

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Toxicidad de la mezcla binaria de los  
plaguicidas metomilo y rotenona en la “lenteja  
de agua”  
*Lemna minor* (Linnaeus, 1758)**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Eduardo Alejandro Hidalgo Nicho

Lima, Perú

AÑO 2015

## *DEDICATORIA*

A mis adorados padres y hermanos por su amor, comprensión y paciencia.

A mi familia pachacasina, quienes me enseñaron lo que había más allá de mi mundo.  
Estarán en mi corazón por siempre.

A mi grupo ciclista por las innumerables conversaciones sobre la importancia de la educación en nuestro país y por ser como son, personas libres que comparten una amistad desinteresada.

A todas aquellas personas que me han regalado la felicidad necesaria para seguir descubriendo mi camino.

## AGRADECIMIENTO

Al momento de escribir estas líneas, las primeras personas que aparecen en mi mente son mis padres. Sin ellos jamás hubiera cumplido mi sueño de titularme a través de lo que siempre me gustó, investigar.

También agradezco a las personas que me ayudaron durante el trabajo en el laboratorio: A David por los consejos acertados y no tan acertados, al profesor Juan Carlos por ser uno de los mejores profesores que tuve en la carrera de biología y al profesor Iván por darme las palabras necesarias en el momento preciso.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>AGRADECIMIENTO</b> .....                              | <b>3</b>  |
| <b>ÍNDICE</b> .....                                      | <b>4</b>  |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....                             | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                            | <b>9</b>  |
| <b>RESUMEN</b> .....                                     | <b>10</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                    | <b>11</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                             | <b>12</b> |
| <b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....                            | <b>14</b> |
| 2.1 USO DE PLAGUICIDAS EN LA AGRICULTURA .....           | 14        |
| 2.2 REGULACION DEL USO DE PLAGUICIDAS EN EL PERU.....    | 15        |
| 2.3 PLAGUICIDAS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO .....          | 16        |
| 2.3.1. <i>Metomilo</i> .....                             | 17        |
| 2.3.2. <i>Rotenona</i> .....                             | 19        |
| 2.3.3. <i>Mezclas de plaguicidas</i> .....               | 21        |
| 2.4 ENSAYOS ECOTOXICOLOGICOS .....                       | 22        |
| 2.5 ORGANISMOS BIO-INDICADORES .....                     | 23        |
| 2.5.1. <i>Descripción de Lemna minor</i> .....           | 23        |
| <b>3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> ..... | <b>27</b> |
| 3.1 PROBLEMATICA .....                                   | 27        |
| 3.2 JUSTIFICACION.....                                   | 27        |
| <b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....                    | <b>29</b> |
| 4.1 HIPOTESIS .....                                      | 29        |
| 4.2 OBJETIVOS.....                                       | 29        |
| 4.2.1. <i>Objetivo general</i> .....                     | 29        |
| 4.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....                 | 29        |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                     | <b>30</b> |
| 5.1 LUGAR DE EJECUCION.....                              | 30        |
| 5.2 PLAGUICIDAS EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO .....          | 30        |
| 5.3 ORGANISMO BIOINDICADOR.....                          | 30        |
| 5.4 METODOLOGIA.....                                     | 30        |
| 5.4.1. <i>Condiciones físicas del ensayo</i> .....       | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.4.2. Acondicionamiento .....  | 31        |
| 5.4.3. Ensayos .....  | 33        |
| 5.4.4. Análisis de los datos:.....  | 35        |
| 5.4.5. Determinación de BMDL y BMD:.....  | 38        |
| 5.4.6. Determinación de la Concentración Efectiva Media (CE <sub>50</sub> ): .....  | 39        |
| 5.4.7. Determinación del efecto sinérgico o antagónico.....   | 39        |
| 5.4.8. Validación de los ensayos: .....   | 40        |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 6.1 DETERMINACION TAXONOMICA DE <i>LEMNA MINOR</i> L. ....  | 41        |
| 6.2 VALIDACION DE LOS ENSAYOS .....   | 42        |
| 6.3 TOXICIDAD AGUDA INDIVIDUAL DEL METOMILO .....   | 44        |
| 6.3.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento.....  | 46        |
| 6.3.2. Determinación de los valores del Método Punto de Referencia .....  | 47        |
| 6.3.3. Determinación de la CE <sub>50</sub> mediante el análisis Probit .....   | 49        |
| 6.4 TOXICIDAD AGUDA INDIVIDUAL DE LA ROTENONA.....  | 50        |
| 6.4.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento.....  | 52        |
| 6.4.2. Determinación de los valores del Método Punto de Referencia .....  | 53        |
| 6.4.3. Determinación de la CE <sub>50</sub> mediante el análisis Probit .....   | 55        |
| 6.5 TOXICIDAD BINARIA DE LA ROTENONA Y EL METOMILO.....   | 55        |
| 6.5.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento.....  | 58        |
| 6.5.3. Determinación de la CE <sub>50</sub> mediante el análisis Probit .....   | 61        |
| 6.5.4. Determinación del efecto sinérgico.....  | 62        |
| <b>7. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>68</b> |
| 7.1 CONDICIONES DEL ENSAYO .....  | 68        |
| 7.2 INHIBICION DEL CRECIMIENTO.....   | 70        |
| 7.3 EMPLEO DE LOS VALORES DEL METODO PUNTO DE REFERENCIA.....   | 72        |
| 7.4 EFECTO SINERGICO .....  | 74        |
| <b>8. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>10. ANEXOS.....</b>  | <b>89</b> |
| TABLA 1A. VALORES CRUDOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE METOMILO CON AGUA EMBOTELLADA. PARAMETROS AF Y NF DE LOS TRES DIAS DE LECTURA..... | 89        |
| TABLA 2A. DATOS CRUDOS DE LOS PARAMETROS CTC Y PH (INCLUIDO EL PESO SECO) EN EL ENSAYO DE METOMILO CON AGUA EMBOTELLADA. ....         | 90        |
| TABLA 3A. VALORES CRUDOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ROTENONA CON AGUA DESTILADA. PARAMETROS AF Y NF DE LOS TRES DIAS DE LECTURA.....   | 91        |

|  |    |
|--|----|
| TABLA 4A. DATOS CRUDOS DE LOS PARAMETROS CTC Y PH (INCLUIDO EL PESO SECO) EN EL ENSAYO DE ROTENONA CON AGUA DESTILADA. ....                  | 92 |
| TABLA 5A. VALORES CRUDOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE MEZCLA BINARIA CON AGUA EMBOTELLADA. PARAMETROS AF Y NF DE LOS TRES DIAS DE LECTURA. .... | 93 |
| TABLA 6A. DATOS CRUDOS DE LOS PARAMETROS CTC Y PH (INCLUIDO EL PESO SECO) EN EL ENSAYO DE TOXICIDAD BINARIA CON AGUA EMBOTELLADA.....        | 94 |
| TABLA 7A. VALORES CRUDOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE METOMILO CON AGUA DESTILADA. PARAMETROS AF Y NF DE LOS TRES DIAS DE LECTURA.....          | 95 |
| TABLA 8A. DATOS CRUDOS DE LOS PARAMETROS CTC Y PH (INCLUIDO EL PESO SECO) EN EL ENSAYO DE METOMILO CON AGUA DESTILADA. ....                  | 96 |
| TABLA 9A. VALORES CRUDOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ROTENONA CON AGUA EMBOTELLADA. PARAMETROS AF Y NF DE LOS TRES DIAS DE LECTURA.....        | 98 |
| TABLA 10A. DATOS CRUDOS DE LOS PARAMETROS CTC Y PH (INCLUIDO EL PESO SECO) EN EL ENSAYO DE ROTENONA CON AGUA EMBOTELLADA. ....               | 99 |

# LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA 1. LISTA DE LOS PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA CON REGISTRO VIGENTE.....  | 16 |
| TABLA 2. CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL METOMILO FRENTE A ORGANISMOS ACUATICOS Y TERRESTRES. ....   | 18 |
| TABLA 3. CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DE LA ROTENONA EN ORGANISMOS ACUATICOS.....   | 20 |
| TABLA 4. CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DE <i>LEMNA MINOR</i> FRENTE A PLAGUICIDAS. ....  | 25 |
| TABLA 5. CONCENTRACION EN 1L DE SOLUCION DE LOS MINERALES EN LA SOLUCION HIDROPONICA LA MOLINA®. ....  | 31 |
| TABLA 6. CONCENTRACION EN 1L DE SOLUCION DE LOS MINERALES EN EL FERTILIZANTE BYFOLAN FORTE®. ....  | 32 |
| TABLA 7. ANALISIS DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DEL AGUA DE MESA EMBOTELLADA CON UNA Sonda<br>MULTIPARAMETROS (HANNA HI9828). ....  | 32 |
| TABLA 8. CONCENTRACIONES EMPLEADAS PARA EL ENSAYO DE LA MEZCLA BINARIA EQUITOXICA (EN MG·L <sup>-1</sup> ). ....   | 35 |
| TABLA 9. NIVEL DE SIGNIFICANCIA EN LA PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE LAS VARIANZAS. ....  | 42 |
| TABLA 10. NUMERO DE FRONDAS Y AREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) EN LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> SOMETIDA A DOS ENSAYOS DE<br>TOXICIDAD INDIVIDUAL SEGUN EL TIPO DE AGUA EMPLEADA (DIA 7: LECTURA 168 H). .... | 42 |
| TABLA 11. PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO (%IR) SEGUN EL PARAMETRO CTC EN CUATRO ENSAYOS. ....  | 43 |
| TABLA 12. PRODUCCION DE NUEVAS FRONDAS Y AREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL<br>PLAGUICIDA METOMILO AL CUARTO Y SEPTIMO DIA DE LECTURA. ....                        | 44 |
| TABLA 13. NECROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA<br>METOMILO AL CUARTO Y SEPTIMO DIA DE LECTURA. ....                            | 44 |
| TABLA 14. CLOROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA<br>METOMILO SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....                                       | 45 |
| TABLA 15. DETERMINACION DE LA TASA DE CRECIMIENTO E INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LOS PARAMETROS EVALUADOS EN<br>LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA METOMILO. ....                       | 46 |
| TABLA 16. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO NF COMO RESPUESTA<br>PARA LOS MODELOS DICOTOMICOS (METOMILO; LECTURA 168 H). ....                         | 47 |
| TABLA 17. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO NF COMO RESPUESTA<br>EN LOS MODELOS DICOTOMICOS (METOMILO; LECTURA 168 H). ....                           | 48 |
| TABLA 18. CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA – EC <sub>50</sub> DE DOS PARAMETROS UTILIZANDO LA NECROSIS COMO RESPUESTA<br>FITOTOXICA.....   | 49 |
| TABLA 19. PRODUCCION DE NUEVAS FRONDAS Y AREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL<br>PLAGUICIDA ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....                                   | 50 |
| TABLA 20. CLOROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA<br>ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....                                       | 50 |
| TABLA 21. NECROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA<br>ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....                                       | 51 |
| TABLA 22. DETERMINACION DE LA TASA DE CRECIMIENTO E INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LOS PARAMETROS EVALUADOS EN<br>LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA ROTENONA. ....                       | 52 |

|   |    |
|---|----|
| TABLA 23. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO NF COMO RESPUESTA EN LOS MODELOS DICOTOMICOS (ROTENONA; LECTURA 168 H).....                                | 53 |
| TABLA 24. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO AF COMO RESPUESTA EN LOS MODELOS DICOTOMICOS (ROTENONA; LECTURA 168 H).....                                | 54 |
| TABLA 25. CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA – EC <sub>50</sub> DE DOS PARAMETROS UTILIZANDO LA NECROSIS COMO RESPUESTA FITOTOXICA.....   | 55 |
| TABLA 26. PRODUCCION DE NUEVAS FRONDAS Y AREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA A LA MEZCLA DE LOS PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....           | 56 |
| TABLA 27. CLOROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA A LA MEZCLA DE LOS PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....               | 56 |
| TABLA 28. NECROSIS TOTAL EN LA FRONDA Y EL AREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) DE LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA A LA MEZCLA DE LOS PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA SEGUN EL DIA DE LECTURA. ....         | 57 |
| TABLA 29. DETERMINACION DE LA TASA DE CRECIMIENTO E INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LOS PARAMETROS EVALUADOS EN LA MACROFITA <i>LEMNA MINOR</i> EXPUESTA AL MEZCLA DE PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA. ....     | 59 |
| TABLA 30. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO NF Y LAS FRONDAS NECROTICAS COMO RESPUESTA EN LOS MODELOS DICOTOMICOS (MEZCLA BINARIA; LECTURA 168 H)..... | 60 |
| TABLA 31. DETERMINACION DE LOS VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PARAMETRO AF COMO RESPUESTA EN LOS MODELOS DICOTOMICOS (MEZCLA BINARIA; LECTURA 168 H).....                          | 60 |
| TABLA 32. CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA – EC <sub>50</sub> DE DOS PARAMETROS UTILIZANDO LA NECROSIS COMO RESPUESTA FITOTOXICA.....   | 62 |
| TABLA 33. CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA ESTIMADA Y EXPERIMENTAL DEL PARAMETRO NF PARA EL CALCULO DEL VALOR CONCENTRACION-ADICION. ....   | 62 |
| TABLA 34. CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA ESTIMADA Y EXPERIMENTAL DEL PARAMETRO AF PARA EL CALCULO DEL VALOR CONCENTRACION-ADICION. ....   | 63 |
| TABLA 35. VALORES BMD Y BMDL (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO COMO DATO AL PROMEDIO DE LAS RESPUESTAS POR CADA CONCENTRACION EN EL PARAMETRO AF (METOMILO; LECTURA 168 H). ....                            | 64 |
| TABLA 36. VALORES BMD Y BMDL (EN M·L <sup>-1</sup> ) EN EL PARAMETRO AF SEGUN EL METODO EMPLEADO. ....  | 64 |
| TABLA 37. VALORES DE LA EC <sub>10</sub> Y DEL BMD (EN MG·L <sup>-1</sup> ) EN EL PARAMETRO AF DE LOS ENSAYOS ANALIZADOS. ....  | 65 |
| TABLA 38. ESTIMACION DE LA CE <sub>50</sub> (EN MG·L <sup>-1</sup> ) UTILIZANDO EL PAQUETE ESTADISTICO BMDS®.....   | 66 |
| TABLA 39. VALORES COMPARADOS DE LA EC <sub>50</sub> (EN MG·L <sup>-1</sup> ) CON LOS PROGRAMAS ESTADISTICOS PROBIT Y BMDS® UTILIZANDO EL PARAMETRO AF.....  | 66 |
| TABLA 40. COMPARACION DE LOS VALORES DE LA CONCENTRACION ADICION (CA) ENTRE (EN MG·L <sup>-1</sup> ) CON LOS PROGRAMAS ESTADISTICOS PROBIT Y BMDS®. PARAMETRO AF.....   | 67 |
| TABLA 41. COMPARACION DE LOS VALORES DE LA CONCENTRACION ADICION (CA) ENTRE (EN MG·L <sup>-1</sup> ) CON LOS PROGRAMAS ESTADISTICOS PROBIT Y BMDS®. PARAMETRO NF. ....  | 67 |

# LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. ESTRUCTURA QUIMICA DEL METOMILO.....   | 17 |
| FIGURA 2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA ROTENONA. ....  | 19 |
| FIGURA 3. VISTA DORSAL Y VENTRAL DE LA FRONDA EN <i>LEMNA MINOR</i> . ....   | 24 |
| FIGURA 4. DETECCION DE AREA TOTAL Y NECROSIS EN <i>LEMNA MINOR</i> . ....  | 37 |
| FIGURA 5. <i>LEMNA MINOR</i> L.....  | 41 |
| FIGURA 6. NUMERO DE FRONDAS DURANTE LAS DOS LECTURAS REALIZADAS (METOMILO). ....   | 45 |
| FIGURA 7. CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DEL MODELO CONTINUO QUANTAL-LINEAR UTILIZANDO EL PARAMETRO AF COMO VALOR DE RESPUESTA PARA LA DETERMINACION DEL BMD Y BMDL.....                         | 48 |
| FIGURA 8. NUMERO DE FRONDAS DE <i>L. MINOR</i> EXPUESTA AL PLAGUICIDA ROTENONA DURANTE LAS DOS LECTURAS REALIZADAS. ....   | 51 |
| FIGURA 9. CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DEL MODELO CONTINUO LOG-LOGISTIC UTILIZANDO EL PARAMETRO AF Y EL AREA CON NECROSIS COMO VALORES DE RESPUESTA PARA LA DETERMINACION DEL BMD Y BMDL. .... | 54 |
| FIGURA 10. EFECTOS FITOTOXICOS EN EL CONTROL. ....   | 57 |
| FIGURA 11. EFECTOS FITOTOXICOS DE LA MEZCLA BINARIA EN <i>LEMNA MINOR</i> A LAS 96 Y 168 H. ....   | 58 |
| FIGURA 12. CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL MODELO CONTINUO MULTISTAGE UTILIZANDO EL PARAMETRO AF COMO VALOR DE RESPUESTA PARA LA DETERMINACION DEL BMD Y BMDL. ....                              | 61 |

## RESUMEN

Se evaluó la toxicidad individual y binaria de los plaguicidas metomilo y rotenona en la macrofita *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) para determinar la acción sinérgica o antagónica de una mezcla equitóxica. Los ensayos se realizaron bajo condiciones de laboratorio (T  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ ; H  $48,6 \pm 9,4 \%$ ) y los resultados fueron analizados con los programas estadísticos BMDS<sup>®</sup> y Probit para calcular la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) a través de los parámetros Área de la Fronda (AF) y Nuevas Frondas (NF). Los resultados sugieren una mayor precisión al utilizar el Método del Punto de Referencia del programa BMDS<sup>®</sup> para el cálculo de la concentración efectiva. Adicionalmente, se calculó la concentración total de clorofila (CTC) y peso húmedo (PH) para determinar la inhibición del crecimiento (*Ir*). Del mismo modo, se realizó una comparación entre los valores NOAEL (nivel de efecto no observado) y LOAEL (nivel bajo de efecto observado) versus los valores de BMDL (límite inferior del punto de referencia) y BMD (nivel de variación en el punto de referencia), respectivamente. El análisis muestra que existe una mayor precisión al emplear los valores BMD y BMDL. La acción fitotóxica varió según el parámetro analizado. La CE<sub>50</sub> mostró mayores valores en el parámetro NF (1079,22 mg·L<sup>-1</sup> para rotenona; 7147,42 mg·L<sup>-1</sup> para metomilo; 597,904 mg·L<sup>-1</sup> mezcla binaria: metomilo y 298,93 mg·L<sup>-1</sup> mezcla binaria: rotenona) que en el parámetro AF (782,173 mg·L<sup>-1</sup> para rotenona; 6919,79 mg·L<sup>-1</sup> para metomilo; 629,513 mg·L<sup>-1</sup> mezcla binaria: metomilo y 314,754 mg·L<sup>-1</sup> mezcla binaria: rotenona). Finalmente, el modelo de concentración-adición mostró que la acción fitotóxica de la mezcla de ambos plaguicidas en *Lemna minor* tiene un efecto sinérgico.

Palabras clave: BMD, BMDL, CE<sub>50</sub>, *Lemna minor*, metomilo, rotenona, toxicidad binaria, toxicidad individual.

## ABSTRACT

Macrophyte *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) was used to evaluate the phytotoxicity of the individual and mix action of methomyl and rotenone pesticides under laboratory conditions (Temperature  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; Humidity 48,6 9,4 %). The taken measures to establish half effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) were the frond area (AF) and production of new fronds (NF). In this study, BMD5<sup>®</sup> and Probit statistical data analyses were used to compare the results about effective concentration. Results suggest Benchmark dose method of BMD5<sup>®</sup> program was more effective than Probit program when  $\text{EC}_{50}$  were determined. Additionally, total chlorophyll concentration (CTC) and humidity weight (PH) parameters were calculated to determinate the growth inhibition (*Ir*). Likewise, NOAEL (no observed adverse effect level) and LOAEL (low observer adverse effect level) were compared with BMDL (lower bench mark dose) and BMD (Bench mark dose), respectively. BMD and BMDL values were more accurate than NOAEL and LOAEL values. Phytotoxic action varied according the parameter.  $\text{EC}_{50}$  values of *Lemna minor* showed poor sensibility to methomyl pesticide with an elevated concentration in both parameters ( $6919,79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $7147,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for AF and NF, respectively). Results of rotenone pesticide were lower than methomyl, with  $1079,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (NF) and  $782,173 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (AF). Finally, the mix toxicity was  $597,904 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (methomyl: NF),  $298,93 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (rotenone: NF),  $629,513 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (methomyl: AF) and  $314,754 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (rotenone: AF). For synergy calculation, Concentration-Adition value was used, concluding a higher synergism.

Keywords: Binary toxicity, BMD, BMDL,  $\text{EC}_{50}$ , individual toxicity, *Lemna minor*, methomyl, rotenone.

# 1. INTRODUCCIÓN

El uso de los plaguicidas mantienen un rol protagónico dentro de la agricultura nacional a pesar de los avances tecnológicos para mejorar la tecnología agrícola, puesto que la mayoría de la población dedicada a este rubro forma parte de la denominada agricultura familiar (Julca, 2014; Velazco & Velazco, 2012), los cuales mantienen la visión sobre los beneficios de utilizar plaguicidas en sus cultivos (SafeWork, 2011).

Debido a ello, se ha ido regulando la comercialización de diversos plaguicidas para evitar que su empleo cause daños a la salud y el ambiente, estableciendo las concentraciones que generan efectos mínimos y letales en diversos organismos a través de ensayos ecotoxicológicos (SENASA, 2014). No obstante, poco se ha estudiado sobre el uso de la acción combinada de los plaguicidas.

Dentro de los plaguicidas con mayor uso en el país se encuentran el metomilo y la rotenona, ambos utilizados para un amplio rango de plagas agrícolas. La rotenona, al ser de origen vegetal, tiene la ventaja de ser biodegradable y no producir desequilibrio en el ecosistema por lo que provoca un impacto mínimo sobre la fauna benéfica (Iannacone & Lamas, 2003). En cambio, el metomilo puede tener una vida media persistente si se presentan las condiciones ideales en el suelo, pudiendo llegar hasta los cincuenta días (Van Scoy *et al.*, 2013). Si bien se conoce el efecto que produce cada plaguicida de manera individual en diversos organismos, aún no existen estudios que registren el efecto de la acción combinada de ambos plaguicidas en plagas y organismos no destinatarios.

Para determinar el efecto de la combinación de ambos plaguicidas, se empleó la lenteja de agua *Lemna minor* (Linnaeus, 1758), una monocotiledónea acuática que a menudo flota en las superficies de cuerpos de agua, es de rápido crecimiento y se utiliza habitualmente para establecer la calidad de los cuerpos de agua a través del monitoreo de metales pesados o de otros contaminantes acuáticos (Khellaf & Zerdaoui, 2010).

La cuantificación de los efectos fitotóxicos generados por la interacción de un determinado plaguicida con *L. minor* permite establecer el porcentaje de inhibición del crecimiento, la concentración efectiva al 10% (CE<sub>10</sub>), la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>), el nivel con un menor efecto observado (LOAEL) y la ausencia del efecto observado (NOAEL). No obstante, en el presente estudio se ha incluido al método del punto de referencia (Benchmark dose – BMD) para el cálculo de la concentración efectiva media y los equivalentes del NOAEL y LOAEL (BMD y BMDL, respectivamente). La ventaja de este método radica en que su valor no depende de las dosis trabajadas, siendo más específicos para el cálculo de aquellas concentraciones que mostrarán un bajo nivel de efecto tóxico.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad fitotóxica de la mezcla binaria de los plaguicidas metomilo y rotenona en el organismo indicador “lenteja de agua” con la finalidad de determinar si la interacción de dichas mezclas en organismos no destinatarios causa un efecto sinérgico o antagónico. Adicionalmente, se utilizó el método BMD para conocer su eficacia en el cálculo de la CE<sub>50</sub>.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Uso de plaguicidas en la agricultura

Los plaguicidas son sustancias químicas, orgánicas o inorgánicas, o sustancias naturales que se utilizan para combatir plagas, enfermedades y plantas arvenses. Debido a que estas sustancias químicas pueden matar, repeler o regular el crecimiento de organismos, tiene un amplio uso dentro de la agricultura familiar (MINAGRI, 2011).

Este tipo de agricultura utiliza la fuerza de trabajo familiar en el desarrollo de las actividades agrícolas (Julca, 2014), siendo una práctica muy común que representa al 77% del empleo agrícola en Latinoamérica (Leporati *et al.*, 2014). Por ello, debe prestarse especial atención al uso de los plaguicidas, ya que causan muchos efectos adversos sobre la salud, el comercio y el medio ambiente.

Estos efectos adversos son los responsables de un millón de intoxicaciones agudas accidentales, de las cuales un 70% son ocupacionales (Yengle *et al.*, 2008). Dicha exposición puede darse a través del contacto directo o por alimentos contaminados (Aijón & Cumplido, 2007).

No obstante, estas intoxicaciones usualmente se dan por una manipulación incorrecta o descuidada, debido a que el agricultor rural no cuenta con las actitudes adecuadas. Por ejemplo, Montoro *et al.* (2009), en un estudio de la sierra central del Perú, señalan que el material empleado durante la aplicación de los plaguicidas consiste principalmente en el uso de botas (63%), uso de mandil plástico (62%), uso de polo o camisa manga larga (47%), uso de mascarilla o pañuelo (15%) y el uso de guantes (15%).

Asimismo, Yanggen *et al.* (2003) realizaron un estudio en una localidad ecuatoriana y encontraron que, debido a los costos asociados en la aplicación de los plaguicidas, los agricultores aplican varios productos en una sola fumigación, independientemente de si contienen o no los mismos ingredientes activos.

## **2.2 Regulación del uso de plaguicidas en el Perú**

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA, a través de la Comisión Nacional de Plaguicidas, es la encargada de revisar, analizar y proponer alternativas al registro, uso y manejo de los plaguicidas agrícolas en el país (MINAGRI, 1993). Así, se establecen mecanismos de control, registro y fiscalización de los insumos de uso agrícola (SENASA, 2014).

Por ejemplo, en el 2007 se elaboró una lista de los plaguicidas aptos para su comercialización en el país. Para los plaguicidas considerados en este estudio, existen 21 marcas comerciales autorizadas para metomilo y 6 para rotenona (Tabla 1).

Por otro lado, la aprobación del Reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola regula todas las actividades comprendidas en el ciclo de vida de estos plaguicidas, desde su fabricación hasta su disposición final. Ello con el objetivo de asegurar la protección a la salud, el ambiente y la eficacia biológica (MINAGRI, 2015).

El MINAGRI (2015) establece que dicha regulación debe considerar la realización de ensayos y estudios ecotoxicológicos, tomando como referencia las Directrices de la FAO sobre “Criterios Ecológicos para el Registro de Plaguicidas”. Dichos estudios deben incluirse en los informes técnicos: agronómico, toxicológico y ambiental.

Tabla 1. Lista de los plaguicidas Metomilo y Rotenona con registro vigente.

| N° de Registro     | Nombre comercial                 | Nombre común | País de origen                   | Titular del registro                                    |
|--------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|---|
| 201-96-AG-SENASA   | Lannate 90                       | Metomil      | EE.UU.                           | Dupont Perú S.A.C.                                      |
| 240-96-AG-SENASA   | Methomex 90 PS                   | Metomil      | Israel                           | Profiandina Perú S.A.                                   |
| 241-96-AG-SENASA   | Methomex 20 LS                   | Metomil      | Israel/Colombia                  | Profiandina Perú S.A.                                   |
| 265-96-AG-SENASA   | Lanmarck                         | Metomil      | China                            | Basf Peruana S.A.<br>Tecnología Química y Comercio S.A. |
| 322-96-AG-SENASA   | Nala-T 24                        | Metomil      | Perú/China                       | Agro Klinge S.A.  |
| 325-96-AG-SENASA   | Shocker-T 90 PS                  | Metomil      | China/ Sudafrica                 | Serfi S.A.  |
| 354-97-AG-SENASA   | Rambo D                          | Metomil      | Perú/ Sudafrica                  | Silvestre Perú S.A.C.                                   |
| 393-97-AG-SENASA   | Westmyl 90                       | Metomil      | Jordania/China                   | Silvestre Perú S.A.C.                                   |
| 399-97-AG-SENASA   | Dethomil 90 PS                   | Metomil      | Sudafrica/Singapur/China         | Neo Agrum S.A.C.  |
| 440-97-AG-SENASA   | Metiocarb 90                     | Metomil      | Gran Bretaña                     | Pineralandina S.A.                                      |
| 469-97-AG-SENASA   | Lannafarm 90 PS                  | Metomil      | Sudafrica/Singapur/China         | Tecnología Química y Comercio S.A.                      |
| 528-97-AG-SENASA   | Nala-T                           | Metomil      | Sudafrica                        | Drokasa Perú S.A.                                       |
| 590-98-AG-SENASA   | Supermill 200 LS                 | Metomil      | Sudafrica/ Perú/ Singapur/ China | Drokasa Perú S.A.                                       |
| 591-98-AG-SENASA   | Supermill 90 PS                  | Metomil      | China/Colombia/Israel/ Sudafrica |   |
| 652-98-AG-SENASA   | Methavin 90 SP                   | Metomil      | EE.UU.                           | Dupont Perú S.A.C.                                      |
| 745-98-AG-SENASA   | Lannate LV                       | Metomil      | Perú                             | Serfi S.A.  |
| 758-98-AG-SENASA   | Spock                            | Metomil      | México/ Indonesia                | Dupont Perú S.A.C.                                      |
| 767-98-AG-SENASA   | Lannate 40 SP                    | Metomil      | Sudafrica/China                  | Aris Industrial S.A.                                    |
| 885-99-AG-SENASA   | Kuromil 90 PS                    | Metomil      | Perú                             | Famagro S.A.  |
| 410-97-AG-SENASA   | Rote-Biol                        | Rotenona     | Perú                             | Serfi S.A.  |
| 781-98-AG-SENASA   | Extracto-L                       | Rotenona     | Perú                             | Serfi S.A.  |
| 783-98-AG-SENASA   | Extracto                         | Rotenona     | Perú                             | ECOPRO S.A.   |
| 588-98-AG-SENASA   | Rothenox 10 CE<br>Rothenox-SP 10 | Rotenona     | Perú                             | ECOPRO S.A.   |
| 761-98-AG-SENASA   | CE                               | Rotenona     | Perú                             | ECOPRO S.A.   |
| 965-2000-AG-SENASA | Rothenox 8PM                     | Rotenona     | Perú                             | ECOPRO S.A.   |

Fuente: MINAGRI (2008)

### 2.3 Plaguicidas empleados en este estudio

El metomilo [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S], es uno de los plaguicidas de mayor uso en el Perú y se emplea como insecticida-acaricida para el control de un amplio rango de plagas agrícolas, siendo usado también como molusquicida, garrapaticida y contra arañas; así como en cebos para el control de la mosca doméstica (Iannacone *et al.*, 2011). Asimismo, Robertson & Smith-Vaniz (2008) refieren que la rotenona [C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>] es un químico natural producido por plantas leguminosas cuya actividad tóxica, radica en el bloqueo de la ingesta celular de oxígeno, siendo el ingrediente activo en los insecticidas orgánicos comúnmente más utilizados en la agricultura.

