras de los lagos de Andresito y del Embalse Rincón del Bonete.....	24
3.3.4 MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua.....	24
3.3.5 Riesgos potenciales para la salud humana que pueda causar el consumo de las tarariras contaminadas con MC-LR.....	24
4. Resultados	
4.1 Puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras	25
4.2 MC-LR en músculo de tarariras de los lagos de Andresito y del Embalse Rincón del Bonete.....	28
4.3 MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua	28
4.4 Riesgos potenciales para la salud humana que pueda causar el consumo de las tarariras contaminadas con MC-LR.....	28
5. Discusión	
5.1 Puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras.....	32
5.2 MC-LR en agua y músculo de tarariras del Embalse Rincón del Bonete.....	34
5.3 Riesgos potenciales para la salud humana por el consumo de las tarariras contaminadas con MC-LR.....	36
6. Conclusiones y perspectivas.....	39
7. Anexos.....	40
8. Bibliografía.....	42

RESUMEN

A escala global, uno de los problemas de calidad del agua más extendido es el incremento progresivo de la eutrofización de los ambientes acuáticos. Como síntoma de la eutrofización se destaca la aparición de floraciones tóxicas de fitoplancton, siendo uno de los efectos más graves la producción de toxinas, cianotoxinas. Las microcistinas (MC) son potentes hepatotoxinas y en este grupo la MC-LR una de las variedades más habituales. Los peces son capaces de bioacumular la MC-LR en sus tejidos y transferirla a niveles superiores de la cadena alimentaria, constituyendo un riesgo para los organismos que lo consumen (pájaros, peces) e incluso para la salud humana.

El objetivo de esta tesis fue determinar los riesgos para la salud humana ocasionados por el consumo de tarariras capturadas en el Embalse Rincón del Bonete. Este embalse es eutrófico y las floraciones tóxicas de cianobacterias son frecuentes, principalmente en verano. Para lograr dicho objetivo se puso a punto y validó una metodología para la detección, identificación y cuantificación de MC-LR en músculo de tararira para luego cuantificar la MC-LR en músculo de tararira del Embalse Rincón del Bonete. También se cuantificó la MC-LR en agua dicho embalse. Se realizó una encuesta a los pescadores artesanales del Embalse Rincón del Bonete para caracterizar a la comunidad de pescadores y conocer el consumo de tarariras para así determinar el potencial riesgo a la salud de los consumidores. Durante la puesta a punto de la metodología se ensayaron diferentes métodos hasta lograr las condiciones óptimas para la cuantificación de MC-LR en músculo de tararira. El método seleccionado y validado se basó en cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC/PDA). La concentración de MC-LR en el músculo de los 35 ejemplares de tarariras analizadas y en las muestras de agua fue no detectable ($<2 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $<0.04 \mu\text{g}/\text{L}$ respectivamente). Los niveles de MC-LR encontrados en músculo de tarariras se encuentran por debajo de la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) propuesta por la OMS.

El presente estudio constituye un importante aporte científico para el país teniendo en cuenta que en Uruguay no hay antecedentes de estudios de bioacumulación de la MC-LR en músculo de pescado de consumo humano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre eutrofización, cianobacterias y cianotoxinas

A escala global, uno de los problemas de calidad de agua más extendido es el incremento progresivo de la eutrofización de los ambientes acuáticos. La causa primaria que desencadena este proceso es un aumento en la concentración de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, en una tasa mayor a la que el sistema acuático puede procesar (44). Las principales fuentes antropogénicas son los desechos orgánicos urbanos, domésticos e industriales (aportes puntuales) y los aportes inorgánicos provenientes de la actividad agrícola-ganadera (aportes difusos) (17, 44). El clima puede alterar la productividad al modificar la entrada de energía solar al sistema. El aumento de la temperatura y los cambios en los patrones de precipitación como consecuencia del calentamiento global pueden tener efectos sinérgicos significativos sobre los procesos de eutrofización en los ecosistemas acuáticos (58). Otros aspectos a tener en cuenta son factores propios del sistema como la transparencia del agua debida al material disuelto y en suspensión, morfología del sistema y tiempo de residencia del agua (17).

La eutrofización conduce gradualmente al incremento de la productividad general del ecosistema acuático, lo que provoca un deterioro general en la calidad del agua, reducción del oxígeno disuelto y de la biodiversidad acuática y muerte de los peces (9, 44). Uno de los principales síntomas de la eutrofización es la aparición de floraciones de cianobacterias, fenómeno que en los últimos años se repite con mayor frecuencia tanto en ecosistemas continentales como costeros de todo el mundo (17, 59, 66). Las cianobacterias son microorganismos procariontes fotosintéticos que tienen clorofila-a y realizan fotosíntesis oxigénica. Son capaces de habitar ambientes acuáticos (marinos y continentales), semi-acuáticos y terrestres, así como también ambientes con condiciones extremas (hipersalinos, ecosistemas polares) (24, 82). En los ecosistemas acuáticos las cianobacterias forman parte del fitoplancton (82) pero bajo determinadas condiciones pueden aumentar su biomasa respecto a su concentración original en un período de tiempo corto (días a semanas) originando una floración (17). Pueden ser evidentes a simple vista por la coloración verde y la turbidez que le confieren al agua o por la presencia de acumulaciones en el litoral o franjas densas superficiales. Las floraciones de cianobacterias pueden estar formadas por una o más especies y su tiempo de inicio y permanencia puede ser muy variable, esto depende principalmente de las condiciones climáticas de la región (44, 66).

La presencia de floraciones de cianobacterias en el agua origina problemas de varios tipos. El proceso de descomposición de las floraciones causa desoxigenación del agua lo cual influye en la supervivencia de los animales acuáticos y en todo el ecosistema (17, 44). Por otro lado se produce la alteración de las características organolépticas del agua ya que le confieren color, sabor y olor (originada por la producción de metabolitos volátiles olorosos por ejemplo geosmina) (18, 82). También en aguas utilizadas para potabilización la presencia masiva de cianobacterias trae problemas graves ya que hacen más complejos los procesos aumentando sus costos (18). Pero uno de los efectos más graves es la producción de toxinas, cianotoxinas, metabolitos secundarios producidos por las cianobacterias en el interior de las células y

liberados al agua al producirse la lisis o envejecimiento celular (36, 78, 82). Sin embargo la presencia de floraciones de cianobacterias no necesariamente está asociada a la presencia de cianotoxinas, ya que no todas las cepas son tóxicas (51). Las cianotoxinas son producidas únicamente por aquellas cianobacterias que tienen los genes apropiados, los cuales se expresarán o no dependiendo de las condiciones ambientales. Entre los factores ambientales que influyen se encuentran la intensidad de luz, temperatura, estabilidad de la columna de agua, pH, entre otros (51).

Las cianotoxinas pueden ser de muy diversa naturaleza química: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes (83). Dentro de las hepatotoxinas se distinguen las microcistinas (MC) responsables de la mayor parte de casos de intoxicación en el mundo. Son producidas por especies de los géneros de *Dolichospermum (Anabaena)*, *Microcystis*, *Oscillatoria* y *Planktothrix* entre otros. Son heptapéptidos cíclicos que actúan inhibiendo principalmente a las fosfatasa tipo 1 y tipo 2A, causando un aumento en la fosforilación de las proteínas celulares y desencadenado el proceso de apoptosis con el consecuente daño celular (82). También se ha descrito que la ingestión crónica de pequeñas dosis puede tener efecto promotor de tumores a largo plazo (18, 83). Hay una gran variedad química de estos compuestos, se conocen más de 90 especies químicas, siendo las más habituales las variedades de microcistina LR (MC-LR), RR (MC-RR) e YR (MC-YR) (83). Estas toxinas son relativamente estables y resistentes a la hidrólisis y oxidación por lo que pueden perdurar por largos períodos en el cuerpo de agua (54, 78). La exposición humana a las cianotoxinas puede ocurrir por distintas vías: (i) Por ingestión de agua de consumo, (ii) durante actividades recreativas en cuerpos de agua que desarrollan floraciones vía dérmica o por inhalación, (iii) al consumir animales expuestos a cianobacterias y que acumularon las cianotoxinas (iv) mediante hemodiálisis, si el agua que se utiliza no fue debidamente purificada (83).

1.2 Toxicidad de las cianotoxinas

La toxicidad de las cianotoxinas es muy variada. La dosis letal 50 (LD₅₀) para el caso de saxitoxina (neurotoxina) es de 10 µg/kg mientras que para las microcistinas pueden variar entre 25-150 µg/kg de peso corporal (78, 51).

Las primeras intoxicaciones humanas causadas por consumo de agua contaminada con cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur (17). El episodio más grave ocurrió en Brasil el año 1996 donde murieron más de 50 pacientes sometidos a tratamientos de hemodiálisis, en los que se utilizó agua contaminada de con MC (3, 40). En el caso de hepatotoxinas, los síntomas más comunes que pueden deberse a la exposición a una o varias toxinas son inespecíficos ya que son parecidos a los de muchas toxicosis gastrointestinales (78) lo que hace que el problema pase desapercibido. En la mayoría de los países del mundo se han producido intoxicaciones graves e incluso fatales del ganado, animales domésticos (por ejemplo caballos, cerdos, perros, ovejas) y salvajes (por ejemplo jirafas, rinocerontes) y aves (por ejemplo patos, flamencos) debido a floraciones de cianobacterias productoras de cianotoxinas, generalmente tras haber bebido aguas contaminadas (36, 79).

A niveles tróficos superiores, se observa un efecto de las cianotoxinas en peces, moluscos bivalvos y macroinvertebrados (17). Estos organismos pueden resistir ciertos niveles de cianotoxinas, actuando como vectores de las mismas a través de la trama trófica. Las mortalidades de peces que se han detectado durante floraciones tóxicas se han asociado más con cambios de pH o a la bajada en la presión parcial de O₂, que con la presencia de estas toxinas (29, 32, 65). Se ha demostrado que los peces son susceptibles a la acción tóxica de MC durante muchos estadios de su vida, tras la exposición a estas toxinas vía oral o por inmersión en agua que las contengan, sin embargo suele existir un tiempo de latencia más o menos prolongado hasta que se inducen los efectos adversos y posteriormente la mortalidad (65). En cuanto a los efectos nocivos de las MC en los peces, se ha comprobado que las mismas, además de afectar al hígado, producen cambios histopatológicos en hepatopáncreas, intestino, riñón, función cardíaca, opérculos y cerebro (32). También se han detectado alteraciones en diversos parámetros sanguíneos e inmunológicos y elevación de las enzimas séricas. Por otro lado, se observa un aumento de tasa de mortalidad, inhibición del herbivorismo y alteraciones del comportamiento: una mayor concentración de MC-LR disminuye la actividad nadadora de los peces (28, 65).

1.3 Bioacumulación de microcistina en peces

Se entiende por bioacumulación el proceso que causa aumento de la concentración de un compuesto en el tejido de un organismo acuático respecto a la concentración presente en agua, debido al ingreso a través de alguna vía de exposición (38). Para el caso de las cianotoxinas, esto significa que hay acumulación de las toxinas en los tejidos de algunos animales que las ingieren. En los peces, las cianotoxinas pueden ingresar a través de diversas rutas: ingestión directa de fitoplancton (especies fitoplanctívoras), ingreso de MC disuelta a través del epitelio (opérculos, epitelio intestinal, piel) o exposición a través de la trama trófica (por ejemplo, ingestión de moluscos los cuales habían filtrado cianotoxinas del agua) (38). Diferentes estudios de campo y experimentales a nivel del laboratorio han demostrado que la MC puede acumularse en órganos y tejidos de peces (corazón, hígado, gónadas, cerebro, riñón y músculo), pudiendo llegar a ser transferidas a niveles superiores de la cadena alimentaria, constituyendo un riesgo para los organismos que lo consumen (pájaros, peces) e incluso para la salud humana (48, 65, 82).

1.4 Métodos para la detección y cuantificación de microcistina en peces

Para conocer los niveles de MC-LR en los tejidos de peces se necesitan tener métodos fiables y sensibles que permitan detectar y cuantificar esta clase de toxinas (50). Existen diferentes métodos para la detección y cuantificación de la MC-LR los cuales pueden ser de screening (por ejemplo el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)) o métodos fisicoquímicos (por ejemplo cromatografía líquida alta resolución (HPLC), espectrometría de masas, entre otros) (54, 70). Para la determinación de microcistina en músculo de pescado todavía no existe un acuerdo sobre cuál es la mejor metodología para este tipo de análisis (60). Los kits de ELISA representan una alternativa simple y menos costosa que el HPLC por ejemplo. La sensibilidad y la selectividad que ofrecen estos kits pueden proporcionar una estimación de las microcistinas presentes en la muestra con un procesamiento mínimo de la misma. Sin embargo, presentan algunas limitaciones. Las

variantes de MC no se pueden distinguir y por otro lado la reactividad cruzada con otros compuestos de la muestras pueden llevar a una sobreestimación de la toxicidad real (50, 54, 51). La cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC/PDA) es un método específico, sensible, aceptado internacionalmente. Sin embargo es técnicamente exigente, caro y requiere un procesamiento de la muestra eficiente para eliminar las interferencias de la matriz. La MC presenta un espectro característico con un máximo de absorción a 238 nm. El detector PDA permite registrar el espectro de la MC, lo cual proporciona una mejor evidencia de la presencia de esta toxina en una muestra (50, 54, 70).

Otra opción es hacer una identificación más precisa de las MC usando cromatografía líquida seguida por la detección con espectrometría de masas (LC / MS). Este detector identifica al compuesto en base a su masa y carga, con lo cual limita las posibles interferencias que puedan surgir y mejora la selectividad (51). La información estructural proporcionada por este método actúa como una huella digital para las toxinas individuales y puede ser utilizado para confirmar la presencia de MC (50, 51, 54, 65).

1.5 Antecedentes en Uruguay

El fenómeno de las floraciones de cianobacterias es mundial y Uruguay no es la excepción. Se han registrado floraciones de cianobacterias desde 1982, principalmente en verano, en diversos ríos, estuarios, lagos, lagunas costeras y embalses (embalses sobre el Río Negro, embalse de Salto Grande) (8, 10, 21, 61, 62, 71). Estos eventos están relacionados con el aumento de la eutrofización en los mismos y cambios en la dinámica de los ríos, como consecuencia de la construcción de represamientos en cascada, los cuales interfieren en el tiempo de residencia del agua, favoreciendo el desarrollo de floraciones (25). En Uruguay, los géneros más frecuentes que producen MC son *Microcystis*, *Nodularia* y *Dolichospermum* (*Anabaena*) (77).

La presencia de toxinas (MC) en agua se determinó a partir de 1999, cuando De León y colaboradores (21) usando kits de anticuerpos monoclonales (Envirogard, SDI, Newark DE, USA) estudiaron dos localidades del Departamento de Colonia, resultando positivos el 100% de los eventos analizados. Existen antecedentes de toxicidad, debido a MC, en floraciones de las costas del Río de la Plata en Colonia y Montevideo, en embalses del Río Negro y Salto Grande y en lagos urbanos como el Lago Rodó (19, 25, 31, 71, 77, 69).

Diferentes investigaciones a nivel regional (7, 48, 49, 84) e internacional (85, 86, 88) demostraron que las MC pueden acumularse en los tejidos de peces, constituyendo un riesgo para la salud de los consumidores. En Uruguay no está establecido un programa Nacional de monitoreo para determinar los niveles de MC en los peces ni en ningún otro organismo de consumo humano, por lo cual no hay datos sobre los efectos negativos que ocasionan en el ambiente y en el hombre, tanto a nivel de salud como económico. En este contexto, es necesario determinar el contenido de MC en el músculo de los pescados que se comercializan para evaluar los efectos que pueda tener su ingesta por parte de los consumidores. Actualmente en el país se analizan MC totales en agua mediante kits de ELISA comerciales (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (78). El Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios – Área de Toxinas Naturales (TOX) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay realiza la determinación de MC-LR en agua por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC-PDA) (77). Sin embargo, no es posible determinar

MC-LR en otra matriz diferente al agua (por ejemplo peces) ya que no existe, a nivel nacional, la metodología adecuada. El músculo de pez es una matriz más compleja que el agua debido a la presencia, por ejemplo, de proteínas y grasa, las cuales interfieren al momento del análisis. Se necesita poner a punto un método que permita la determinación cuantitativa de MC-LR en esta matriz y así evaluar la posible bioacumulación en la cadena trófica de esta cianotoxina.

Las tarariras (*Hoplias sp.*) habitan ríos, arroyos y lagunas de todo el país, principalmente en áreas de densa vegetación que usan como zona de caza. Se encuentran también en ríos, arroyos y lagunas de las áreas costeras y planicies interiores de Río Grande del Sur (Brasil) y Argentina. Los ejemplares tienen tamaño grande, pudiendo alcanzar 90 cm de largo y 12 kg de peso. Tienen la capacidad de soportar condiciones de bajo oxígeno en agua (75, 76). No tienen hábitos migratorios, sino que se mantienen sedentarios por largos períodos de tiempo (68). Se alimentan preferentemente de peces como *Astyanax sp.* y ranas, pudiendo consumir aves e incluso ratones (2, 75). Por su tamaño, calidad de carne y abundancia es objeto de explotación comercial tanto en el mercado nacional (principalmente en el interior del país) como en el regional. También es atractiva desde el punto de vista de pesca deportiva (75). Debido a que ocupa altos niveles tróficos, diferentes estudios han mostrado que puede ser usada como biomonitor de la contaminación ambiental, ya que puede acumular diferentes contaminantes en su organismo (por ejemplo mercurio, compuestos clorados persistentes) (3, 46, 67, 68). Según la bibliografía consultada no hay antecedentes de bioacumulación de MC en tarariras en Uruguay ni en la región.

1.6 Justificación del estudio

El Embalse del Rincón del Bonete pertenece a la cuenca del Río Negro. Presenta una superficie total de 1071 km² y una profundidad máxima de 32 m (13). Según la concentración de fósforo total y biomasa registrada en algunos veranos se clasifica como eutrófico (14). Las floraciones tóxicas de cianobacterias ocurren frecuentemente. Las principales especies de cianobacterias que se han reportado pertenecen al género *Microcystis* y *Dolichospermum*, potenciales productoras de MC (11, 12, 13, 15, 31). Los análisis de toxicidad realizados en el embalse determinaron la presencia de MC, principalmente en verano (11, 12, 13, 15, 31).

En los márgenes del Embalse Rincón del Bonete existen asentamientos pesqueros artesanales, fundamentalmente en la zona de San Gregorio del Polanco, que ofrecen una importante fuente de ocupación en la región ya que es uno de los puertos de mayor desembarco de pescado junto con la ciudad de Pasos de los Toros. Las especies más capturadas son las tarariras, los bagres y las viejas de agua (30). Los volúmenes de pesca son diferentes y varían según la época del año. Los pescadores que acampan en el río una semana pescan un promedio de 150 kg de pescado (30). Esta actividad se puede ver perjudicada en la calidad de sus productos, debido a la presencia de cianotoxinas, constituyendo un factor de riesgo sanitario para las poblaciones directa o indirectamente vinculadas a los cuerpos de agua afectados.

Dada la capacidad de los peces de bioacumular MC-LR y los riesgos asociados a la posible transferencia de la misma a niveles superiores de la trama trófica, el presente trabajo pretende evaluar si existe

bioacumulación de la MC en músculo de tarariras del Embalse Rincón del Bonete y conocer el potencial riesgo para la salud de los consumidores. Dicho embalse es eutrófico y las floraciones potencialmente tóxicas de cianobacterias ocurren frecuentemente, por lo tanto el consumo de músculo de tarariras puede constituir un riesgo para los consumidores. Se seleccionó la tararira ya que es la principal especie capturada en esta zona, se encuentra en la cima de la trama trófica, no es migradora, es empleada para consumo humano, es posible capturarla a lo largo del año y su tamaño corporal es suficientemente grande como para obtener la cantidad de muestra necesaria para el análisis. La MC se puede bioacumular en diversos órganos (hígado, músculo, intestino) (38, 88). En base a los objetivos planteados, se trabajará con el músculo ya que es la parte que se consume.

Según la bibliografía consultada no hay antecedentes de bioacumulación de MC en tarariras en Uruguay ni en la región. En este trabajo se cuantifica por primera vez en Uruguay la MC-LR en músculo de tarariras del Embalse Rincón del Bonete y se discuten los riesgos potenciales para la salud humana que pueda causar su consumo.

2. HIPOTESIS, PREDICCIONES Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

En un ambiente eutrófico con frecuente presencia de cianobacterias productoras de MC-LR se esperaría que se produjera la acumulación de dicha toxina en músculo de peces para consumo humano representando un riesgo para la salud humana.

2.2 Predicciones

- La MC-LR producida por las floraciones de cianobacterias presentes en el embalse Rincón del Bonete se acumula en el músculo de las tarariras.
- La MC-LR acumulada en el músculo de tararira presenta un riesgo potencial a la salud humana.

2.3 Objetivos

Objetivo general

Determinar los riesgos para la salud humana ocasionados por el consumo de tarariras capturadas en un ambiente con frecuentes floraciones de cianobacterias.

Objetivos específicos

- a. Poner a punto una metodología analítica para la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de pez.
- b. Cuantificar la MC-LR en músculo de tarariras presentes en el embalse Rincón del Bonete.
- c. Cuantificar la de MC-LR total (extracelular e intracelular) en muestras de agua del embalse Rincón del Bonete.
- d. Determinar los riesgos potenciales para la salud humana que pueda causar el consumo de las tarariras contaminadas con MC-LR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de estudio

El Río Negro presenta tres grandes embalses construidos en cadena: Bonete, Baygorria y Palmar. Los mismos son dendríticos, con gran desarrollo de la línea de costa y meandros profundos y extensos. Fueron construidos inicialmente para la generación de energía, aunque hoy son utilizados para diversos fines: riego, pesca artesanal y deportiva, extracción de agua para potabilizar y actividades turísticas (19, 22, 31). El uso predominante de los suelos es la ganadería extensiva, seguida de las actividades arroceras y forestales. En la porción baja de la cuenca se destaca el aumento reciente de la lechería y de los cultivos intensivos de soja y trigo (13). Estos sistemas han sido clasificados como eutróficos (14). El uso de la tierra en la cuenca intensificó los procesos de deterioro de la calidad del agua (19). A esto se agrega el desarrollo de actividades productivas industriales como el cultivo de Esturión lo que puede traer aparejado un aumento en los aportes de nutrientes al cuerpo de agua (22). Por otra parte, el Río Negro es receptor de los efluentes de las ciudades asentadas en sus márgenes y de sus afluentes (22). Entre los efectos de la eutrofización se destaca la presencia de cianobacterias que desarrollan floraciones potencialmente tóxicas durante el verano, comprometiendo el uso del agua con fines recreativos o para potabilización (19, 63).

El Embalse del Rincón del Bonete pertenece a la cuenca del Río Negro (figura 1). Sus principales características morfométricas se presentan en la tabla 1. La temperatura del cuerpo de agua varía entre 15 y 26°C y presenta una concentración de fósforo total y clorofila-a (promedio) de 85 ug/L (+/-39 ug/L) y 8.4 ug/L (+/-9.1ug/L) respectivamente (14).

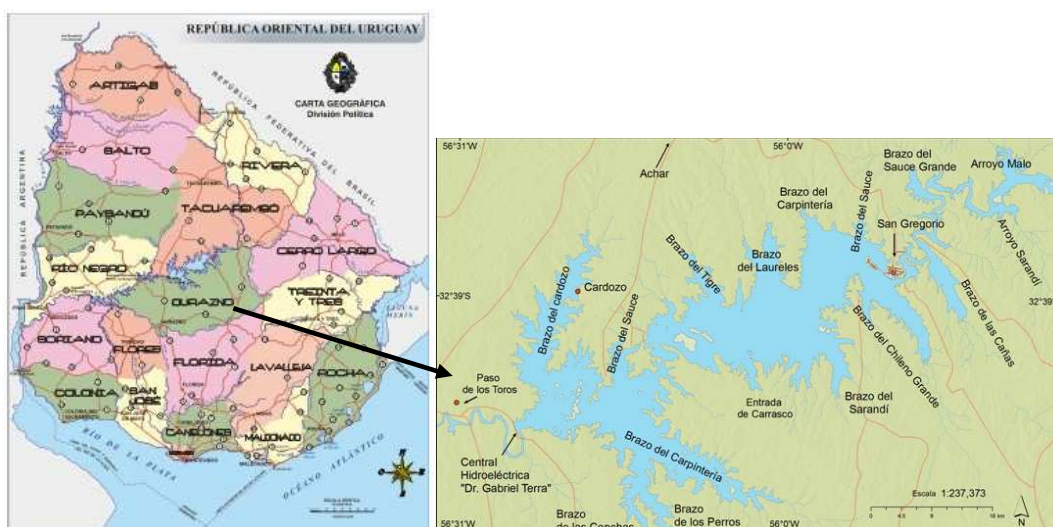


Figura 1 – Mapa de Uruguay donde se indica la ubicación del Embalse Rincón del Bonete.

Tabla 1 – Ubicación y características morfométricas del embalse Rincón del Bonete (basado en 17)

Ubicación	32° 49´S; 56° 25´W
Área de la Cuenca (km ²)	39541
Superficie (km ²)	1071
Volumen (km ³)	8.8
Profundidad máxima (m)	32
Tiempo residencia (días)	150

Los principales tributarios del embalse en estudio son el río Negro, el río Tacuarembó y los arroyos Las Cañas, Malo, del Blanquillo, Chileno Grande y Cardozo. Todos estos cursos de agua son una fuente de diversidad de flora y fauna, pero además son fuente de ingreso para pescadores artesanales y areneros.

En sus márgenes se encuentra la ciudad de San Gregorio de Polanco, cuya población se dedica principalmente a la pesca artesanal, seguido por la agricultura (cultivo de arroz) y la silvicultura. Por otro lado, esta ciudad es un lugar turístico por excelencia, siendo un destino de vacaciones muy frecuentado por la población del Departamento de Tacuarembó y zonas cercanas (30). El Embalse Rincón del Bonete es eutrófico y las floraciones potencialmente tóxicas de cianobacterias ocurren frecuentemente (tabla 2). En la tabla 3 se muestran los resultados de toxicidad en agua debida a MC-LR para el embalse en estudio.

Tabla 2 – Antecedentes de la abundancia de cianobacterias potencialmente tóxicas y de fitoplancton total, biovolumen de cianobacterias y de fitoplancton total para el embalse Rincón del Bonete (basado en 15).

Fecha	Abundancia Cianobacterias (cel/mL)	Abundancia Fitoplancton Total (cel/mL)	Biovolúmen Cianobacterias (mm ³ /L)	Biovolúmen Fitoplancton Total (mm ³ /L)
23/09/2011	0	559	0	0.166
25/01/2012	3827 (principalmente <i>Microcystis sp</i>)	4105	0.764	0.878
22/02/2012	7792 (principalmente <i>Microcystis sp</i>)	9567	0.645	0.733
01/03/2012	0	145	0	0.093

Tabla 3 – Antecedentes de MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua para el embalse Rincón del Bonete, analizado por HPLC-PDA. El límite de cuantificación del método es 0.35 µg/L.

	Microcistina- LR total (µg/L)	Referencia
09/2009	18	12
12/2009	No cuantificable, <0.35	12
01/2010	294	12, 31
02/2010	197	12, 31
03/2010	2109	12, 31
12/2010	1018	12
01/2011	38	12
02/2011	335	12
03/2011	132	12
01/2012	No cuantificable, <0.35	13
02/2012	No cuantificable, <0.35	13
03/2012	No cuantificable, <0.35	13
12/2012	0.97	13
01/2013	6.6	13

3.2 Muestreo

Entre el 9 y el 11 de febrero de 2012 se realizó el muestreo de agua y tarariras en el Embalse Rincón del Bonete. Se planificó un único muestreo temporal en verano, dado que es la época en la que ocurren las mayores floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas. Se trató de abarcar espacialmente los principales lugares de pesca del embalse.

Peces

Las tarariras del Rincón del Bonete fueron obtenidas de las capturas de los pescadores artesanales, en coordinación con el proyecto GEF/FAO – GCP/URU/030/GFF, provenientes de tres brazos del embalse formados por el Arroyo Laureles, Los Perros y Chileno (Tabla 4, Fig. 2). Los pescadores utilizan como artes de pesca espineles de profundidad o malla tamaño #6. Las tarariras se mantuvieron en una conservadora con hielo hasta el momento de desembarcar. Al llegar a tierra se registró el peso total de cada uno de los ejemplares así como también su longitud total, utilizando como precisión 1 g y 1 mm, respectivamente.

Se seleccionaron tarariras adultas de una talla aproximada de 50 cm y un peso aproximado de 1.5 kg. Una vez seleccionados, se abrió cada uno de los ejemplares de forma de obtener el músculo (manta). Las mantas se colocaron por separado en bolsas de polietileno previamente rotuladas. Dado la imposibilidad de congelarlas fueron acondicionadas en conservadoras con hielo para su traslado a Montevideo lo antes posible. Al llegar al laboratorio (24 horas luego del muestreo) se almacenaron en freezer a una temperatura aproximada de -20 °C hasta el momento del análisis. Se analizaron 35 ejemplares de tarariras adultas. Este número de especímenes no fue previamente establecido pero se consideró representativo de los principales lugares de pesca en estudio.

Tabla 4. Características de las tarariras seleccionadas a partir de la captura de los pescadores artesanales del Embalse Rincón del Bonete en el período 9 al 11 de febrero 2012. N: número de ejemplares. DE: desvío estándar.