### 2.3.1. Metomilo

El metomilo (S-methyl N-[methylcarbamoyloxy]thioacetimidate; fig. 1) es un carbamato de amplio espectro, inhibidor de la acetilcolinesterasa y utilizado para el tratamiento foliar de los diversos organismos vegetales (algodón, tabaco, frutas y verduras). Su efectividad radica en el daño del sistema nervioso de la plaga durante el contacto directo o por el consumo de las plantas ya tratadas (Aktar *et al.*, 2010; Iannacone *et al.*, 2008; Ziping *et al.*, 2014).

Aunque el metomilo es utilizado para el uso de muchos vegetales, campos de cultivo, frutas y plantas ornamentales, puede descomponerse luego de los tres días de aplicación dependiendo de las condiciones del campo (Tocker & Wilmington, 1980). No obstante, Van Scoy *et al.* (2013) mencionan que si se presentan las condiciones idóneas en el suelo, la vida media del metomilo puede llegar hasta los cincuenta días.

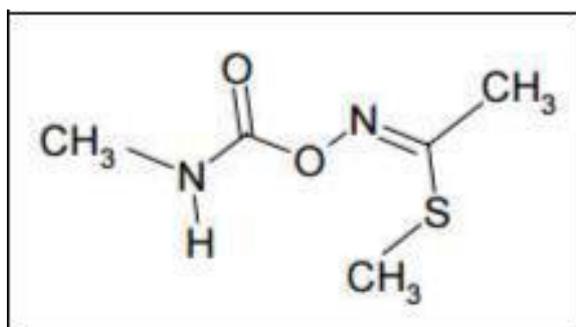


Figura 1. Estructura química del metomilo.

Fuente: FAO (2002).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), The Environment Protection Agency (EPA) y European Chemical Classification (ECC) han calificado al metomilo como un plaguicida muy tóxico y peligroso. Tiene una alta solubilidad en el agua por lo que puede contaminar fácilmente fuentes de agua cercanas al lugar donde es aplicado (Mohamed, 2009). Asimismo, se ha determinado la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de diversos organismos (Tabla 2), los cuales ayudan a determinar la cantidad de plaguicida que debe ser aplicado en el ambiente.

Tabla 2. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del metomilo frente a organismos acuáticos y terrestres.

| Orden                       | Organismos                                      | Tiempo de exposición | CL <sub>50</sub> (mg IA·L <sup>-1</sup> ) | Ref. |
|-----------------------------|---|----------------------|---|------|
| <b>Organismos acuáticos</b> |   |                      |   |      |
| Anostraca                   | <i>Thamnocephalus platyurus</i> (Packard, 1877) | 96                   | 0,12                                      | 1    |
| Diplostraca                 | <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)             | 48                   | 0,0088                                    | 2    |
|                             | <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)             | 48                   | 0,022                                     | 3    |
| Decapoda                    | <i>Penaeus duorarum</i> (Burkenroad, 1939)      | 96                   | 0,019                                     | 3    |
|                             | <i>Penaeus duorarum</i> (Burkenroad, 1939)      | 96                   | 0,23                                      | 2    |
|                             | <i>Uca pugilator</i> (Bosc, 1802)               | 96                   | 0,00238                                   | 3    |
| Cypriniformes               | <i>Pimephales promelas</i> (Rafinesque, 1820)   | 96                   | 0,00243                                   | 3    |
| Salmoniformes               | <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)      | 96                   | 3,73                                      | 1    |
| Labriformes                 | <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)   | 96                   | 1,89                                      | 1    |
| Siluriformes                | <i>Corydoras arcuatus</i> (Elwin, 1939)         | 48                   | < 0,002                                   | 4    |
|                             | <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque, 1818)   | 96                   | 0,53                                      | 2    |
| Cyprinodontiformes          | <i>Poecilia latipinna</i> (Lesueur, 1821)       | 96                   | 2,08                                      | 5    |
|                             | <i>Cyprinodon variegatus</i> (La Cepède, 1803)  | 96                   | 1,16                                      | 2    |
| Perciformes                 | <i>Lepomis macrochirus</i> (Rafinesque, 1819)   | 96                   | 1,05                                      | 2    |
| <b>Otros organismos</b>     |   |                      |   |      |
| Diptera                     | <i>Culex pipiens</i> (Linnaeus, 1758)           | 24                   | 2,455                                     | 6    |
|                             | <i>Anopheles multicolor</i> (Cambouliu, 1902)   | 24                   | 2,468                                     |      |
| Coleoptera                  | <i>Anthonomus eugenii</i> (Canno, 1894)         | 24                   | 0,00027                                   | 7    |
| Hymenoptera                 | <i>Melipona beecheii</i> (Bennett, 1831)        | 24                   | 0,00041                                   | 7    |
|                             | <i>Trigona nigra</i> (Cresson, 1878)            | 24                   | 0,00015                                   |      |
|                             | <i>Trichogramma pretiosum</i>                   | 144                  | 0,034                                     | 9    |
| Acrasida                    | <i>Rosculus ithacus</i> (Hawes, 1963)           | 10                   | 0,00603                                   | 10   |

Referencias: 1. Bakoulia & Karaima (2008) 2. Van Scoy *et al.*(2013); 3. Department of Pesticide Regulation (1996); 4. Iannacone & Alvariño (2008); 5. Napán *et al.*, (2010); 6. Kady *et al.*(2008); 7. Servin *et al.* (2002); 8. Valdovinos-Núñez *et al.* (2009); 9. Iannacone *et al.* (2014); 10. Hikal *et al.* (2015)

Fuente: Elaboración propia.

### 2.3.2. Rotenona

Christmann & Jayne (1939) mencionan que el principio activo de la rotenona [(1,2, 12a-tetrahydro-8,9-dimethoxy-2(1-menthylethenyl (1) benzopyrono (2,4-b)furo (2,3-h) (1) benzophyran-6 (6H) – one; fig. 2] se extrae principalmente de plantas pertenecientes al género *Derris* (Loureiro, 1790) aunque también puede ser aislada de otros géneros como *Lonchocarpus* (Kunth, 1824), *Milletia* (Wight & Arnott, 1834), *Mindulea* (Bentham, 1852) y *Ormocarpum* (Beauvois, 1810).

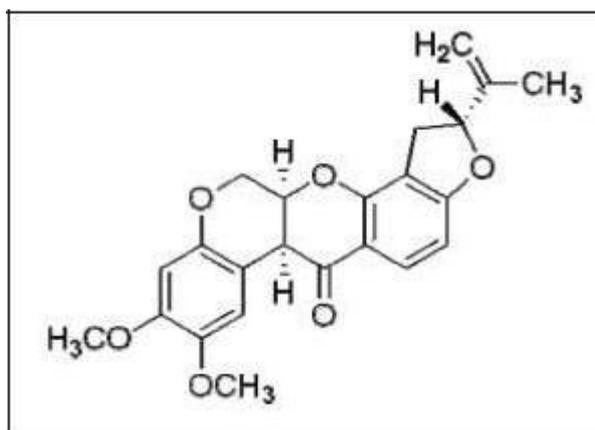


Figura 2. Estructura química de la rotenona.

Fuente: Rattanapan (2007).

La rotenona es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) como un plaguicida moderadamente peligroso de clase II (Rattanapan, 2007). Además, su origen vegetal le confiere la ventaja de ser biodegradable y no producir desequilibrio en el ecosistema por lo que provoca un impacto mínimo sobre la fauna benéfica (Iannacone & Lamas, 2003).

Posee dos sitios de acción en la célula, inhibe el complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria y despolimeriza los micro-túbulos (Ren & Feng, 2007). Permanece en el cuerpo del insecto por dos o tres días, privándolo de oxígeno en la respiración celular hasta su muerte (Rattanapan, 2007).

Chandler & Marking (1982) refieren que los invertebrados acuáticos – muestra poblacional de un río en Wyoming, U.S. – pueden presentar un rango de mortalidad que varía desde 2,5 a 10 mg IA·L<sup>-1</sup> de la rotenona. Por otro lado, Ling (2003) ha registrado la concentración letal media de diversos organismos acuáticos que son sometidos a la rotenona (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de la Rotenona en organismos acuáticos.

| Orden            | Organismos                                      | Tiempo de exposición | CL <sub>50</sub> (mg IA·L <sup>-1</sup> ) |
|------------------|---|----------------------|---|
| Catenulida       | <i>Catenula</i> (Dugès, 1832)                   | 24                   | 5,1                                       |
| Seriata          | <i>Planaria</i> (Müller, 1773)                  | 48                   | < 0,500                                   |
| Arhynchobdellida | Hirudinea (Lamarck, 1818)                       | 72                   | <0,100                                    |
| Cyclopoida       | <i>Cyclops</i> sp. (Müller, 1776)               | 24                   | < 0,100                                   |
| Arguloidea       | <i>Argulus</i> sp (Müller, 1785)                | 24                   | ~ 0.025                                   |
| Diplostraca      | <i>Daphnia pulex</i> (Leydig, 1860)             | 24                   | 0,027                                     |
|                  | <i>Daphnia pulex</i> (Leydig, 1860)             | 24                   | < 0,025                                   |
| Calanoida        | <i>Diaptomus siciloides</i> (Lilljeborg, 1889)  | 24                   | < 0,025                                   |
| Popocopida       | <i>Cypridopsis</i> sp (Brady, 1818)             | 24                   | 0,49                                      |
| Decapoda         | <i>Palaemonetes kadiakensis</i> (Rathbun, 1902) | 24                   | 5,15                                      |
|                  | <i>Cambarus immunis</i> (Hagen, 1870)           | 24                   | > 0,500                                   |
| Odonata          | <i>Macromia</i> (Rambur, 1842)                  | 72                   | 4,7                                       |
| Plecoptera       | <i>Pteronarcys californica</i> (Newport, 1848)  | 24                   | 2,9                                       |
| Hemiptera        | <i>Notonecta</i> sp. (Linnaeus, 1758)           | 24                   | 3,42                                      |
|                  | <i>Notonecta</i> sp. (Linnaeus, 1758)           | 24                   | ~ 0,100                                   |
| Trichoptera      | <i>Hydropsyche</i> sp. (Pictet, 1834)           | 96                   | 0,605                                     |
| Coleoptera       | <i>Gyrinus</i> sp. (Linnaeus, 1767)             | 24                   | 3,55                                      |
| Actinedida       | Hydrachnidae (Leach, 1815)                      | 96                   | ~ 0,050                                   |
| Hygrophila       | <i>Physa pomilia</i> (Conrad, 1834)             | 24                   | 6,35                                      |
| Sorbeoconcha     | <i>Oxytrema</i> sp (Rafinesque, 1819)**         | 96                   | 1,75                                      |
| Hygrophila       | <i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)       | 96                   | > 1,00                                    |
| Veneroida        | <i>Dreissena polymorpha</i> (Pallas, 1771)      | 48                   | 0,219                                     |
|                  | <i>Corbicula manilensis</i> (Philippi, 1844)    | 96                   | 7,5                                       |
| Unionida         | <i>Obliquaria reflexa</i> (Rafinesque, 1820)    | 48                   | > 1,00                                    |
|                  | <i>Elliptio buckleyi</i> (Lea, 1843)            | 96                   | 2,95                                      |
|                  | <i>Elliptio complanata</i> (Lightfoot, 1786)    | 96                   | 2   |

\* El género *Oxytrema* ha cambiado a *Pleurocera* (Rafinesque, 1831)

Fuente: Modificado de Ling (2003).

### 2.3.3. Mezclas de plaguicidas

Se define a la mezcla de plaguicidas como la combinación de dos o más de éstos para ser aplicados en una solución de aerosol. Es una práctica común en la agricultura puesto que se traduce en un ahorro de tiempo, trabajo, energía y costo del equipo; además de potenciar el efecto tóxico, aunque ello dependerá de la formulación empleada. No obstante, también pueden producir un daño a los cultivos, causando fitotoxicidad y problemas de incompatibilidad entre los plaguicidas utilizados (Kumar, 2014).

Los componentes individuales de dicha mezcla interactúan entre sí por medio de la vía toxico-cinética o la toxico-dinámica, produciendo un efecto antagónico, de adición o de sinergismo, los cuales tienen implicaciones importantes (Laetz *et al.*, 2009).

La vía toxico-cinética puede resumirse como el proceso en el que el tóxico es absorbido por el organismo, su distribución en el cuerpo, las acciones que realiza el organismo con el agente xenobiótico y como este agente es removido del cuerpo (Krishnan & Peyret, 2009). En cambio, la vía toxico-dinámica, hace alusión a la relación dosis-respuesta describiendo los efectos causados por el tóxico en el organismo y tomando en cuenta los diferentes niveles de exposición y tiempo (Kumar, 2013).

Asimismo, los patrones de interacción que presentan las mezclas son: a) aditivo si la respuesta del organismo frente a los tóxicos es igual a la suma de las exposiciones individuales, b) sinérgico si el efecto es superior a la suma de las exposiciones individuales y c) antagónico si el efecto es menor a la suma de las exposiciones individuales (Kepner, 2004).

Industrialmente se utilizan mezclas de plaguicidas con efectos sinérgicos para la reducción de costos. En el caso de la rotenona se ha empleado el piperonil cicloneno (Brannon, 1950), el té de saponina (Zhaoujun *et al.*, 2013), el alcaloide natural matrina (Quiming *et al.*, 2013), la metaflumizona (Yaping, 2014), entre otros. Del mismo modo, Knabke (1981) realizó una combinación de efecto sinérgico entre el metomilo y el ácido 2-dihanvinilo-3,3-dimetilciclopropanocarboxilato, este último pertenece a la familia de los pirotenoides relacionados al ácido crisantémico.

A pesar de que en la práctica existen numerosas combinaciones cuyos efectos toxicológicos han sido comprobados de manera científica, existen muchas otras combinaciones creadas a partir del conocimiento empírico del agricultor. Dicha situación ocasiona un impacto en la salud de los agricultores debido a las malas prácticas agrícolas en el manejo de estos plaguicidas durante y después de su uso (Montoro *et al.*, 2009).

## **2.4 Ensayos ecotoxicológicos**

Un ensayo ecotoxicológico permite determinar la calidad del aire, el suelo y los cuerpos de agua a través de bio-indicadores para establecer un monitoreo sin la necesidad de equipos complejos (Girotti *et al.*, 2008). De todos los métodos mencionados, el estudio de la calidad del agua cobra mayor importancia debido a la gran variedad de químicos orgánicos e inorgánicos que pueden diluirse en esta. Ello permite el establecimiento de criterios de calidad para protección de la vida acuática, así como los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Iannacone *et al.*, 2011).

En esta clase de ensayos debe tomarse especial consideración a la dosis empleada y el tiempo de exposición a la que el organismo es sometido. Mientras que la dosis puede ser considerada como una simple variable que actúa en función al número de moléculas, el tiempo se toma como una variable multidimensional puesto que supone la determinación de la toxico-dinámica (absorción y eliminación del tóxico) y la toxico-cinética (estudio entre la exposición y la recuperación), así como la frecuencia y duración de exposición (Drost *et al.*, 2007).

Cabe señalar que la mayoría de estos ensayos son diseñados para pruebas individualizadas en condiciones de laboratorio, las cuales buscan determinar la causa y el efecto de la relación entre el tóxico y el organismo bio-indicador. Sin embargo, no es posible reflejar la toxicidad de un ecosistema con múltiples componentes, donde existen diversas variaciones físicas y químicas (Stenström, 2013).

## 2.5 Organismos bio-indicadores

Se utilizan organismos no destinatarios debido a que los plaguicidas son ampliamente utilizados y regularmente detectados durante los monitoreos ambientales (Alexander & Culp, 2013). Pinilla (1998) menciona que estos organismos (bioindicador) deben ser de fácil colección y medición cuantificable, relacionado con el efecto que se desea indicar. Asimismo, debe existir información biológica y ecológica sobre el indicador a emplear.

### 2.5.1. Descripción de *Lemna minor*

La lenteja de agua - *Lemna minor* (Linnaeus, 1758; fig. 3), de la familia Liliópsida, es una planta monocotiledónea acuática que a menudo flota en la superficie de los cuerpos de agua. Esta macrofita se caracteriza por poseer un rápido crecimiento a través de la gemación, fácil adaptabilidad a varias condiciones y puede tolerar un amplio rango de pH (4,5 – 8,3) (Khellaf & Zerdaoui, 2010). Debido a su rápida propagación, cada fronda es considerada una unidad formadora de colonias, donde la fronda madre permanece conectada por algún tiempo con sus frondas hijas por medio de estípites. El tamaño de cada colonia varía según la abscisión de estípites en una zona específica de abscisión preformada (Topp *et al.*, 2011).

Es usada habitualmente en estudios de la calidad de los cuerpos de agua, ya que es eficaz en el monitoreo de metales pesados o de otros contaminantes acuáticos, porque puede acumular ciertos químicos y servir como un monitor biológico (Radić *et al.*, 2010).

Se caracteriza por tener entre dos a cinco frondas (hojas) por colonia. El lado dorsal de éstas es de color verde oscuro, con el ápice simétrico y sin bolsas de aire prominentes como en otras especies del género, lo que le brinda una textura plana y lisa. Pueden tener entre 1 a 3 líneas dorsales y una línea media en cada fronda. Cada colonia presenta una sola raíz (Daubs, 1965; Suman & Venu, 2012).

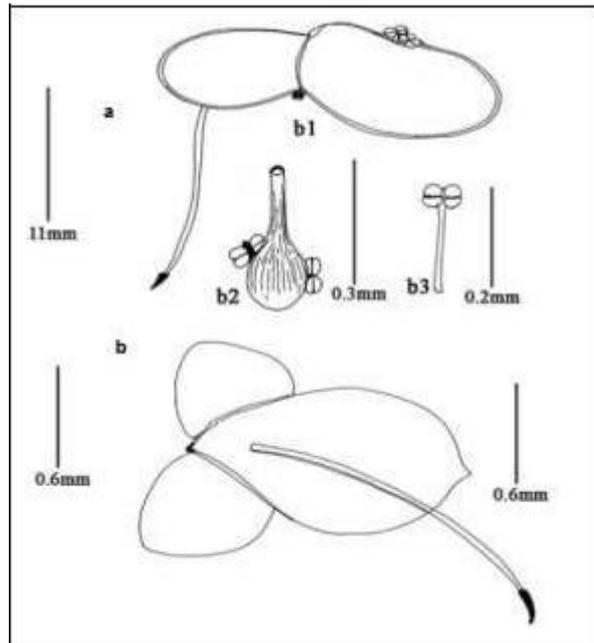


Figura 3. Vista dorsal y ventral de la fronda en *Lemna minor*.

a. Vista dorsal; b. Vista lateral; b1. Fronda con flores; b2. Flor hembra madura con dos flores macho. b3. Flor macho.

Fuente: Suman & Venu (2012)

*Lemna minor* produce un mayor número de colonias hijas por cada fronda madre frente a otras especies de lemnáceas. En un estudio realizado por Lemon *et al.* (2001) se determinó que el crecimiento de esta macrofita supera a las especies *Spirodela polyrhiza* (Linnaeus, 1753) y *Wolffia borealis* (Engelmann, 1968) puesto que las frondas de *L. minor* son las que más viven (31,3 días) y las que más frondas hijas producen (14,0).

Una de las ventajas del crecimiento exponencial de este monocultivo es que permite obtener la cantidad de individuos suficientes para someter a las colonias a diferentes concentraciones de una determinada prueba y durante un período de siete días. Ello permite cuantificar los diferentes efectos observados en el crecimiento vegetativo: número de frondas, área total de las frondas, peso seco, peso fresco, clorofila, clorosis y necrosis en un corto periodo de tiempo (OECD, 2006).

Numerosos ensayos ecotoxicológicos se centran en las respuestas morfológicas de las lemnaáceas frente a los plaguicidas tomando como variable la CL<sub>50</sub> (ver tabla 4), la tasa de multiplicación (TM) o el contenido total de clorofila (CTC), aunque también existen estudios de las respuestas fisiológicas.

Tabla 4. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de *Lemna minor* frente a plaguicidas.

| Clase química                      | Plaguicida    | Tiempo de exposición/<br>horas | Concentración | Autor   |
|------------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|---|
| <b>Estudios realizados en ug·L</b> |               |                                |               |   |
|                                    | Monolinuron   | 96                             | 28,3          |   |
| Urea sustituida                    | Linuron       | 96                             | 30,5          | Gatidou <i>et al.</i> (2014)                    |
|                                    | Diuron        | 96                             | 300           |   |
| Triazina                           | Atrazina      | 96                             | 153           |   |
|                                    | Cyanazina     | 96                             | 705           |   |
| Cloroacetanilido                   | Alachlor      | 96                             | 198           | (Fairchild,<br>Sappington, &<br>Ruessler, 1999) |
|                                    | Metolachlor   | 96                             | 343           |   |
| Tiocarbamato                       | EPTC          | 96                             | 7 512         |   |
|                                    | Triatato      | 96                             | > 10 000      |   |
| Ácido fenoxi-acético               | 2,4 D         | 96                             | > 100 000     |   |
| Ácido fenoxi-acético               | 2,4 D         | 96                             | > 100 000     |   |
| Dinitroalinina                     | Trifuralin    | 96                             | 170           |   |
| Ácido benzóico                     | Dicamba       | 96                             | > 100 000     |   |
| Ácido benzóico                     | Dicamba       | 96                             | > 100 000     |   |
| Triazinona                         | Metribuzin    | 96                             | 37            |   |
| Triazinona                         | Metribuzin    | 96                             | 37            |   |
| Sulfonilurea                       | Simazina      | 96                             | 166           |   |
|                                    | Clorosulfuron | 96                             | 0,7           |   |
| Carbofurano                        | Paraquat      | 96                             | 51            |   |
|                                    | Bromoxynil    | 96                             | 8 065         |   |
| Piridina                           | Diquat        | 96                             | 18            |   |
|                                    | Metsulfuron   | 96                             | 0,4           |   |

Continúa Tabla 4

Continúa Tabla 4

| Clase química                      | Plaguicida    | Tiempo de exposición/<br>horas | Concentración | Autor                               |
|------------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| <b>Estudios realizados en mg·L</b> |               |                                |               |                                     |
| Organoclorado                      | Endosulfan    | 96                             | 10,4          | Alberdi <i>et al.</i> (2007)        |
| Organofosforado                    | Clorpirifos   | 96                             | 1,5           |                                     |
| Inhibidor de quitina               | Diflubenzuron | 96                             | 459,5         | Pérola (2008)                       |
| Triazina                           | Cianazina     | 96                             | 0,705         | MINPLAN (2003)                      |
|                                    | Cianazina*    | 336                            | 0,064         |                                     |
| Sulfato de amonio                  | Gluticid      | 168                            | 3,73 +- 0,36  | Carballo <i>et al.</i><br>(2008)    |
| Carbofurano                        | Paraquat      | 96                             | 0.016         | (Iannacone <i>et al.</i> ,<br>2011) |
| <b>Estudios realizados en g·L</b>  |               |                                |               |                                     |
| Acenilida                          | Metolacloro   | 96                             | 143           |                                     |
|                                    | Atrazina      | 96                             | 153           |                                     |
| Triazina                           | Cyanazina     | 96                             | 705           |                                     |
|                                    | Metribuzin    | 96                             | 37            |                                     |
| Sulfonilurea                       | Simazina      | 96                             | 166           |                                     |
|                                    | Clorosulfuron | 96                             | 0,7           |                                     |
| Piridina                           | Metsulfuron   | 96                             | 0,4           | Lasfar (2004)                       |
|                                    | Diquat        | 96                             | 18            |                                     |
| Tiocarbamato                       | Paraquat      | 96                             | 51            |                                     |
|                                    | EPTC          | 96                             | 7512          |                                     |
| Benzonitrilo                       | Triatato      | 96                             | > 10000       |                                     |
| Acido Benzóico                     | Bromoxynil    | 96                             | 8065          |                                     |
|                                    | Dicamba       | 96                             | > 100 000     |                                     |

\* Estudio realizado con *Lemna gibba*.  
Fuente: Elaboración propia.

# 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

## 3.1 Problemática

Las mezclas complejas que se realizan habitualmente, pueden producir múltiples interacciones entre los principios activos, generando un riesgo latente en los organismos involucrados en el proceso al interactuar con el medio biótico y abiótico. Después de la aplicación de los plaguicidas, tanto individuales como la gama de mezclas, parte del producto se deposita en el follaje del cultivo y el resto cae a través de éste hacia el suelo (Conant, 2005; Ministerio de Salud, 2007; Yanggen *et al.*, 2003). García (1997) menciona que entre el 97% y 99% de las cantidades de los plaguicidas aplicados no alcanzan a los organismos que se desean combatir. Dicha cantidad se distribuye en el ambiente, hacia el cual extiende sus efectos tóxicos de acuerdo a las circunstancias dadas.

Gaete & Chávez (2008) mencionan que no existe una regulación de dichas mezclas complejas en las normas ambientales; esta falta de control y registro adecuado, sumado a la poca comprensión de los efectos colaterales, pueden ocasionar diversos tipos de problemas como malformaciones congénitas, esterilidad, cáncer, entre otros (Amparán *et al.*, 2003).

## 3.2 Justificación

La población agrícola ocupa un lugar importante en el empleo total (representando al 25,1% de la PEA ocupada en el país) y contribuye con el 7,5% del producto bruto interno – PIB (MINAGRI, 2012a; Torres, 2004). Por otro lado, DFID & Thompson (2004) mencionan que la tasa de crecimiento en la productividad agrícola mantiene una relación directa con la reducción de la pobreza, por lo que el fortalecimiento de este sector resulta indispensable para la generación de oportunidades que provean una gran diversificación económica, ayudando a mantener un soporte básico para la alimentación local, regional y nacional (AIF, 2009; de Janvry & Sadoulet, 2010).

Debido al escaso conocimiento sobre la cantidad y tipos de plaguicidas (ingredientes activos) que se aplican en los campos y del poco control de los desechos que constantemente se ven expuestos a los factores del medio ambiente (García & Rodríguez, 2012), los gobiernos, gremios y ONGs han promovido políticas y financiado proyectos orientados a fomentar los cambios tecnológicos entre los agricultores. Ello también se debe al cumplimiento de lo suscrito en acuerdos internacionales como el capítulo 19 del Programa 21 de la Conferencia Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo, donde el Perú se comprometió a implementar las recomendaciones del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas desde 1986 y el Principio de Información y Consentimiento Previos desde 1991 (Blair, 2001; Yanggen *et al.*, 2003).

Asimismo, aunque el país ha regulado el ingreso de los plaguicidas químicos de uso agrario según su peligrosidad para la salud y el medio ambiente (MINAGRI, 2012b), estos siguen siendo insumos altamente productivos en la agricultura, por lo que es necesario realizar pruebas con organismos no destinatarios del control químico para determinar si existen secuelas negativas del uso de plaguicidas en el ambiente (Iannacone & Alvarino, 2005; Yanggen *et al.*, 2003).