Zona de muestreo	N	Talla promedio (cm) /DE (cm)	Peso / DE (kg)
Arroyo Laureles	15	46.98 / 1.68	1.29 / 0.13
Arroyo Los Perros	15	50.81 / 2.13	1.58 / 0.19
Arroyo del Chileno	5	43.36 / 2.54	1.06 / 0.32

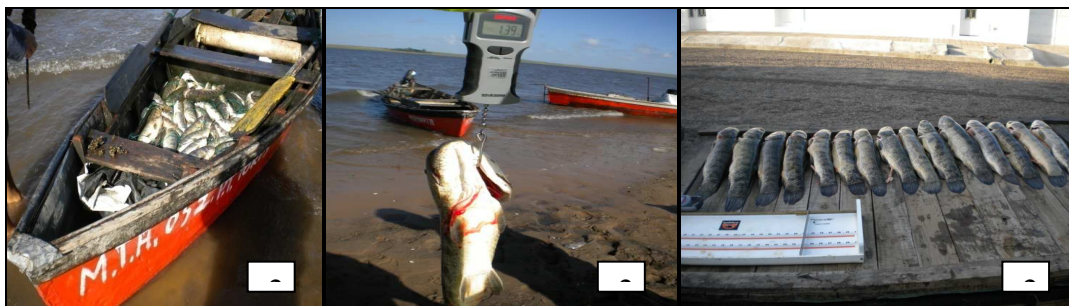


Figura 2. Proceso de selección de los ejemplares de tarariras para su estudio. 2a: Captura de tarariras del día; 2b: Registro de peso; 2c: Registro de talla. Fotos: Macarena Simoens. Febrero 2012.

Como área control fueron seleccionados los lagos de Andresito, Departamento de Flores. Esta localidad se encuentra emplazada en el extremo norte del departamento de Flores, sobre ruta 3, próximo al embalse artificial de la represa de Palmar. La zona es propicia para el camping y pesca deportiva siendo las tarariras una de las especies capturadas. Dicha elección se basó en la similitud de la fauna íctica con la existente en Rincón del Bonete, así como también por la facilidad para obtener las muestras y a que se encontraban en un hábitat sin floraciones al momento de la captura. Las tarariras del área control se obtuvieron de capturas de los pescadores artesanales de la zona quienes utilizan como artes de pesca espineles de profundidad o malla tamaño #6. Las mismas fueron enviadas congeladas a Montevideo y acondicionadas en conservadoras. Inmediatamente a su llegada a Montevideo se almacenaron en freezer temperatura aproximada de -20 °C hasta el momento del análisis. Se seleccionaron tarariras adultas de la misma talla y peso que las del Embalse Rincón del Bonete. Se analizaron 4 tarariras a los efectos de tener suficiente muestra para realizar todos los análisis necesarios para la puesta a punto de las metodologías.

Agua

Se seleccionaron 8 estaciones de muestreo para análisis de MC-LR total (extracelular e intracelular) en agua. En cada una de las zonas de pesca donde se capturaron las tarariras (Arroyo Laureles, Los Perros y Chileno) se tomaron entre 2 a 3 muestras de agua. En la figura 3 se muestra la ubicación de las estaciones de muestreo de agua y de tarariras.

De cada punto de muestreo se tomó 1 litro de agua subsuperficial y se almacenó en una botella de plástico previamente rotulada. Las muestras se mantuvieron en una conservadora con hielo hasta el momento de

desembarcar. Al llegar a tierra se congelaron previo a su traslado a Montevideo. Se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento de su análisis (Figura 4).

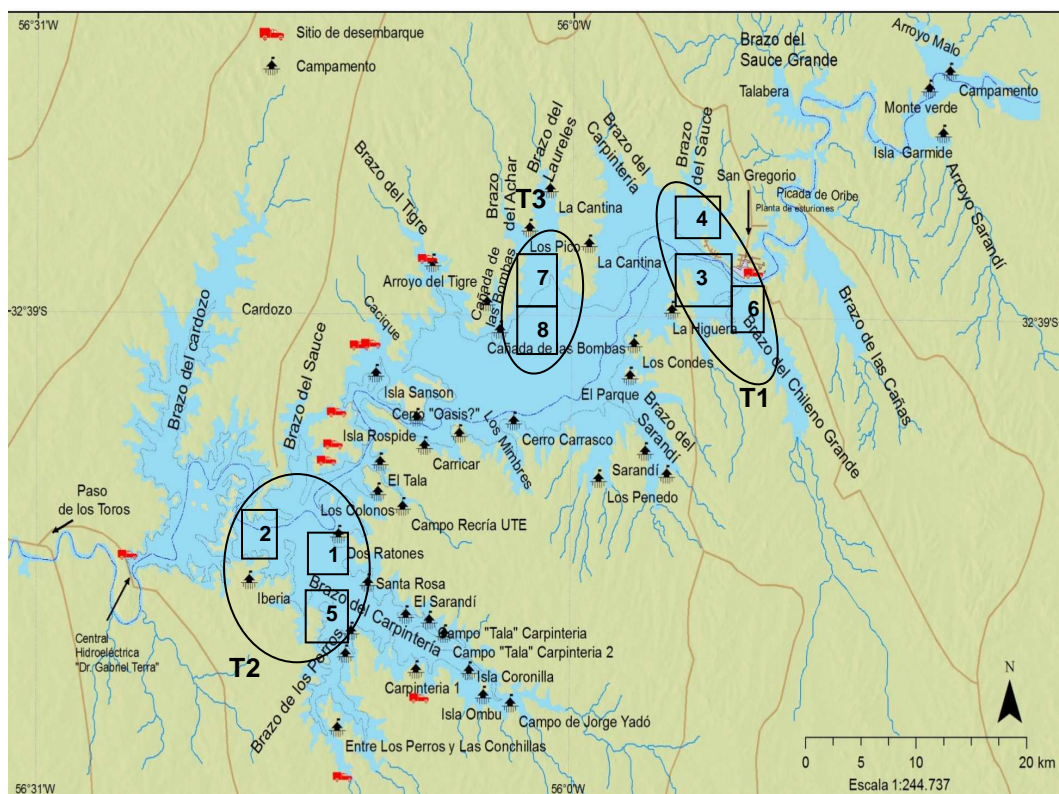


Figura 3. Ubicación de las 8 estaciones de muestreo de agua en el embalse Rincón del Bonete (1 a 8) y de las 3 zonas de captura de tarariras (T1 a T3) por parte de los pescadores artesanales a partir de la cual se seleccionaron los ejemplares para su estudio. Se indican también los principales sitios de desembarque de pescado (en rojo) así como también los campamentos de los pescadores (en negro). Figura cedida por el proyecto GEF/FAO - GCP/URU/030/GFF “Aproximación Ecosistémica para el Manejo de Recursos Acuáticos”, DINARA – MGAP.



Figura 4. Muestreo del agua subsuperficial del embalse Rincón del Bonete: 4a y 4b) aspecto del agua en la zona cercana a la represa hidroeléctrica “Dr. Gabriel Terra” (zona de muestreo 1 y 5); 4c) conservación de las muestras de agua durante el muestreo. Fotos: Macarena Simoens. 9/02/2012.

3.3 Metodología analítica

3.3.1. Aspectos generales

En la bibliografía se encuentran diferentes metodologías para la detección y cuantificación de la MC-LR, como por ejemplo el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección con arreglo de diodo (HPLC/PDA) la cromatografía líquida (LC) con detector de masa (LC/MS) (51). Para la determinación de microcistina en músculo de pescado no existe un acuerdo sobre cuál es la mejor metodología para este tipo de análisis (60). En el presente trabajo para la detección y cuantificación de MC en músculo de pescado se utilizó HPLC/PDA ya que se cuenta con el equipamiento y experiencia necesaria para poder llevar a cabo este tipo de metodología. La cromatografía líquida es un método específico, sensible y aceptado internacionalmente. La detección y cuantificación de MC en músculo de pescado utilizando HPLC está comprometido debido a las interferencias causadas por componentes de la muestra. Por tal motivo resultan críticas las etapas de extracción y limpieza de la muestra previo al análisis, así como también la etapa de detección. El detector de arreglo de diodo (PDA) permite registrar el espectro de absorción de la MC-LR (el cual es característico de la molécula) lo que proporciona mejor evidencia de la presencia de dicha toxina que el uso de una sola longitud de onda, como sucede con el detector ultravioleta (54).

3.3.2 Puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tararira

La puesta a punto de la metodología se llevó a cabo en el Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios – Área de Toxinas Naturales (TOX) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

En una primera instancia se hizo una búsqueda bibliográfica de los métodos disponibles y accesibles para determinar MC-LR en tejido de pez, focalizando en el músculo. Se seleccionaron las metodologías propuestas por Magalhães y colaboradores (48), Cazenave y colaboradores (7), y Xie y colaboradores (60) ya que fueron las que más se ajustaban a las condiciones existentes en el laboratorio. En el primer caso (48) los investigadores analizan MC-LR en músculo de *Tilapia rendalli* mediante técnica de ELISA. De esta metodología se ensayó la etapa de extracción y limpieza de la muestra y se modificó la etapa de detección para adaptarla al HPLC. En las otras dos publicaciones se reporta el análisis de MC-LR en músculo de pez: *Odontesthes bonariensis* en el caso de Cazenave y colaboradores (7) y *Hypophthalmichthys molitrix* el caso de Xie y colaboradores (60) mediante HPLC/PDA seguido de LC/MS. Por lo tanto en la puesta a punto se realizaron modificaciones en las etapas de extracción, limpieza y/o detección de forma de ajustar las metodologías a la matriz en estudio (tararira), al equipamiento existente en el laboratorio (HPLC/PDA) para lograr las condiciones óptimas para la cuantificación de MC-LR en músculo de tararira. En resumen, a partir de las modificaciones realizadas en los 3 métodos inicialmente seleccionados se generaron cinco metodologías (figura 5 y 6).

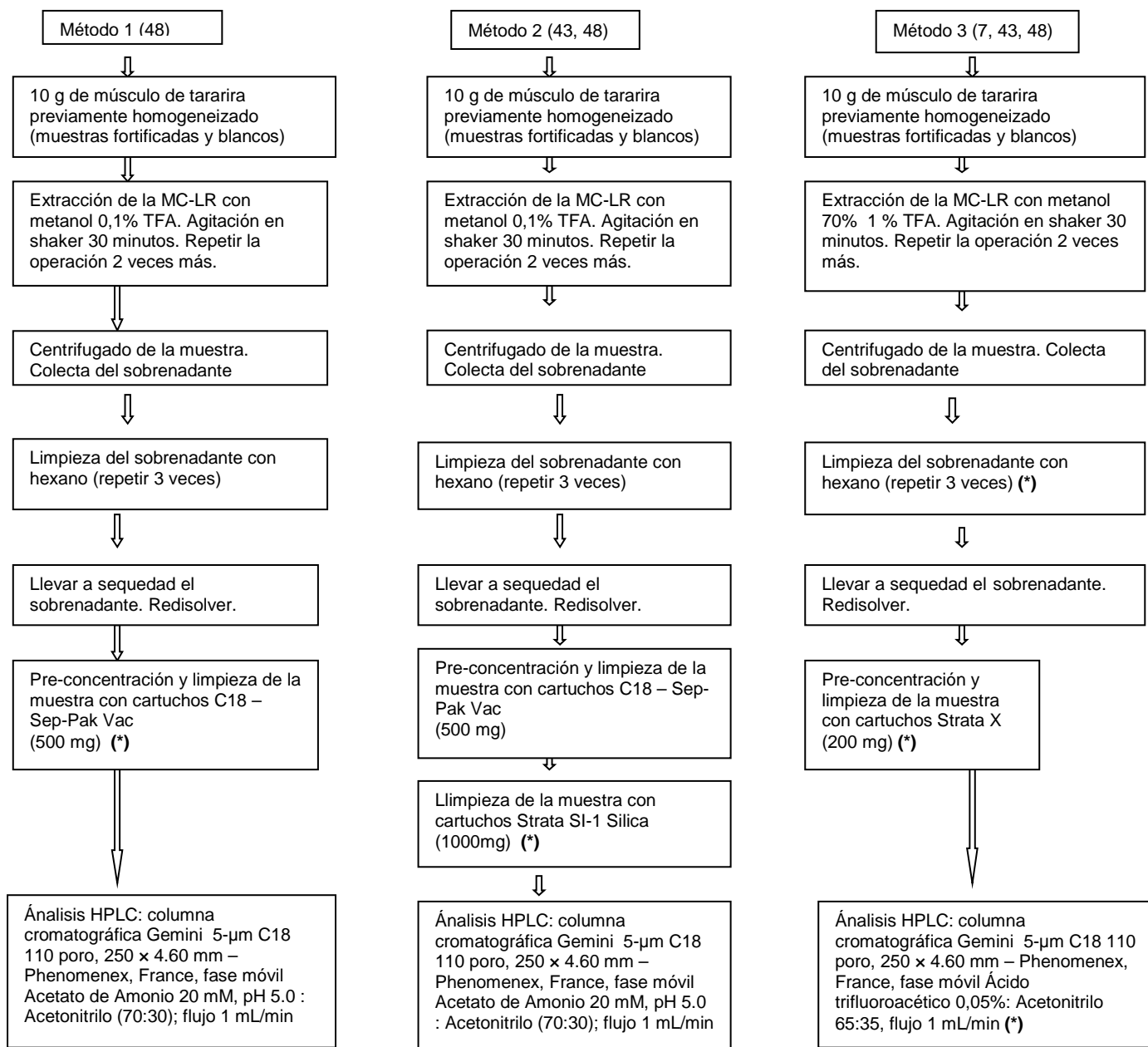


Figura 5- Métodos ensayados para la puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tararira. Se indican los métodos 1 a 3. Las etapas marcadas con (*) son modificaciones respecto al método publicado.

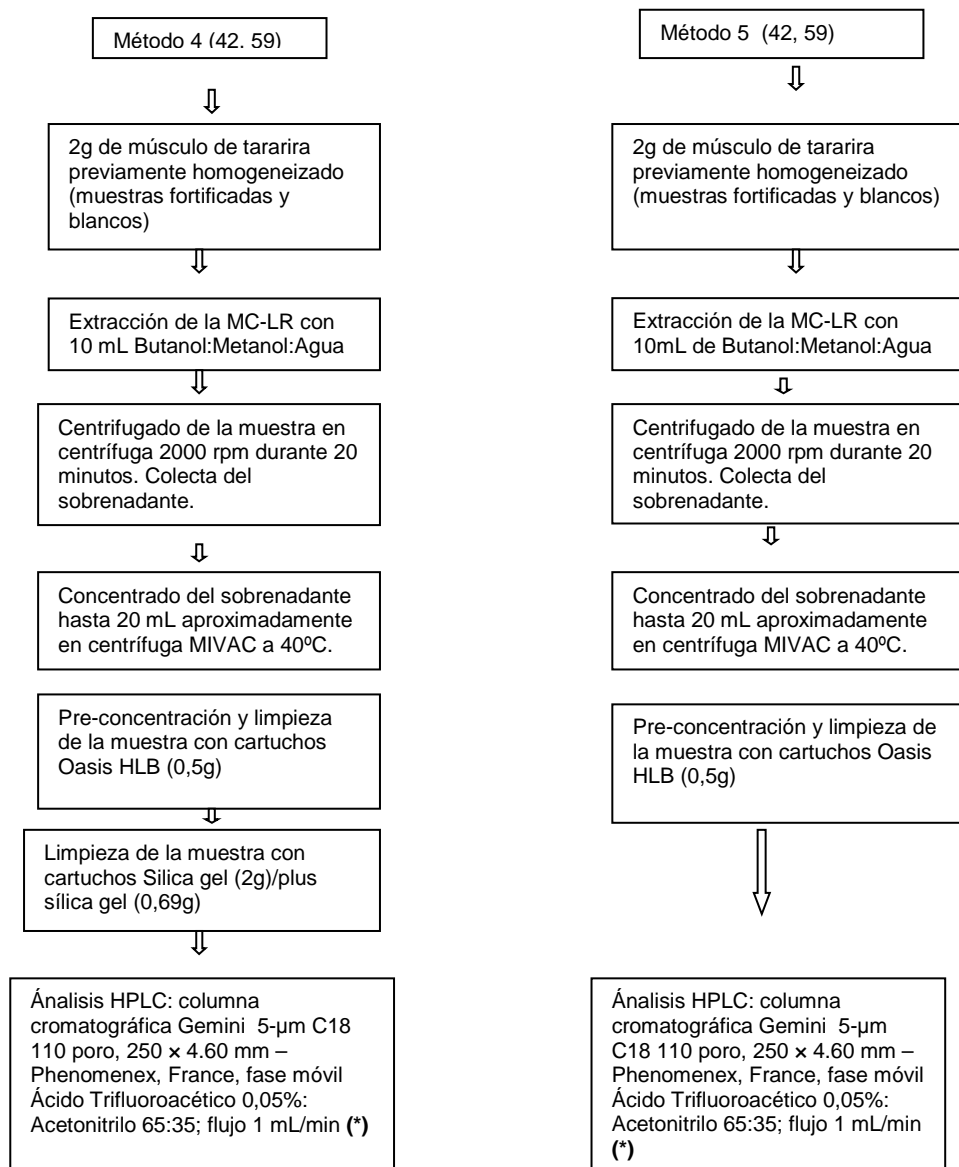


Figura 6 - Métodos ensayados para la puesta a punto de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras. Se indican los métodos 4 y 5. Las etapas marcados con (*) son modificaciones respecto al método publicado.

En todos los casos se trabajó con las muestras de músculo de tararira capturadas en los lagos de Andresito según se explica en el punto 2.2. Estas muestras se denominaron muestra blanco. Para asegurar la extracción de la MC-LR del músculo de tarariras se adicionó a la muestra blanco una concentración conocida de MC-LR previo a la etapa de extracción (muestra fortificada). Se determinó el porcentaje de toxina recuperado (porcentaje de recuperación). No existen materiales de referencia (muestra con valor asignado) para MC-LR en músculo de pez, con lo cual la evaluación de la performance del método se realizó con muestras fortificadas.

Para tomar una decisión sobre cual método seguir se evaluó el porcentaje de recuperación de MC-LR obtenido con la muestra blanco fortificada y la eficiencia en la etapa de limpieza de la muestra, evaluando la presencia o no de interferencias (compuestos de no interés) en el tiempo de retención de la MC-LR en el cromatograma obtenido, la resolución del pico de interés y la pureza del mismo.

En la figura 7 se muestra un esquema general de la metodología empleada para establecer las condiciones óptimas de extracción y detección de MC-LR en músculo de tararira.

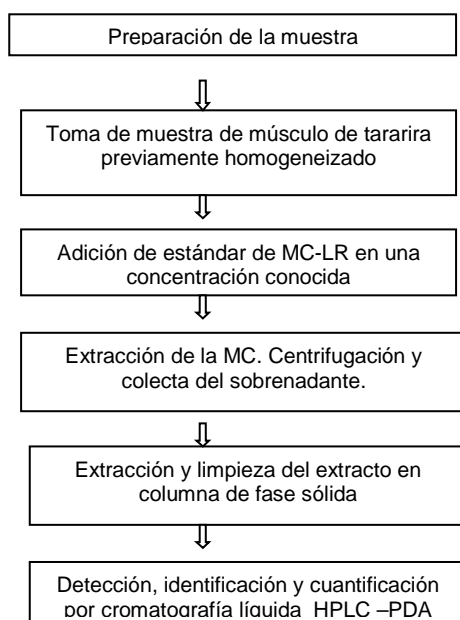


Figura 7 – Metodología usada para la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tararira.

La metodología empleada consistió en:

- a) preparación de la muestra: las muestras de músculo de tararira se descongelaron hasta temperatura ambiente. Se extrajo la piel de las mantas de músculo y se realizó la homogeneización de la misma a través de desmenuzamiento mecánico con equipo Retsch GM 200 (Grindo Mix).
- b) toma de muestra: para los diferentes análisis se realizó la toma de muestra necesaria de acuerdo a la metodología usada (10 ó 2 g) en balanza analítica con una precisión de 0,01 g.

- c) extracción de la toxina: se utilizaron diferentes solventes de extracción (tabla 5) para lograr extraer la mayor cantidad posible de MC-LR del músculo de tararira. Para favorecer el contacto entre muestra y solvente se homogeneizó por agitación en shaker (Quimis Q225M), ó usando Polytron (Ultra Turrax T25 basic IKA) y en ambos casos sonicado por 5 minutos con Bandelin Sonoplus sonicator (MYC Ultrasonic cleaner). Luego de centrifugar durante 15 minutos a 4000 rpm se obtuvo un sobrenadante de aspecto límpido. En algunos casos se realizó una limpieza con hexano del sobrenadante según indica la bibliografía (50) lo cual ayuda a eliminar grasa de la muestra y facilitar la etapa siguiente.

Tabla 5– Solventes de extracción utilizados durante la puesta a punto de la metodología para lograr extraer la mayor cantidad posible de MC-LR de las muestras blancos fortificadas de músculo de tararira.

Solvente de extracción	Referencia bibliográfica
Metanol 70% conteniendo 1% de ácido trifluoroacético	7, 42
Metanol 0,1% de ácido trifluoroacético	48
Butanol: Metanol: agua (1:4:15)	16, 60, 85, 86

- d) pre-concentración y limpieza: esta etapa se realizó utilizando extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE) (73, 85). En la SPE la muestra pasó por un cartucho que retuvo a la MC-LR por adsorción la cual luego se eluyó con un solvente polar. Se utilizaron diferentes cartuchos SPE (tabla 6).

La diferencia entre los cartuchos SPE se basa en el relleno que tienen y por lo tanto en el tipo de interacción que establecen con la MC-LR y las posibles interferencias, para lograr una mejor limpieza de la muestra. En los casos donde se encontraron en la bibliografía diferentes condiciones de acondicionamiento, lavado y elución se realizaron en el laboratorio variadas pruebas preliminares para establecer las condiciones óptimas de recuperación de toxina.

- e) concentración de la muestra: la muestra se llevó a sequedad a 40°C para luego redissolver e inyectar en el HPLC según el punto f.

Tabla 6 – Características principales de los cartuchos empleados en la etapa de pre-concentración y limpieza de forma de obtener una muestra libre de interferencias que permita una adecuada detección y cuantificación por HPLC.

Tipo de cartucho SPE	Proveedor	Características	Referencia bibliográfica
Strata X (200mg)	Phenomenex, Francia	Relleno de pirrolidona modificado.	4, 29
Oasis HLB (0,5g)	Waters corporation, Milford, MA, USA	Relleno de N-vinil pirrolidona – copolímero DVB	60
Silica gel (2g)/plus sílica gel (0,69g)	Waters corporation, Milford, MA, USA	Relleno basado en partículas de sílica	87
Strata SI-1 Silica (1000mg)	Phenomenex, Francia	Relleno basado en partículas de sílica	39
C18 – Sep-Pak Vac (500 mg)	Waters corporation, Milford, MA, USA	Relleno basado en partículas de sílica unidas a partículas de octadecil	39

f) detección, identificación y cuantificación de la MC-LR: en esta etapa se utilizó cromatografía líquida de alta presión con detector de arreglo de diodos HPLC-PDA). El equipo usado (Waters, Milford, MA, USA) consiste en bomba P515, inyector automático W717, horno TCM y detector PDA 2996, Waters. En este método la muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la muestra emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas determinan la separación de los contenidos en la muestra. Como consecuencia de la distinta movilidad, a la salida del detector se obtiene un cromatograma, el cual está compuesto por una serie de picos, cada uno de los cuales representa un analito. Se probaron distintas composiciones de la fase móvil de forma de lograr una resolución adecuada del pico de interés (tabla 7). La velocidad de flujo fue de 1,0 mL/min en condiciones isocráticas. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C.

Tabla 7 – Composición de las fases móviles utilizadas durante la puesta a punto de la metodología de forma de obtener un cromatograma libre de interferencias al tiempo de retención de la MC-LR.

Composición de fase móvil	Referencia bibliográfica
Acetato de Amonio 20 mM, pH 5.0 : Acetonitrilo (70:30)	48
Ácido trifluoroacético 0,05%: Acetonitrilo 65:35	43

Para la cuantificación de la MC se construyó una curva de calibración. Se utilizaron estándares de MC-LR provenientes de Sigma (St Louis, MO, USA). A partir de una concentración inicial de estándar se realizaron las diluciones correspondientes, de forma de cubrir el rango de trabajo preestablecido. Se trabajó con cinco niveles de concentración de estándar por duplicado. Se graficó el área de pico promedio obtenida en cada nivel (variable dependiente) versus la concentración de estándar (variable independiente). Se calculó la ecuación de la recta por medio de una regresión lineal.

Una vez obtenido el cromatograma, para identificar a la MC-LR se comparó el cromatograma obtenido para las muestras de músculo de tararira blanco con el obtenido para el estándar en las mismas condiciones cromatográficas. Se seleccionó el pico de interés de acuerdo a su tiempo de retención (posición del pico en el eje del tiempo) y espectro de absorción al máximo de absorción, 238 nm. La cuantificación de la MC-LR se realizó a través de la ecuación de la recta de la curva de calibración, a partir del valor de área obtenido para el pico identificado como MC-LR en la muestra blanco.

Luego de poner a punto la metodología se realizó la validación de la misma en base a los criterios establecidos por la "American Association of Official Analytical Chemists International" (AOAC Internacional) (1), asociación científica reconocida a nivel mundial que se dedica a la excelencia analítica. Los parámetros analíticos que se validaron son los que generalmente se tienen en cuenta para verificar la performance de un método analítico: exactitud (veracidad y precisión), límite de detección, límite de cuantificación, linealidad en el rango de trabajo, selectividad y curva de calibración.

3.3.3 MC-LR en músculo de tarariras de los lagos de Andresito y del Embalse Rincón del Bonete

El método que se seleccionó para el análisis de muestras fue el N° 5 ya que fue el que demostró mejor performance en el punto 2.3.2. Para asegurar el resultado analítico en cada "batch" de muestras analizadas se incorporaron dos muestras fortificadas. El resultado obtenido para la muestra se corrigió con el porcentaje de recuperación obtenido con la muestra fortificada, de forma de compensar las pérdidas que se tienen a lo largo del método.

3.3.4 MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua

Para la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR total en agua se siguió la metodología existente en el Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios – Área de Toxinas Naturales del LATU (39, 43) la cual está validada según la norma ISO/IEC 17025. La misma se basa en la detección mediante cromatografía líquida con detector de arreglos de diodo. El límite de detección de este método es 0,04 µg/L y el límite de cuantificación es 0,08 µg/L. Para asegurar el resultado analítico en cada batch de muestras analizadas se incorporaron dos muestras fortificadas. El resultado obtenido para la muestra se corrigió con el porcentaje de recuperación obtenido con la muestra fortificada, de forma de compensar las pérdidas que se tienen a lo largo del método.

3.3.5 Riesgos potenciales para la salud humana que pueda causar el consumo de las tarariras contaminadas con MC-LR

Según consta en los registros de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINARA) en el embalse Rincón del Bonete operan cerca de 50 pescadores artesanales (23). En el año 2012 se realizó un censo (26) sobre la comunidad de pescadores artesanales de San Gregorio de Polanco por el proyecto GCP/URU/03/GFF en

forma conjunta con el Ministerio de Desarrollo Social (MIDES) donde se relevó un total de 26 pescadores. Para poder realizar este trabajo se accedió a la base de datos de dicho censo. Se constató que tres pescadores ya no se dedican a la esta actividad. De los 23 pescadores restantes se pudo localizar a 10. Se realizaron encuestas a los pescadores del embalse Rincón del Bonete para poder caracterizar la comunidad de pescadores y cuantificar el consumo de tararira en la zona en estudio. Se utilizó un formulario de encuesta (Anexo I) que se elaboró con la colaboración de la Soc. Msc. Vanesa Olivero. En el mismo se recabaron datos sobre sexo y edad del encuestado así como también datos respecto a la integración de su núcleo familiar. Los principales aspectos relevados de la actividad pesquera fueron la frecuencia con la que asiste a pescar, los kg de tararira obtenidos en cada salida y a quien le vende lo que pesca (a la población local, a un intermediario local o a un intermediario regional). En cuanto a los hábitos de consumo de tararira se preguntó la frecuencia de consumo y que parte de la tararira consume. Finalmente se preguntó si consideraba importante realizar un estudio sobre los peces del embalse para conocer la calidad de la carne que se está consumiendo.

Por otro lado, para evaluar el potencial riesgo para la salud humana que pueda causar el consumo de músculo de tararira del embalse en estudio, se definió una concentración máxima permitida de MC. En Uruguay no existe una reglamentación que establezca el contenido máximo de MC que puede estar presente en pescados para consumo humano. Por lo tanto, dicha concentración fue calculada como: $C_{\text{máx}} = (bw \cdot TDI) / I$ (38), donde: **C máx** es la concentración máxima permitida de MC en músculo de tararira ($\mu\text{g MC/g}$ músculo de tararira por kg peso del consumidor); **bw** es el peso del consumidor (kg); **TDI** es la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) establecida por la OMS: 0,04 $\mu\text{g MC/kg}$ para un peso medio de 60 kg; **I** es el consumo diario de músculo de tararira (g).

4.RESULTADOS

4.1 Puesta a punto y validación de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras

Método 1

En este método se hizo una primera limpieza con hexano y luego una limpieza en fase sólida antes de la cuantificación por HPLC usando cartuchos C18. Sin embargo no se logró separar la toxina de interés de los otros compuestos presentes en la muestra, lo cual quedó de manifiesto en el cromatograma, ya que al inyectar muestras de “tararira blanco” aparecieron picos al tiempo de retención de la MC-LR con un espectro distinto al de esta toxina. Se cambiaron las condiciones cromatográficas (composición de fase móvil) para mejorar esta situación. Con la fase móvil Acetonitrilo: Ácido Trifluoroacético 0,05% (30:70) se logró una leve mejoría respecto a la otra fase móvil utilizada (acetato de Amonio 20 mM, pH 5.0: Acetonitrilo (70:30)), pero en la mayoría de los casos no se pudieron eliminar definitivamente las interferencias (Figura 8). Al trabajar con muestras fortificadas, en los casos en que se pudo cuantificar, ya que se logró separar a las interferencias de la toxina de interés, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron dispares (varían entre 20-40%). En varios casos la resolución cromatográfica del pico de interés fue mala y se realizó la

cuantificación por altura del pico en lugar de área de pico, como se trabaja habitualmente en cromatografía. En otros casos no se pudo determinar el porcentaje de recuperación debido a la presencia de interferencias en el tiempo de retención del compuesto, que enmascaró la toxina.