El uso de plantas en ensayos de toxicidad permiten la investigación, detección y cuantificación del tóxico activo en el medio natural (Radić *et al.*, 2010), siendo la *Lemna* frecuentemente utilizada para realizar ensayos toxicológicos de muchas sustancias debido a su pequeño tamaño, rápido crecimiento y por su alta sensibilidad a varios contaminantes (Swanson *et al.*, 1991), evitando así el uso indiscriminado de los plaguicidas.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 Hipótesis

La exposición de la “lenteja de agua” *L. minor* a la mezcla binaria equitóxica de la rotenona y el metomilo produce un efecto sinérgico en comparación a la toxicidad individual de cada plaguicida.

### 4.2 Objetivos

#### 4.2.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad de la mezcla binaria de los plaguicidas rotenona y metomilo en la macrofita “lenteja de agua” *L. minor*.

#### 4.2.2 Objetivos específicos

Determinar la toxicidad individual de la rotenona en la macrofita *L. minor*.

Determinar la toxicidad individual del metomilo en la macrofita *L. minor*.

Determinar la concentración equitóxica efectiva de rotenona y metomilo sobre *L. minor*.

Determinar la efectividad del modelo BMD para el cálculo de la concentración efectiva de los ensayos de toxicidad individual y binaria en la macrofita *L. minor*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Física Aplicada F-211 de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma – URP, Santiago de Surco, Lima, Perú, ubicado en posición geográfica:

Lat. -12.133726 (12°8'1.42''S) y Long. -76.980364 (76°58'49.31''W). El estudio se realizó entre los meses de diciembre de 2014 a junio del 2015.

### 5.2 Plaguicidas empleados para el estudio

Se emplearon dos productos sintéticos formulados metomilo (Lannate<sup>®</sup> 90: 900g·L<sup>-1</sup>) obtenido de la casa comercial “Agroinversiones Señor de Muruhuay” y rotenona (Rotebiol<sup>®</sup>: 100,3 mg·L<sup>-1</sup>) obtenido de la casa comercial “Agro Alvino E.I.R.L.”

### 5.3 Organismo bioindicador

*Lemna minor* se obtuvo de un acuario del centro de la ciudad de Lima. Para su identificación se utilizó la clave taxonómica propuesta por Daubs (1965). Adicionalmente, dicha clave se complementó con el trabajo de Suman & Venu (2012).

### 5.4 Metodología

#### 5.4.1. Condiciones físicas del ensayo

Se utilizó una cámara de cultivo para reducir el grado de contaminación y mantener una temperatura y humedad estable. En la parte superior de la cámara, se ubicaron tres tubos fluorescentes de la marca GE Lighting<sup>®</sup> USA, cada uno con una luminiscencia de 40 Watts con la finalidad de proveer una iluminación vertical continua, con un fotoperiodo de 24: 0 h.

Para determinar la luminosidad en lux, se utilizó el Software LoggerPro® Versión 3.2.1 en Español junto al sensor de luz y la interfase proporcionados por el Laboratorio de Física Intermedia de la Facultad de Ingeniería de la URP. Se realizaron las pruebas con los tres tubos fluorescentes para determinar la distancia, con un tiempo de 10 min por cada ensayo. El promedio de los datos obtenidos (3 datos por seg) a una distancia de 25 cm fue de 3556,50 lux.

#### 5.4.2. Acondicionamiento

Semanas antes al inicio de los ensayos se seleccionaron aquellas colonias de *L. minor* que no presentaron daños visibles en sus frondas, siendo esterilizadas según el protocolo sugerido por EC (2007). Cada colonia se sumergió en una solución de Hipoclorito de sodio al 0,5% (v:v) por al menos un min. Una vez finalizado el tratamiento, se lavaron las frondas con abundante agua destilada estéril y se repitió el procedimiento.

Finalizada la esterilización, las colonias se colocaron en 400 mL de solución hidropónica La Molina<sup>®</sup>, la cual contiene una solución de macro nutrientes y micro nutrientes (tabla 5). Adicionalmente se añadió 0,5 mL del fertilizante Byfolan Forte<sup>®</sup> para asegurar que el cultivo posea todos los nutrientes minerales esenciales (tabla 6).

Tabla 5. Concentración en 1L de solución de los minerales en la Solución Hidropónica La Molina<sup>®</sup>.

|                                      | Concentración (%) | Minerales | ppm (mg/L) |
|--------------------------------------|-------------------|-----------|------------|
| <b>Solución A (macro nutrientes)</b> |                   |           |            |
| Nitrato de Potasio                   | 2,2               | K         | 210        |
| Nitrato de Amonio                    | 1,4               | N         | 190        |
| Superfosfato triple                  | 0,72              | Ca        | 150        |
| <b>Solución B (micro nutrientes)</b> |                   |           |            |
| Sulfato de Magnesio                  | 5,5               | Mg        | 45         |
| Quelato de Hierro 6% Fe              | 0,425             | P         | 35         |
| Solución de micronutrientes          | 10                | Fe        | 1          |
| Sulfato de Manganeso                 | 0,05              | Mn        | 0,5        |
| Ácido Bórico                         | 0,003             | B         | 0,5        |
| Sulfato de Zinc                      | 0,0017            | Zn        | 0,15       |
| Sulfato de Cobre                     | 0,001             | Cu        | 0,1        |
| Molibdato de Amonio                  | 0,0002            | Mo        | 0,05       |

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6. Concentración en 1L de solución de los minerales en el fertilizante Byfolan Forte®.

| <b>Ingrediente</b>                         | <b>Concentración (%)</b> |
|--|--------------------------|
| Nitrógeno total                            | 11,470                   |
| Fósforo como P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 8,000                    |
| Azufre                                     | 6,000                    |
| Boro                                       | 0,230                    |
| Calcio                                     | 0,036                    |
| Cobre                                      | 0,025                    |
| Cobalto                                    | 0,040                    |
| Fierro                                     | 0,002                    |
| Manganeso                                  | 0,050                    |
| Molibdeno                                  | 0,005                    |
| Magnesio                                   | 0,025                    |
| Zinc                                       | 0,080                    |
| Ácido indolacético                         | 0,003                    |
| Clorhidrato de tiamina                     | 0,004                    |

Fuente: Elaboración propia.

El medio se repuso al cabo de una semana de cultivo; además, se cubrió la superficie de los vasos con un tapón de algodón para evitar la evaporación y facilitar el intercambio gaseoso.

Siguiendo el protocolo de la OECD (2006), las plantas se mantuvieron durante un mínimo de ocho semanas con la solución hidropónica y el agua de mesa Cielo® (tabla 7) para asegurar la depuración de todos los posibles residuos del lugar de origen.

Tabla 7. Análisis de los parámetros fisicoquímicos del agua de mesa embotellada con una sonda multiparámetros (HANNA HI9828).

| <b>Parámetro</b>            | <b>Unidad</b> | <b>Medición</b> |
|-----------------------------|---------------|-----------------|
| Oxígeno disuelto            | DO mg/L       | 4,05            |
| Porcentaje de saturación DO | DO%           | 46,9            |
| pH                          | -             | 6,97            |
| Salinidad                   | ppm           | 0,3             |

### **5.4.3. Ensayos**

Un día antes de iniciar cada ensayo se seleccionaron 118 colonias sin lesiones visibles o cambios de color. Estas se depositaron en una vaso de precipitado con 300 mL de agua destilada estéril (pH = 6,6) sin solución hidropónica.

Se realizaron un total de cuatro ensayos de toxicidad aguda individual (dos de metomilo y dos de rotenona) con modificaciones del protocolo de la OECD (2006). Dichos ensayos variaron en el tipo de agua utilizada; los dos primeros ensayos de metomilo y rotenona se realizaron con agua destilada y los otros dos con el agua de mesa Cielo<sup>®</sup>.

Para cada ensayo se realizaron seis repeticiones por tratamiento, siendo el número inicial de colonias de 3 ejemplares (3 a 4 frondas por ejemplar). Asimismo, las unidades del ensayo se colocaron en un beaker BOECO<sup>®</sup> de 50 mL por un periodo de 168 h, con lecturas a los cuatro (96 h) y siete días (168 h). Luego de cumplido el tiempo de exposición, las muestras fueron procesadas para su posterior análisis. Se empleó el tratamiento control (sin el tóxico) para comparar los resultados.

Debido a la naturaleza de los insecticidas a emplear, el tipo de ensayo fue con reposición del medio de cultivo a cuatro días de iniciado el ensayo. Las colonias se expusieron a diferentes concentraciones de los tóxicos escogidos durante siete días sin aireación y con iluminación vertical continua (24 h; luz artificial).

#### **5.4.3.1 Toxicidad aguda individual**

La actividad tóxica del metomilo y la rotenona, se analizaron empleando cinco concentraciones más un control negativo por cada tóxico. Los productos fueron dosificados de acuerdo a las recomendaciones comerciales. Para el caso del metomilo, se preparó un stock de concentración distinto por cada ensayo realizado.

La concentración máxima del primer ensayo con metomilo fue de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , realizando las siguientes diluciones:  $400 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$ ,  $80 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$ ,  $16 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$  y  $2 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$ . El factor de dilución fue de 0,2.

En el segundo ensayo con metomilo se utilizó las concentraciones empleadas por Iannacone & Alvariño (2008), preparando una solución stock de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$  en 500 mL realizando las siguientes diluciones:  $4000 \text{ mg}\cdot\text{IAL}^{-1}$ ,  $2000 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ mg}\cdot\text{IAL}^{-1}$ ;  $500 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$  y  $250 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$ . El factor de dilución empleado fue de 0,5.

Para el caso de la rotenona, ambos ensayos se efectuaron preparando una solución stock de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en 500 mL realizando las siguientes diluciones:  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por cada ensayo, se realizaron lecturas a las 96 h y 168 h. El factor de dilución utilizado fue de 0,5.

El presente estudio sólo consideró el análisis de los resultados de un ensayo por cada plaguicida. En el caso del metomilo se analizó el ensayo realizado con agua Cielo<sup>®</sup> y en el caso de la rotenona el ensayo realizado con agua destilada.

#### **5.4.3.2 Toxicidad aguda binaria:**

Se preparó una solución madre con  $4000 \text{ mg}\cdot\text{IA L}^{-1}$  de metomilo y  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de rotenona en agua de mesa Cielo<sup>®</sup>, considerándola como la proporción de 1:1. La evaluación de la mezcla equitóxica se realizó en cuatro diluciones seriadas al 50%, 25%, 12,5% y 6,25% más un control negativo. Asimismo, se establecieron lecturas a las 96 h y 168 h.

Las concentraciones utilizadas en el ensayo de toxicidad fueron las siguientes:

Tabla 8. Concentraciones empleadas para el ensayo de la mezcla binaria equitóxica (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

| Concentración  | Metomilo | Rotenona |
|----------------|----------|----------|
| Control        | 0        | 0        |
| R <sub>1</sub> | 250      | 125      |
| R <sub>2</sub> | 500      | 250      |
| R <sub>3</sub> | 1000     | 500      |
| R <sub>4</sub> | 2000     | 1000     |
| R <sub>5</sub> | 4000     | 2000     |

#### 5.4.4. Análisis de los datos:

##### 5.4.4.1 Número de frondas (NF):

Se utilizó el registro fotográfico para el conteo de las frondas durante el inicio del ensayo, así como la lectura durante el ensayo (96 h) y la lectura final del ensayo (168 h). El mismo método se utilizó para la determinación de la clorosis (frondas se tornan amarillas) y la necrosis (presencia de tejido muerto en la fronda y borde irregular), supeditando la presencia de estos signos de fitotoxicidad cuando al menos la mitad de la fronda presentaba dichas características. Asimismo, se utilizó el protocolo de la OECD (2006) para la determinación de la tasa de producción de nuevas frondas ( $\mu$ ) y la inhibición del crecimiento ( $Ir$ ).

*Fórmula para la determinación de  $\mu$ :*

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (1)$$

Donde:

$\mu_{i-j}$ : Promedio de crecimiento específico de un momento  $i$  a un momento  $j$ .

$N_i$ : Número de frondas observadas en el ensayo o prueba control en el tiempo  $i$ .

$N_j$ : Número de frondas observadas en el ensayo o prueba control en el tiempo  $j$ .

$t_i$ : Momento en el que inicia el ensayo.

$t_j$ : Momento en el que finaliza el ensayo.

*Fórmula para la determinación de Ir:*

$$\%Ir = \frac{(\mu_c - \mu_r)}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

% Ir : Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento promedio.

- $\mu_c$  : Valor promedio de  $\mu$  en el control.
- $\mu_r$  : Valor promedio de  $\mu$  en el grupo de tratamiento.

#### **5.4.4.2 Área de la fronda (AF):**

El registro fotográfico se realizó en las lecturas de todos los ensayos utilizando una cámara compacta Canon<sup>®</sup> SX700HS. El área total de cada ensayo, así como el área de la necrosis y la clorosis, se determinó con el software de distribución gratuita ImageJ<sup>®</sup> (fig. 4), desarrollado por el Research Services Branch, del National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. También se utilizaron las fórmulas (1) y (2).

Las colonias se recolectaron inmediatamente después de la segunda lectura y se formaron dos grupos por cada concentración (tres unidades de ensayo en cada grupo). Con el primer grupo se determinó el peso seco y con el segundo grupo se calculó el contenido total de clorofila. Cada unidad de ensayo fue centrifugada de manera individual a 3000 rpm x 10 min en tubos eppendorf de 5 mL (Centrífuga Heraeus Labofuge 200<sup>®</sup>), a los cuales se les hizo un agujero en la parte inferior para descartar el exceso de agua. Luego, se utilizó una balanza analítica (Alexander MϕBBA<sup>®</sup>) para calcular el peso fresco de cada concentración. Cabe señalar que en los ensayos de toxicidad individual donde se utilizó agua destilada, este procedimiento se realizó por cada grupo y no por cada unidad de ensayo.

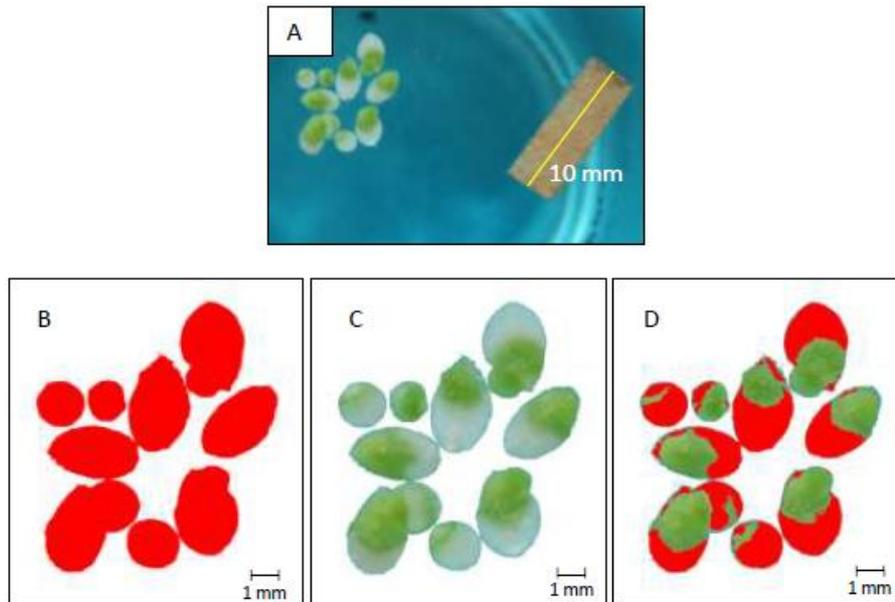


Figura 4. Detección de área total y necrosis en *Lemna minor*.

Ensayo metomilo (agua Cielo®); lectura 96 h; 4000 mg·L<sup>-1</sup> [2]. A: Imagen original con una tira de papel de 10 mm; B: frondas aisladas; C: cálculo del área total y D: cálculo de la necrosis.

#### 5.4.4.3 Peso húmedo (PH):

Se colocaron todas las muestras del primer grupo en una estufa (Thermo Electron Corporation®) durante 24 h a 43°C para posteriormente determinar el peso seco.

#### 5.4.4.4 Contenido Total de Clorofila (CTC):

La prueba del contenido total de clorofila se realizó una vez determinado el peso fresco del segundo grupo. Para esta prueba, las muestras fueron sumergidas en metanol en tubos herméticos de 2 mL; posteriormente, fueron cubiertas con papel platino y guardadas durante 96 h en un ambiente frío. Finalizado el tiempo de extracción de la clorofila, se midió la absorbancia a 635 nm y 660 nm (con un espectrofotómetro Merck SQ118®). Para calcular el contenido total de clorofila a y clorofila b, se modificó la absorbancia en la fórmula mencionada por Valenzuela (2013):

$$\text{Cchl a} = 12,63 \times A_{664,5} - 2,52 \times A_{647}$$

$$\text{Cchl b} = 20,47 \times A_{647} - 4,73 \times A_{664,5}$$

$$\text{Cchl total} = 17,95 \times A_{647} + 7,90 \times A_{664,5}$$

#### **5.4.5. Determinación de BMDL y BMD:**

En el presente estudio se optó por utilizar el método Benchmark dose (punto de referencia), empleando el paquete estadístico BMDS<sup>®</sup> versión 2,6 elaborado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2015).

Este método, reemplaza los valores de NOAEL (nivel de efecto no observado) y LOAEL (nivel con bajos efectos adversos) por el BMDL (nivel inferior al punto de referencia) y el BMD (punto de referencia), respectivamente. Cabe señalar que los valores de NOAEL y LOAEL son ampliamente utilizados en la toxicología. No obstante, el modelo BMD supera las limitaciones que implican el uso del NOAEL, tales como la dependencia estricta en la selección de concentraciones y el tamaño de la muestra de estudio a partir del cual se identifica el efecto crítico.

Para la determinación del BMDL y el BMD de las pruebas evaluadas, se utilizó el modelo dicotómico, el cual es utilizado para describir dos niveles de respuesta, usualmente categorizados como presencia o ausencia (ej. frondas vivas y frondas muertas). Para el análisis de los datos, se utilizó la necrosis como valor de respuesta frente a los parámetros de NF y AF. En el caso de NF se consideró como fronda necrótica a aquella hoja que presentaba más de la mitad del tejido muerto mientras que en el parámetro de AF se consideró como necrosis a toda el área de la fronda que presentó tejido muerto. En algunos casos, el análisis computarizado de las imágenes no permitió la detección del área necrótica, optándose por la selección manual del área.

El modelo dicotómico presenta nueve variaciones del mismo, las cuales ayudan a representar el amplio rango de la curva de la dosis-respuesta de un determinado tóxico. Se emplearon ocho de estas variaciones, escogiendo aquella que presentó un valor de p más significativo. Además, se optó por analizar la suma de las respuestas de todos los ensayos por cada concentración, considerando como respuesta a la cantidad de frondas necróticas (parámetro NF) y el área total necrosada (parámetro AF).

#### **5.4.6. Determinación de la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>):**

Para la determinación de la CE<sub>50</sub> individual de cada tóxico y de la mezcla binaria, se empleó el programa computarizado Probit versión 1,5 (Thron *et al.*, 1995). Luego, el resultado fue contrastado con el método del punto de referencia (BMD) a través del programa estadístico BMD5<sup>®</sup> para establecer su efectividad en el cálculo de la concentración efectiva al 10% y 50% (CE<sub>10</sub> y CE<sub>50</sub>, respectivamente). Para hallar la CE<sub>50</sub> con el modelo BMD, se modificó el valor de respuesta al 50%. Por defecto, este valor es equivalente al 10% del efecto observado (CE<sub>10</sub>).

#### **5.4.7. Determinación del efecto sinérgico o antagónico**

Se determinó el valor de Concentración-Adición (CA) para el ensayo de toxicidad binaria. Este valor fue propuesto por Otitoloju (2002) para metales pesados y mencionado por Gaete & Chávez (2008).

En la Concentración-Adición se asume que, cuando dos tóxicos actúan de modo similar siendo mezclados en cualquier proporción, ellos se sumarán para dar la respuesta observada. El valor de CE<sub>50</sub> estimada se obtiene sumando los valores de CE<sub>50</sub> de los tóxicos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla de acuerdo a las proporciones probadas. Luego, estos valores de CE<sub>50</sub> estimadas son divididos por los valores obtenidos experimentalmente de la mezcla binaria, para así determinar la clase de acción conjunta de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{CE_{50} \text{ estimada}}{CE_{50} \text{ experimental de la mezcla}}$$

Donde CA = 1 indica que el efecto es aditivo, CA > 1 que hay sinergia y que CA < 1 que hay antagonismo.

#### **5.4.8. Validación de los ensayos:**

Como primer criterio para la validación de los ensayos de toxicidad individual se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22 para Windows 7. De este modo, se calculó la homogeneidad de los parámetros evaluados mediante el factor ANOVA y a un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

Los parámetros evaluados para este análisis estadístico fueron la producción de nuevas frondas (NF), la totalidad de frondas necróticas y cloróticas, el área de la fronda (AF) y el área necrótica y clorótica. Asimismo, se utilizó el parámetro de contenido total de clorofila (CTC) como un factor determinante para la elección de los ensayos analizados de toxicidad individual.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación taxonómica de *Lemna minor* L.

Se utilizó la clave taxonómica propuesta por Daubs (1965) para determinar la especie (fig. 5). Las colonias utilizadas para el presente estudio presentan frondas planas, elípticas, ligeramente asimétricas, con el ápice redondeado, un nervio central y cámaras de aerénquima pequeñas y no prominentes. El color verde del envés es más claro que en el haz. Asimismo, se evidencia una sola raíz (talo) por fronda madre, sin escamillas dorsales o ventrales y con una vaina alada (caliptra) en la base de la misma.

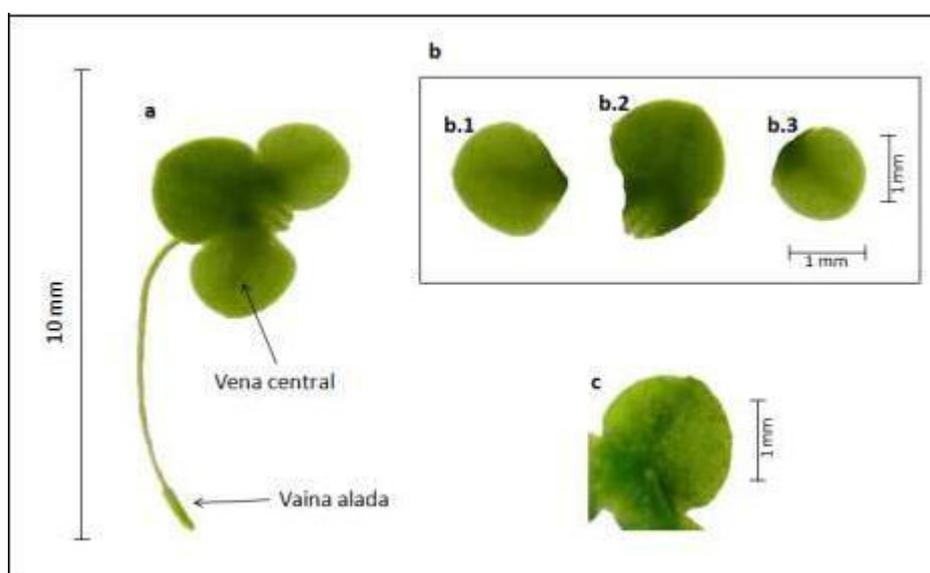


Figura 5. *Lemna minor* L.

a. Vista del haz. Medida de la raíz: 6.1331 mm; caliptra: 0,994 mm b. Medida transversal: b.1) 1,791 mm; b.2) 2,866 mm y b.3) 1,407 mm. Medida longitudinal: b.1) 2,062 mm; b.2) 2,339 mm y b.3) 1,871 mm. c. Vista del envés. Cámaras de aerénquima no prominentes.

Las medidas de las frondas se ubican dentro del rango establecido para esta especie (1,5 – 5 x 1 – 3,32 mm), lo mismo que con el talo (hasta 6,2 mm) y la caliptra (0,5 – 3,1 mm).

## 6.2 Validación de los ensayos

Con el análisis mediante el factor ANOVA se obtuvo un nivel de significancia menor a 0,05 en todos los parámetros evaluados de los ensayos donde se utilizó agua Cielo<sup>®</sup> (tabla 9).

Tabla 9. Nivel de significancia en la prueba de homogeneidad de las varianzas.

| Parámetros evaluados   | Metomilo |       | Rotenona |       |
|------------------------|----------|-------|----------|-------|
|                        | AD       | AC    | AD       | AC    |
| número de frondas (NF) | 0,029    | 0,000 | 0,000    | 0,000 |
| frondas con necrosis   | 0,001    | 0,000 | 0,403    | 0,000 |
| frondas con clorosis   | 0,051    | 0,000 | 0,000    | 0,000 |
| área total (AF)        | 0,415    | 0,000 | 0,034    | 0,011 |
| área con necrosis      | 0,005    | 0,000 | 0,154    | 0,000 |
| área con clorosis      | 0,002    | 0,000 | 0,002    | 0,003 |

AD: Agua destilada; AC: Agua Cielo<sup>®</sup>

No obstante, para el caso de la rotenona se decidió emplear la data generada en el ensayo AD puesto que, cuando se empleó la data obtenida con el ensayo AC, no se pudo realizar el análisis respectivo debido a la ausencia de una relación entre el tóxico y los parámetros evaluados (tabla 10).

Tabla 10. Número de frondas y área total (mm<sup>2</sup>) en la macrofito *Lemna minor* sometida a dos ensayos de toxicidad individual según el tipo de agua empleada (día 7: lectura 168 h).

|         | Metomilo |        |     |        | Rotenona |        |     |        |
|---------|----------|--------|-----|--------|----------|--------|-----|--------|
|         | AD       |        | AC  |        | AD       |        | AC  |        |
|         | NF       | AF     | NF  | AF     | NF       | AF     | NF  | AF     |
| control | 210      | 387,15 | 285 | 702,63 | 165      | 275,49 | 307 | 681,90 |
| A       | 199      | 384,54 | 229 | 524,39 | 114      | 200,57 | 139 | 262,96 |
| B       | 162      | 304,18 | 203 | 419,82 | 123      | 197,17 | 127 | 255,26 |
| C       | 175      | 322,22 | 149 | 287,25 | 100      | 160,08 | 128 | 244,56 |
| D       | 146      | 235,05 | 139 | 254,30 | 59       | 117,47 | 123 | 233,90 |
| E       | 83       | 158,32 | 72  | 162,70 | 56       | 111,27 | 128 | 242,24 |

AD: agua destilada y AC: Agua Cielo<sup>®</sup>; NF: número de frondas y AF: área de la fronda.

Por otro lado, también se consideró el porcentaje de inhibición del parámetro de clorofila (CTC) para determinar la validez del ensayo. Dicho parámetro fue uno de los factores determinantes para la elección de los dos ensayos de toxicidad individual analizados (tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento (%Ir) según el parámetro CTC en cuatro ensayos.

|         | Metomilo |       | Rotenona |       |
|---------|----------|-------|----------|-------|
|         | AD       | AC    | AD       | AC    |
| control | -        | -     | -        | 0     |
| A       | 44,74    | 17,49 | 16,02    | 54,30 |
| B       | 30,83    | 42,76 | 30,63    | 52,15 |
| C       | 61,47    | 60,88 | 44,96    | 55,69 |
| D       | 66,19    | 63,54 | 90,30    | 50,28 |
| E       | 39,55    | 96,84 | *        | 41,37 |

AD: agua destilada y AC: Agua Cielo®

\* No se midió este valor.

Puede observarse que en el caso del ensayo de rotenona AC, los valores son discordantes y no guardan relación con el incremento de las sustancias tóxicas. Caso contrario sucede en el ensayo de rotenona AD, donde fue posible determinar todos los parámetros analizados.

### 6.3 Toxicidad aguda individual del Metomilo

Al evaluar el efecto por exposición a las cinco concentraciones, las cuales se ubicaron en un rango de 250 a 4000 mg·L<sup>-1</sup> del ingrediente activo, se encontró una disminución de nuevas frondas (NF) y el área total de las frondas (AF) a medida que aumentó la concentración del metomilo (tabla 12).

Tabla 12. Producción de nuevas frondas y área total (mm<sup>2</sup>) de la macrofitas *Lemna minor* expuesta al plaguicida metomilo al cuarto y séptimo día de lectura.

| Concentración<br>mg·L <sup>-1</sup> | Día 4   |        | Día 7   |         |
|-------------------------------------|---------|--------|---------|---------|
|                                     | Frondas | Área   | Frondas | Área    |
| 0                                   | 177     | 416,99 | 285     | 702,632 |
| 250                                 | 151     | 365,28 | 229     | 524,388 |
| 500                                 | 140     | 308,46 | 203     | 419,816 |
| 1000                                | 120     | 206,95 | 149     | 287,251 |
| 2000                                | 92      | 205,15 | 139     | 254,302 |
| 4000                                | 71      | 169,73 | 72      | 162,696 |

Asimismo, en la segunda lectura (día 7: 168 h) se observó una mortalidad del 68,59% en la concentración más alta (fig. 6), siendo mayor la presencia de necrosis respecto a las otras concentraciones (tabla 13).