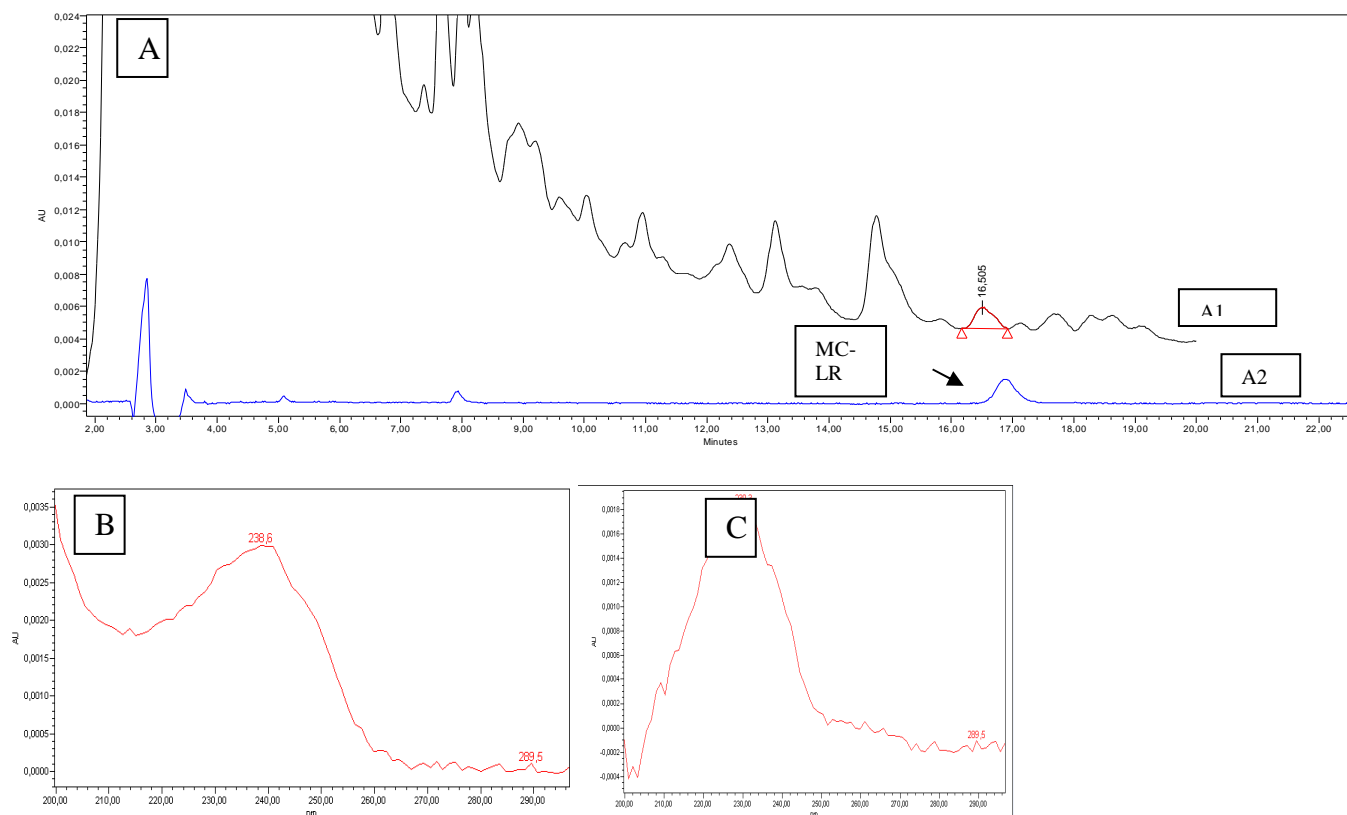


Figura 8 – (A) Cromatogramas obtenidos (a 238 nm) luego de inyectar la muestra de tararira blanco (A1) donde se indica el pico que coincide con el tiempo de retención de la MC-LR y luego de inyectar estándar de MC-LR (A2) donde se indica el pico correspondiente a MC-LR. (B) Espectro de absorción a 238 nm para el estándar de MC-LR. (C) Espectro de absorción a 238 nm para el compuesto (interferencia) que eluye al mismo tiempo de retención que la MC-LR.

Método 2

En este método se hizo una primera limpieza con hexano y luego la limpieza en fase sólida de la muestra con dos cartuchos diferentes en serie: C18 primero y Strata SI-1 Silica después para remover los compuestos que coeluyen junto con la toxina de interés. Se comparó el cromatograma obtenido luego de la limpieza con cartuchos C18 (método 1) versus el obtenido con los dos cartuchos en serie (método 2) y se vió que en este último caso el perfil del cromatograma no mejoró tal como se esperaba. En la mayoría de los casos no se lograron eliminar las interferencias que co-eluyen con la MC-LR, obteniendo un cromatograma similar al de la figura 8. En las muestras fortificadas los porcentaje de recuperación obtenidos fueron bajos (30%).

Método 3

Este método se descartó ya que el cartucho utilizado no fue compatible con este tipo de muestras. No se obtuvieron resultados aceptables.

Método 4

En este método se hizo la extracción en fase sólida de la MC-LR usando un cartucho Oasis HLB (0,5 g) seguido de cartucho silica gel/plus silica gel en serie para remover los compuestos que coeluyen junto con la toxina de interés. Los cromatogramas obtenidos demostraron que usar los dos tipos de cartucho en serie fue efectivo para eliminar muchos de los compuestos que co-eluyen con la MC-LR. Esto facilitó la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR. Sin embargo, en las muestras fortificadas los porcentajes de recuperación obtenidos fueron bajos (promedio 12%).

Método 5

En este método se hizo la extracción en fase sólida de la MC-LR usando un cartucho Oasis HLB (0,5g). El cromatograma obtenido permite la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR de forma inequívoca ya que la resolución del pico de interés es muy buena y la pureza del pico es adecuada lo cual indica que no coexisten dos compuestos (Figura 9). El porcentaje de recuperación promedio obtenido con las muestras fortificadas fue del 60%. Se verificó repetibilidad entre los resultados obtenidos. Frente a la evidencia de buena separación cromatográfica y parámetros de performance aceptables es que se seleccionó este método para analizar las muestras de músculo de tararira.

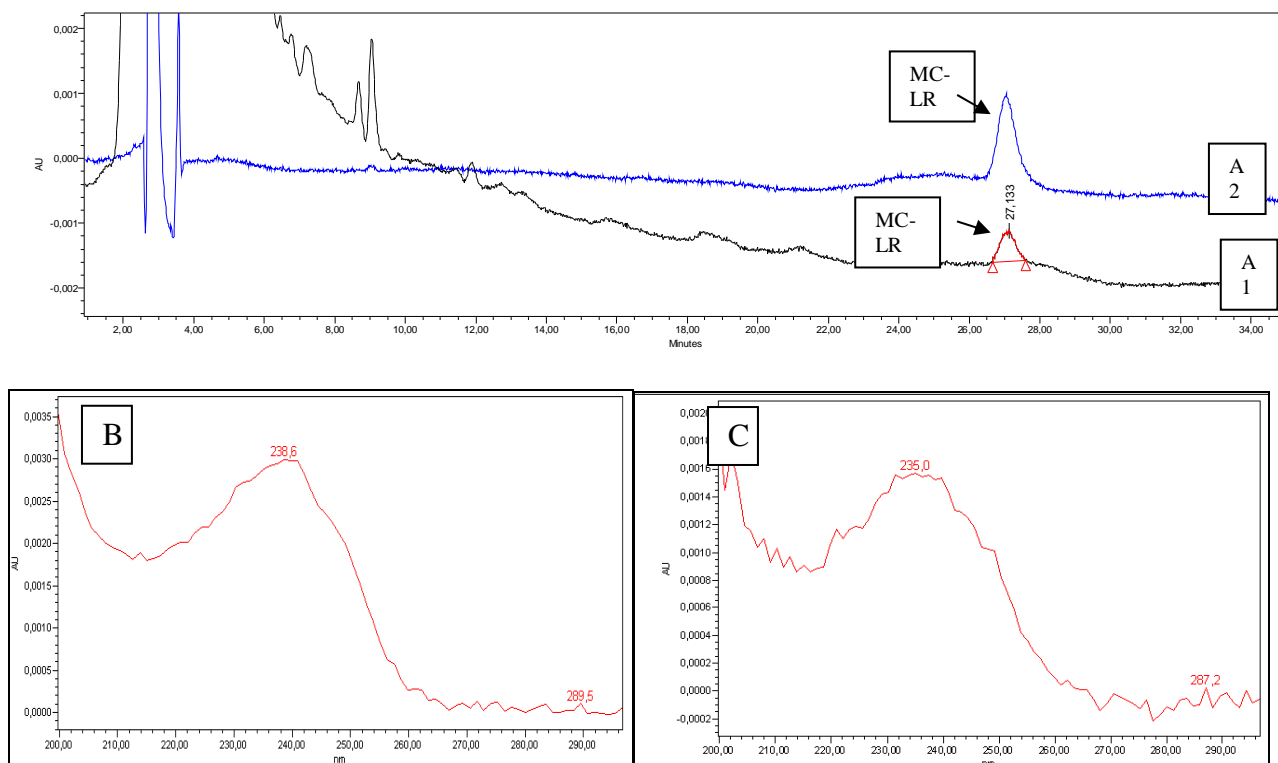


Figura 9 – (A) Cromatograma obtenido (a 238 nm) luego de inyectar la muestra de tararira fortificada (A1) y luego de inyectar estándar de MC-LR (A2). En ambos casos se indica el pico correspondiente a MC-LR. (B) Espectro de absorción a 238 nm para el estándar de MC-LR y para el pico de MC-LR en la muestra fortificada (C).

Una vez seleccionado el método se procedió a la validación del mismo. La linealidad del instrumento (detector) se verificó a través del coeficiente de correlación (r) obtenido con la curva de calibración donde se graficó la concentración de estándar (variable independiente) versus la respuesta del detector (área de pico promedio obtenida en cada nivel, variable dependiente). Se calculó la ecuación de la recta por medio de una regresión lineal y se obtuvo un $r > 0.99$ lo cual se considera aceptable. La exactitud del método se evaluó a través de estudios de veracidad y precisión. En el primer caso se analizaron muestras de músculo de tararira fortificadas con MC-LR y se obtuvo un porcentaje de recuperación de MC-LR (promedio) de 60%. Para la precisión del método se realizaron réplicas de muestras fortificadas y se calculó la desviación estándar relativa entre las mismas ($RSD_R < 20\%$). Los resultados obtenidos para ambos parámetros (veracidad y precisión) cumplen con los criterios de aceptación establecidos en la AOAC (1). La selectividad del método fue adecuada ya que no se detectaron picos cromatográficos debido a interferencias en el tiempo de retención de la MC-LR. El límite de detección (LD) se define como la mínima concentración de toxina que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada en las condiciones de análisis. Se calculó como la concentración correspondiente a una señal 3 veces superior a la señal-ruido obtenida en el cromatograma de las tarariras blanco. El límite de cuantificación (LC) se define como la mínima concentración de toxina que puede determinarse con veracidad y precisión en las condiciones de análisis. Se calculó como la

concentración correspondiente a una señal 6 veces superior a la señal-ruido obtenida en el cromatograma de las tarariras blancos. El LD del método es 2 µg/kg y el LC 4 µg/kg.

4.2 MC-LR en músculo de tarariras de los lagos Andresito y del Embalse Rincón del Bonete

El método 5 se aplicó para analizar MC en el músculo de tarariras de los lagos de Andresito y del Embalse Rincón del Bonete. Se analizaron un total de 4 ejemplares y 35 ejemplares, respectivamente, de tarariras adultas siendo el contenido de MC-LR en las mismas no detectable, es decir menor al LD (MC-LR <2µg/kg).

4.3 MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua

Los valores de MC-LR total (intracelular y extracelular) en agua para las 9 estaciones de muestreo resultaron no detectables, es decir menor al LD (MC-LR <0,04 µg/L).

4.4 Riesgos potenciales para la salud humana por el consumo de tarariras contaminadas con MC-LR

La totalidad de los pescadores encuestados son hombres que practican la pesca artesanal en el Embalse Rincón del Bonete. El promedio de edad es de 50 años. En un 70% de los casos los pescadores encuestados viven con su familia, y dentro de éstos en un 20% de los casos hay niños menores a 12 años. El 30% restante vive solo. Para el 70% de los encuestados la pesca es su principal fuente de ingreso. En base a la información recopilada se identifican dos tipos de procedimientos de pesca artesanal. En el primero los pescadores salen a pescar por el día y pescan en zonas cercanas a la ciudad de San Gregorio de Polanco. En el segundo los pescadores salen a pescar y permanecen embarcados entre 3 a 5 días por lo tanto acampan a orillas del embalse. En este caso pescan en zonas más alejadas de la ciudad para lo cual recorren el embalse aproximadamente 8-9 horas en bote hasta llegar a un buen lugar de pesca donde, según explican, se obtienen “buenas tarariras” y “en buena cantidad”. La mitad de los pescadores encuestados salen a pescar 4 veces por mes (una vez por semana, todas las semanas) y en cada salida acampan entre 3 a 5 días a orillas del embalse (fig10).

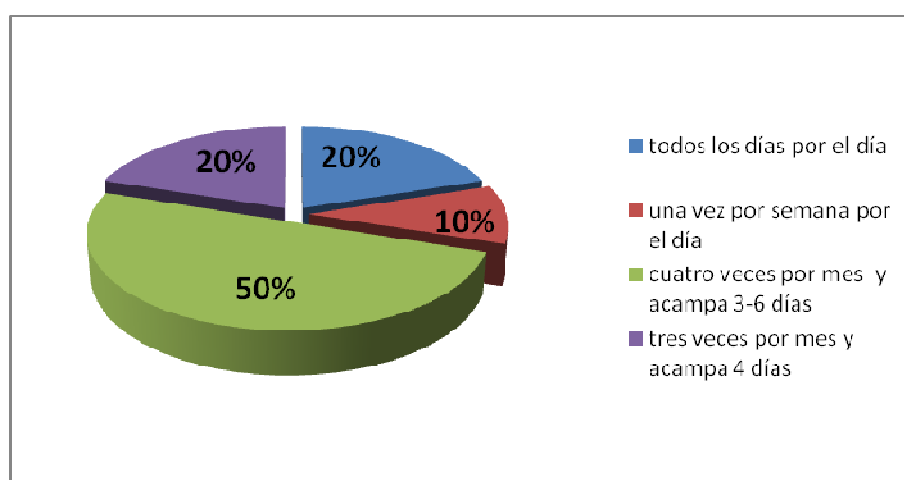


Figura 10. Frecuencia con la que los pescadores artesanales encuestados salen a pescar en el embalse Rincón del Bonete.

En el 100% de los casos las especies capturadas son tarariras, bagre y vieja del agua. La captura promedio por salida depende de cada caso. Los pescadores que salen a pescar por el día (sea todos los días o una vez por semana) capturan en promedio 70 kg por semana. Aquellos que permanecen embarcados varios días y pescan en zonas más alejadas a la ciudad obtienen un promedio de 270 kg por semana. En cuanto a la comercialización de la tararira, solamente un 10% del total de los pescadores encuestados vende lo obtenido a la población local de San Gregorio de Polanco. En el 80% de los casos, los pescadores encuestados las venden a un acopiador o intermediario que, según explican, lleva el producto hacia el Departamento de Rivera. El 10% restante realiza el negocio directamente con un comerciante brasileño, que lleva las tarariras hacia San Pablo y Porto Alegre principalmente. Con respecto al consumo de tararira, el 90% de la población encuestada asevera que le gusta la tararira y solamente un 10% responde que no le agrada. En cuanto a la frecuencia de consumo, el 40% de los encuestados manifestó incorporar la tararira a su plan de alimentación una vez por semana (una porción), seguido por aquellos que lo hacen 1 a 2 veces al mes (30%) (Figura 11). Para todos los casos, en las familias donde hay niños menores de 12 años la frecuencia de consumo es la misma que los adultos.