Tabla 13. Necrosis total en la fronda y el área (mm<sup>2</sup>) de la macrofitas *Lemna minor* expuesta al plaguicida metomilo al cuarto y séptimo día de lectura.

| Concentración<br>mg·L <sup>-1</sup> | Día 4   |        | Día 7   |         |
|-------------------------------------|---------|--------|---------|---------|
|                                     | Frondas | Área   | Frondas | Área    |
| 0                                   | 0       | 0      | 1       | 1,076   |
| 250                                 | 0       | 0,051  | 5       | 10      |
| 500                                 | 0       | 0,166  | 1       | 3,082   |
| 1000                                | 0       | 2,559  | 2       | 5,921   |
| 2000                                | 3       | 7,728  | 11      | 27,009  |
| 4000                                | 24      | 47,394 | 54      | 111,601 |

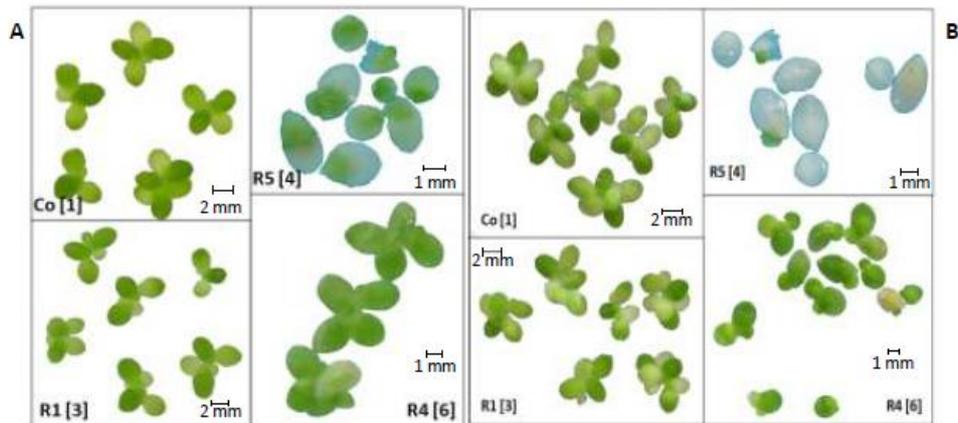


Figura 6. Número de frondas durante las dos lecturas realizadas (metomilo).

Co: Control; R1: 250 mg·L<sup>-1</sup>; R4: 2000 mg·L<sup>-1</sup> y R5: 4000 mg·L<sup>-1</sup>

A: Lectura a las 96h; B: Lectura a las 168 h.

Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

Por otro lado, la clorosis varió según el día de lectura (tabla 14), siendo la concentración de 2000 mg·L<sup>-1</sup> la que obtuvo el valor más alto al término del séptimo día. La concentración de 4000 mg·L<sup>-1</sup> no presentó este efecto fitotóxico.

Tabla 14. Clorosis total en la fronda y el área (mm<sup>2</sup>) de la macrofitas *Lemna minor* expuesta al plaguicida metomilo según el día de lectura.

| Concentración<br>mg·L <sup>-1</sup> | Día 4   |      | Día 7   |        |
|-------------------------------------|---------|------|---------|--------|
|                                     | Frondas | Área | Frondas | Área   |
| 0                                   | 0       | 0    | 0       | 0      |
| 250                                 | 0       | 0    | 0       | 0      |
| 500                                 | 0       | 0    | 2       | 3,645  |
| 1000                                | 0       | 0    | 5       | 3,568  |
| 2000                                | 2       | 1    | 3       | 4,8103 |
| 4000                                | 0       | 0    | 1       | 0      |

### 6.3.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

El grupo control presentó una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) superior a las concentraciones empleadas en el presente estudio, tanto en el parámetro NF (0,223) como en el parámetro AF (0,245), siendo el margen de variación entre ambos parámetros de 0,022.

En la tabla 15 se observa que hubo una reducción gradual de la tasa de crecimiento a medida que se aumentó la concentración del metomilo en el medio, llegando a valores cercanos a cero para la concentración más alta.

Ello se corrobora con el cálculo de la inhibición de crecimiento ( $Ir$ ), el cual es significativamente alto en la concentración de 4000 mg·L<sup>-1</sup> cuando se consideran los parámetros NF y CTC, reduciéndose levemente con los parámetros AF y PH.

Tabla 15. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en la macrofita *Lemna minor* expuesta al plaguicida metomilo.

| C    | $\mu$ NF | % $Ir$ NF | $\mu$ AF | % $Ir$ AF | % $Ir$ PH | % $Ir$ CTC |
|------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|
| 0    | 0,223    | -         | 0,245    | -         | -         | -          |
| 250  | 0,189    | 15,101    | 0,196    | 11,843    | 14,318    | 6,478      |
| 500  | 0,177    | 20,696    | 0,157    | 29,339    | 38,628    | 34,777     |
| 1000 | 0,140    | 37,195    | 0,153    | 31,372    | 57,122    | 57,770     |
| 2000 | 0,115    | 48,186    | 0,107    | 51,857    | 60,626    | 65,620     |
| 4000 | 0,021    | 90,403    | 0,030    | 86,486    | 80,388    | 98,160     |

C: Concentración en mg·L<sup>-1</sup>;  $\mu$ : tasa de crecimiento;  $Ir$ : Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF; Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila.

### 6.3.2. Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Se utilizó el modelo dicotómico mencionado en la metodología, considerando las concentraciones de 0, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 mg·L<sup>-1</sup> y la lectura a las 168 h. Al utilizar el parámetro NF como respuesta se observó que sólo el modelo Quantal-Linear fue adecuado para el análisis de los datos (tabla 16), siendo los valores de BMD y de BMDL fueron de 1255,28 mg·L<sup>-1</sup> y 328,939 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabla 16. Determinación de los valores BMD y BMDL (en mg·L<sup>-1</sup>) utilizando el parámetro NF como respuesta para los modelos dicotómicos (Metomilo; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $\chi^2$ | BMD     | BMDL    |
|----------------|------------|----------|---------|---------|
| Gamma          | 0,9972     | 0,15     | 1354    | 1186,86 |
| Logistic       | 0,7209     | 2,08     | 1541,92 | 1404,22 |
| Log-Logistic   | 0,991      | 0,28     | 1382,54 | 1204,22 |
| Log-Probit     | 0,9995     | 0,06     | 1322,72 | 1154,57 |
| Multistage     | 0,1768     | 7,65     | 1193,83 | 1026,59 |
| Probit         | 0,918      | 0,95     | 1453,24 | 1311,79 |
| Weibull        | 0,9871     | 0,34     | 1407,26 | 1227,85 |
| Quantal-Linear | 0          | 30,85    | 1255,28 | 328,939 |

Cuando se analizó el parámetro AF como respuesta, los modelos Multistage, Probit, y Quantal-Linear obtuvieron los mejores resultados para el cálculo de los valores de BMD y BMDL (tabla 17). Al igual que en el parámetro anterior, se tomó en cuenta aquel modelo que tuviese un valor de p lo más cercano a cero. No obstante, dos de los modelos presentaron dicha característica por lo que se optó por el Quantal-Linear puesto que tuvo un valor de  $\chi^2$  superior al modelo Multistage. Para el modelo elegido los valores de BMD y BMDL se situaron en 525,915 y 431,088 en mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabla 17. Determinación de los valores BMD y BMDL (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizando el parámetro NF como respuesta en los modelos dicotómicos (Metomilo; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $x^2$  | BMD     | BMDL    |
|----------------|------------|--------|---------|---------|
| Gamma          | 0,0319     | 8,81   | 1005,61 | 928,357 |
| Logistic       | 0,0261     | 11,04  | 1038,38 | 977,136 |
| Log-Logistic   | 0,0257     | 9,28   | 1009,9  | 931,613 |
| Log-Probit     | 0,0371     | 8,48   | 1001,54 | 927,632 |
| Multistage     | 0          | 43,95  | 730,748 | 681,702 |
| Probit         | 0,0019     | 17,04  | 939,676 | 883,447 |
| Weibull        | 0,0176     | 10,11  | 1022,93 | 934,967 |
| Quantal-Linear | 0          | 145,96 | 525,915 | 431,088 |

En el siguiente gráfico se incluye el rango de posibles valores de NOAEL con fines comparativos.

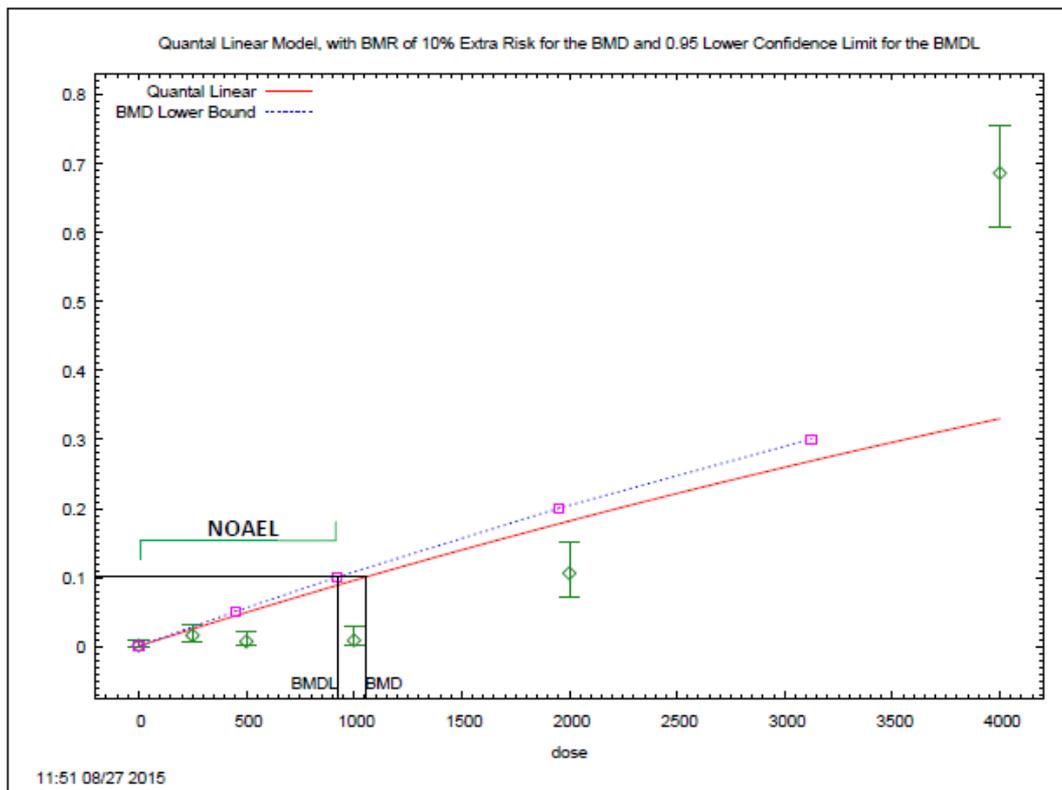


Figura 7. Curva de dosis-respuesta del modelo continuo Quantal-Linear utilizando el parámetro AF como valor de respuesta para la determinación del BMD y BMDL

### 6.3.3. Determinación de la CE<sub>50</sub> mediante el análisis Probit

Por otro lado, no se consideró a la clorosis como fitotoxicidad debido a que su presencia fue poco significativa, encontrándose en las concentraciones de 500 71,56 mg·L<sup>-1</sup>, 1000 mg·L<sup>-1</sup> y 2000 mg·L<sup>-1</sup>. La cantidad de clorosis hallada mediante el programa ImageJ no permitió su posterior análisis.

La concentración efectiva media fue mayor cuando se utilizó el parámetro de frondas (NF), con 3383,54 mg·L<sup>-1</sup> aunque no hubo una variación significativa con respecto a la CE<sub>50</sub> del área (AF), el cual fue de 3313,51 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 18).

Tabla 18. Concentración Efectiva Media – EC<sub>50</sub> de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica.

| Parámetro                     | EC10    |         | EC50    |         |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                               | área    | fronda  | área    | fronda  |
| Estimación mg·L <sup>-1</sup> | 1992,01 | 2193,63 | 3313,51 | 3383,54 |
| Inferior 95%                  | 1457,67 | 1299,07 | 2872,47 | 2762,25 |
| Superior 95%                  | 2350,43 | 2697,61 | 4037,31 | 4627,03 |

Nota: Chi<sup>2</sup> área: 0,179; Chi<sup>2</sup> fronda: 0,104.

Al comparar el valor intermedio que existe entre los límites inferior y superior de las concentraciones halladas, se encuentra que cuando se utiliza el área se reduce la variación entre ambos límites.

## 6.4 Toxicidad aguda individual de la Rotenona

Al evaluar el efecto por exposición a las cinco concentraciones entre los 250 y 2000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  del ingrediente activo durante el ensayo final, se observó una mortalidad total en las dos concentraciones más altas ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a partir del cuarto día (lectura 96h), lo cual que sugiere una alta toxicidad del plaguicida (tabla 19).

Tabla 19. Producción de nuevas frondas y área total ( $\text{mm}^2$ ) de la macrofita *Lemna minor* expuesta al plaguicida rotenona según el día de lectura.

| Concentración<br>$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | día 4   |         | día 7   |         |
|--|---------|---------|---------|---------|
|  | frondas | área    | frondas | área    |
| 0  | 100     | 178,957 | 165     | 275,488 |
| 125  | 78      | 144,104 | 114     | 200,566 |
| 250  | 89      | 131,485 | 123     | 197,172 |
| 500  | 76      | 121,52  | 100     | 160,078 |
| 1000   | 59      | 117,473 | 59      | 117,473 |
| 2000   | 56      | 111,274 | 56      | 111,274 |

Por otro lado, la clorosis no guardó una relación de dependencia con las concentraciones utilizadas. En la siguiente tabla se muestran los resultados de la clorosis obtenida:

Tabla 20. Clorosis total en la fronda y el área ( $\text{mm}^2$ ) de la macrofita *Lemna minor* expuesta al plaguicida rotenona según el día de lectura.

| Concentración | día 4   |        | día 7   |        |
|---------------|---------|--------|---------|--------|
|               | frondas | área   | frondas | área   |
| 0             | 6       | 7,639  | 24      | 24,894 |
| 125           | 5       | 8,099  | 9       | 18,584 |
| 250           | 6       | 12,428 | 10      | 21,852 |
| 500           | 4       | 2,708  | 6       | 3,317  |
| 1000          | 4       | 5,073  | 2       | 2,594  |
| 2000          | 0       | 0      | 0       | 0      |

Caso contrario sucedió con la necrosis, cuyos valores guardaron relación con el nivel de concentración utilizado (tabla 21). En el caso de la concentración más alta (2000 mg·L<sup>-1</sup>), el área total corresponde a la cantidad de tejido necrótico. En la concentración de 1000 mg·L<sup>-1</sup> la necrosis fue predominante aunque hubo presencia de tejido vivo.

Tabla 21. Necrosis total en la fronda y el área (mm<sup>2</sup>) de la macrofita *Lemna minor* expuesta al plaguicida rotenona según el día de lectura.

| Concentración | día 4   |         | día 7   |         |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
|               | frondas | área    | frondas | área    |
| 0             | 2       | 1       | 7       | 11,305  |
| 125           | 0       | 0,7     | 3       | 9,681   |
| 250           | 3       | 3,855   | 6       | 17,268  |
| 500           | 4       | 9,891   | 6       | 12,166  |
| 1000          | 43      | 73,494  | 43      | 105,739 |
| 2000          | 55      | 109,425 | 56      | 111,274 |

En la siguiente figura se observa el comportamiento de las colonias sometidas a las diferentes concentraciones en dos intervalos de tiempo.

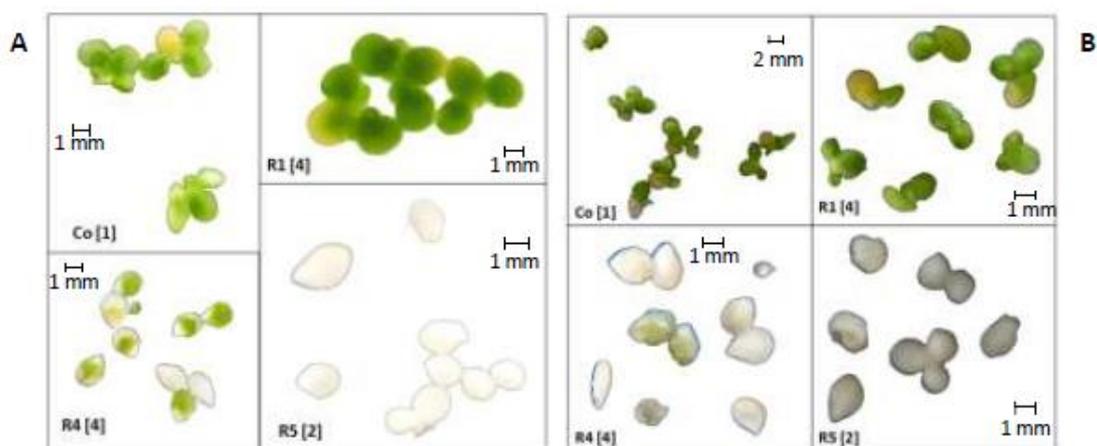


Figura 8. Número de frondas de *L. minor* expuesta al plaguicida rotenona durante las dos lecturas realizadas.

Co: Control; R1: 125 mg·L<sup>-1</sup>; R4: 1000 mg·L<sup>-1</sup> y R5: 2000 mg·L<sup>-1</sup>

A: Lectura a las 96h; B: Lectura a las 168 h.

Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

Además, en la figura mostrada se observa la presencia de clorosis en el control desde la segunda lectura, lo cual puede deberse al uso de agua destilada pura como medio para el ensayo. Asimismo, puede observarse que la mortalidad en la concentración de 1000 mg·L<sup>-1</sup> fue progresiva hasta alcanzar la necrosis total.

#### 6.4.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

En cuanto la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) del control, se encontraron diferencias entre el parámetro NF (0,160) y el parámetro AF (0,127), siendo el primer parámetro el que mostró mayor variación entre el dato control y la concentración más alta (tabla 22).

Este resultado fue similar en la inhibición del crecimiento, donde la medición a través de la fronda mostró mayor sensibilidad en la concentración más alta, con un 96,74% de inhibición de nuevas frondas frente al 84,61% de inhibición del área. El caso del peso húmedo (PH) fue menos sensible, mostrando un 77,53% de inhibición en la concentración más alta.

Tabla 22. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en la macrofita *Lemna minor* expuesta al plaguicida rotenona.

| C    | $\mu$ NF | % Ir NF | $\mu$ AF | % Ir AF | % Ir PH | % Ir CTC |
|------|----------|---------|----------|---------|---------|----------|
| 0    | 0,160    | -       | 0,127    | -       | -       | -        |
| 125  | 0,107    | 33,10   | 0,070    | 45,18   | 34,457  | 16,015   |
| 250  | 0,118    | 26,30   | 0,080    | 36,92   | 33,333  | 30,630   |
| 500  | 0,085    | 46,48   | 0,051    | 59,88   | 45,318  | 44,959   |
| 1000 | 0,013    | 92,07   | 0,018    | 85,89   | 66,292  | 90,300   |
| 2000 | 0,005    | 96,74   | 0,020    | 84,61   | 77,528  | *        |

C: Concentración en mg·L<sup>-1</sup>;  $\mu$ : tasa de crecimiento; Ir: Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF; Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila.

\*No se efectuó la medición de este dato.

#### 6.4.2. Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Al evaluar el parámetro NF como respuesta se encontró que, con excepción de los modelos Log-Logistic, Log-Probit y Weibull, todos los demás fueron favorables para el cálculo del BMD y el BMDL con los datos utilizados (tabla 23), siendo el modelo Quantal-Linear el escogido para la determinación de estos valores, los cuales fueron de 164,044 mg·L<sup>-1</sup> para BMD y 139,388 mg·L<sup>-1</sup> para el BMDL.

Tabla 23. Determinación de los valores BMD y BMDL (en mg·L<sup>-1</sup>) utilizando el parámetro NF como respuesta en los modelos dicotómicos (Rotenona; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $x^2$ | BMD     | BMDL    |
|----------------|------------|-------|---------|---------|
| Gamma          | 0          | 83,41 | 164,044 | 139,388 |
| Logistic       | 0,003      | 16,01 | 439,301 | 391,451 |
| Log-Logistic   | 0,845      | 0,99  | 650,913 | 545,821 |
| Log-Probit     | 0,8336     | 0,87  | 614,098 | 534,892 |
| Multistage     | 0,0001     | 24,67 | 349,131 | 316,22  |
| Probit         | 0,0002     | 22,37 | 394,433 | 350,809 |
| Weibull        | 0,8461     | 0,81  | 653,395 | 538,064 |
| Quantal-Linear | 0          | 83,41 | 164,044 | 139,388 |

Del mismo modo, el análisis del parámetro AF mostró valores de p adecuados en los modelos Logistic, Multistage, Probit y Quantal-Linear (tabla 24). Debido a que todos los modelos mencionados arrojaron valores de p semejantes se optó por escoger el modelo Quantal-Linear, que obtuvo el valor más alto en el  $x^2$ . Los valores obtenidos para BMD de 118,893 mg·L<sup>-1</sup> y para BMDL de 106,137 mg·L<sup>-1</sup>.

Por otro lado, se representan los valores de BMD y BMDL (figura 9) de manera gráfica. Se ha utilizado el modelo Quantal-Linear del parámetro AF, incluyendo además el valor de NOAEL con fines comparativos.

Tabla 24. Determinación de los valores BMD y BMDL (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizando el parámetro AF como respuesta en los modelos dicotómicos (Rotenona; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $\chi^2$ | BMD     | BMDL    |
|----------------|------------|----------|---------|---------|
| Gamma          | 0,3462     | 4,47     | 554,763 | 521,809 |
| Logistic       | 0          | 36,04    | 365,082 | 333,295 |
| Log-Logistic   | 0,3417     | 3,34     | 599,369 | 532,26  |
| Log-Probit     | 0,3443     | 3,32     | 580,781 | 527,634 |
| Multistage     | 0          | 57,09    | 289,697 | 269,097 |
| Probit         | 0          | 47,1     | 321,927 | 293,89  |
| Weibull        | 0,3501     | 3,28     | 622,917 | 537,346 |
| Quantal-Linear | 0          | 160,48   | 118,893 | 106,137 |

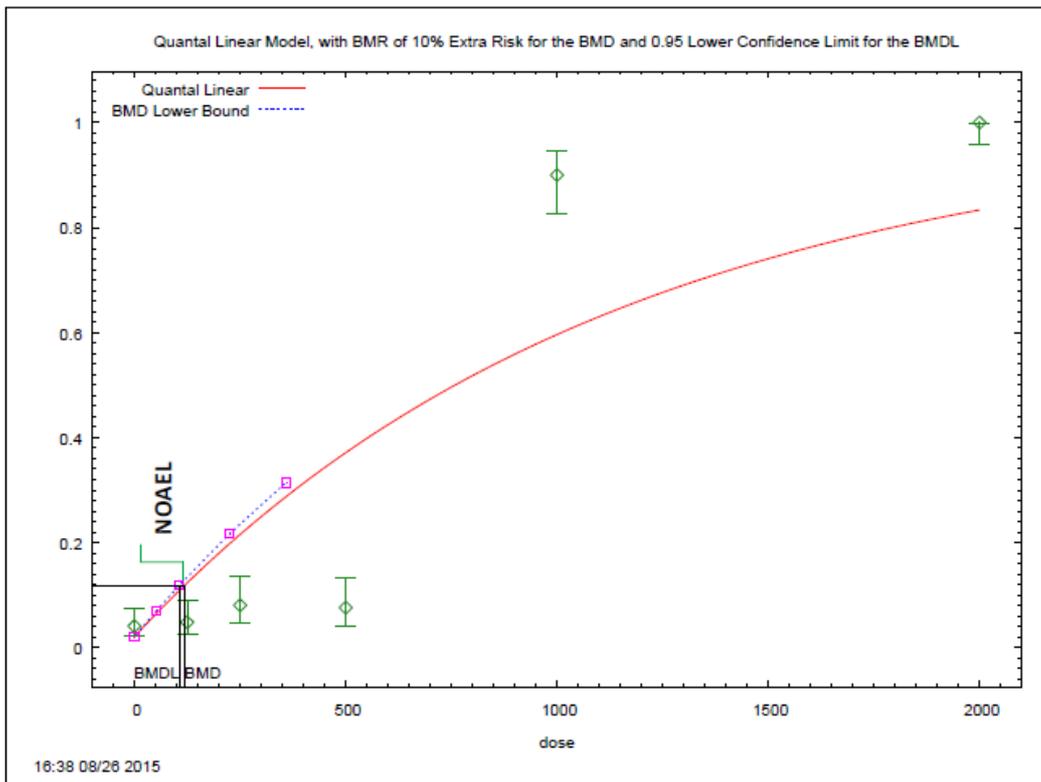


Figura 9. Curva de dosis-respuesta del modelo continuo Log-Logistic utilizando el parámetro AF y el área con necrosis como valores de respuesta para la determinación del BMD y BMDL.

### 6.4.3. Determinación de la CE<sub>50</sub> mediante el análisis Probit

Al estimar la concentración efectiva media para ambos parámetros (tabla 25) se observa una gran diferencia entre la EC<sub>50</sub> del área (769,034 mg·L<sup>-1</sup>) y la fronda (858,634 mg·L<sup>-1</sup>). Ello puede deberse al valor de  $x^2$  establecido para cada parámetro, siendo más alto en el área.

Tabla 25. Concentración Efectiva Media – EC<sub>50</sub> de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica.

| Parámetro                     | EC <sub>10</sub> |         | EC <sub>50</sub> |         |
|-------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
|                               | área             | fronda  | área             | fronda  |
| Estimación mg·L <sup>-1</sup> | 587,328          | 614,119 | 769,034          | 858,634 |
| Inferior 95%                  | 471,904          | 448,781 | 685,968          | 756,876 |
| Superior 95%                  | 664,008          | 710,388 | 827,784          | 937,071 |

Nota: Chi<sup>2</sup> del área: 3,757; Chi<sup>2</sup> de la fronda: 0.839

## 6.5 Toxicidad binaria de la Rotenona y el Metomilo

Al evaluar los parámetros de NF y AF se encontró que todas las concentraciones presentaron efectos similares al término del ensayo (tabla 26), donde la concentración más baja (B) tuvo una diferencia de 10 frondas con respecto a la concentración más alta (F) en el séptimo día. No obstante, el parámetro AF permitió observar una mayor variabilidad en ambas lecturas.

Tabla 26. Producción de nuevas frondas y área total (mm<sup>2</sup>) de la macrofita *Lemna minor* expuesta a la mezcla de los plaguicidas metomilo y rotenona según el día de lectura.

| Concentración en mg·L <sup>-1</sup> |      |      | día 4   |         | día 7   |         |
|-------------------------------------|------|------|---------|---------|---------|---------|
| Den.                                | Met. | Rot. | frondas | área    | frondas | área    |
| A                                   | 0    | 0    | 65      | 172,968 | 103     | 267,323 |
| B                                   | 250  | 125  | 55      | 183,97  | 65      | 201,013 |
| C                                   | 500  | 250  | 57      | 178,064 | 60      | 188,219 |
| D                                   | 1000 | 500  | 54      | 165,505 | 57      | 179,126 |
| E                                   | 2000 | 1000 | 55      | 164,656 | 55      | 164,656 |
| F                                   | 4000 | 2000 | 55      | 170,875 | 55      | 170,875 |

Den.: Denominación de la concentración; Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona

La incidencia de la clorosis fue poco pronunciada y estuvo ausente en las dos concentraciones más altas (tabla 27). Además, se evidencia la reducción de la clorosis total en la concentración C, lo que puede deberse a un aumento de la necrosis en dicha concentración. La misma situación se da con el control (figura 7).

Tabla 27. Clorosis total en la fronda y el área (mm<sup>2</sup>) de la macrofita *Lemna minor* expuesta a la mezcla de los plaguicidas metomilo y rotenona según el día de lectura.

| Concentración en mg·L <sup>-1</sup> |      |      | día 4   |       | día 7   |       |
|-------------------------------------|------|------|---------|-------|---------|-------|
| Den.                                | Met. | Rot. | frondas | área  | frondas | área  |
| A                                   | 0    | 0    | 3       | 7,030 | 0       | 0     |
| B                                   | 250  | 125  | 2       | 4,420 | 4       | 5,933 |
| C                                   | 500  | 250  | 2       | 8,848 | 4       | 0     |
| D                                   | 1000 | 500  | 2       | 2,890 | 0       | 0,346 |
| E                                   | 2000 | 1000 | 0       | 0     | 0       | 0     |
| F                                   | 4000 | 2000 | 0       | 0     | 0       | 0     |

Den.: Denominación de la concentración; Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona

En este ensayo se observó que se tornaron cloróticas al cuarto día se tornaron necróticas para el séptimo día (fig. 8). A continuación se muestra el comportamiento de las colonias de una repetición del control:

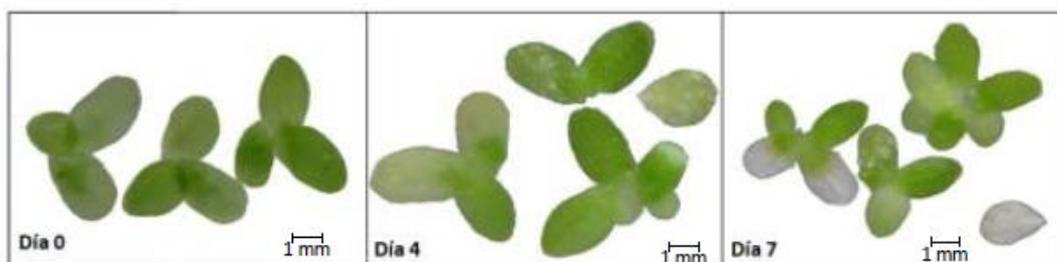


Figura 10. Efectos fitotóxicos en el control.