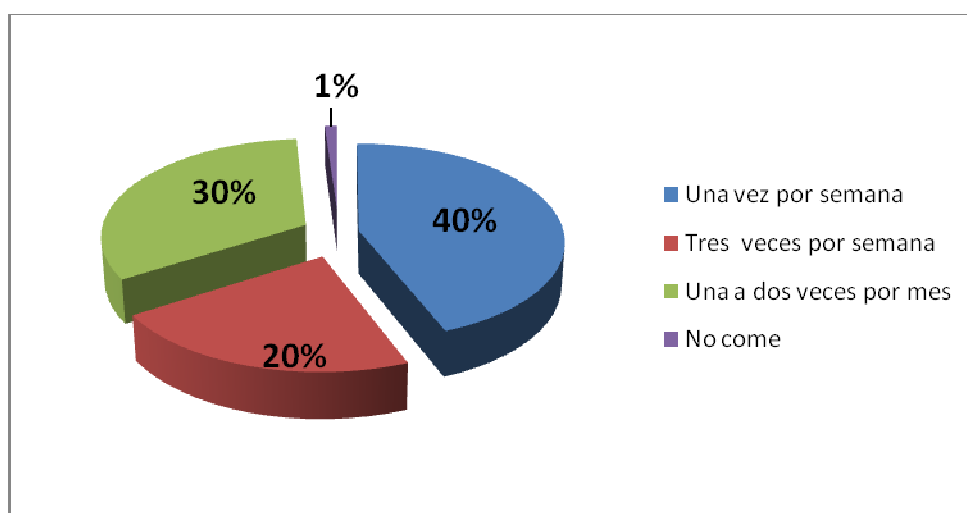


Figura 11. Frecuencia de consumo de tararira por parte de los 10 pescadores artesanales del embalse Rincón del Bonete encuestados.

Se recogieron varios comentarios donde se manifestaron básicamente dos motivos para no consumir tararira, ambos relacionados a las características propias del pescado: la cantidad de espinas dificulta su preparación para la cocción y por otro lado el sabor de la carne, donde se aclaró que el bagre y la vieja del agua son más sabrosos que la tararira. Según lo relevado en la encuesta, al norte del Río Negro y en zonas limítrofes a Brasil se prefiere consumir tararira, mientras que en la zona de estudio pese a que “hay cultura de comer pescado”, la carne preferida es la de bagre. Los pescadores que consumen tararira únicamente consumen el músculo. Las formas de cocción son variadas: en forma de milanesa, asada, a la plancha o en guiso. Por último, se preguntó si consideraban importante realizar estudios en los peces del Embalse Rincón del Bonete. En el 90% de los casos la respuesta fue afirmativa y estuvo acompañada por varios comentarios como por ejemplo “es importante ya que la fumigación en los cultivos de soja se hace contra el lago y esto

podría perjudicar a los peces”, “largan contaminantes al embalse y nadie hace nada”, “las agroindustrias tienen influencia en el agua del embalse”, entre otros. Solamente un 10% considera que no es necesario ya que la carne de pescado es “sana”, “de buena calidad”, “no tiene hormonas como la carne de vaca, ya que el pescado es algo natural”.

En base a los hábitos de consumo relevados con la encuesta se calculó la concentración máxima (C máx) permitida de MC, que puede estar presente en el músculo de tararira sin causar un riesgo para la salud de los consumidores (Tabla 8), calculada según fórmula (1) de la sección 7.

Tabla 8 – Concentración máxima permitida de MC en músculo de tararira en relación al nivel de consumo de los consumidores.

TDI (µg MC/kg de peso corpóreo por día)	bw (kg)	Frecuencia de consumo	I (g por día)*	C máx (µg MC/g músculo de Tararira)
0.04	60	1 porción por semana	21	0.11
0.04	60	3 porciones por semana	64	0.0375
0.04	60	Una o dos porciones por mes	5 - 10	0.48 – 0.24

*Se considera una porción de 150 g de músculo de tararira

C máx es la concentración máxima permitida de MC en músculo de tararira (ug MC/g músculo de tararira) calculada como $C_{máx} = bw \cdot TDI / I$ donde **bw** es el peso del consumidor (kg); **TDI** es la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) establecida por la OMS: 0,04 ug MC/kg para un peso medio de 60 kg; **I** es el consumo de músculo de tararira (g).

5. DISCUSIÓN

Las cianotoxinas se pueden acumular en diferentes organismos acuáticos (6). Cualquier organismo que se captura para el consumo humano a partir de los cuerpos de agua que contienen floraciones de cianobacterias tóxicas puede contener cianotoxinas, como por ejemplo MC-LR (38). Para evitar o reducir los riesgos de salud asociados con el consumo de productos acuáticos, es fundamental conocer los niveles de MC presente en las principales especies de peces y mariscos capturados en lagos eutróficos.

En Uruguay hasta el momento, no hay datos respecto al riesgo que existe al consumir músculo de pescado contaminados con MC-LR. Esto se debe, en parte, a que no existía a nivel nacional una metodología adecuada que permita identificar y cuantificar MC-LR en dichos tejidos. Este hecho resalta la importancia del presente estudio donde la información generada constituye el primer antecedente en el país en estudios de este tipo. En el presente trabajo se logró poner a punto una metodología para determinar MC-LR en músculo de tararira y evaluar el posible riesgo para la salud humana que pudiera significar su consumo. Los ejemplares de tararira fueron capturados en el Embalse Rincón del Bonete donde la aparición de floraciones tóxicas de cianobacterias ocurre frecuentemente.

5.1 Puesta a punto y validación de una metodología analítica para detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tarariras

Para lograr un método analítico adecuado para la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR en músculo de tararira se probaron distintas metodologías. La homogeneización mecánica de la muestra fue similar para todos los métodos ensayados, ya que se logró un buen desmenuzamiento del músculo de pescado, de forma de tener una muestra lo más homogénea posible para luego hacer la toma de muestra. La diferencia consistió en los solventes usados para la extracción de la toxina, condiciones de concentración y limpieza de la muestra para eliminar interferencias, así como también de las condiciones cromatográficas.

El método 1 y 2 está basado en el método reportado por Magalhães y colaboradores (48, 49) donde se determinó MC-LR en hígado y vísceras de pescado por HPLC y en músculo por ELISA. Los resultados obtenidos al intentar aplicar esta metodología para análisis de MC-LR en músculo de pez por HPLC no fueron satisfactorios. Al hacer la determinación por HPLC se observó un alto nivel de "ruido", traducido en picos con altas áreas de fondo en el cromatograma en el tiempo de retención cercano a la MC-LR, compuestos no deseados que dificultan la correcta identificación y cuantificación de dicha toxina. Se hicieron modificaciones para revertir esta situación: por ejemplo en el método 2 se hizo una doble limpieza SPE y se cambiaron las condiciones cromatográficas (principalmente cambios en la composición de la fase móvil). En algunos casos con dichas modificaciones se logró un cromatograma libre de interferencias y se pudo identificar y cuantificar correctamente a la MC-LR. Sin embargo, en la mayoría de los casos esto no se logró. Cuando fue posible cuantificar la MC-LR el porcentaje de recuperación obtenido fue del 20-30 %, pero los resultados no fueron reproducibles.

Con el método 3 no se obtuvieron resultados aceptables ya que la limpieza en fase sólida no fue adecuada, con lo cual se descartó.

Respecto al método 4, en el mismo se realizó una doble limpieza por columna de fase sólida lo cual ocasionó pérdida de toxina que queda demostrado con el bajo porcentaje de recuperación obtenido (12%).

El método elegido fue el método 5. En las condiciones de ensayo del laboratorio y con la matriz de estudio (músculo de tararira) no fue necesaria la doble limpieza que se realizó en el método 4 (cartuchos HLB OASIS y posteriormente columna sílica gel (2g)/plus sílica gel (0,69g)). Al usar solamente los cartuchos HLB OASIS se vió que la limpieza de la muestra fue efectiva ya que al momento de la detección por HPLC se pudo identificar y cuantificar a la MC-LR de forma inequívoca. Por otro lado el porcentaje de recuperación fue mejor respecto al obtenido luego de usar dos cartuchos en serie (método 4).

En el tiempo de retención de la MC-LR se obtuvo un pico con buena resolución, pureza adecuada y espectro característico de dicha toxina. Frente a la evidencia de buena separación cromatográfica y parámetros de performance aceptables es que se seleccionó este método para analizar las muestras de músculo de tararira. El porcentaje de recuperación promedio obtenido con las muestras fortificadas fue de 60%. Dicho porcentaje de recuperación se considera aceptable para el presente trabajo ya que no hay antecedentes de estudios de este tipo con tarariras. La recuperación de la MC libre a partir de tejidos animales puede variar entre 15 y 105%, dependiendo del tratamiento previo de muestra (extracción y limpieza), el tipo de tejido del cual se extrae y la variante de MC con la cual se fortifica a la muestra (72). Si se compara el valor de recuperación obtenido (60%) con lo reportado en la bibliografía por diferentes investigadores que emplearon una metodología similar (etapa de extracción y limpieza SPE y detección por cromatografía líquida), se observa que los porcentajes de recuperación son dispares. Ibelings y colaboradores (37) analizaron MC-LR en hígado de pescado (*Osmerus eperlanus*) del Lago IJsselmeer (Noruega), a partir de una metodología basada en una etapa de extracción y posterior limpieza en fase sólida (SPE) con detección HPLC/PDA. El porcentaje de recuperación promedio obtenido fue de 68%. Xie y colaboradores (87) determinaron el contenido de MC-LR en músculo de *Hypophthalmichthys molitrix* recolectados del Lago Chaohu (China). El porcentaje de recuperación de toxina obtenido luego de la etapa de extracción y limpieza (SPE) realizando la detección y cuantificación con HPLC/PDA fue de 89%. Gutierrez-Praena y colaboradores (6) analizaron MC en hígado y músculo de pescado (*Tinca tinca*) recolectados de tres estanques con floraciones de cianobacterias (*Microcystis aeruginosa* entre otras) en España. Se realizó la etapa de extracción de la toxina, de limpieza (basada en SPE) y la detección utilizando LC/MS. En el caso de MC-LR el porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras fortificadas fue de 99-100% para músculo y 97% en el caso de hígado. En China, Luo y colaboradores (47) determinaron la acumulación de MC en hígado de diferentes especies de pescados del Lago Taihuwas utilizando una metodología con una etapa de limpieza (SPE) y detección con HPLC MS-MS. Se obtuvieron valores de recuperación promedio de 86% para la MC-LR. Cadel y colaboradores (5) determinaron el contenido de MC libre y unido covalentemente en diferentes tejidos de trucha (intestino, hígado, branquias y músculo). La metodología aplicada se basó en una etapa de extracción y limpieza (SPE) con posterior detección por LC-MS/MS. El porcentaje de recuperación obtenido para la MC-LR en el intestino fue de 80%, 73% para el hígado, 47% para las branquias y 35% para el músculo.

En muchos de los estudios realizados la eficiencia de extracción y limpieza de la toxina (porcentaje de recuperación) no se reporta. Soares y colaboradores (73) realizaron experimentos de depuración de MC en *Tilapia rendalli*. Para ello analizaron MC en hígado y músculo de los pescados mediante técnica de ELISA. No hay datos del porcentaje de recuperación. Nyakairu y colaboradores (57) determinaron los niveles de

MC-LR en diferentes órganos (músculo, estómago e intestino) de *Oreochromis niloticus* y *Lates niloticus* obtenidos de dos lagos de Uganda. Para ello utilizaron una metodología basada en cromatografía líquida con detector de espectrometría de masa (LC/MS/MS). No hay datos del porcentaje de recuperación obtenido.

Magalhães y colaboradores (48) cuantificaron los niveles de MC en músculo, hígado y vísceras de *Tilapia rendalli* de la Laguna Jacarepaguá, Brasil. Para ello utilizaron una metodología basada en extracción en fase sólida con detección HPLC (en el caso de hígado y vísceras), mientras que en el caso del músculo la misma fue por técnicas inmunológicas (ELISA). En ninguno de los tres casos se reportó el porcentaje de recuperación obtenido con esta metodología.

Hay que tomar en cuenta que mediante el uso de solventes orgánicos se extraen solamente las "microcistinas libres" (es decir, las que se encuentran disueltas o unidas reversiblemente a proteínas fosfatasas). Una vez unido covalentemente a cualquiera de las proteínas fosfatasas u otra cisteína que contiene péptidos (por ejemplo, glutatión), las microcistinas se pueden oxidar para liberar una porción de la fracción de Adda como 2-metil-3-metoxi-4-ácido fenilbutírico (MMPB), que luego se puede cuantificar por espectrometría de masas. Este método cuantifica el total de carga de MC (libre+unida) acumulado en los tejidos. Sin embargo, la MC libre representa la fracción que es considerada más biodisponible, y por lo tanto, es la de más interés debido a los efectos que pueda causar en el ambiente y en la salud (72).

5.2 MC-LR en agua y músculo de tarariras del Embalse Rincón del Bonete

Cualquier organismo que se captura para el consumo humano a partir de los cuerpos de agua (lagos, ríos o estuarios) donde hay floraciones de cianobacterias tóxicas podría contener cianotoxinas en sus tejidos (38). Ni y colaboradores (56) estudiaron la bioacumulación de MC-LR en tejidos de pez (*Aristichthys nobilis*) durante una floración de *Microcystis* en un estanque en China. Se detectó MC-LR en agua (promedio de 2,9 µg/L) y en los diferentes tejidos del pescado (hígado, intestino, riñón, músculo) con un máximo de 2,29 µg/g (peso seco) en el intestino. Magalhães y colaboradores (49) realizaron un estudio en la Bahía de Sepetiba, Brasil, donde determinaron la concentración de MC en agua, seston y músculo de pescado de dicho cuerpo de agua. Se detectó MC en todas las muestras de seston, agua (con un máximo de 0,12 µg /L) y músculo de pescado (máximo de 39,6 µg/kg, peso seco). Se encontró una correlación significativa entre la concentración de MC en las muestras de seston y músculo de pescado así como entre la concentración de MC en las muestras de agua y músculo de pescado.

En el embalse Rincón del Bonete es frecuente la presencia de floraciones tóxicas de cianobacterias y de MC-LR, por lo tanto en el presente estudio se esperaba encontrar acumulación de MC-LR en músculo de tarariras. Se realizó un muestreo en el verano donde se abarcó una zona espacial grande tanto para el muestreo de agua como de tarariras. Sin embargo, no se detectó MC-LR en las muestras de agua ni de músculo analizadas.