Repetición n°6

Por otro lado, la necrosis tuvo un gran efecto en todas las concentraciones empleadas, existiendo un aumento desde el día al día 7 (segunda lectura). En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en cada concentración.

Tabla 28. Necrosis total en la fronda y el área total ( $\text{mm}^2$ ) de la macrofito *Lemna minor* expuesta a la mezcla de los plaguicidas metomilo y rotenona según el día de lectura.

| Concentración en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |      |      | día 4   |         | día 7   |         |
|--|------|------|---------|---------|---------|---------|
| Den.   | Met. | Rot. | frondas | área    | frondas | área    |
| A  | 0    | 0    | 2       | 4,251   | 10      | 28,531  |
| B  | 250  | 125  | 3       | 16,894  | 20      | 55,353  |
| C  | 500  | 250  | 4       | 15,525  | 27      | 83,33   |
| D  | 1000 | 500  | 19      | 31,740  | 39      | 126,41  |
| E  | 2000 | 1000 | 36      | 97,789  | 54      | 164,656 |
| F  | 4000 | 2000 | 41      | 107,358 | 55      | 170,875 |

Den.: Denominación de la concentración; Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona.

En la figura 9 se observa que la concentración F tiene un color distinto a la concentración de E a pesar de que ambos son tejidos necróticos. Ello puede deberse a que la cantidad de tóxico empleado podría inducir a una degeneración de la fronda.

La respuesta de la concentración más baja (B) fue similar a la respuesta del control, el cual no presentó efectos fitotóxicos pronunciados. No obstante, se destaca que la producción de nuevas frondas tanto para el grupo control como para las demás concentraciones fue muy limitada hasta el cuarto día de iniciado el ensayo.

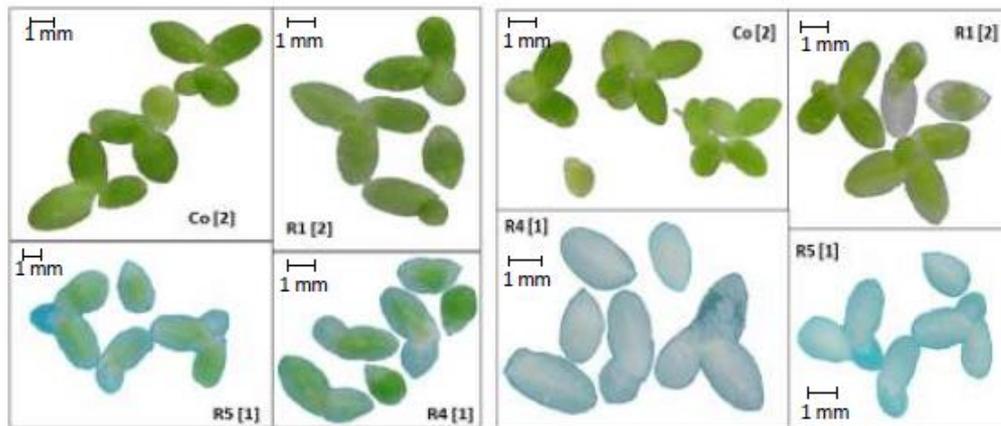


Figura 11. Efectos fitotóxicos de la mezcla binaria en *Lemna minor* a las 96 y 168 h.

Co: Control; R1: B  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; R4: E  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y R5: F  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

A: Lectura a las 96h; B: Lectura a las 168 h.

Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

### 6.5.1. Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

La tasa de crecimiento se redujo drásticamente en todas las concentraciones y los dos parámetros evaluados (tabla 29), existiendo una diferencia de 0,089 puntos entre el control y la menor concentración utilizada (B) para el parámetro NF y 0,078 puntos para el parámetro AF.

Respecto a la inhibición del crecimiento, los valores son similares en el parámetro NF y AF, superando el 90% en ambos a partir de la concentración D para el primer parámetro y desde la concentración C para el segundo.

No obstante, el parámetro CTC refleja una mayor correlación con la concentración utilizada, existiendo una inhibición del 39,691% en la menor concentración (B) y una inhibición del 93,718% en la concentración más alta (F). Por otro lado, el parámetro PH muestra una inhibición similar en todas las concentraciones.

Tabla 29. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en la macrofita *Lemna minor* expuesta al mezcla de plaguicidas metomilo y rotenona.

| Concentración en mg·L <sup>-1</sup> |      |      |       |         | % Ir  |        | % Ir    |        |
|-------------------------------------|------|------|-------|---------|-------|--------|---------|--------|
| Den.                                | Met. | Rot. | μ NF  | % Ir NF | μ AF  | AF     | % Ir PH | CTC    |
| A                                   | 0    | 0    | 0,092 | -       | 0,080 | -      | -       | -      |
| B                                   | 250  | 125  | 0,026 | 71,288  | 0,013 | 83,660 | 59,552  | 39,691 |
| C                                   | 500  | 250  | 0,015 | 83,684  | 0,006 | 93,004 | 70,740  | 56,839 |
| D                                   | 1000 | 500  | 0,008 | 91,627  | 0,007 | 91,722 | 61,446  | 61,331 |
| E                                   | 2000 | 1000 | 0,003 | 97,158  | 0,002 | 97,722 | 69,793  | 90,072 |
| F                                   | 4000 | 2000 | 0,003 | 97,158  | 0,002 | 97,894 | 75,215  | 93,718 |

Den.: Denominación de la concentración; Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona; C: Concentración en mg·L<sup>-1</sup>; μ: tasa de crecimiento; Ir: Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF: Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila.

#### 6.5.2. Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Al evaluar el parámetro NF se encontró que el modelo Log-Logistic fue el que mejor respondió a los datos analizados (Tabla 30). En el caso del metomilo, el valor de BMD calculado fue de 210,053 mg·L<sup>-1</sup>, mientras que el BMDL fue de 139,127 mg·L<sup>-1</sup>. En contraste con este plaguicida, la rotenona presentó un nivel de BMD y BMDL inferior, situándose en 105,017 mg·L<sup>-1</sup> y 69,5635 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabla 30. Determinación de los valores BMD y BMDL (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizando el parámetro NF y las frondas necróticas como respuesta en los modelos dicotómicos (Mezcla binaria; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $X^2$ | Metomilo |         | Rotenona |         |
|----------------|------------|-------|----------|---------|----------|---------|
|                |            |       | BMD      | BMDL    | BMD      | BMDL    |
| Gamma          | 0,0136     | 10,67 | 159,754  | 87,303  | 79,8768  | 43,6515 |
| Logistic       | 0,0661     | 8,81  | 207,202  | 177,911 | 103,601  | 88,9554 |
| Log-Logistic   | 0          | 23,64 | 210,053  | 139,127 | 105,017  | 69,5635 |
| Log-Probit     | 0,0002     | 20,17 | 206,87   | 141,725 | 103,437  | 70,8625 |
| Multistage     | 0,1473     | 5,36  | 131,965  | 88,9847 | 65,9825  | 44,4923 |
| Probit         | 0,2123     | 5,83  | 200,075  | 173,874 | 100,037  | 86,937  |
| Weibull        | 0,0433     | 8,14  | 156,426  | 92,8177 | 78,2129  | 46,4089 |
| Quantal-Linear | 0,0001     | 23,34 | 85,2518  | 72,0494 | 42,6259  | 36,0247 |

Asimismo, en el parámetro AF se evidenció una respuesta favorable en tres modelos, destacando el modelo de Log-Logistic para el cálculo de los valores de BMD y BMDL (Tabla 31). En el plaguicida metomilo dichos valores se situaron en  $258,476 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $205,657 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente; en el caso del plaguicida rotenona estos valores fueron de  $129,236 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $102,829 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Tabla 31. Determinación de los valores BMD y BMDL (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizando el parámetro AF como respuesta en los modelos dicotómicos (Mezcla binaria; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $X^2$ | Metomilo |         | Rotenona |         |
|----------------|------------|-------|----------|---------|----------|---------|
|                |            |       | BMD      | BMDL    | BMD      | BMDL    |
| Gamma          | 0,0136     | 10,67 | 206,685  | 156,093 | 103,343  | 78,0464 |
| Logistic       | 0,0661     | 8,81  | 202,554  | 185,448 | 101,277  | 92,7242 |
| Log-Logistic   | 0          | 23,64 | 258,476  | 205,657 | 129,236  | 102,829 |
| Log-Probit     | 0,0002     | 20,17 | 250,086  | 202,617 | 125,042  | 101,308 |
| Multistage     | 0,1473     | 5,36  | 168,511  | 126,717 | 84,2553  | 63,3586 |
| Probit         | 0,2123     | 5,83  | 192,29   | 177,16  | 96,1448  | 88,5798 |
| Weibull        | 0,0433     | 8,14  | 202,748  | 155,001 | 101,374  | 77,5004 |
| Quantal-Linear | 0,0001     | 23,34 | 83,7998  | 76,0284 | 41,8999  | 38,0142 |

En la figura 12 se realiza una comparación del NOAEL versus el valor de BMDL. Se ha utilizado el modelo continuo Log-Logistic del parámetro AF con las concentraciones empleadas del plaguicida metomilo durante la mezcla binaria.

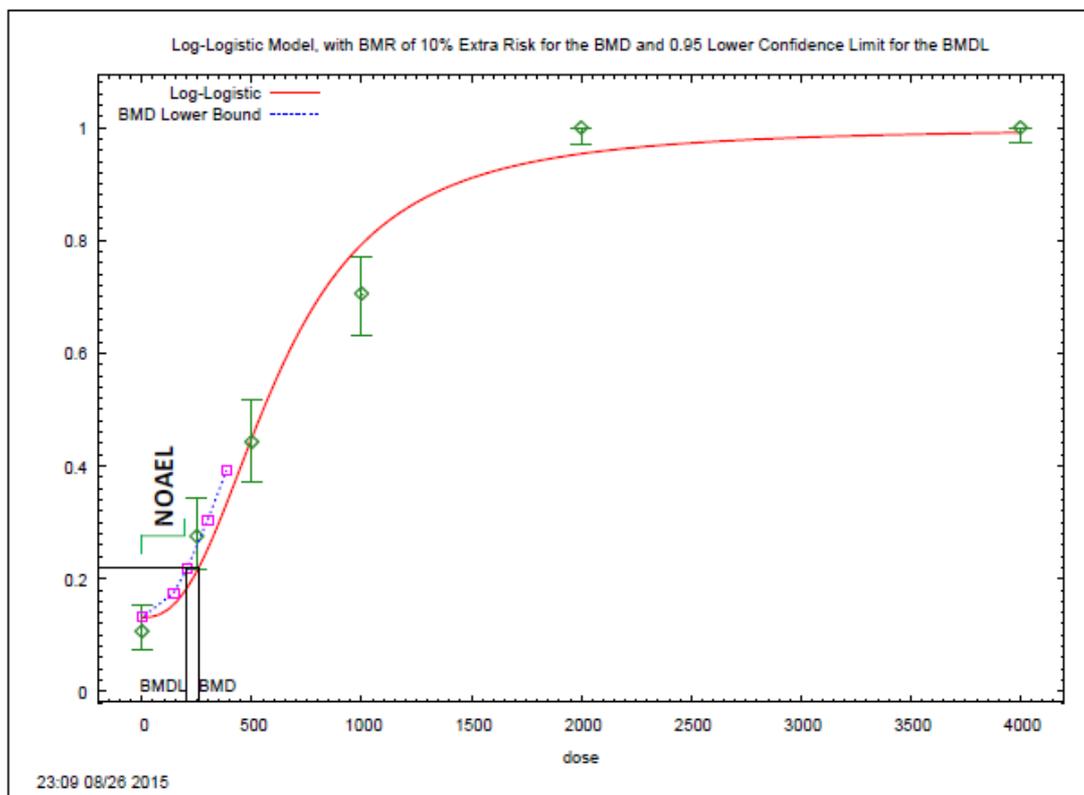


Figura 12. Curva dosis-respuesta del modelo continuo Multistage utilizando el parámetro AF como valor de respuesta para la determinación del BMD y BMDL.

### 6.5.3. Determinación de la CE<sub>50</sub> mediante el análisis Probit

Con respecto a la concentración efectiva media, el parámetro NF presentó una menor variación entre el límite inferior y superior frente al parámetro AF (Tabla 32). Para el caso del primer parámetro, se estimó una CE<sub>50</sub> de 587,723 mg·L<sup>-1</sup> (metomilo) y 293,863 mg·L<sup>-1</sup> (rotenona) la cual fue ligeramente menor que la CE<sub>50</sub> estimada para el parámetro AF: 616,021 mg·L<sup>-1</sup> (metomilo) y 308,004 mg·L<sup>-1</sup> (rotenona).

Tabla 32. Concentración Efectiva Media – EC<sub>50</sub> de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica.

| Parámetro                     | EC <sub>50</sub> Met |         | EC <sub>50</sub> Rot |         |
|-------------------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|
|                               | área                 | fronda  | área                 | fronda  |
| Estimación mg·L <sup>-1</sup> | 616,021              | 587,723 | 308,004              | 293,863 |
| Inferior 95%                  | 279,824              | 467,677 | 139,922              | 233,84  |
| Superior 95%                  | 942,617              | 710,271 | 471,305              | 355,136 |

Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona. Chi<sup>2</sup> del área Met: 19,281; Chi<sup>2</sup> de la fronda Met: 6,477; Chi<sup>2</sup> de la fronda Rot: 6,477, Chi<sup>2</sup> del área Rot: 19,283.

#### 6.5.4. Determinación del efecto sinérgico

Se utilizó el modelo de Concentración – Adición para determinar el efecto causado por la mezcla de ambos plaguicidas. Para ello, la CE<sub>50</sub> estimada se obtuvo de la suma de las concentraciones efectivas medias halladas en los ensayos de toxicidad individual.

Para el parámetro NF ambos plaguicidas mostraron valores de CA mayores a 1, lo cual indica un efecto sinérgico (tabla 33). Dicho efecto, es mayor en la rotenona que en el metomilo puesto que en el primer plaguicida se registran valores más elevados de CA.

Tabla 33. Concentración Efectiva Media estimada y experimental del parámetro NF para el cálculo del valor concentración-adición.

| Parámetro                     | CE <sub>50</sub> estimada | CE <sub>50</sub> experimental |        | CA   |       |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------|------|-------|
|                               |                           | Met.                          | Rot.   | Met. | Rot.  |
| Estimación mg·L <sup>-1</sup> | 4242,17                   | 587,72                        | 293,86 | 7,22 | 14,44 |
| Inferior 95%                  | 3519,13                   | 467,68                        | 233,84 | 7,52 | 15,05 |
| Superior 95%                  | 5564,10                   | 710,27                        | 355,14 | 7,83 | 15,67 |

Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona; CA: Concentración-adición.

Lo mismo sucede al analizar el parámetro AF para determinar el valor de CA (Tabla 34), donde se destaca la alta variación de dicho valor para el plaguicida rotenona.

Tabla 34. Concentración Efectiva Media estimada y experimental del parámetro AF para el cálculo del valor concentración-adición.

| Parámetro                     | CE <sub>50</sub><br>estimada | CE <sub>50</sub><br>experimental |        | CA    |       |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------|-------|-------|
|                               |                              | Met.                             | Rot.   | Met.  | Rot.  |
| Estimación mg·L <sup>-1</sup> | 4082,54                      | 616,02                           | 308,00 | 6,63  | 13,25 |
| Inferior 95%                  | 3558,44                      | 279,82                           | 139,92 | 12,72 | 25,43 |
| Superior 95%                  | 4865,09                      | 942,62                           | 471,31 | 5,16  | 10,32 |

Met.: Metomilo; Rot.: Rotenona; CA: Concentración-adición.

Empleo de los valores del Método Punto de Referencia para la determinación de la concentración efectiva

Debido a que el cálculo de los valores de BMD y BMDL son novedosos en su aplicación para estudios con *L. minor*, se utilizaron dos métodos para el análisis de los parámetros NF y AF.

En el primer método, aplicado en el presente estudio, se consideró como dato la suma de todos los resultados obtenidos en una misma concentración para calcular los valores de BMD y BMDL (método A). Por otro lado, en el método B se consideró cada dato como el promedio de las respuestas de cada concentración.

La diferencia entre ambos métodos fue notoria en todos los ensayos analizados puesto que en el método B muchos de los valores de p fueron superiores a 0,005. Por ejemplo, en el parámetro AF del ensayo de toxicidad binaria, se encontró que ningún modelo fue adecuado cuando se empleó el método B (tabla 35).

Tabla 35. Valores BMD y BMDL (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizando como dato al promedio de las respuestas por cada concentración en el parámetro AF (Metomilo; lectura 168 h).

| Modelo         | valor de p | $X^2$ | BMD     | BMDL    |
|----------------|------------|-------|---------|---------|
| Gamma          | 0,6766     | 1,52  | 155,017 | 65,5913 |
| Logistic       | 0,8685     | 1,26  | 151,915 | 120,31  |
| Log-Logistic   | 0,3371     | 3,38  | 193,854 | 104,284 |
| Log-Probit     | 0,4102     | 2,88  | 187,563 | 105,843 |
| Multistage     | 0,8577     | 0,77  | 126,383 | 64,6775 |
| Probit         | 0,934      | 0,83  | 144,217 | 116,266 |
| Weibull        | 0,762      | 1,16  | 152,062 | 70,3441 |
| Quantal-Linear | 0,5036     | 3,33  | 62,8499 | 48,8467 |

En todos los ensayos analizados ambos métodos arrojaron el mismo modelo de regresión (tabla 36), destacando el hecho de que en el método B los valores de  $x^2$  fueron inferiores que en el método A.

Tabla 36. Valores BMD y BMDL (en  $\text{m}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el parámetro AF según el método empleado.

| Ensayo        | Modelo         | Método | Valor de p | $X^2$  | BMD     | BMDL    |
|---------------|----------------|--------|------------|--------|---------|---------|
| Rot           | Quantal-Linear | A      | 0          | 160,48 | 118,893 | 106,137 |
|               |                | B      | 0,0047     | 15,01  | 87,048  | 62,721  |
| Met           | Quantal-Linear | A      | 0          | 145,96 | 525,915 | 431,088 |
|               |                | B      | 0          | 30,63  | 1323,99 | 899,338 |
| Mezcla<br>Met | Log-Logistic   | A      | 0          | 23,64  | 629,513 | 564,828 |
|               |                | B      | 0,3371     | 3,38   | 629,507 | 475,737 |
| Mezcla<br>Rot | Log-Logistic   | A      | 0          | 23,64  | 314,754 | 282,414 |
|               |                | B      | 0,3371     | 3,38   | 314,753 | 237,868 |

Rot: rotenona; Met: Metomilo; Mezcla: Toxicidad binaria de ambos plaguicidas. A: promedio de las respuestas obtenidas en cada concentración; B: suma de las respuestas obtenidas en cada concentración.

Asimismo, los valores de BMDL tienen una gran variación en los ensayos de toxicidad individual. Caso contrario sucede en el ensayo de toxicidad binaria, donde los valores obtenidos para BMD son similares en ambos métodos.

Por otro lado, el valor de BMD utilizado en el presente estudio se calculó con un 10% de respuesta del efecto observado (necrosis), por lo que puede compararse con la concentración efectiva al 10% - EC<sub>10</sub> obtenido del análisis Probit durante el cálculo de la concentración efectiva media. Al realizar esta comparación en el parámetro AF, se observa que el valor de BMD se encuentra entre los límites superior e inferior en el ensayo de toxicidad binaria (tabla 37).

Tabla 37. Valores de la EC<sub>10</sub> y del BMD (en mg·L<sup>-1</sup>) en el parámetro AF de los ensayos analizados.

|                            | Met     | Rot     | Mezcla Met | Mezcla Rot |
|----------------------------|---------|---------|------------|------------|
| EC <sub>10</sub>           | 1992,01 | 587,328 | 249,935    | 124,204    |
| EC <sub>10</sub> lim. inf. | 1457,67 | 471,904 | 33,086     | 23,418     |
| EC <sub>10</sub> lim. sup. | 2350,43 | 664,008 | 442,250    | 211,500    |
| BMD                        | 525,915 | 118,893 | 258,476    | 129,236    |

EC<sub>10</sub>: Concentración efectiva al 10%; lim. sup.: límite superior; lim. inf.: límite inferior; Met: Metomilo; Rot: Rotenona.

El valor de BMD también puede ser utilizado para el cálculo de la CE<sub>50</sub> si es que se modifica el valor de respuesta al 50%. Por ello, se utilizó el modelo dicotómico del programa estadístico BMDS<sup>®</sup> (tabla 38). Al comparar los valores de BMD<sub>50</sub> con los valores de CE<sub>50</sub> obtenidos mediante el análisis Probit se observa una variación significativa en el ensayo de toxicidad individual con el plaguicida metomilo.

Tabla 38. Estimación de la CE<sub>50</sub> (en mg·L<sup>-1</sup>) utilizando el paquete estadístico BMDS®.

| Ensayo      | Modelo         | Parámetro | valor de p | X <sup>2</sup> | CE <sub>50</sub> |
|-------------|----------------|-----------|------------|----------------|------------------|
| Rot         | Quantal-Linear | NF        | 0          | 83,41          | 1079,22          |
|             |                | AF        | 0          | 160,48         | 782,173          |
| Met         | Quantal-Linear | NF        | 0          | 89,92          | 7147,42          |
|             |                | AF        | 0          | 145,96         | 6919,79          |
| Mezcla Met. | Log-Logistic   | NF        | 0,0486     | 7,88           | 597,904          |
|             |                | AF        | 0          | 23,64          | 629,513          |
| Mezcla Rot. | Log-Logistic   | NF        | 0,0486     | 7,88           | 298,93           |
|             |                | AF        | 0          | 23,64          | 314,754          |

Rot: rotenona; Met: Metomilo; Mezcla: Toxicidad binaria de ambos plaguicidas. NF: número de frondas; AF: Área de frondas.

Por ejemplo, los valores de CE<sub>50</sub> calculados mediante el análisis Probit para los parámetros AF y NF en el plaguicida metomilo fueron de 3313,51 mg·L<sup>-1</sup> y 3383,54 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente (tabla 18). Mientras que los valores de CE<sub>50</sub> para el mismo plaguicida y calculados mediante el análisis del paquete estadístico BMDS® se ubican por encima del límite superior (tabla 39).

Tabla 39. Valores comparados de la EC<sub>50</sub> (en mg·L<sup>-1</sup>) con los programas estadísticos Probit y BMDS® utilizando el parámetro AF.

|                            | Met.    | Rot.    | Mezcla Met. | Mezcla Rot. |
|----------------------------|---------|---------|-------------|-------------|
| EC <sub>50</sub>           | 3313,51 | 769,034 | 615,842     | 301,162     |
| EC <sub>50</sub> lim. inf. | 2872,47 | 685,968 | 279,796     | 154,125     |
| EC <sub>50</sub> lim. sup. | 4037,31 | 827,784 | 942,346     | 444,313     |
| EC <sub>50</sub> (BMD)     | 6919,79 | 782,173 | 629,513     | 314,754     |

EC<sub>50</sub>: Concentración efectiva al 50%; lim. sup.: límite superior; lim. inf.: límite inferior; Met: Metomilo; Rot.: Rotenona

Con respecto al efecto sinérgico, pudo comprobarse el resultado obtenido en el modelo de Concentración-Adición al reemplazar los valores por la EC<sub>50</sub> por los valores de BMD<sub>50</sub> del programa BMDS<sup>®</sup>, no encontrando diferencias significativas para el resultado de la CA en el parámetro AF (tabla 40).

Tabla 40. Comparación de los valores de la Concentración Adición (CA) entre (en mg·L<sup>-1</sup>) con los programas estadísticos Probit y BMDS<sup>®</sup>. Parámetro AF.

| Parámetro                 | CE <sub>50</sub><br>estimada | CE <sub>50</sub><br>experimental |         | CA    |       |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------|-------|-------|
|                           |                              | Met.                             | Rot.    | Met.  | Rot.  |
| EC <sub>50</sub> (BMD)    | 7701,963                     | 629,513                          | 314,754 | 12,23 | 24,46 |
| EC <sub>50</sub> (Probit) | 4082,54                      | 616,02                           | 308,00  | 6,63  | 13,25 |

**Met.:** Metomilo; **Rot.:** Rotenona; **CA:** Concentración-adición.

Una situación similar sucedió con el parámetro NF (tabla 41). En ambos parámetros se observa que el valor de CA es mayor cuando se utiliza el valor de BMD como cálculo para la EC<sub>50</sub>.

Tabla 41. Comparación de los valores de la Concentración Adición (CA) entre (en mg·L<sup>-1</sup>) con los programas estadísticos Probit y BMDS<sup>®</sup>. Parámetro NF.

| Parámetro                 | CE <sub>50</sub><br>estimada | CE <sub>50</sub><br>experimental |         | CA    |       |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------|-------|-------|
|                           |                              | Met.                             | Rot.    | Met.  | Rot.  |
| EC <sub>50</sub> (BMD)    | 8226,64                      | 597,904                          | 298,93  | 13,76 | 27,52 |
| EC <sub>50</sub> (Probit) | 4242,174                     | 587,723                          | 293,863 | 7,22  | 14,44 |

**Met.:** Metomilo; **Rot.:** Rotenona; **CA:** Concentración-adición.

De este modo, pudo comprobarse el efecto sinérgico causado por la interacción de los plaguicidas metomilo y rotenona.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Condiciones del ensayo

El análisis de los resultados debe abordarse considerando las diversas variables que confluyen en la realización de un ensayo. En este caso, la primera variable a tomar en cuenta es la clase de agua utilizada en los ensayos de toxicidad individual.

En el presente estudio se realizaron dos ensayos de toxicidad individual por cada plaguicida utilizado. Tanto para el caso del metomilo y la rotenona, en el primer ensayo se consideró el empleo de agua destilada (AD) como medio mientras que en el segundo ensayo se utilizó agua embotella Cielo<sup>®</sup> (AC). De este modo, los resultados serían discriminados y analizados por grupos (AD versus AC). No obstante, una indagación previa de las respuestas obtenidas reveló que solo un ensayo por cada plaguicida presentó una consistencia adecuada para su análisis.

En el caso del metomilo fue el ensayo en donde se utilizó agua Cielo<sup>®</sup> y, en el caso de la rotenona, el ensayo donde se utilizó agua destilada como medio. Por ello, una de las características más notorias en los resultados mostrados en el capítulo anterior fue la cantidad de frondas producidas en el ensayo donde se empleó agua Cielo<sup>®</sup> (metomilo), la cual fue mayor al ensayo donde se empleó agua destilada (rotenona).

La diferencia radica en el tipo y calidad de agua empleada. Por ejemplo se sabe que una concentración adecuada de calcio y magnesio en el medio promueve una óptima absorción de sales, traduciéndose en el crecimiento de la planta (Stiles & Jörgensen, 1914). Considerando que el agua destilada carece de cualquier tipo de minerales, era esperable que los parámetros de NF y AF presentaran un mayor aumento en aquellos ensayos donde se empleó agua Cielo como medio<sup>®</sup> (tabla 10), deduciendo que el agua empleada fue un factor determinante en la cantidad obtenida en ambos parámetros.

Por otro lado, una de las ventajas de utilizar a la macrofita *Lemna* como un organismo evaluador, es la presencia de signos de fitotoxicidad (necrosis y clorosis), los cuales son visibles y fáciles de registrar. Se destaca que en el ensayo donde se utilizó agua destilada como medio (rotenona), se acentuaron dichos signos de fitotoxicidad en el grupo control (necrosis: 11,305 mm<sup>2</sup>; clorosis: 24,894 mm<sup>2</sup>).

Merrill (1915) ya discutía sobre los efectos de utilizar agua destilada en organismos acuáticos, los cuales simulaban a la toxicidad. Entre los factores que menciona el autor, se encuentra la ausencia de calcio como un rol fundamental para el correcto metabolismo de la planta. Asimismo, la falta de nutrientes esenciales conduce al deterioro de la planta, tal como se evidencia en los resultados. Otro de los efectos registrados por el uso de agua destilada fue identificado por Halaban & Hillman (1970), quienes reportan la inhibición de la floración en la macrofita *Lemna perpusilla* (Torrey, 1843).

El efecto causado por el uso de agua destilada y agua Cielo<sup>®</sup> no parece estar relacionado con la cantidad utilizada por cada unidad de ensayo (50 mL), aún cuando la OECD (2006) recomienda un mínimo de 100 mL para dichas unidades. No obstante, debe considerarse este factor para futuras pruebas.

Otra variable que influye en el crecimiento de *Lemna* es la intensidad de luz utilizada para los ensayos. Aún cuando la OECD (2006) estableció un rango que oscila entre los 6500 a 10000 lux para asegurar una máxima producción de frondas. En el presente estudio la intensidad de luz fue de 3556,5 lux (equivalente a 48,013  $\mu\text{m}^2\text{S}^{-1}$ ). Como ello afectaría al crecimiento teórico esperado, se optó por someter el cultivo y los ensayos a un fotoperiodo de 24:0 horas luz:oscuridad.

Yin *et al.* (2015) reportan un aumento de la densidad poblacional en la macrofita *Lemna aequinoctialis* (Welwitsch, 1860) cuando fue sometida a un fotoperiodo de 24:0 h luz:oscuridad y a intensidades de luz de 20, 50, 80 y 110  $\mu\text{m}^2\text{S}^{-1}$ , siendo la última la que produjo mejores resultados.

Debido a que la intensidad utilizada se encuentra dentro del rango que promueve un óptimo desarrollo de nuevas frondas en *Lemna*, se asume que esta variable no causa un efecto adverso en el crecimiento de las frondas.

No obstante, se observó que en el ensayo de toxicidad binaria la producción de nuevas frondas fue escasa en el grupo control, aún cuando se empleó agua Cielo<sup>®</sup> por lo que deben considerarse otros factores que influyeron en dicho resultado.

Si bien se utilizó una cámara de cultivo en todos los ensayos, esta no provee el aislamiento necesario, quedando sometida a factores ambientales (luz, temperatura y humedad). Por ello, el ambiente donde se encontraba fue fundamental para controlar estos parámetros. No obstante, el ensayo de toxicidad binaria se realizó en un ambiente distinto a las pruebas de toxicidad individual, por lo que puede haberse producido un efecto negativo en el cultivo madre y sus colonias al no haber considerado un tiempo de adaptación para el nuevo ambiente.

## **7.2 Inhibición del crecimiento**

Durante el análisis se descartó el uso de agua destilada como un efecto causal de la sensibilidad de los parámetros utilizados para medir la inhibición del crecimiento; ello se estableció al comparar los parámetros de inhibición en los cuatro ensayos de toxicidad individual realizados. Tal es el caso del contenido total de clorofila – CTC (tabla 11), donde se muestra que los ensayos escogidos para el análisis del capítulo anterior presentaron una mayor inhibición cuando se sometieron a concentraciones más elevadas del tóxico.

Se observa que los valores obtenidos en los ensayos descartados (Metomilo AD y Rotenona AC) no necesariamente responden a la concentración empleada. Por ejemplo, los resultados de la inhibición de clorofila en el ensayo de rotenona con agua Cielo<sup>®</sup> mostraron poca variación en todas las concentraciones empleadas, impidiendo su utilización para establecer el valor de la concentración efectiva media.

Los demás parámetros utilizados para medir la inhibición del crecimiento varían en cuanto a sensibilidad, siendo el menos específico el peso húmedo (PH) y el más específico el contenido total de clorofila para todos los ensayos. Asimismo, la producción de nuevas frondas (NF) mostró gran sensibilidad para los ensayos de toxicidad individual; aunque Valenzuela (2013), en un estudio realizado en *Lemna valdiviana* (Philippi, 1864), ubica al parámetro NF y PH como los menos sensibles para determinar la inhibición del crecimiento.

Se concuerda con el autor en cuanto al parámetro PH, el cual tiene un gran riesgo de variación según el protocolo que se emplee para el pesado de las concentraciones. En este estudio, no se estableció un protocolo para efectuar dichos cálculos, siendo necesaria una estandarización del proceso para futuros ensayos.

Por otro lado, el parámetro del área de la fronda (AF) mostró mayor sensibilidad en el estudio de la mezcla binaria, seguido por el parámetro NF y CTC respectivamente. Este resultado se debe a una mejor interacción del autor con la interfaz del programa Image J<sup>®</sup>, el cual amplía las posibilidades en el estudio de las imágenes digitales. Abràmoff, Magalhaes & Ram (2014) mencionan que este software (de código abierto) es utilizado para el análisis de imágenes biomédicas, aunque recientemente se han incorporado investigaciones con la macrofita *Lemna sp* (Hrušková, 2012; Valenzuela, 2013; Van Hoeck *et al.*, 2015, entre otros).

Debido a que las investigaciones con este programa son escasas en el área de toxicología utilizando la macrofita *Lemna sp*, aún no se han establecido parámetros de medición específicos para detectar el área necrótica y clorótica, quedando a la libre interpretación del investigador.

Tangou *et al.*, (2013) utilizaron el software Image Pro-Plus<sup>®</sup> para el análisis fotográfico de *L. minor*. En este estudio, establecen ciertas pautas para optimizar el análisis de las fotografías, donde se destaca el hecho de mantener una misma distancia entre la cámara y las lentejitas de agua para la toma de fotografías, pauta que no fue considerada en este estudio.

De este modo, estandarizaron el reconocimiento del color a diferentes intensidades de RGB (Red-Green-Blue) y clasificaron al tejido vivo y necrótico entre rangos de 100 a 255 y de 200 a 255, respectivamente. No obstante, el reconocimiento de la intensidad de color dependió de los investigadores.

Aunque existen programas especializados para la determinación del área y del porcentaje de clorosis y necrosis (Eberius, 2001), el uso de programas gratuitos para el análisis de imágenes otorga a cualquier investigador la posibilidad de incrementar la especificidad de sus datos, por lo que una estandarización en la metodología se vuelve imprescindible.

### **7.3 Empleo de los valores del Método Punto de Referencia**

Tradicionalmente se han utilizado los valores del nivel de efecto no observable (NOAEL) y bajo nivel de efecto observable (LOAEL) para determinar el riesgo de la sustancia estudiada y su efecto crítico (Barlow et al., 2009). Sin embargo, el uso del punto de referencia (BMD) y el nivel por debajo del punto de referencia (BMDL) son científicamente más avanzados que el método de NOAEL, el cual sólo deriva de los datos obtenidos y no considera la relación existente en la curva de la dosis y la respuesta.

El paquete estadístico utilizado para el cálculo de estos valores cuenta con varios modelos y su utilización varía según la especie y el tipo de estudio realizado. Asimismo, el punto de referencia se ha utilizado en diferentes áreas de la toxicología, la medicina y farmacología por lo que su aplicación está ampliamente difundida en otras áreas. No obstante, la aplicación del modelo en la macrofita *Lemna sp* aún es novedosa y carece de un protocolo estandarizado.

La decisión de utilizar el modelo dicotómico responde a la factibilidad de relacionar dos variables respuesta (tejido vivo versus tejido muerto) y a la fácil interpretación de los resultados a través del valor de p y el  $\chi^2$ .

Aunque existen otros modelos como el de tóxico-difusión, donde se comparan las respuestas obtenidas de un mismo organismo en varios intervalos de tiempo a una concentración determinada. No se consideró este modelo debido que el modelo posee una gran complejidad a nivel estadístico. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de su aplicabilidad para futuros estudios con la macrofito *L. minor*.

Del mismo modo, al ser un modelo novedoso para ensayos con *L. minor*, aún deben considerarse investigaciones adicionales que permitan establecer un protocolo adecuado para trabajar con la data obtenida. Cabe señalar que observaciones posteriores permitieron establecer que el manejo de los datos puede ser un factor importante al momento de determinar los valores de BMD y BMDL.

En el presente estudio y en ambos parámetros (NF y AF) se consideró como dato la suma de todos los resultados obtenidos en una misma concentración para calcular los valores de BMD y BMDL (método A). No obstante, cuando el dato analizado fue el promedio de las respuestas de cada concentración (método B), los resultados variaron en ambos valores y en todos los ensayos (tabla 36).

El empleo del método A para hallar los valores de BMD y BMDL ha mostrado tener una mayor certeza que la utilización del método B. Además, aunque los modelos de regresión con mejores resultados son los mismos en ambos métodos, debe recalcarse la diferencia existente en los valores de BMD y BMDL (tabla 36). Ello puede interpretarse como un ajuste para reflejar mayor exactitud de los resultados en el método A.

Por otro lado, el empleo del valor de BMD como equivalente de la EC<sub>10</sub> (tabla 37) arrojó valores por debajo del límite inferior de la EC<sub>10</sub>. Lo mismo sucedió al calcular el valor de BMD con una respuesta del 50% para realizar un análisis comparativo entre las EC<sub>50</sub> obtenidas en los ensayos.

Ello puede sugerir una mayor especificidad puesto que el método del punto de referencia (BMD) nos permite trabajar con varios modelos para encontrar el que mejor se adapte a los datos obtenidos.

No obstante, debido a que los valores de BMD y BMDL son novedosos para trabajos toxicológicos con *Lemna sp.*, es necesario realizar más estudios que permitan una estandarización de la metodología.

## **7.4 Efecto sinérgico**

Como se mencionó anteriormente, el metomilo es un carbamato que inhibe la acetilcolinesterasa, una enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina, el cual es un neurotransmisor de muchas sinapsis presentes en animales e insectos. No obstante, Wessler *et al.* (2001) han reportado la presencia de este neurotransmisor en un amplio rango de organismos tales como bacterias, algas, protozoos y plantas. En este último grupo, Odjakova & Hadjiivanova (1997) refieren que la acetilcolina puede estar involucrada en una serie de procesos de regulación fisiológica, tales como la germinación, floración, morfogénesis, la fotosíntesis y la elongación de la planta.

Diversas investigaciones en células animales han permitido establecer el ciclo de la acetilcolina. Cuando esta es producida para encontrarse con sus receptores, la acetilcolinesterasa la degrada inmediatamente en dos productos inactivos: el acetato y la colina, siendo la colina el que completa el ciclo de vida de la acetilcolina (Rosenjack & Rosenthal, 2015).

Aunque existen estudios que han establecido la biosíntesis de la colina en las plantas a través de la vía etanolamina (Subbarao *et al.*, 2001), también se ha demostrado la presencia de acetilcolina en el tejido de las plantas, además de la existencia de las enzimas involucradas en su síntesis. Bajo esta vía, la colina es transformada por dos transferasas en fosfatidilcolina, el cual es uno de los mayores fosfolípidos en las membranas biológicas (Tretyn, 1991).

Ello guarda relación con los resultados obtenidos por Kandeler *et al.* (1974), quienes estudiaron la respuesta de la acetilcolina en la macrofita *Lemna gibba* (Linnaeus, 1753). Sus resultados mostraron que la acetilcolina parece alterar la permeabilidad de la membrana cuando el medio está acidificado, alterando su metabolismo y produciendo un intercambio de iones de hidrógeno por iones de potasio.

Debido a que la colinesterasa presente en las plantas es sensible a los derivados del ácido carbámico y los compuestos organofosforados (Roshchina, 2004), la exposición al plaguicida metomilo puede producir un desequilibrio en el intercambio de iones Ca – K de la membrana y por ende, la ruptura y muerte celular. Moussa *et al.* (1989) mencionan que este plaguicida causa un incremento en la permeabilidad de la membrana, lo que corroboraría su acción al inhibir la colinesterasa.

El hecho de que los resultados del presente estudio mostraran una baja sensibilidad de la macrofita *L. minor* frente al metomilo, puede sugerir que existe una mayor síntesis de la colina por medio de la vía etanolamina, lo que reduciría el efecto fitotóxico. Otra posibilidad nos lleva a mencionar la capacidad de respuesta del organismo frente al agente xenobiótico, la cual sería efectiva con concentraciones inferiores a 1637,31 mg·L<sup>-1</sup> (BMD: parámetro AF).

Ello hace necesario contar con estudios específicos que evalúen la respuesta de la membrana celular en *L. minor* cuando es sometida a concentraciones de metomilo.

Por otro lado, la alta fitotoxicidad de *L. minor* al ser sometida a la rotenona, responde al hecho de que este plaguicida causa daños directos en la mitocondria, específicamente en la cadena respiratoria a través del complejo I y despolimerizando los microtúbulos de esta organela.

Cabe señalar que en la mitocondria se producen las especies reactivas al oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) o moléculas derivadas de la utilización del oxígeno en la célula.

Las ROS como el superóxido, es detoxificado y transformado a peróxido de hidrógeno por medio de otras moléculas, el cual es un importante regulador de la actividad celular (Bolisetty & Jaimes, 2013).

Este proceso es realizado, en su mayoría, en los complejos I y II de la cadena respiratoria. Asimismo, otro aspecto importante a mencionar, es la relación que tiene la mitocondria con el proceso apoptótico de la célula (Li, 2003).

Los cambios que producen la presencia de moléculas de rotenona en el complejo I, alteran el equilibrio de la producción de las moléculas ROS, ocasionando la estimulación de la mitocondria a respuestas pro-apoptóticas y un cambio letal en la permeabilización de la membrana mitocondrial con una subsecuente ruptura de la membrana externa y muerte celular (Le Bras *et al.*, 2005).

Debido a que la rotenona causa daños significativos en la célula, se asume que la macrofita *L. minor* es incapaz de reducir el efecto causado por el segundo plaguicida (metomilo), lo que se traduce en un aumento del efecto fitotóxico y una mayor sensibilidad a la acción combinada de ambos plaguicidas.

## 8. CONCLUSIONES

La sensibilidad de la macrofita *Lemna minor* varió en los ensayos de toxicidad individual, siendo menor cuando se utilizó el plaguicida metomilo ( $EC_{50}$ ; Parámetro AF:  $6919,79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y parámetro NF:  $7147,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en comparación con la rotenona ( $EC_{50}$ ; Parámetro AF:  $782,173 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y parámetro NF:  $1079,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

La evaluación del parámetro área total (AF) mostró mayor sensibilidad frente al parámetro nuevas frondas (NF) al momento de determinar la concentración efectiva al 10% y 50% ( $EC_{10}$  y  $EC_{50}$ , respectivamente) en todos los ensayos.

El modelo de Concentración-Adición mostró un efecto sinérgico en los parámetros evaluados (AF y NF) puesto que los valores obtenidos fueron mayores a uno. Dicho efecto sinérgico fue mayor en el parámetro NF (27,52 rotenona y 13,76 metomilo) que en el parámetro AF (24,46 rotenona y 12,23 metomilo).

El parámetro de contenido total de clorofila (CTC) fue el más sensible al momento de determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento en los

ensayos de toxicidad individual (65,62% en  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de metomilo y 90,30% en  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de rotenona). En el caso del ensayo de toxicidad binaria, el parámetro AF presentó mayor sensibilidad (la combinación

$2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de rotenona y  $4000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de metomilo causan una inhibición del 97,89%). Asimismo, el parámetro de peso húmedo (PH) fue el menos sensible en todos los ensayos.

El modelo Punto de Referencia (BMD – Benchmark dose) utilizado a través del programa estadístico BMD<sup>®</sup>, resultó tener una mayor especificidad para el cálculo de la concentración efectiva media –  $EC_{50}$  que el programa computarizado Probit, con el cual se obtuvieron valores de  $EC_{50}$  con grandes márgenes de variación.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abràmoff, M., Magalhaes, P., & Ram, S. (2014). Image Processing with ImageJ.

*Biophotonics International*, 11(7), 36 – 42.

AIF. (2009). *La agricultura, motor de crecimiento y de la reducción de la pobreza*. Washington.

Aijón, C., & Cumplido, A. (2007). *Percepción del riesgo de los agroquímicos en la localidad de Basavilbaso, Entre Ríos*. Barcelona, España.

Aktar, M. W., Sengupta, D., Alam, S., & Chowdhury, A. (2010). Risk assessment and chemical decontamination of an oxime carbamate insecticide (methomyl) from eggplant, *Solanum melongena* L.

*Environmental Monitoring and Assessment*, 168: 657–668. doi:10.1007/s10661-009-1141-0

Alberdi, J., Sáñez, M., Di Marzio, W., & Tortorelli, M. (2007). Evaluación ecotoxicológica de dos insecticidas sobre *Daphnia magna*, *Scenedesmus quadricauda* y *Lemna minor*. In *VIII Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental* (p. 1). Montevideo, Uruguay: Sociedad Química y Toxicología de América Latina.

Alexander, A., & Culp, J. (2013). Predicting the Effects of Insecticide Mixtures on Non-Target Aquatic Communities. In S. Trdan (Ed.), *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technology* (Primera, pp. 83 – 99). Rijeka, Croatia: In Tech. do:10.5772/53356

Amparán, R., Téllez, J., & Navarro, M. del C. (2003). Metodologías para el estudio del impacto de contaminantes plaguicidas. *Revista de Toxicología En Línea* 18: 2 – 29.

Bakouli, P., & Karaima, C. (2008). Acute toxicity evaluation of an insecticide used in potato cultures with the use of bioassays. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17: 1002–1006.

Brannon, L. (1950). Insecticide comprising rotenone and piperonyl cyclonene as a synergist therefor. United States.

Carballo, O., Trujillo, J., Álvarez, E., Pomares, Y., & Villa, P. (2008). Toxicidad aguda del fungicida biológico Gluticid en planta acuática: *Lemna minor*. *Revista de Toxicología En Línea*, 15: 21 – 34.

Chandler, J. H., & Marking, L. L. (1982). Toxicity of Rotenone to Selected Aquatic Invertebrates and Frog Larvae. *The Progressive Fish-Culturist*, 44(2), 78–80. doi:10.1577/1548-8659(1982)44[78:TORTSA]2.0.CO;2

Christmann, L., & Jayne, D. (1939). Stabilized rotenone compositions. United States.

Conant, J. (2005). Los plaguicidas son veneno. Retrieved October 6, 2010, from [http://www.ruralfinance.org/fileadmin/templates/rflc/documents/Los\\_\\_plaguicidas\\_\\_son\\_\\_veneno.pdf](http://www.ruralfinance.org/fileadmin/templates/rflc/documents/Los__plaguicidas__son__veneno.pdf)

Daubs, E. H. (1965). *A monograph of Lemnaceae*. (University of Illinois, Ed.) (Primera Ed). Illinois: University of Illinois Press.

De Janvry, A., & Sadoulet, E. (2010). Agricultural Growth and Poverty Reduction: Additional Evidence. *World Bank Research Observer*, 25(1): 1 – 20.

Department of Pesticide Regulation. (1996). *Hazard Assessment of the Insecticide Methomyl to Aquatic Organisms in the San Joaquin River System*. California, US.

DFID, & Thompson, A. (2004). *Agriculture, growth and poverty reduction. Agriculture and Natural Resource*. London, UK.

Drost, W., Matzke, M., & Backhaus, T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere*, 67(1), 36 – 43.

Eberius, M. (2001). Observation Parameters of the Duckweed Growth Inhibition Test. Frond number - Total Frond Area - Dry weight. Retrieved July 18, 2015.

Environmental Canada. (2007). *Biological Test method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, Lemna minor* (Segunda Ed). Ontario.

Fairchild, J., Sappington, L., & Ruessler, D. (1999). *An Ecological Risk Assessment of the Potential for Herbicide Impacts on Primary Productivity of the Lower Missouri River*. South Carolina.

FAO. (2002). *Methomyl. S-methyl N-[(methylcarbamoyl)oxy]thioacetimidate*. Roma, Italia.

Gaete, H., & Chávez, C. (2008). Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de la toxicidad de mezclas binarias de cobre , cinc y Evaluación arsénico sobre *Daphnia obtusa* ( Kurz , 1874 ) ( Cladocera , Crustacea ). *Limnetica*, 27(1): 1 – 9.

Garcia, C., & Rodríguez, G. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3b), 1 – 10.

García, J. E. (1997). Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. *Agronomía Mesoamericana*, 8(1): 119 – 135.

Gatidou, G., Stasinakis, A. S., & Iatrou, E. I. (2014). Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.030

Girotti, S., Maiolini, E., Bolelli, L., Ghini, S., Ferri, E., Barile, N., & Medvedeva, S. (2008). Analytical techniques and bioindicators in environmental control: honey bees, mussels, bioluminescent bacteria: rapid immunoassays for pesticide detection. In L. Simeonov & V. Sargsyan (Eds.), *Soil Chemical Pollution Risk Assessment Remediation and Security*: 327 – 347 pp. doi:10.1007/978-1-4020-8257-3\_29

Halaban, R., & Hillman, W. (1970). Response of *Lemna perpusilla* to periodic transfer to distilled water. *Plant Physiology*, 46, 641 – 644.

Hikal, W., Al-Herrawy, A., El-Daly, E., & Elowa, S. (2015). Assessment of Pesticide Toxicity Using the Freshwater Amoeba *Rosculus ithacus* in vitro. *Pyrex Journal of Research in Environmental Studies*, 2(1): 8 – 12.

Hrušková, Z. (2012). *Fyziologické odpovědi okřehku Lemna minor na zatížení prostředí fluoranthenem*. Mendelova univerzita v Brně.

Iannacone, J., & Alvarino, L. (2005). Selectividad del insecticida Cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. *Ecología Aplicada*, 4(1,2): 91 – 104.

Iannacone, J., & Alvariño, L. (2008). Efecto Ecotoxicológico del Metomilo en *Corydoras Lacépède*, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) y su Caracterización Leucocitaria. *Ecología Aplicada*, 7(1,2): 55 – 61.

Iannacone, J., Alvariño, L., & Mamani, N. (2011). Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1): 23–29. doi:10.5132/jbse.2011.01.004

Iannacone, J., Alvariño, L., Paredes, C., Alayo, M., Mamani, N., Bonifacio, J., Miglio, M. (2011). Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. *Acta Toxicológica Argentina*, 19(1), 19 – 31.

Iannacone, J., Alvariño, L., Rosa, R. La, & Torre, M. I. La. (2014). Acute and chronic toxicity of Methomyl and Lantana camara (Verbenaceae) to five biological control agents of agriculture pest in Peru. *Boletim Do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, 8(1), 169 – 183. doi:10.5935/2177-4560.20140012

Iannacone, J., & Lamas, G. (2003). Efectos toxicológicos del nim, rotenona y cartap sobre tres micro- avispas parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*, 29: 123–142.

Julca, M. Ley Marco para la Promoción y Desarrollo Sostenible de la Agricultura Familiar (2014). Lima, Peru: Congreso de la República del Perú.

Kady, G., Kamel, N., Mosleh, Y., & Bahght, I. (2008). Comparative Toxicity of Two Bio-Insecticides (Spinotoram and Vermetic) Compared with Methomyl Against *Culex pipiens* and *Anopheles multicolor*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(2), 198 – 205.

Kandeler, R., Hügel, B., & Rottenburg, T. (1974). Relations Between Photosynthesis and Flowering in Lemnaceae. In R. Marcelle (Ed.),

*Environmental and Biological control of Photosynthesis* (pp. 161 – 169). Belgium.

Kepner, J. (2004). The Big Unknowns of Pesticide Exposure. *Pesticides and You*, 23: 17 – 20.

Khellaf, N., & Zerdaoui, M. (2010). Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology (London, England)*, 19(8), 1363–8. doi:10.1007/s10646-010-0522-z

Knabke, J. (1981). Synergistic insecticidal combinations comprising methomyl and 2-dihalovinyl-3,3-dimethylcyclopropanecarboxylates. United States.

Krishnan, K., & Peyret, T. (2009). Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) Modeling in Ecotoxicology. *Emerging Topics in Ecotoxicology*, 2: 145 – 175.

Kumar, S. (2013). Dose - response models to understand toxicodynamics for pollutants in ecosystems. *International Journal of Environment Science: Development and Monitoring*, 4(3): 77 – 80.

Kumar, S. (2014). Scope and Relevance of using Pesticide Mixture in Crop Protection: A Critical Review. *International Journal of Environment Science and Toxicology*, 2(5): 119 – 123.

Laetz, C. A., Baldwin, D. H., Collier, T. K., Hebert, V., Stark, J. D., & Scholz, N. L. (2009). The synergistic toxicity of pesticide mixtures: Implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon.

*Environmental Health Perspectives*, 117(3): 348–353. doi:10.1289/ehp.0800096

Lasfar, S. (2004). *Modélisation de la croissance de Lemna minor et de la cinétique d'enlèvement du phosphore et de l'azote sous un environnement contrôlé*. Université de Montréal.

Le Bras, M., Clément, M., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology. Cellular and Molecular Biology*, 20, 205 – 220.

Lemon, G., Posluszny, U., & Husband, B. (2001). Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. *Aquatic Botany*, 70(1): 79 – 87.

Leporati, M., Salcedo, S., Jara, B., Boero, V., & Muñoz, M. (2014). La Agricultura Familiar en Cifras. In S. Salcedo & L. Guzmán (Eds.),

*Agricultura Familiar en América Latina y el Caribe: Recomendaciones de Política* (Primera, p. 497). Santiago, Chile: FAO.

Li, N. (2003). Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production.

*Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8516–8525. doi:10.1074/jbc.M210432200

Ling, N. (2003). *Rotenone: a review of its toxicity and use for fisheries management. Science for Conservation* (Primera Ed). Wellington, New Zeland: Department of Conservation.

Merrill, M. C. (1915). Some Relations of Plants to Distilled Water and Certain Dilute Toxic Solutions. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2(3), 459 – 498. doi:10.2307/2990114

MINAGRI. Constituyen Comisión Nacional de Plaguicidas con carácter permanente (1993). Lima, Peru.

MINAGRI. (2008, February 29). Disponen publicar listas de plaguicidas agrícolas, de plaguicidas químicos de uso agrícola, de productos biológicos formulados registrados y de plaguicidas agrícolas por nombre común del ingrediente activo cuyo registro se encuentra restringido o prohibido. *El Peruano*, p. 17. Lima, Peru.

MINAGRI. (2011). *Cadena agroproductiva de Papa. Uso adecuado de insumos*. Lima.

MINAGRI. (2012a). *Plan Estratégico Sectorial Multianual 2012 - 2016*. Lima.

MINAGRI. (2012b, June 3). Aprueban el Reglamento para Reforzar las Acciones de Control Post Registro de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola. *El Peruano*, p. 1. Lima, Peru.

MINAGRI. (2015). Aprueban Reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola. Retrieved March 29, 2015.

Ministerio de Salud. (2007). *La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta por el ambiente*. (Secretaría del Ambiente y Desarrollo Sustentable, Ed.) (Primera Ed). Buenos Aires, Argentina: Gráfica Laft S.R.L.

MINPLAN. (2003). *Desarrollos de niveles guía nacionales de Calidad de Agua Ambiente correspondientes a Ciazina*. Buenos Aires, Argentina.

Mohamed, M. S. (2009). Degradation of methomyl by the novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4), 6 p. doi:10.2225/vol12-issue4-fulltext-11

Montoro, Y., Moreno, R., Gomero, L., & Reyes, M. (2009). Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 26(4): 466 – 472.

Moussa, I., Ouazzani, C., Bonavent, J., BERVILLÉ, A., & Ghazi, A. (1989).

*Maize mitochondria F1-ATPase inhibition by the Cochliobolus heterostrophus race T-toxin and methomyl*. (A. Graniti, R. D. Durbin, & A. Ballio, Eds.) *Advance Research on Phytotoxins and Plant Pathogenesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-73178-5

Napán, K., Llanos, C., & Paredes, C. (2010). Toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) (Poeciliidae). *The Biologist*, 8(1): 21 – 28.

Odjakova, M., & Hadjiivanova, C. (1997). Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 23(1 - 2): 94 – 102.

OECD. (2006). *Test N°221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*. Paris: OECD Publishing.

Pérola, J. (2008). *Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na ausência de presença de sedimento*. Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Pinilla, G. (1998). *Indicadores Biológicos en Ecosistemas Acuáticos Continentales de Colombia*. (Centro de Investigaciones Científicas, Ed.). Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

Quiming, H., Qi, T., Yue, S., Xiliang, Y., Dan, A., 严寒, & 杜波. (2013). Pesticide composition containing matrine and rotenone and use thereof. China.

Radić, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Mikelić, I. L., Rajčić, M. M., Sirac, S., ...

Pavlica, M. (2010). Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology*, 19(1), 216– 22. doi:10.1007/s10646-009-0408-0

Rattanapan, A. (2007). *Biochemical and Molecular detection of cypermethrin and rotenone resistance in the tropical armyworm, Spodoptera litura (Fabricius)*. Kastsart University.

Ren, Y., & Feng, J. (2007). Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 303–311. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04741.x

Robertson, D. R., & Smith-Vaniz, W. F. (2008). Rotenone: An Essential but Demonized Tool for Assessing Marine Fish Diversity. *BioScience*, 58(2): 165. doi:10.1641/B580211

Rosenjack, J., & Rosenthal, L. (2015). *Lehne's Pharmacology for Nursing Care* (9th ed.). China: Elsevier.

Roshchina, V. (2004). Plant cholinesterase activity as a biosensor: cellular models. In I. Silman, H. Soreq, L. Anglister, D. Michaelson, & A. Fisher (Eds.), *Cholinergic Mechanisms. Function and dysfunction* (pp. 679 – 680). London, UK: Taylor & Francis.

SafeWork. (2011). *Seguridad y Salud en la Agricultura*. Ginebra.

SENASA. (2014, October 11). Disponen la publicación del Procedimiento: Importación, Vigilancia y Control de Plaguicidas de uso agrícola para consumo propio (v.01) en el portal del SENASA. *El Peruano*, p. 1. Lima, Peru.

Servin, R., Aguilar, R., Martínez, J., Troyo, E., & Ortega, A. (2002). Monitoring of Resistance to three insecticides on Pepper weevil (*Anthonomus eugenii*) in populations from Baja California Sur, Mexico. *Interciencia*, 27(12): 691 – 694.