La concentración de MC-LR que se encuentra en el músculo del pescado es muy dependiente de la exposición de los peces a dichas cianotoxinas y a la duración de las floraciones tóxicas (20, 38). Por ejemplo, en climas tropicales y subtropicales, donde las floraciones son permanentes, ocurre una exposición crónica de los peces a las mismas, lo cual lleva a mayores niveles de MC (20). En el caso del embalse Rincón del Bonete, en el verano donde se llevó a cabo el muestreo (febrero 2012) se encontraron cianobacterias

potencialmente tóxicas. La especie más abundante correspondió al género *Microcystis* (tabla 2). Sin embargo, no se detectó MC-LR en las muestras de agua analizadas (tabla 3). La presencia de floraciones de cianobacterias no implica la presencia de toxinas, ya que no todas las cepas son tóxicas (51). En ambientes naturales coexisten ambos tipos de floraciones (tóxicas y no tóxicas). En una floración de *Microcystis* aún no está claro que factores determinan la síntesis de microcistinas (41). Factores ambientales tales como intensidad de luz, temperatura y salinidad del agua, pH, radiación ultravioleta, concentración de nutrientes, presencia de metales traza pueden influir en el crecimiento de las cianobacterias y por lo tanto en la producción de las toxinas (35, 41, 51, 55, 56).

En las muestras de agua la MC-LR puede estar en forma disuelta o dentro de las células de los organismos que la producen. En el embalse Rincón del Bonete se registró MC-LR en las muestras de agua en los veranos anteriores (2010 y 2011) y posteriores a este estudio (2013) pero no en el verano 2012, fecha en la cual se realizó el muestreo (tabla 3). Los días previos a la campaña de muestreo se constató la presencia de una floración de *Microcystis* (tabla 2), que si bien era potencialmente tóxica los niveles de MC-LR fueron no detectables en las muestras de agua analizadas. Por ello las tarariras podrían no estar en contacto con la toxina desde el verano anterior al muestreo.

La bioacumulación de MC en el músculo de los peces depende de la ingestión y absorción de la MC por parte de los peces y los procesos de desintoxicación y excreción que se produzcan en cada organismo (7, 73). En el medio acuático, las cianotoxinas son liberadas al agua circundante durante la lisis de las cianobacterias. Por lo tanto, los peces están naturalmente expuestos a la MC a través de la ingestión de las cianobacterias tóxicas o alimentos contaminados, y, en menor medida, a través de la toxina disuelta (7, 51). Según Magalhães y colaboradores (48) la principal vía de exposición a la toxina es a través de la ingestión oral. Una vez absorbida, la MC es transportada a través del torrente sanguíneo y se distribuye a los diversos órganos o tejidos como branquias, hígado, músculo, intestino y riñón, donde se puede acumular (7). Experimentos de laboratorio para estudiar la depuración de MC demuestran que los peces pueden rápidamente, en cuestión de días, eliminar la MC de sus tejidos, pero no hay datos concretos respecto a la tasa de depuración de las variables específicas de MC (20). Song y colaboradores (74) detectaron MC en el hígado y músculo de pescado (*Carassius auratus Linnaeus*) aún cuando las concentraciones de MC disuelta en agua eran muy bajas o muy pocas cianobacterias fueron detectadas. Vasconcelos y colaboradores (81) investigaron la bioacumulación de MC y sus potenciales efectos mutagénicos en *Oreochromis niloticus*. Los resultados obtenidos sugieren que mecanismos complejos de acumulación y depuración ocurren en el pez, y el músculo puede contener niveles altos de MC aún cuando la floración de cianobacterias ya no esté presente. Soares y colaboradores (73) realizaron diferentes estudios de acumulación y depuración de MC en *Tilapia rendalli* bajo condiciones de laboratorio. Demostraron que la acumulación de MC en hígado y músculo de tilapia ocurren con diferentes perfiles. Estos autores encontraron la mayor concentración de toxina en el hígado en el sexto día de exposición a la MC, mientras que la máxima concentración de toxina en músculo fue durante el período de depuración, cuando los peces no estaban expuestos a las cianobacterias tóxicas. Estos resultados sugieren que en los ambientes naturales las toxinas pueden encontrarse en el músculo de pez varios días después que la floración de cianobacterias terminó. Magalhães y colaboradores (48) realizaron un estudio de bioacumulación de MC en *Tilapia rendalli* en la Laguna de Jacarepaguá. Los

resultados demostraron que incluso en los períodos donde las floraciones algales decaen y la MC es no detectable en las muestras de seston, la toxina es detectable en músculo e hígado de pez. En base a la bibliografía consultada, no se encontraron datos acerca del mecanismo de acumulación-detoxificación de las tarariras.

5.3 Riesgos potenciales para la salud humana por el consumo de tarariras contaminadas con MC-LR

Para poder evaluar los potenciales riesgos para la salud humana que pueda causar el consumo de tarariras contaminadas con MC-LR hay que tomar en cuenta los niveles de dicha toxina en los tejidos que son empleados para el consumo humano así como también la dosis o frecuencia con la que dichos alimentos son ingeridos y el peso del consumidor (según punto 2.3.5). A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud estableció una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,04 ug MC/kg para un peso medio de 60 kg (17). En el presente trabajo todas las muestras de músculo de tararira analizadas presentaron valores de MC no detectables, menores que la concentración máxima permitida de MC (C máx) calculada en la tabla 8 tomando en cuenta las tres frecuencias de consumo que se identificaron en la encuesta. Sin embargo diferentes estudios de campo y experimentales a nivel del laboratorio demostraron que las MC pueden acumularse en tejidos de peces y superar la IDT, lo cual constituye un riesgo para la salud humana (48, 65). Xie y colaboradores (85) encontraron que un 31% de las muestras de músculo de dos especies de peces expuestas a MC en el lago de Chaohu (China) superaban la IDT. En una investigación posterior, estos mismos autores (88) estudiaron la transferencia, distribución y bioacumulación de MC en seis especies de peces expuestos a MC en el lago Taihu (China). Los resultados obtenidos demuestran, para una especie, la MC alcanzó concentraciones en músculo superiores a la IDT. En este mismo Lago, Jia y colaboradores (47) cuantificaron los niveles de MC-LR en músculo en 4 especies de peces (*Hypophthalmichthys Molitrix*, *Aristichthysnobilis*, *Carassiusauratus* y *Cyprinuscaipio*). En el 56% de las muestras analizadas los valores de MC-LR se encuentran por encima de la TDI. Song y colaboradores (45) determinaron la MC-LR en músculo de peces de tres lagos de China. Los resultados demostraron que estos ejemplares no son aptos para consumo humano debido a la bioacumulación de MC-LR en sus tejidos. En todos los casos se supera la IDT, entre 5-148 veces para el Lago Taihu, 2-50 veces para el Lago Chaohu y 1.5 – 4 para el Lago Diachi. En Brasil (Laguna Jacarepaguá) Magalhães y colaboradores (48) con los resultados obtenidos para *Tilapia rendalli* también demostraron que en un 72% de las muestras los niveles de MC en músculo son mayores a la IDT. En el Lago San Roque, Argentina, Cazenave y colaboradores (7) estudiaron la especie *Odontesthes bonariensis* la cual acumula MC en sus tejidos en concentraciones que supera a la IDT.

Es importante tomar en cuenta que, en este trabajo, la IDT utilizada para el cálculo de la C máxima está estimada para adultos sanos de 60 kg, por lo tanto el riesgo podrá ser mayor cuando los niños estén expuestos (38). Los niños, a diferencia de los adultos, son más propensos a ser afectados por las cianotoxinas debido a una combinación de tamaño más pequeño (es decir, de peso corporal) y a la etapa de desarrollo (73). Por otro lado, la concentración máxima permitida es inversamente proporcional al consumo de pescado, con lo cual frente a un mismo consumidor, cuanto mayor sea el consumo, menor es la C máx permitida y por lo tanto mayor es el riesgo.

Según los datos publicados por la FAO (27), actualmente el consumo mundial per cápita de pescado es de 19 kg por año. Sin embargo la distribución de consumo es asimétrica porque mientras que en China se consumen 35 kg de pescado per cápita al año, en América del Norte, Asia y Oceanía este consumo es en promedio 22 kg y en Sudamérica solo 10 kg. Uruguay, según los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) (4), es un país que tiene altos niveles de ingesta en carnes rojas y un consumo per cápita mucho más bajo de productos del mar. El consumo de pescado per cápita apenas alcanza a los 54 gramos por semana (2,9 kg por año), lo cual representa 1/3 de porción. Este valor se encuentra por debajo de la recomendación internacional (1 a 2 porciones por semana). Si se compara con los países de la región, el consumo en Uruguay es el más bajo. En Brasil el consumo de pescado es de 14,5 kg per cápita por año (52) mientras que en Argentina es de 9 kg per cápita por año (53). En el presente trabajo el 40% de los encuestados manifestó consumir una porción de músculo de tararira una vez por semana (150 gramos por persona por semana), lo cual es un consumo mayor al promedio nacional publicado por el INE.

Hay que tomar en cuenta que un alto porcentaje de los consumidores se encuentra fuera de la zona de estudio ya que, según la encuesta realizada, en un 80% de los casos las tarariras que se capturan se venden a un acopiador o un intermediario cuyos clientes se localizan en el Departamento de Rivera (frontera con Brasil).

El valor de la concentración máxima permitida de MC (C máx) podría servir para fijar un “nivel de alerta” ya que el consumo de tararira con concentraciones de MC mayores a la $C_{máx}$ podrían causar un riesgo a la salud humana, estableciendo períodos de veda en caso de ser necesario. Sin embargo, con los datos obtenidos en este trabajo resulta difícil establecer un “nivel de alerta” debido a otros factores que hay que tomar en cuenta: peso consumidor (depende si es niño, hombre o mujer), su estado salud y el ingreso de MC por otras vías (por ejemplo agua). Además cabe resaltar las limitaciones que se tuvieron al momento de realizar la encuesta donde fue muy difícil contactar al pescador (se pudieron encuestar solamente a 10). Se debería ampliar el estudio para tener datos más representativos de la realidad de los pescadores respecto al consumo y comercialización de la tararira. Por otro lado, dado el alto porcentaje de consumidores se encuentran fuera de la zona estudio (Rivera, Brasil), al momento de establecer un “nivel de alerta” hay que tomar en cuenta este dato para proteger la salud de los consumidores locales y de aquellos que se encuentran en otras zonas del país e incluso del exterior.

En cuanto a la parte del pescado (tararira) que se consume, las encuestas mostraron que los pescadores artesanales del Embalse Rincón del Bonete y sus familias consumen únicamente el músculo. El consumo de los pescados es a menudo restringido a tejido muscular, como en el caso en estudio, pero esto no siempre es así. En Uruguay existen datos de pescadores de Montevideo y Piriápolis que comen, además del músculo, las huevas e hígados de pescados como “brótola” y “corvina” (81). De acuerdo con Ibelings y Chorus (38) las exposiciones más altas a las toxinas de cianobacterias están casi siempre relacionadas con aquellos animales que el hombre come en su totalidad. La MC-LR se puede acumular en los distintos órganos de peces de agua dulce pero la concentración de dicha toxina tiende a ser más alta en el intestino y el hígado (por ser el órgano diana de esta cianotoxina), algo menor en los riñones y las gónadas, y mucho menor en el tejido muscular (73, 74). Xie y colaboradores (85) encontraron niveles de MC-LR de 115 ug/kg en el intestino del pez estudiado pero no se detectó MC-LR en músculo ni hígado de dicho pez. Zhang y colaboradores (64)

reportaron estos mismos resultados, indicando que la MC-LR se podría acumular en los distintos órganos del pez más que en el músculo. Esto es relevante para la salud humana ya que el músculo es, en general, el tejido consumido.

Otro factor a tener en cuenta es el efecto de la de cocción del alimento, el cual hay que tomarlo en cuenta para la evaluación de riesgos, ya que influye en la cantidad de toxina que realmente se ingiere. Los efectos de la cocción dependen del método aplicado, el tiempo de cocción, temperatura empleada, y también las características particulares del compuesto en estudio. En el caso de las cianotoxinas se han realizado muy pocos estudios sobre este tema. Guzmán-Guillén y colaboradores (34) estudiaron el efecto de diferentes técnicas de cocción (horno microondas y ebullición) en el músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a MC. Los resultados obtenidos mostraron que las técnicas de cocción estudiadas no pueden eliminar o alterar la MC, sino que reducen los niveles de MC no conjugados en el músculo de pescado entre 25% y 50% (33, 34). En este trabajo la determinación de MC en músculo de tararira se realizó en el pescado crudo. Sin embargo las encuestas realizadas mostraron que el músculo de tararira se consume en forma de milanesa, asada a las brasas, a la plancha y formando parte de una cazuela. Al sufrir un proceso de cocción el riesgo potencial para la salud humana sería menor que si se consume el músculo de tararira crudo.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Desde el área de la Química Analítica se puso a punto una metodología analítica para su aplicación en el área de las Ciencias Ambientales, con relación a la salud humana.
- La ausencia de toxicidad en el músculo de tarariras se explicaría por la ausencia de toxicidad en el agua en los meses previos al muestreo y durante el mismo junto con los procesos de acumulación y depuración de la MC que tienen lugar en los peces. La hipótesis de trabajo planteada no se puede descartar ya que las predicciones no se cumplieron. Debería volver a testarse en el futuro.
- La concentración máxima (C máx) de MC en músculo de tararira que podría estar presente sin causar un riesgo en la salud del consumidor calculada en este trabajo no debería tomarse como un “nivel de alerta” hasta no tener más estudios.
- El presente trabajo constituye un importante aporte científico para el país teniendo en cuenta que en Uruguay no hay antecedentes de estudios de bioacumulación de la MC-LR en músculo de pescado de consumo humano. Además, a partir de este trabajo se cuenta con la metodología adecuada para determinar MC-LR en músculo de pescado.
- Sería bueno implementar un plan de muestreo de los ejemplares que se capturan para consumo humano en el Embalse Rincón del Bonete (por ejemplo tarariras, bagre) para evitar o reducir el riesgo a la salud humana dado la alta frecuencia con que ocurren las floraciones y los antecedentes toxicidad es este Embalse, así como también la frecuencia consumo de estos pescados y la preocupación de los pescadores.

7. ANEXOS

ANEXO 1 - FICHA DE RELEVAMIENTO DIRIGIDA A PESCADORES DEL EMBALSE RINCÓN DEL BONETE

Fecha:

A. DATOS PERSONALES

Edad:.....

Sexo: M..... F.....

¿Cuántas personas viven con Ud.?

De esas personas, ¿Cuántas son menores a 12 años?

	Mayor a 12 años	Menor 12 años
hombre		
mujer		

¿Cuáles son las fuentes de ingreso que poseen para vivir usted y su familia?

Únicamente la pesca.....Otros trabajos fuera de la actividad pesquera

Ambos.....Otros..... ¿cuál?.....

B. DATOS SOBRE LA ACTIVIDAD PESQUERA

- ¿Pesca tarariras? Si No
- ¿Con que frecuencia pesca?

Todos los días		Una vez por semana	
Más de una vez por semana		Una vez al mes	

- ¿Cuántos kilos de pescado obtiene por salida?
- De lo que Ud. pesca:

¿Con cuanto se queda su familia?

¿Cuanto vende en San Gregorio de Polanco?

¿Cuanto vende a un intermediario?