Stenström, J. (2013). *Mixture Toxicity of Pesticides and Biological Effects in Agricultural Streams. Field and Laboratory Studies*. Swedish University of Agricultural Sciences.

Stiles, W., & Jörgensen, I. (1914). The antagonism between ions in the absorption of salts by plants. *The New Phytologist*, 13(8): 253 – 268.

Subbarao, G., He Levine, L., & Stutte, G. (2001). Glycine Betaine Accumulation: Its Rol in Stress Resistance in Crop Plants. In M. Pessaraki (Ed.), *Hanbook of Plant and Crop Physiology* (2nd ed., pp. 881 – 907). New York: Marcel Dekker Inc.

Suman, H., & Venu, P. (2012). The taxonomy and report of flowering in *Lemna* L. (Lemnaceae) in India. *Current Science*, 102(12): 1629 – 1632.

Swanson, S., Collen, R., Freemark, K., & MacQuarrie, P. (1991). Testing for Pesticide Toxicity to Aquatic Plants: Recommendations for Test Species. In American Society for Testing and Materials (Ed.), *Plants for Toxicity Assessment. Second Volumne*. (Primera Ed, pp. 77 – 97). Philadelphia: Ann Arbor, MI.

Tangou, T., Baya, D. trésor, & Musbono, D. (2013). *MOonitoring the influence of light intensity on the growth and mortaility of duckweed (Lemna minor) through digital images processing*. Cartagena, Colombia.

Thron, J., Weaver, V., & Baker, J. (1995). Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*, 88, 1510 – 1512.

Tocker, S., & Wilmington, D. (1980). Microencapsulated Methomyl Insecticide. United States.

Topp, C., Henke, R., Keresztes, Á., Fischer, W., Eberius, M., & Appenroth, K. (2011). A novel mechanism of abscission in fronds of *Lemna minor* L. and the effect of silver ions. *Plant Biology*, 13(3), 517–523. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00394.x

Torres, V. (2004). La agricultura peruana en los tiempos del TLC. Retrieved September 23, 2014,

Tretyn, A. (1991). Acetylcholine in Plants: Presence, Metabolism and Mechanism of Action. *The Botanical Review*, 57(1): 33 – 73.

USEPA. (2015). Benchmark Dose Software (BMDS). Washington: Environmental Agency Protecion.

Valdovinos-Núñez, G. R., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Ruiz Sanchez, E. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of Economic Entomology*, *102*(5), 1737–1742. doi:10.1603/029.102.0502

Valenzuela, J. (2013). *Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de Lemna valdiviana Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como tóxicos de referencia*. Universidad Austral de Chile.

Van Hoeck, A., Horemans, N., Van Hees, M., Nauts, R., Knapen, D., Vandenhove, H., & Blust, R. (2015).  $\beta$ -Radiation Stress Responses on Growth and Antioxidative Defense System in Plants: A Study with Strontium-90 in Lemna minor. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7), 15309–15327. doi:10.3390/ijms160715309

Van Scoy, A., Yue, M., Deng, X., & Tjeerdema, R. (2013). Environmental fate and toxicology of methomyl. *Review Environmental Contamination Toxicology*, *222*: 93 – 109.

Velazco, J., & Velazco, J. (2012). Características del empleo agrícola en el Perú. In *Empleo y Protección Social* (Primera, pp. 161 – 211). Lima, Peru: Departamento de Economía - Pontificia Universidad Católica del Perú.

Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., & Kirkpatrick, C. J. (2001). The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Japanese Journal of Pharmacology*, *85*(1), 2–10. doi:10.1254/jjp.85.2

Yanggen, D., Crissman, C., & Espinosa, P. (2003). *Los Plaguicidas: Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador*. (Centro Internacional de la Papa & Instituto Nacional Autónomo de investigaciones, Eds.) (Primera). Quito: Ed. Abya-Yala.

Yaping, X. (2014). Insecticidal composition compounded by metaflumizone and rotenone. China.

Yengle, M., Palhua, R., Lescano, P., Villanueva, E., Chachi, E., Yana, E., & Zavarria, R. (2008). Prácticas de utilización de plaguicidas en agricultores en el distrito de Huaral-Peru, noviembre 2005. *Revista Peruana de Epidemiología*, *12*(1): 6.

Yin, Y., Yu, C., Yu, L., Zhao, J., Sun, C., Ma, Y., & Zhou, G. (2015). The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 187, 84–90. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.097

Zhaoujun, L., Bell, S., Jun, Q., Zhihui, G., & Wai-Kuen, T. (2013). Rotenone compound insecticide for preventing tirathaba rufivena walker. China.

Ziping, L., & Gang, H. (2014). Methomyl solvent systems. China.

## 10. ANEXOS

Tabla 1a. Valores crudos obtenidos en el ensayo de metomilo con agua embotellada. Parámetros AF y NF de los tres días de lectura.

| Fecha de inicio del ensayo             | 09/05/2015                           |       |      | T= total       |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
|--|--------------------------------------|-------|------|----------------|---|-------|---------------|------|------|----|---|--------|-------|------|
| Organismo                              | <i>Lemna minor</i>                   |       |      | N = necrosis   |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
| Tiempo de exposición                   | 7 días, con reposición al cuarto día |       |      | C = clorosis   |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
| Medio utilizado                        | Agua cielo                           |       |      |                |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
| Condiciones de cámara de cultivo       | 30,0 °C - 45% humedad                |       |      |                |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
| Tipo de sustancia                      | Metomilo                             |       |      |                |   |       |               |      |      |    |   |        |       |      |
| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Día 0 - 0 hrs                        |       |      | Día 4 - 96 hrs |   |       | Día 7 - 168 h |      |      |    |   |        |       |      |
|  | Fronda                               |       | Área | Fronda         |   | Área  | Fronda        |      | Área |    |   |        |       |      |
|  | T                                    | T     | T    | N              | C | T     | N             | C    | T    | N  | C |        |       |      |
| Control 1                              | 10                                   | 23,13 | 24   | 0              | 0 | 60,13 | 0,00          | 0,00 | 44   | 0  | 0 | 102,56 | 0,00  | 0,00 |
| Control 2                              | 10                                   | 21,89 | 32   | 0              | 0 | 85,34 | 0,00          | 0,00 | 53   | 1  | 0 | 138,11 | 1,08  | 0,00 |
| Control 3                              | 9                                    | 18,51 | 31   | 0              | 0 | 64,43 | 0,00          | 0,00 | 44   | 0  | 0 | 96,11  | 0,00  | 0,00 |
| Control 4                              | 9                                    | 20,88 | 30   | 0              | 0 | 69,93 | 0,00          | 0,00 | 51   | 0  | 0 | 108,37 | 0,00  | 0,00 |
| Control 5                              | 11                                   | 21,67 | 33   | 0              | 0 | 76,22 | 0,00          | 0,00 | 45   | 0  | 0 | 109,89 | 0,00  | 0,00 |
| Control 6                              | 11                                   | 20,13 | 27   | 0              | 0 | 60,94 | 0,00          | 0,00 | 48   | 0  | 0 | 147,58 | 0,00  | 0,00 |
| 250                                    | 11                                   | 24,99 | 23   | 0              | 0 | 53,53 | 0,00          | 0,00 | 42   | 1  | 0 | 93,01  | 0,84  | 0,00 |
| 250                                    | 9                                    | 24,82 | 27   | 0              | 0 | 64,37 | 0,00          | 0,00 | 41   | 0  | 0 | 92,08  | 1,52  | 0,00 |
| 250                                    | 11                                   | 21,55 | 29   | 0              | 0 | 77,59 | 0,00          | 0,00 | 38   | 1  | 0 | 81,43  | 2,55  | 0,00 |
| 250                                    | 10                                   | 23,61 | 24   | 0              | 0 | 59,68 | 0,00          | 0,00 | 35   | 2  | 0 | 80,23  | 3,55  | 0,00 |
| 250                                    | 10                                   | 20,32 | 23   | 0              | 0 | 53,44 | 0,05          | 0,00 | 36   | 1  | 0 | 80,76  | 0,03  | 0,00 |
| 250                                    | 10                                   | 17,48 | 25   | 0              | 0 | 56,67 | 0,00          | 0,00 | 37   | 0  | 0 | 96,89  | 0,00  | 0,00 |
| 500                                    | 10                                   | 26,31 | 25   | 0              | 0 | 59,33 | 0,00          | 0,00 | 36   | 0  | 0 | 78,68  | 0,00  | 0,00 |
| 500                                    | 10                                   | 22,43 | 24   | 0              | 0 | 47,57 | 0,00          | 0,00 | 36   | 0  | 1 | 72,52  | 1,48  | 1,64 |
| 500                                    | 10                                   | 22,59 | 20   | 0              | 0 | 47,04 | 0,13          | 0,00 | 32   | 0  | 1 | 56,33  | 0,30  | 2,00 |
| 500                                    | 9                                    | 20,05 | 25   | 0              | 0 | 48,32 | 0,00          | 0,00 | 34   | 0  | 0 | 62,48  | 0,00  | 0,00 |
| 500                                    | 10                                   | 26,84 | 24   | 0              | 0 | 61,90 | 0,04          | 0,00 | 34   | 1  | 0 | 72,45  | 1,30  | 0,00 |
| 500                                    | 10                                   | 21,39 | 22   | 0              | 0 | 44,30 | 0,00          | 0,00 | 31   | 0  | 0 | 77,37  | 0,00  | 0,00 |
| 1000                                   | 9                                    | 20,06 | 20   | 0              | 0 | 36,10 | 1,50          | 0,00 | 21   | 0  | 0 | 45,03  | 0,21  | 0,00 |
| 1000                                   | 9                                    | 14,00 | 23   | 0              | 0 | 34,80 | 2,10          | 0,00 | 23   | 0  | 1 | 46,22  | 0,54  | 0,89 |
| 1000                                   | 9                                    | 15,95 | 20   | 0              | 0 | 33,88 | 0,64          | 0,00 | 29   | 1  | 3 | 47,37  | 0,45  | 1,91 |
| 1000                                   | 10                                   | 16,62 | 22   | 0              | 0 | 41,49 | 0,40          | 0,00 | 26   | 1  | 1 | 56,47  | 1,31  | 1,66 |
| 1000                                   | 9                                    | 16,54 | 17   | 0              | 0 | 29,88 | 0,17          | 0,00 | 24   | 0  | 0 | 43,33  | 0,00  | 0,00 |
| 1000                                   | 10                                   | 15,42 | 18   | 0              | 0 | 30,80 | 0,20          | 0,00 | 26   | 0  | 0 | 48,84  | 0,06  | 0,00 |
| 2000                                   | 11                                   | 23,55 | 11   | 1              | 1 | 35,53 | 2,11          | 1,00 | 27   | 1  | 0 | 49,33  | 9,32  | 0,00 |
| 2000                                   | 9                                    | 19,02 | 20   | 2              | 0 | 24,59 | 1,35          | 0,00 | 22   | 2  | 0 | 37,02  | 8,69  | 1,00 |
| 2000                                   | 10                                   | 16,61 | 17   | 0              | 1 | 28,64 | 1,50          | 0,00 | 19   | 4  | 0 | 31,95  | 3,88  | 0,00 |
| 2000                                   | 11                                   | 18,52 | 14   | 0              | 0 | 37,83 | 0,00          | 0,00 | 25   | 1  | 1 | 44,32  | 1,90  | 0,89 |
| 2000                                   | 9                                    | 19,18 | 20   | 0              | 0 | 39,18 | 1,59          | 0,00 | 20   | 2  | 1 | 45,78  | 2,65  | 1,93 |
| 2000                                   | 12                                   | 23,23 | 10   | 0              | 0 | 39,38 | 0,73          | 0,00 | 26   | 1  | 1 | 45,91  | 0,57  | 1,88 |
| 4000                                   | 10                                   | 19,65 | 12   | 5              | 0 | 25,95 | 10,85         | 0,00 | 10   | 8  | 0 | 21,33  | 16,52 | 0,00 |
| 4000                                   | 10                                   | 22,03 | 12   | 8              | 0 | 30,11 | 9,46          | 0,00 | 12   | 10 | 0 | 28,48  | 18,64 | 0,00 |
| 4000                                   | 11                                   | 24,37 | 10   | 3              | 0 | 31,02 | 6,22          | 0,00 | 13   | 12 | 0 | 30,53  | 24,81 | 0,00 |
| 4000                                   | 9                                    | 18,48 | 12   | 6              | 0 | 22,07 | 6,01          | 0,00 | 10   | 9  | 1 | 21,54  | 19,24 | 1,91 |
| 4000                                   | 11                                   | 23,00 | 14   | 2              | 0 | 30,52 | 8,53          | 0,00 | 13   | 7  | 0 | 28,45  | 19,74 | 0,00 |
| 4000                                   | 11                                   | 24,28 | 11   | 0              | 0 | 30,06 | 6,32          | 0,00 | 14   | 8  | 0 | 32,36  | 12,63 | 0,00 |

Tabla 2a. Datos crudos de los parámetros CTC y PH (incluido el peso seco) en el ensayo de metomilo con agua embotellada.

| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | R   | Absorbancia |       | mL | Peso<br>húmedo<br>(g) | Clorofila (µg·g <sup>-1</sup> ) |         |         | Peso<br>seco (g) |
|--|-----|-------------|-------|----|-----------------------|---------------------------------|---------|---------|------------------|
|  |     | 660         | 635   |    |                       | Chl a                           | Chl b   | total   |                  |
| Control                                | [1] | 0,047       | 0,08  | 2  | 0,0202                | 0,39201                         | 1,41529 | 1,8073  |                  |
|  | [2] | 0,084       | 0,11  | 2  | 0,028                 | 0,78372                         | 1,85438 | 2,6381  |                  |
|  | [3] | 0,073       | 0,105 | 2  | 0,0199                | 0,65739                         | 1,80406 | 2,46145 |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0249                |                                 |         |         | 0,0024           |
|  | [5] |             |       |    | 0,0235                |                                 |         |         | 0,0028           |
|  | [6] |             |       |    | 0,0176                |                                 |         |         | 0,0017           |
| 125                                    | [1] | 0,04        | 0,106 | 2  | 0,0182                | 0,23808                         | 1,98062 | 2,2187  |                  |
|  | [2] | 0,045       | 0,115 | 2  | 0,0186                | 0,27855                         | 2,1412  | 2,41975 |                  |
|  | [3] | 0,051       | 0,079 | 2  | 0,0201                | 0,44505                         | 1,3759  | 1,82095 |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0163                |                                 |         |         | 0,0007           |
|  | [5] |             |       |    | 0,0178                |                                 |         |         | 0,001            |
|  | [6] |             |       |    | 0,0239                |                                 |         |         | 0,001            |
| 250                                    | [1] | 0,03        | 0,095 | 2  | 0,0147                | 0,1395                          | 1,80275 | 1,94225 |                  |
|  | [2] | 0,015       | 0,049 | 2  | 0,0152                | 0,06597                         | 0,93208 | 0,99805 |                  |
|  | [3] | 0,014       | 0,081 | 2  | 0,0105                | -0,0273                         | 1,59185 | 1,56455 |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0145                |                                 |         |         | 0,001            |
|  | [5] |             |       |    | 0,0155                |                                 |         |         | 0,001            |
|  | [6] |             |       |    | 0,0119                |                                 |         |         | 0,0008           |
| 500                                    | [1] | 0,048       | 0,045 | 2  | 0,0085                | 0,49284                         | 0,69411 | 1,18695 |                  |
|  | [2] | 0,032       | 0,032 | 2  | 0,0104                | 0,32352                         | 0,50368 | 0,8272  |                  |
|  | [3] | 0,037       | 0,034 | 2  | 0,0083                | 0,38163                         | 0,52097 | 0,9026  |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0103                |                                 |         |         | 0,0011           |
|  | [5] |             |       |    | 0,01                  |                                 |         |         | 0,0034           |
|  | [6] |             |       |    | 0,01                  |                                 |         |         | 0,001            |
| 1000                                   | [1] | 0,032       | 0,039 | 2  | 0,0094                | 0,30588                         | 0,64697 | 0,95285 |                  |
|  | [2] | 0,03        | 0,03  | 2  | 0,0077                | 0,3033                          | 0,4722  | 0,7755  |                  |
|  | [3] | 0,025       | 0,025 | 2  | 0,0064                | 0,25275                         | 0,3935  | 0,64625 |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0099                |                                 |         |         | 0,0058           |
|  | [5] |             |       |    | 0,0102                |                                 |         |         | 0,0007           |
|  | [6] |             |       |    | 0,0092                |                                 |         |         | 0,0011           |
| 2000                                   | [1] | 0           | 0,001 | 2  | 0,003                 | 0,00252                         | 0,02047 | 0,01795 |                  |
|  | [2] | 0,005       | 0,002 | 2  | 0,0036                | 0,05811                         | 0,01729 | 0,0754  |                  |
|  | [3] | 0,002       | 0,001 | 2  | 0,0043                | 0,02274                         | 0,01101 | 0,03375 |                  |
|  | [4] |             |       |    | 0,0054                |                                 |         |         | 0,0001           |
|  | [5] |             |       |    | 0,0055                |                                 |         |         | 0,0004           |
|  | [6] |             |       |    | 0,0045                |                                 |         |         | 0,0004           |

R: unidad de ensayo.

Tabla 3a. Valores crudos obtenidos en el ensayo de rotenona con agua destilada. Parámetros AF y NF de los tres días de lectura.

| Fecha de inicio del ensayo             | 27/02/2015                           |       | T= total     |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
|--|--------------------------------------|-------|--------------|----------------|---|-------|---------------|------|----|----|---|-------|-------|-------|
| Organismo                              | <i>Lemna minor</i>                   |       | N = necrosis |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
| Tiempo de exposición                   | 7 días, con reposición al cuarto día |       | C = clorosis |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
| Medio utilizado                        | Agua destilada                       |       |              |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
| Condiciones de cámara de cultivo       | 28,9 °C - 58% humedad                |       |              |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
| Tipo de sustancia                      | Rotenona                             |       |              |                |   |       |               |      |    |    |   |       |       |       |
| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Día 0 - 0 hrs                        |       |              | Día 4 - 96 hrs |   |       | Día 7 - 168 h |      |    |    |   |       |       |       |
|  | Fronda                               |       | Área         | Fronda         |   |       | Fronda        |      |    |    |   |       |       |       |
|  | T                                    | N     |              | T              | N | C     | T             | N    | C  |    |   |       |       |       |
| Control 1                              | 9                                    | 17,70 | 16           | 0              | 1 | 26,90 | 0,00          | 1,98 | 29 | 3  | 4 | 42,32 | 2,17  | 5,80  |
| Control 2                              | 9                                    | 18,70 | 19           | 0              | 0 | 42,29 | 0,00          | 0,59 | 28 | 0  | 5 | 57,83 | 1,55  | 4,68  |
| Control 3                              | 9                                    | 21,72 | 17           | 0              | 1 | 26,93 | 0,00          | 0,00 | 23 | 1  | 5 | 36,83 | 1,24  | 2,79  |
| Control 4                              | 9                                    | 18,54 | 12           | 1              | 1 | 22,96 | 0,00          | 3,66 | 23 | 2  | 3 | 36,85 | 3,77  | 2,92  |
| Control 5                              | 9                                    | 19,03 | 20           | 0              | 2 | 25,01 | 0,00          | 0,84 | 31 | 1  | 3 | 40,69 | 1,27  | 3,26  |
| Control 6                              | 9                                    | 17,54 | 16           | 1              | 1 | 34,86 | 1,00          | 0,56 | 31 | 0  | 4 | 60,98 | 1,31  | 5,45  |
| 125                                    | 9                                    | 19,55 | 12           | 0              | 1 | 26,91 | 0,00          | 1,62 | 20 | 0  | 1 | 27,71 | 0,00  | 1,38  |
| 125                                    | 9                                    | 21,15 | 15           | 0              | 1 | 23,18 | 0,70          | 2,79 | 19 | 1  | 1 | 40,78 | 1,93  | 3,35  |
| 125                                    | 9                                    | 18,85 | 13           | 0              | 1 | 23,04 | 0,00          | 1,11 | 19 | 1  | 2 | 34,95 | 2,78  | 4,14  |
| 125                                    | 9                                    | 18,92 | 12           | 0              | 1 | 19,75 | 0,00          | 1,06 | 17 | 0  | 2 | 31,02 | 0,57  | 3,64  |
| 125                                    | 9                                    | 21,20 | 13           | 0              | 1 | 25,85 | 0,00          | 1,51 | 19 | 1  | 1 | 34,85 | 2,56  | 2,42  |
| 125                                    | 9                                    | 23,52 | 13           | 0              | 0 | 25,37 | 0,00          | 0,00 | 20 | 0  | 2 | 31,26 | 1,84  | 3,65  |
| 250                                    | 9                                    | 19,93 | 14           | 1              | 1 | 23,80 | 2,00          | 3,06 | 20 | 1  | 0 | 32,81 | 2,54  | 0,47  |
| 250                                    | 9                                    | 18,30 | 16           | 0              | 0 | 18,96 | 0,07          | 0,00 | 18 | 0  | 1 | 35,49 | 0,87  | 4,61  |
| 250                                    | 9                                    | 17,61 | 15           | 0              | 0 | 18,40 | 0,00          | 0,00 | 22 | 1  | 2 | 27,94 | 2,34  | 2,22  |
| 250                                    | 9                                    | 20,28 | 14           | 1              | 2 | 21,57 | 0,87          | 4,84 | 23 | 1  | 1 | 35,09 | 4,19  | 1,78  |
| 250                                    | 9                                    | 17,37 | 15           | 0              | 2 | 18,16 | 0,00          | 2,42 | 18 | 2  | 1 | 26,31 | 3,26  | 1,32  |
| 250                                    | 9                                    | 19,04 | 15           | 1              | 1 | 30,59 | 0,92          | 2,11 | 22 | 1  | 5 | 39,54 | 4,07  | 11,46 |
| 500                                    | 9                                    | 13,64 | 11           | 1              | 1 | 14,52 | 2,00          | 1,06 | 16 | 2  | 1 | 28,95 | 3,35  | 0,49  |
| 500                                    | 10                                   | 18,34 | 15           | 1              | 1 | 18,93 | 0,63          | 1,01 | 17 | 1  | 1 | 25,32 | 2,24  | 1,34  |
| 500                                    | 9                                    | 18,44 | 10           | 0              | 1 | 19,04 | 0,60          | 0,47 | 18 | 0  | 1 | 25,49 | 0,73  | 0,52  |
| 500                                    | 9                                    | 20,57 | 16           | 0              | 0 | 24,81 | 0,66          | 0,00 | 17 | 2  | 1 | 28,80 | 5,40  | 0,96  |
| 500                                    | 9                                    | 20,13 | 13           | 2              | 0 | 23,40 | 5,00          | 0,00 | 16 | 1  | 0 | 25,30 | 0,45  | 0,00  |
| 500                                    | 9                                    | 21,19 | 11           | 0              | 1 | 20,82 | 1,00          | 0,17 | 16 | 0  | 2 | 26,23 | 0,00  | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 16,17 | 9            | 6              | 1 | 16,17 | 13,65         | 0,43 | 9  | 9  | 0 | 16,17 | 16,17 | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 18,72 | 11           | 7              | 1 | 20,77 | 11,80         | 2,70 | 11 | 9  | 0 | 20,77 | 14,92 | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 16,61 | 9            | 7              | 0 | 16,61 | 12,61         | 0,00 | 9  | 9  | 0 | 16,61 | 16,61 | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 20,05 | 10           | 6              | 1 | 24,77 | 6,84          | 0,74 | 10 | 9  | 0 | 24,77 | 22,68 | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 16,36 | 9            | 9              | 0 | 16,36 | 13,50         | 0,00 | 9  | 9  | 0 | 16,36 | 16,36 | 0,00  |
| 1000                                   | 9                                    | 21,58 | 11           | 8              | 1 | 22,80 | 15,10         | 1,20 | 11 | 7  | 2 | 22,80 | 19,00 | 2,59  |
| 2000                                   | 9                                    | 19,33 | 10           | 10             | 0 | 21,68 | 21,68         | 0,00 | 10 | 10 | 0 | 21,68 | 21,68 | 0,00  |
| 2000                                   | 9                                    | 18,22 | 10           | 9              | 0 | 19,23 | 19,23         | 0,00 | 10 | 9  | 0 | 19,23 | 17,38 | 0,00  |
| 2000                                   | 9                                    | 16,21 | 9            | 9              | 0 | 16,21 | 16,21         | 0,00 | 9  | 9  | 0 | 16,21 | 16,21 | 0,00  |
| 2000                                   | 9                                    | 18,86 | 9            | 9              | 0 | 18,86 | 18,86         | 0,00 | 9  | 9  | 0 | 18,86 | 18,86 | 0,00  |
| 2000                                   | 9                                    | 17,18 | 9            | 9              | 0 | 17,18 | 17,18         | 0,00 | 9  | 10 | 0 | 17,18 | 17,18 | 0,00  |
| 2000                                   | 9                                    | 18,11 | 9            | 9              | 0 | 18,11 | 18,11         | 0,00 | 9  | 9  | 0 | 18,11 | 18,11 | 0,00  |

Tabla 4a. Datos crudos de los parámetros CTC y PH (incluido el peso seco) en el ensayo de rotenona con agua destilada.

| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | R   | Absorbancia |       | mL | Peso<br>húmedo | Clorofila |         | Peso<br>seco |
|--|-----|-------------|-------|----|----------------|-----------|---------|--------------|
|  |     | 660         | 635   |    |                | Chl a     | Chl b   |              |
| Control                                | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,29        | 0,101 | 2  | 0,0244         | 0,54483   | 5,45857 | 6,0034       |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0267         |           |         |              |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 2                                      | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,247       | 0,077 | 2  | 0,0157         | 0,35007   | 4,69188 | 5,04195      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0175         |           |         |              |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 16                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,199       | 0,075 | 2  | 0,0159         | 0,44577   | 3,71878 | 4,16455      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0178         |           |         |              |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 80                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,159       | 0,057 | 2  | 0,0147         | 0,31923   | 2,98512 | 3,30435      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0146         |           |         |              |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 40                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,021       | 0,026 | 2  | 0,0089         | 0,27546   | 0,30689 | 0,58235      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,009          |           |         |              |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 2000                                   | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] |             |       | 2  | 0,004          |           |         | 0,005        |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] | -           | -     |    | 0,006          | -         | -       | -            |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |

R: unidad de ensayo.

Tabla 5a. Valores crudos obtenidos en el ensayo de mezcla binaria con agua embotellada. Parámetros AF y NF de los tres días de lectura.

| Fecha de inicio del ensayo          | 08/06/2015                           |               | T= total     |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------|--------|----------------|---|--------|---------------|------|--------|----|---|--------|-------|------|
| Organismo                           | Lemna minor                          |               | N = necrosis |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
| Tiempo de exposición                | 7 días, con reposición al cuarto día |               | C = clorosis |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
| Medio utilizado                     | Agua destilada                       |               |              |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
| Condiciones de cámara de cultivo    | 31,6 °C - 46% humedad                |               |              |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
| Tipo de sustancia                   | Rotenona                             |               |              |        |                |   |        |               |      |        |    |   |        |       |      |
| Concentración (mg·L <sup>-1</sup> ) |                                      | Día 0 - 0 hrs |              |        | Día 4 - 96 hrs |   |        | Día 7 - 168 h |      |        |    |   |        |       |      |
| Met                                 | Rot                                  | Fronda        |              | Fronda |                |   | Fronda |               |      | Fronda |    |   | Fronda |       |      |
|                                     |                                      | T             | Área         | T      | N              | C | T      | N             | C    | T      | N  | C | T      | N     | C    |
| Control 1                           |                                      | 9             | 24,30        | 10     | 0              | 0 | 25,86  | 0,00          | 0,00 | 18     | 3  | 0 | 43,69  | 6,94  | 0,00 |
| Control 2                           |                                      | 9             | 26,61        | 10     | 0              | 0 | 25,41  | 0,00          | 0,00 | 16     | 1  | 0 | 43,23  | 0,69  | 0,00 |
| Control 3                           |                                      | 9             | 23,96        | 11     | 0              | 0 | 25,66  | 0,05          | 0,00 | 17     | 1  | 0 | 43,67  | 4,96  | 0,00 |
| Control 4                           |                                      | 9             | 25,31        | 11     | 1              | 0 | 28,56  | 0,00          | 0,00 | 19     | 1  | 0 | 44,75  | 1,71  | 0,00 |
| Control 5                           |                                      | 10            | 22,64        | 12     | 1              | 0 | 32,42  | 4,20          | 0,00 | 18     | 1  | 0 | 50,57  | 6,24  | 0,00 |
| Control 6                           |                                      | 12            | 30,11        | 11     | 0              | 3 | 35,06  | 0,00          | 7,03 | 15     | 3  | 0 | 41,42  | 8,00  | 0,00 |
| 250                                 | 125                                  | 9             | 30,65        | 9      | 1              | 0 | 30,65  | 9,55          | 0,00 | 10     | 4  | 0 | 34,78  | 12,40 | 0,32 |
| 250                                 | 125                                  |               | 30,66        | 9      | 0              | 0 | 30,66  | 1,54          | 0,00 | 11     | 2  | 0 | 34,44  | 9,75  | 0,00 |
| 250                                 | 125                                  | 9             | 28,97        | 9      | 1              | 0 | 28,97  | 0,89          | 0,00 | 9      | 4  | 0 | 28,97  | 9,35  | 0,00 |
| 250                                 | 125                                  | 9             | 33,16        | 9      | 1              | 1 | 33,16  | 2,01          | 2,75 | 13     | 3  | 2 | 37,10  | 5,76  | 5,61 |
| 250                                 | 125                                  | 9             | 31,93        | 10     | 0              | 0 | 32,42  | 1,09          | 0,00 | 11     | 3  | 1 | 33,58  | 9,71  | 0,00 |
| 250                                 | 125                                  | 9             | 28,10        | 9      | 0              | 1 | 28,10  | 1,82          | 1,67 | 11     | 4  | 1 | 32,15  | 8,37  | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 25,89        | 9      | 1              | 2 | 25,89  | 2,31          | 6,50 | 9      | 4  | 0 | 25,89  | 12,02 | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 32,84        | 9      | 0              | 0 | 27,68  | 2,42          | 0,00 | 11     | 2  | 0 | 33,57  | 5,40  | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 31,74        | 10     | 0              | 0 | 33,31  | 2,23          | 2,35 | 11     | 7  | 0 | 33,31  | 23,37 | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 30,64        | 10     | 1              | 0 | 32,82  | 2,89          | 0,00 | 10     | 6  | 0 | 32,82  | 17,47 | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 32,73        | 10     | 1              | 0 | 31,21  | 2,87          | 0,00 | 10     | 4  | 0 | 35,47  | 12,78 | 0,00 |
| 500                                 | 250                                  | 9             | 27,16        | 9      | 1              | 0 | 27,16  | 2,80          | 0,00 | 9      | 4  | 0 | 27,16  | 12,30 | 0,00 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 23,67        | 9      | 5              | 0 | 20,54  | 5,82          | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 23,67  | 21,61 | 0,35 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 27,65        | 9      | 3              | 1 | 24,23  | 4,08          | 0,00 | 9      | 5  | 0 | 27,65  | 14,68 | 0,00 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 32,81        | 9      | 2              | 0 | 34,28  | 4,08          | 0,00 | 12     | 4  | 0 | 40,90  | 15,87 | 0,00 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 27,48        | 9      | 2              | 0 | 27,03  | 4,82          | 0,00 | 9      | 7  | 0 | 27,48  | 20,53 | 0,00 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 29,48        | 9      | 1              | 0 | 29,48  | 4,49          | 0,00 | 9      | 5  | 0 | 29,48  | 23,78 | 0,00 |
| 1000                                | 500                                  | 9             | 29,95        | 9      | 6              | 1 | 29,95  | 8,44          | 2,89 | 9      | 9  | 0 | 29,95  | 29,95 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 27,69        | 9      | 3              | 0 | 27,69  | 8,08          | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 27,69  | 27,69 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 26,24        | 9      | 6              | 0 | 26,24  | 20,46         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 26,24  | 26,24 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 30,57        | 10     | 7              | 0 | 32,88  | 21,44         | 0,00 | 10     | 9  | 0 | 32,88  | 32,88 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 26,18        | 9      | 6              | 0 | 26,18  | 17,00         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 26,18  | 26,18 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 27,82        | 9      | 7              | 0 | 27,82  | 15,27         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 27,82  | 27,82 | 0,00 |
| 2000                                | 1000                                 | 9             | 23,85        | 9      | 7              | 0 | 23,85  | 15,54         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 23,85  | 23,85 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 27,34        | 9      | 6              | 0 | 27,34  | 18,38         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 27,34  | 27,34 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 25,48        | 9      | 6              | 0 | 25,48  | 15,76         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 25,48  | 25,48 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 22,09        | 9      | 6              | 1 | 22,09  | 11,25         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 22,09  | 22,09 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 30,22        | 9      | 7              | 1 | 30,22  | 20,12         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 30,22  | 30,22 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 31,36        | 9      | 8              | 0 | 31,36  | 20,81         | 0,00 | 9      | 9  | 0 | 31,36  | 31,36 | 0,00 |
| 4000                                | 2000                                 | 9             | 32,40        | 10     | 8              | 0 | 34,40  | 21,05         | 0,00 | 10     | 10 | 0 | 34,40  | 34,40 | 0,00 |

T: total; N: necrosis y C: clorosis.

Tabla 6a. Datos crudos de los parámetros CTC y PH (incluido el peso seco) en el ensayo de toxicidad binaria con agua embotellada.

| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) |         |     | Absorbancia |       | mL | Peso<br>húmedo | Clorofila |          |         | Peso<br>seco |
|--|---------|-----|-------------|-------|----|----------------|-----------|----------|---------|--------------|
| Met                                    | Rot     | R   | 660         | 635   |    |                | Chl a     | Chl b    | total   |              |
|  |         | [1] | 0,02        | 0,05  | 2  | 0,0125         | 0,1266    | 0,9289   | 1,0555  | 0,0009       |
|  |         | [2] | 0,029       | 0,079 | 2  | 0,0162         | 0,16719   | 1,47996  | 1,64715 | 0,0007       |
|  | Control | [3] | 0,042       | 0,057 | 2  | 0,022          | 0,38682   | 0,96813  | 1,35495 | 0,0006       |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0217         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0256         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,0182         |           |          |         |              |
|  |         | [1] | 0,045       | 0,035 | 2  | 0,0055         | 0,48015   | 0,5036   | 0,98375 | 0,0005       |
|  |         | [2] | 0,018       | 0,042 | 2  | 0,0053         | 0,1215    | 0,7746   | 0,8961  | 0,0013       |
| 250                                    | 125     | [3] | 0,015       | 0,025 | 2  | 0,0051         | 0,12645   | 0,4408   | 0,56725 | 0,003        |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0132         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0089         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,009          |           |          |         |              |
|  |         | [1] | 0,016       | 0,023 | 2  | 0,0047         | 0,14412   | 0,39513  | 0,53925 | -0,0088      |
|  |         | [2] | 0,02        | 0,038 | 2  | 0,0085         | 0,15684   | 0,68326  | 0,8401  | -0,0122      |
| 500                                    | 250     | [3] | 0,013       | 0,015 | 2  | 0,0049         | 0,12639   | 0,24556  | 0,37195 | 0,0058       |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0053         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0063         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,0043         |           |          |         |              |
|  |         | [1] | 0,08        | 0,003 | 2  | 0,0108         | 1,00284   | -0,31699 | 0,68585 | 0,0089       |
|  |         | [2] | 0,02        | 0,005 | 2  | 0,0045         | 0,24      | 0,00775  | 0,24775 | 0,0121       |
| 1000                                   | 500     | [3] | 0,01        | 0,031 | 2  | 0,0032         | 0,04818   | 0,58727  | 0,63545 | -0,006       |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0058         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0087         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,0118         |           |          |         |              |
|  |         | [1] | 0,006       | 0,005 | 2  | 0,0044         | 0,06318   | 0,07397  | 0,13715 | -0,0003      |
|  |         | [2] | 0,007       | 0,004 | 2  | 0,0052         | 0,07833   | 0,04877  | 0,1271  | 0,0003       |
| 2000                                   | 1000    | [3] | 0,013       | 0,002 | 2  | 0,0116         | 0,15915   | -0,02055 | 0,1386  | -0,0002      |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0054         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0008         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,0077         |           |          |         |              |
|  |         | [1] | 0,005       | 0,005 | 2  | 0,0037         | 0,05055   | 0,0787   | 0,12925 | 0,0002       |
|  |         | [2] | 0           | 0,005 | 2  | 0,0073         | -0,0126   | 0,10235  | 0,08975 | 0,0003       |
| 4000                                   | 2000    | [3] | 0           | 0,002 | 2  | 0,0052         | -0,00504  | 0,04094  | 0,0359  | 0            |
|  |         | [4] |             |       |    | 0,0036         |           |          |         |              |
|  |         | [5] |             |       |    | 0,0036         |           |          |         |              |
|  |         | [6] |             |       |    | 0,0054         |           |          |         |              |

R: unidad de ensayo.

Tabla 7a. Valores crudos obtenidos en el ensayo de metomilo con agua destilada. Parámetros AF y NF de los tres días de lectura.

| Fecha de inicio del ensayo          | 10/02/2015 (ensayo descartado para su análisis). |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        | T= total     |       |
|-------------------------------------|--|-------|----------------|---|--------|-------|--------|------|---------------|---|--------|--------|--------------|-------|
| Organismo                           | Lemna minor                                      |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        | N = necrosis |       |
| Tiempo de exposición                | 7 días, con reposición al cuarto día             |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        | C = clorosis |       |
| Medio utilizado                     | Agua destilada                                   |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        |              |       |
| Condiciones de cámara de cultivo    | 28,5 °C - 46% humedad                            |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        |              |       |
| Tipo de sustancia                   | Metomilo   |       |                |   |        |       |        |      |               |   |        |        |              |       |
| Concentración (mg·L <sup>-1</sup> ) | Día 0 - 0 hrs                                    |       | Día 4 - 96 hrs |   |        |       |        |      | Día 7 - 168 h |   |        |        |              |       |
|                                     | Fronda   |       | Fronda         |   | Fronda |       | Fronda |      | Fronda        |   | Fronda |        | Fronda       |       |
|                                     | T  | Área  | T              | N | C      | T     | N      | C    | T             | N | C      | T      | N            | C     |
| Control 1                           | 11   | 23,83 | 24             | 0 | 1      | 43,01 | 0,07   | 1,16 | 27            | 1 | 2      | 59,14  | 3,64         | 7,21  |
| Control 2                           | 9  | 21,50 | 22             | 0 | 1      | 48,05 | 0,00   | 1,78 | 30            | 1 | 1      | 62,03  | 5,52         | 5,35  |
| Control 3                           | 9  | 17,20 | 20             | 0 | 1      | 32,60 | 0,21   | 1,65 | 31            | 3 | 1      | 44,39  | 2,59         | 2,94  |
| Control 4                           | 10   | 21,15 | 18             | 0 | 1      | 35,13 | 0,00   | 2,17 | 25            | 2 | 3      | 47,39  | 4,54         | 11,06 |
| Control 5                           | 10   | 23,54 | 42             | 0 | 0      | 79,97 | 0,30   | 0,00 | 65            | 0 | 0      | 107,94 | 0,00         | 0,00  |
| Control 6                           | 11   | 25,15 | 21             | 0 | 0      | 46,07 | 0,30   | 0,00 | 32            | 0 | 2      | 66,25  | 2,06         | 3,66  |
| 2                                   | 13   | 26,91 | 27             | 0 | 0      | 54,49 | 0,00   | 0,66 | 38            | 0 | 0      | 73,30  | 0,75         | 8,12  |
| 2                                   | 9  | 21,15 | 21             | 0 | 1      | 46,61 | 0,00   | 1,72 | 27            | 0 | 1      | 60,61  | 1,02         | 3,10  |
| 2                                   | 11   | 23,04 | 20             | 0 | 0      | 50,32 | 0,00   | 0,79 | 33            | 0 | 2      | 71,42  | 0,00         | 9,97  |
| 2                                   | 10   | 18,92 | 23             | 0 | 0      | 39,25 | 0,00   | 0,84 | 33            | 0 | 0      | 54,42  | 0,00         | 5,05  |
| 2                                   | 10   | 21,20 | 23             | 0 | 0      | 46,01 | 0,00   | 0,59 | 32            | 0 | 1      | 59,37  | 0,00         | 1,50  |
| 2                                   | 10   | 23,52 | 26             | 0 | 0      | 46,18 | 0,00   | 0,48 | 36            | 0 | 0      | 65,42  | 0,00         | 1,65  |
| 16                                  | 11   | 18,47 | 25             | 0 | 0      | 38,01 | 0,00   | 0,00 | 28            | 0 | 1      | 49,99  | 0,00         | 3,37  |
| 16                                  | 12   | 19,38 | -              | - | -      | -     | -      | -    | 27            | 0 | 1      | 50,57  | 0,00         | 3,84  |
| 16                                  | 9  | 22,14 | 17             | 0 | 0      | 38,03 | 0,00   | 0,89 | 26            | 0 | 1      | 45,12  | 0,00         | 2,34  |
| 16                                  | 10   | 17,96 | 18             | 0 | 0      | 29,25 | 0,00   | 0,38 | 29            | 1 | 1      | 52,71  | 0,88         | 4,29  |
| 16                                  | 10   | 20,16 | 19             | 0 | 0      | 35,54 | 0,00   | 0,56 | 23            | 0 | 1      | 45,19  | 0,00         | 3,70  |
| 16                                  | 11   | 22,92 | 20             | 0 | 0      | 38,98 | 0,00   | 0,63 | 25            | 0 | 0      | 60,60  | 0,00         | 1,63  |
| 80                                  | 11   | 17,39 | 17             | 0 | 0      | 29,11 | 0,00   | 1,01 | 28            | 0 | 1      | 50,61  | 0,00         | 1,49  |
| 80                                  | 10   | 23,11 | 21             | 0 | 0      | 41,05 | 0,00   | 0,00 | 33            | 0 | 0      | 65,33  | 1,80         | 2,71  |
| 80                                  | 10   | 16,93 | 17             | 0 | 0      | 31,05 | 0,00   | 0,00 | 24            | 0 | 1      | 48,69  | 0,25         | 2,99  |
| 80                                  | 10   | 18,76 | 18             | 0 | 0      | 33,35 | 0,00   | 1,16 | 27            | 0 | 1      | 44,65  | 0,00         | 1,95  |
| 80                                  | 11   | 20,36 | 20             | 0 | 0      | 32,80 | 0,00   | 0,00 | 34            | 0 | 0      | 57,08  | 0,00         | 2,42  |
| 80                                  | 11   | 21,87 | 20             | 0 | 0      | 29,81 | 0,00   | 0,00 | 29            | 0 | 0      | 55,87  | 0,00         | 1,99  |
| 400                                 | 9  | 21,51 | 14             | 0 | 1      | 22,92 | 0,00   | 1,14 | 21            | 0 | 0      | 34,84  | 0,00         | 1,14  |
| 400                                 | 9  | 24,44 | 14             | 0 | 0      | 25,98 | 0,00   | 0,00 | 28            | 0 | 0      | 44,10  | 0,00         | 0,00  |
| 400                                 | 12   | 19,79 | 12             | 0 | 0      | 20,76 | 0,00   | 0,00 | 26            | 0 | 0      | 31,16  | 0,00         | 0,00  |
| 400                                 | 12   | 17,74 | 13             | 0 | 0      | 25,84 | 0,00   | 0,00 | 29            | 1 | 1      | 42,78  | 1,12         | 4,35  |
| 400                                 | 11   | 19,97 | 11             | 0 | 0      | 23,08 | 0,42   | 0,00 | 20            | 0 | 0      | 39,78  | 0,00         | 0,60  |
| 400                                 | 9  | 18,33 | 15             | 0 | 0      | 19,99 | 0,00   | 0,00 | 22            | 0 | 0      | 42,38  | 0,00         | 0,34  |
| 2000                                | 9  | 19,74 | 19             | 0 | 1      | 34,85 | 0,31   | 1,54 | 14            | 1 | 3      | 27,53  | 3,22         | 1,06  |
| 2000                                | 9  | 25,02 | 26             | 0 | 0      | 42,61 | 0,52   | 1,65 | 14            | 0 | 1      | 30,16  | 9,32         | 0,00  |
| 2000                                | 9  | 22,24 | 16             | 0 | 0      | 31,53 | 0,03   | 1,47 | 13            | 0 | 2      | 27,05  | 1,46         | 0,00  |
| 2000                                | 9  | 19,80 | 17             | 0 | 0      | 33,24 | 0,00   | 0,00 | 13            | 0 | 0      | 26,99  | 1,43         | 0,00  |
| 2000                                | 9  | 15,92 | 22             | 0 | 0      | 36,56 | 0,00   | 0,00 | 11            | 0 | 0      | 23,02  | 0,97         | 0,00  |
| 2000                                | 9  | 18,40 | 21             | 0 | 0      | 37,30 | 0,00   | 0,58 | 18            | 0 | 0      | 23,57  | 0,00         | 0,00  |

Tabla 8a. Datos crudos de los parámetros CTC y PH (incluido el peso seco) en el ensayo de metomilo con agua destilada.

| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | R   | Absorbancia |       | mL | Peso<br>húmedo | Clorofila |         | Peso<br>seco |
|--|-----|-------------|-------|----|----------------|-----------|---------|--------------|
|  |     | 660         | 635   |    |                | Chl a     | Chl b   |              |
| Control                                | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,38        | 0,146 | 2  | 0,0418         | 0,88638   | 7,08802 | 7,9744       |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0405         |           |         | 0,0053       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 2                                      | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,205       | 0,092 | 2  | 0,0353         | 0,54536   | 3,76119 | 4,30655      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0372         |           |         | 0,0043       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 16                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,258       | 0,112 | 2  | 0,0265         | 0,7644    | 4,7515  | 5,5159       |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0301         |           |         | 0,0033       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 80                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,143       | 0,064 | 2  | 0,0392         | 0,44796   | 2,62449 | 3,07245      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0332         |           |         | 0,0031       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 40                                     | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,126       | 0,055 | 2  | 0,0258         | 0,37713   | 2,31907 | 2,6962       |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,025          |           |         | 0,0027       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |
| 2000                                   | [1] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [2] | 0,225       | 0,099 | 2  | 0,0188         | 0,68337   | 4,13748 | 4,82085      |
|  | [3] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [4] |             |       |    |                |           |         |              |
|  | [5] |             |       |    | 0,0105         |           |         | 0,0012       |
|  | [6] |             |       |    |                |           |         |              |

R: unidad de ensayo.



Tabla 9a. Valores crudos obtenidos en el ensayo de rotenona con agua embotellada. Parámetros AF y NF de los tres días de lectura.

| Fecha de inicio del ensayo          | 07/05/2015 (ensayo descartado para su análisis) |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        | T= total     |      |      |   |   |
|-------------------------------------|---|-------|------|---|---|----------------|-------|------|---------------|---|---|--------|--------------|------|------|---|---|
| Organismo                           | Lemna minor                                     |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        | N = necrosis |      |      |   |   |
| Tiempo de exposición                | 7 días, con reposición al cuarto día            |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        | C = clorosis |      |      |   |   |
| Medio utilizado                     | Agua cielo                                      |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        |              |      |      |   |   |
| Condiciones de cámara de cultivo    | 30,5 °C - 47% humedad                           |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        |              |      |      |   |   |
| Tipo de sustancia                   | Rotenona  |       |      |   |   |                |       |      |               |   |   |        |              |      |      |   |   |
| Concentración (mg·L <sup>-1</sup> ) | Día 0 - 0 hrs                                   |       |      |   |   | Día 4 - 96 hrs |       |      | Día 7 - 168 h |   |   |        |              |      |      |   |   |
|                                     | Fronda  |       | Área |   |   | Fronda         |       |      | Área          |   |   | Fronda |              |      | Área |   |   |
|                                     | T   | T     | T    | N | C | T              | N     | C    | T             | N | C | T      | N            | C    | T    | N | C |
| Control 1                           | 9   | 19,43 | 51   | 1 | 0 | 54,49          | 1,66  | 0,00 | 27            | 1 | 0 | 111,94 | 1,97         | 0,00 |      |   |   |
| Control 2                           | 9   | 16,62 | 39   | 0 | 0 | 43,14          | 1,97  | 0,00 | 22            | 0 | 0 | 85,65  | 2,39         | 0,00 |      |   |   |
| Control 3                           | 9   | 24,73 | 62   | 0 | 0 | 76,14          | 0,00  | 0,00 | 31            | 0 | 0 | 130,85 | 0,00         | 0,00 |      |   |   |
| Control 4                           | 9   | 19,54 | 52   | 1 | 0 | 61,50          | 2,40  | 0,00 | 26            | 2 | 1 | 107,14 | 0,36         | 2,04 |      |   |   |
| Control 5                           | 10  | 28,19 | 57   | 0 | 0 | 71,16          | 0,00  | 0,00 | 33            | 0 | 0 | 151,57 | 0,00         | 0,00 |      |   |   |
| Control 6                           | 12  | 21,88 | 46   | 0 | 1 | 58,83          | 0,12  | 0,96 | 33            | 0 | 1 | 94,76  | 0,00         | 1,18 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 21,16 | 30   | 5 | 0 | 30,55          | 8,86  | 0,00 | 19            | 6 | 0 | 56,65  | 9,38         | 0,00 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 18,06 | 19   | 3 | 0 | 29,37          | 4,83  | 0,00 | 15            | 4 | 0 | 36,45  | 6,16         | 0,00 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 19,94 | 22   | 3 | 0 | 29,71          | 8,26  | 0,00 | 16            | 3 | 0 | 41,98  | 10,59        | 0,00 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 19,75 | 20   | 2 | 1 | 30,29          | 6,52  | 0,00 | 16            | 4 | 0 | 37,10  | 4,89         | 0,00 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 21,18 | 23   | 2 | 0 | 29,90          | 3,33  | 0,00 | 13            | 3 | 0 | 42,65  | 7,93         | 0,00 |      |   |   |
| 125                                 | 9   | 21,81 | 25   | 0 | 0 | 31,90          | 3,30  | 0,00 | 12            | 1 | 0 | 48,15  | 4,16         | 0,00 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 20,85 | 22   | 1 | 0 | 23,84          | 3,40  | 0,00 | 14            | 2 | 0 | 43,75  | 3,63         | 0,00 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 23,03 | 26   | 2 | 1 | 27,24          | 4,26  | 0,00 | 17            | 4 | 1 | 48,57  | 9,18         | 2,35 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 18,46 | 18   | 1 | 1 | 29,83          | 5,07  | 0,00 | 15            | 1 | 1 | 42,22  | 2,83         | 2,00 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 20,95 | 16   | 7 | 0 | 19,88          | 7,51  | 0,00 | 12            | 6 | 0 | 30,47  | 8,81         | 0,00 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 16,18 | 25   | 4 | 0 | 22,15          | 7,96  | 0,00 | 13            | 5 | 1 | 42,73  | 6,96         | 1,58 |      |   |   |
| 250                                 | 9   | 17,16 | 20   | 6 | 0 | 31,05          | 9,14  | 0,00 | 14            | 8 | 0 | 47,52  | 11,66        | 0,00 |      |   |   |
| 500                                 | 9   | 22,71 | 21   | 3 | 0 | 24,61          | 4,54  | 0,00 | 17            | 3 | 0 | 42,82  | 9,62         | 2,09 |      |   |   |
| 500                                 | 9   | 23,55 | 21   | 4 | 0 | 24,35          | 5,37  | 0,00 | 13            | 3 | 0 | 38,10  | 3,44         | 0,00 |      |   |   |
| 500                                 | 9   | 24,34 | 20   | 4 | 0 | 22,81          | 8,36  | 0,00 | 13            | 5 | 1 | 40,90  | 10,19        | 3,79 |      |   |   |
| 500                                 | 9   | 17,19 | 23   | 3 | 0 | 24,99          | 3,21  | 0,00 | 15            | 2 | 0 | 43,79  | 4,87         | 0,00 |      |   |   |
| 500                                 | 9   | 21,64 | 25   | 3 | 0 | 32,41          | 3,98  | 0,00 | 16            | 3 | 0 | 46,08  | 5,11         | 0,00 |      |   |   |
| 500                                 | 10  | 18,84 | 18   | 6 | 0 | 23,76          | 6,95  | 0,00 | 13            | 4 | 0 | 32,88  | 6,07         | 0,00 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 25,76 | 20   | 4 | 1 | 21,60          | 7,13  | 0,00 | 13            | 5 | 1 | 45,18  | 8,08         | 2,15 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 21,30 | 19   | 6 | 1 | 25,10          | 10,40 | 0,00 | 13            | 6 | 0 | 39,26  | 11,19        | 0,00 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 21,56 | 20   | 5 | 0 | 24,80          | 8,58  | 0,00 | 14            | 5 | 0 | 37,56  | 9,72         | 0,00 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 24,24 | 20   | 7 | 0 | 19,90          | 5,90  | 0,00 | 13            | 6 | 0 | 35,79  | 12,56        | 0,00 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 18,15 | 20   | 3 | 0 | 24,02          | 4,76  | 0,00 | 18            | 3 | 0 | 33,43  | 6,32         | 1,47 |      |   |   |
| 1000                                | 9   | 18,52 | 24   | 4 | 0 | 25,90          | 7,07  | 0,00 | 14            | 3 | 0 | 42,68  | 4,11         | 0,00 |      |   |   |
| 2000                                | 10  | 22,98 | 24   | 3 | 0 | 23,53          | 5,59  | 2,85 | 16            | 3 | 0 | 46,51  | 7,51         | 0,00 |      |   |   |
| 2000                                | 9   | 23,24 | 17   | 4 | 1 | 25,01          | 5,44  | 0,00 | 13            | 2 | 1 | 28,67  | 4,61         | 2,10 |      |   |   |
| 2000                                | 9   | 25,54 | 28   | 6 | 0 | 26,28          | 6,82  | 0,00 | 14            | 6 | 0 | 44,90  | 11,66        | 0,00 |      |   |   |
| 2000                                | 9   | 23,57 | 23   | 7 | 0 | 28,36          | 9,30  | 0,00 | 17            | 7 | 0 | 45,46  | 10,09        | 0,00 |      |   |   |
| 2000                                | 9   | 21,62 | 16   | 8 | 0 | 19,01          | 8,62  | 0,00 | 12            | 9 | 0 | 33,43  | 19,22        | 0,00 |      |   |   |
| 2000                                | 9   | 21,61 | 20   | 4 | 0 | 22,44          | 4,56  | 0,00 | 13            | 4 | 0 | 43,28  | 10,83        | 0,00 |      |   |   |

Tabla 10a. Datos crudos de los parámetros CTC y PH (incluido el peso seco) en el ensayo de rotenona con agua embotellada.

| Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | R   | Absorbancia |       | mL | Peso<br>húmedo | Clorofila |          |          | Peso<br>seco |
|--|-----|-------------|-------|----|----------------|-----------|----------|----------|--------------|
|  |     | 660         | 635   |    |                | Chl a     | Chl b    | total    |              |
| Control                                | [1] | 0,063       | 0,151 | 2  | 0,0207         | 0,41517   | 2,793282 | 3,208452 |              |
|  | [2] | 0,037       | 0,126 | 2  | 0,0175         | 0,14979   | 2,404462 | 2,554252 |              |
|  | [3] | 0,051       | 0,159 | 2  | 0,023          | 0,24345   | 3,013818 | 3,257268 |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,0217         |           |          |          | 0,0022       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0256         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0182         |           |          |          | 0,0011       |
| 125                                    | [1] | 0,02        | 0,062 | 2  | 0,0115         | 0,09636   | 1,174664 | 1,271024 |              |
|  | [2] | 0,028       | 0,08  | 2  | 0,0096         | 0,15204   | 1,50532  | 1,65736  |              |
|  | [3] | 0,017       | 0,059 | 2  | 0,0098         | 0,06603   | 1,127438 | 1,193468 |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,0081         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0045         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0085         |           |          |          | 0,0005       |
| 250                                    | [1] | 0,019       | 0,071 | 2  | 0,0094         | 0,06105   | 1,363642 | 1,424692 |              |
|  | [2] | 0,019       | 0,073 | 2  | 0,0113         | 0,05601   | 1,404586 | 1,460596 |              |
|  | [3] | 0,022       | 0,07  | 2  | 0,0084         | 0,10146   | 1,32898  | 1,43044  |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,0058         |           |          |          | 0,0004       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0093         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0084         |           |          |          | 0,0005       |
| 500                                    | [1] | 0,013       | 0,052 | 2  | 0,0028         | 0,03315   | 1,003054 | 1,036204 |              |
|  | [2] | 0,026       | 0,078 | 2  | 0,0074         | 0,13182   | 1,473836 | 1,605656 |              |
|  | [3] | 0,017       | 0,068 | 2  | 0,009          | 0,04335   | 1,311686 | 1,355036 |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,0083         |           |          |          | 0,0004       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0085         |           |          |          | 0,0011       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0071         |           |          |          | 0,0005       |
| 1000                                   | [1] | 0,017       | 0,069 | 2  | 0,0108         | 0,04083   | 1,332158 | 1,372988 |              |
|  | [2] | 0,019       | 0,075 | 2  | 0,0072         | 0,05097   | 1,44553  | 1,4965   |              |
|  | [3] | 0,025       | 0,079 | 2  | 0,0089         | 0,11667   | 1,499038 | 1,615708 |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,007          |           |          |          | 0,0007       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0076         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0072         |           |          |          | 0,0005       |
| 2000                                   | [1] | 0,029       | 0,091 | 2  | 0,0097         | 0,13695   | 1,725782 | 1,862732 |              |
|  | [2] | 0,017       | 0,066 | 2  | 0,0065         | 0,04839   | 1,270742 | 1,319132 |              |
|  | [3] | 0,028       | 0,105 | 2  | 0,0106         | 0,08904   | 2,01712  | 2,10616  |              |
|  | [4] |             |       |    | 0,0078         |           |          |          | 0,0006       |
|  | [5] |             |       |    | 0,0076         |           |          |          | 0,0007       |
|  | [6] |             |       |    | 0,0072         |           |          |          | 0,0011       |

R: unidad de ensayo.