C. HABITO DE CONSUMO

- ¿Ud. consume las tarariras que pesca? SI NO

ANEXO 1 - FICHA DE RELEVAMIENTO DIRIGIDA A PESCADORES DEL EMBALSE RINCÓN DEL BONETE

- ¿Cada cuanto consume tararira?

Dos veces por día		1 o 2 veces al mes	
Una vez al día		Una vez cada 6 meses	
1 o 2 veces a la semana		Una vez al año	

- ¿Los habitantes de su casa menores a 12 años consumen tararira? SI NO

- ¿Cada cuanto lo hacen?

Dos veces por día		1 o 2 veces al mes	
Una vez al día		Una vez cada 6 meses	
1 o 2 veces a la semana		Una vez al año	

En ambos casos,

- ¿Qué parte consumen?

Músculo

Hígado

¿Otra / cual?

D. Otros

¿Le parece importante hacer un estudio de los peces del embalse?

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC International. Peer-Verified Methods Program (1998). *Manual on policies and procedures*. AOAC International.
2. Assis, H.C., Da Silva, C.A, Oba, E., Ramsdorf, W., Magalhães, V., Cestari, M. & Ribeiro, C.A. (2011). First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon*, 57: 141-147
3. Azevedo, S M O F, Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K L, Lau, S, Shaw G R & Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, 181-182: 441-446.
- 4 . Bove, M.I. & Cerruti, F. (2008) *Los alimentos y las bebidas en los hogares. Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos de los Hogares 2005-2006*. Montevideo: Instituto Nacional de Estadística. Disponible en: <http://www.ine.gub.uy/biblioteca>. Fecha de consulta: 25/01/15.
5. Cadel - Six, S., Moyenga, D., Magny, S., Trotereau, S., Edery, M. & Krys, S. (2014). Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Method characterization. *Environmental Pollution*, 185: 333-339.
6. Cameán, A.; Río, V; Moreno, I.; Prieto, A., Puerto, M., Gutiérrez-Praena D. & Soria-Díaz, E. (2013). Analysis of MC-LR and MC-RR in tissue from freshwater fish (*Tinca tinca*) and crayfish (*Procambarus clarkii*) in tench ponds (Cáceres, Spain) by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *Food and Chemical Toxicology*, 57: 170–178.
7. Cazenave, J, Wunderlin, D, Bistoni, M, Amé, V, Krause, E, Pflugmacher, S & Wiegand, C. (2005). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology*, 75: 178-190.
8. Chalar, G., L. De León, L., Brugnoli, E., Clemente, J. & Paradiso, M. (2002). Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse de Salto grande. En: *El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica*. Fernandez Cirelli, A. & Chalar, G. (Eds). Buenos Aires: CYTED Aprovechamiento y gestión de los Recursos Hídricos. pp. 123-142.
9. Chalar, G. (2006). Dinámica de la eutrofización a diferentes escalas temporales: Embalse Salto Grande (Argentina-Uruguay). En: *Eutrofização na America do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*. Tundisi, J.G., Matsumura, T. T. & Sidagis, C. G. (Eds). Sao Carlos: Instituto

Internacional de Ecología, Instituto Internacional de Ecología e Gerenciamiento Ambiental, Academia Brasileira de Ciencias, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. pp 87-101.

10. Chalar, G. (2009) The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. *Limnologia*, 39: 200-208.

11. Chalar, G., Fabián, D., Gonzalez-Piana, M. & Delbene, L. (2010). *Informe anual de los muestreos realizados en los embalses del Río Negro durante el período de noviembre 2000 – marzo 2009, Informe técnico*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy>. Fecha de consulta: 20/01/15.

12. Chalar, G., Fabián, D., Gonzalez-Piana, M. & Delbene, L. (2012). *Caracterización limnológica de los embalses del Río Negro durante el período setiembre 2009 – junio 2011, Informe técnico*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy>. Fecha de consulta: 20/01/15.

13. Chalar, G., Fabián, D., Gonzalez - Piana, M. & Delbene, L. (2013). *Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro. Informe correspondiente a los muestreos realizados en setiembre 2011 y enero, febrero y marzo de 2012, Informe técnico*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy>. Fecha de consulta: 20/01/15.

14. Chalar, G., Gerhard, M., Gonzalez-Piana, M. & Fabián, D. (2014). Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena (Uruguay). *En: Procesos Geoquímicos superficiales en Iberoamérica*. Marcovecchio, J., Botté, S. & Freija, R. (Eds). Red Iberoamericana de física y química ambiental. pp 121-147.

15. Chalar, G., Fabián, D., González - Piana, M. & Piccardo, A. (2015). *Estado y evolución de la calidad de agua de los embalses del Río Negro. Informe Setiembre 2011 – Marzo 2015. Informe técnico*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Informe inédito.

16. Chen, J. & Xie, P. (2005). Seasonal Dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology*, 20: 572-584.

17. Chorus, I. & Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management*. London, Chapman and Hall.

18. Codd, G. ,Morrison, L. & Metcalf, J. (2005). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 264–272.

19. Conde, D., Paradiso, M., Gorga, J., Brugnoli, E., De León, L. & Mandiá, M. (2002). *Problemática de la calidad del agua en el sistema de grandes embalses del Río Negro (Uruguay)*. CIER, 39: 51-68.

20. DeBlois, C., Aranda-Rodriguez, R., Gianic, A. & Bird, D. (2008), Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*, 51: 435–448.
21. De León, L. & Yunes, J. (2001). First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 16: 110-112.
22. Dirección Nacional de Medio Ambiente. Departamento de Calidad Ambiental. División de evaluación de la calidad ambiental (2011). *Monitoreo y evaluación de calidad de agua. Plan para la Definición de una línea de base del Río Negro*. Montevideo: DINAMA.
23. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. *Ensayo piloto de un enfoque de ecosistemas para la pesca costera en Uruguay. GCP/URU/030/GFF*. Disponible en: <http://www.pescaresponsable.gub.uy/rincon-bonete.html>. Consultada 31/08/15.
24. Dodds, W. (2002). *Freshwater Ecology. Concepts and Environmental Applications*. Academic Press.
25. Dorr, F.A., Pinto, E., Moraer, R., Azevedo, S. (2010). Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*, 56: 1247-1256.
26. FAO (2012). *Censo sobre la comunidad de pescadores artesanales de San Gregorio de Polanco*. Montevideo: FAO, Ministerio de Desarrollo Social. (Informe inédito)
27. FAO (2014). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>. Fecha de consulta: 20/05/2015.
28. Ferrão Filho, A. S. (2009). Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 13: 272-312.
29. Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U. M, Esteves, S. M, Gonçalves, F. J.M & Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing “blooms”- a serious global public health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 151-163.
30. Glisenti, C. (2013). *Metodología para la determinación de las condiciones para el desarrollo de las actividades pesqueras regionales. Aplicación caso: San Gregorio de Polanco-Tacuarembó*. (Informe inédito).
31. Gonzalez-Piana, M., Fabián, D., Delbene, L. & Chalar, G. (2011). Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Rio Negro reservoirs, Uruguay. *Harmful Algae News*, 43: 16-17.
32. Gomes A. A., Sampaio, P., Ferrao-Filho, A., Magalhães, V., Marinho, M., Pimentel, A., Barbosa, V, Domingos, P. & Azevedo, S. (2009) Florações de cianobacterias toxicas em uma lagoa costeira hipereutrofica do rio de Janeiro/ RJ (Brasil) e suas conseqüências para saúde humana. *Oecologia Brasiliensis*, 13: 329-345.

33. Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S.; Moreno, I. & Camean, A.M. (2013). Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 139–152.
34. Guzmán-Guillén, R., Prieto, A., Moreno, I., Soria, M. & Cameán, A.M. (2011). Effects of thermal treatments during cooking, microwave oven and boiling, on the unconjugated microcystin concentration in muscle of fish (*Oreochromis niloticus*). *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2060–2067.
35. Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S. K., Kaul, R. B. & Bressie, J.D. (2014). Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*. 54: 188 – 198.
36. Huisman, J., Matthijs, H. & Visser, P. (Eds) 2005. *Harmful cyanobacteria. Aquatic ecology series*. Dordrecht: Springer.
37. Ibelings, B.W., Bruning, K., Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L., Postma, J. & Burger, T. (2005). Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology*, 49: 487-500.
38. Ibelings, B. & Chorus, I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health. *Environmental Pollution*, 150: 177-192.
39. International Organization for Standardization (2005). ISO 20179: *Water quality -- Determination of microcystins -- Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection*. Ginebra: ISO
40. Jochimsen, E. M., Charmichael, W.W., An J. S., Cardo D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., De Melo Filho, D. M., Lyra, T. M., Barreto, V.S. & Azevedo, S. M. (1998). Liver Failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 338: 873-878.
41. Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R., Hadas, O., Sukenik, A. & Elke Dittmann. (2012). The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Aquatic Microbiology*, 3: 138
42. Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Putz, S., Metcalf, J., Codd, G. & Pflugmacher, S. (2003). Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 141-148.
43. Lawton, L., Edwards, C. & Codd, G. (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in Raw and Treated Waters. *Analyst*, 119: 1525-1530.

44. Lampert, W. & Sommer, U. (2007). *Limnoecology, the ecology of lakes and streams*. Oxford: Oxford University Press.
45. Liang Peng, I., Liu, Y., Chen, W., Liu, L., Kent, M. & Song, L. (2010). Health risks associated with consumption of microcystin-contaminated fish and shellfish in three Chinese lakes: Significance for freshwater aquacultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:1804–1811.
46. Lima, A., Souza, J., Shihomatsu, H. & Sarkis, R. (2005). Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. *Environmental Research*, 97:236–244.
47. Luo, W., Jia, J., Lu, Y. & Giesy, J. (2014). Bioaccumulation of microcystins (MCs) in four fish species from Lake Taihu, China: Assessment of risks to humans. *Science of the Total Environment*, 487: 224–232.
48. Magalhães, V. F., Soares, R.M. & Azevedo, S.M.O.F (2001). Microcystin contamination in fish from Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.
49. Magalhães, V., Marinho, M. M., Domingos, P., Oliveira, A.C, Costa & Azevedo, S.M.F.O. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42: 289-298.
50. McElhiney, J., Lawton, L. (2005). Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 219– 230
51. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59: 303-327.
52. Ministério da Pesca E Aquicultura (s.d.). *A pesca no Brasil*. Brasília: MPA. Disponible en <http://www.mpa.gov.br/pesca>. Fecha de consulta 20/06/15.
53. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (2014). *El crecimiento del consumo interno de pescado: la importancia de la promoción*. Buenos Aires: MAGYP. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/index.php?edit_accion=noticia&id_info=140415144119&PHPSESSID=6491459e397964873fb22225216a7a24. Fecha de consulta 20/06/15.
54. Msagati, T., Siame, B. & Shushu, D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78: 382-397.
55. Neilan, B. Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M. & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15: 1239-53.

56. Ni, W., Zhang, J. & Luo, Y. (2015). Microcystin accumulation in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during a *Microcystis*-dominated bloom and risk assessment of the dietary intake in a fish pond in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
57. Nyakairu, G., Nagawa, C. & Mbabazi, J. (2010). Assessment of cyanobacteria toxins in freshwater fish: A case study of Murchison Bay (Lake Victoria) and Lake Mburo, Uganda. *Toxicon*, 55: 939–946.
58. Paerl, H. & Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.
59. Paerl, H., Hall, N. & Calandrino, E. (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment*, 409: 1739-1745.
60. Park, H. & Xie, L. (2007). Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture*, 271: 530 – 536.
61. Pérez, M. C., Bonilla, S. & Martínez, G. (1999). Phytoplankton Community of a polymictic reservoir, La Plata river basin, Uruguay. *Revista Brasileira de Biología*, 59: 535 – 541.
62. Pérez, M. C., Bonilla, S., De León, L., Smarda, J. & Komarek, J. (1999). A bloom of *Nodularia báltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Algological Studies*, 93: 91-101
63. Pérez, M.C. (2002). Fitoplancton del río Negro, Uruguay. *Limnetica*, 21: 81-92.
64. Pérez, S. & Aga, D. (2005). Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 658 – 670.
65. Prieto, A.I., Atencio, L., Puerto M., Pichardo, S., Jos A., Moreno, I. & Cameán, A. (2008). Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. *Revista de Toxicología*, 25: 22-31.
66. Reynolds, C. (2006) *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
67. Ribeiro, C.A.O., Mela, M., Randi, M.A.F., Ventura, D.F., Carvalho, C.E.V & Pelletier, E. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.
68. Ribeiro, C.A.O., Menezes, M. L., Randi, M. A. F., Roche, H. & Miranda, A.L (2008). Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: histopathological, physiological and immunological findings. *Environment International*, 34: 939 – 949.

69. Roegner, A., Pérez, M., Birgit, P., Brena, B., Gonzalez-Sapienza, G. (2014). Rapid quantitative analysis of microcystins in raw surface waters with MALDI MS utilizing easily synthesized internal standards. *Toxicon*, 78: 94-102.
70. Sangolkar, L., Maske, S. & Chakrabarti, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, 40: 3485-3496.
71. Sienra, D. & Ferrari, G. (2006) Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo (Uruguay). *En: Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds). Vida Silvestre 413 - 419.
72. Smith, J. & Boyer, G. (2009). Standardization of microcystin extraction from fish tissues: A novel internal standard as a surrogate for polar and non-polar variants. *Toxicon*, 53: 238–245
73. Soares, R., Magalhães, V. & Azevedo, S. (2004). Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70: 1- 10.
74. Song, L., Chen, W., Peng, L., Wan, N., Gan, N. & Zhang, X. (2007). Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Water Research*, 41: 2853– 2864.
75. Teixeira de Mello, F, González- Bergonzoni, I. & Loureiro, M. (2011). Peces de agua dulce del Uruguay.
76. Tordecilla-Petro, G., Sánchez-Banda, S. & Olaya-Nieto, C. (2005). Crecimiento y mortalidad del Moncholo (*Hoplias malabaricus*) en la Ciénaga Grande de Loricá, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10: 623-632.
77. UNESCO. 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (Ed).
78. Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 7 - 60.
79. Vasconcelos, V. (2001). Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica*, 20: 45-58.
80. Vasconcelos, J., Barbosa, J., Lira, W. & Azevedo, S. (2013). Microcystin bioaccumulation can cause potential mutagenic effects in farm fish. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39: 185–192.
81. Viana, F., Huertas, R. & Danulat, E. (2005). Heavy metal levels in fish from coastal waters of Uruguay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 530–537.

82. Whitton, B.A. & Potts, M. (2002). *The Ecology of Cyanobacteria*, New York: Kluwer Academic.
83. Wiegand, C. & Dittmann, E. (2006). Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50:7-17
84. Wunderlin, D. A., Amé M. V., Galnti, L. N. , Menone, M. L. , Gerpe, M. S. & Moreno, V. J. (2010). Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae*, 9: 66-73.
85. Xie, L., Xie, P., Ozawa, K., Honma, T., Ypkpyama, A. & Park, H. (2004). Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution*, 127: 431-439.
86. Xie, P., Li, L. & Chen, J. (2005). *In vivo* studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicon*, 46: 533-545.
87. Xie, L. & Park, H. (2007). Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture*, 271: 530 – 536.
88. Xie, P., Zhang, D., Liu, Y. & Qiu, T. (2009). Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the total Environment*, 407: 2191-2199.