

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Toxicidad aguda de tres plaguicidas (Butaclor,
Oxcloruro de cobre y Clorpirifos) sobre el anfípodo
bentónico marino *Apohyale grandicornis* (Kroyer, 1845)
(Crustacea: Hyalidae)**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA

Diana Lina Sotelo Vásquez

Lima-Perú

2018

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios y a la Virgen María, quienes inspiraron mi espíritu para la conclusión de esta tesis y quienes pusieron en mi camino a todas esas personas que me alentaron a terminarla. A mi familia que siempre creyó en mí, quienes me apoyaron y dieron animo en todo momento. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis. El Dr. Iannacone Oliver José, por su asesoramiento, paciencia y gran disponibilidad en el transcurso de esta tesis. Al Mgtr. Christian Paredes, jefe del área ecotoxicología en el Instituto del mar del Perú (IMARPE), por su guía al inicio de esta tesis y por proporcionar el ambiente y materiales necesarios para la realización práctica de la tesis. A la Mg. Analí Jiménez, investigadora del IMARPE, por su apoyo en la identificación del anfípodo. Finalmente, agradecer a mi mamá, papá, abuela, hermano, comunidad y amigas por su apoyo, oraciones y aliento constante.

RESUMEN

Los plaguicidas han sido enormemente utilizados desde tiempos antiguos, en la agricultura para la protección de cultivos del ataque de plagas. Sin embargo, la mayoría de estos genera una alta contaminación ambiental; y a pesar de la regulación, estos siguen llegando por diferentes vías a las aguas marinas. El presente trabajo evaluó la toxicidad de tres plaguicidas de uso comercial en el Perú: el herbicida Butaclor, el insecticida Clorpirifos y el fungicida Oxicloruro de Cobre, sobre el anfípodo marino *Apohyale grandicornis* (Krøyer, 1845). Se realizaron bioensayos ecotoxicológicos con los tres modelos empleando protocolos estandarizados, además se efectuó una prueba de sensibilidad utilizando Dicromato de Potasio. Asimismo, tomando como base los ensayos agudos, se evaluó el riesgo ambiental de los tres plaguicidas a nivel acuático, mediante el cálculo del cociente de riesgo (CR). La secuencia de mayor a menor toxicidad según la CL_{50} de los plaguicidas fue: Butaclor > Clorpirifos > Oxicloruro de Cobre. Para la prueba de sensibilidad con Dicromato de Potasio se halló un valor de CL_{50} de 13,04 mg.L⁻¹. El herbicida Butaclor registró la mayor toxicidad de todos los plaguicidas evaluados a las 96h de exposición en *A. grandicornis* con CL_{50} de 0,019 mg.L⁻¹ mostrando una toxicidad 1,11 veces mayor que el Clorpirifos y 28,42 más que el Oxicloruro de Cobre. Finalmente tanto el Butaclor como el Clorpirifos presentan un riesgo ambiental sobre *Apohyale grandicornis*; mientras que el Oxicloruro de cobre sólo mostró riesgo ambiental al utilizar el factor de seguridad para el cálculo del Cociente de riesgo.

Palabras claves: Plaguicidas, Butaclor, Oxicloruro de Cobre, Clorpirifos, Dicromato de Potasio, anfípodo, *Apohyale grandicornis*, bioensayos, CL_{50} , cociente de riesgo, riesgo ambiental.

ABSTRACT

Pesticides have been widely used since ancient times in agriculture for the protection of crops from plagues. However, most of these generate high environmental pollution. Despite of law regulation they continue to arrive by different ways to the ocean. The present work evaluate the toxicity of three commercial pesticides in Peru: the herbicide Butachlor, the insecticide Chlorpyrifos and the fungicide Copper Oxychloride, on the marine amphipod *Apohyale grandicornis* (Krøyer, 1845). Ecotoxicological bioassays were carried out in each one with standardized protocols, in addition to Potassium Dichromate sensibility test. Likewise, based on acute test, the environmental risk of the three pesticides at the aquatic level was evaluated by calculating the risk quotient (RQs). According to the LC₅₀ of the pesticides the sequence in descended order of toxicity was: Butachlor> Chlorpyrifos> Copper Oxychloride. For the Potassium Dichromate sensitivity test an LC₅₀ value of 13,04 mg.L⁻¹ was found. The herbicide Butachlor registered the highest toxicity of all the pesticides evaluated at the 96 hours of exposure in *A. grandicornis* with LC₅₀ of 0,019 mg.L⁻¹, showing a toxicity 1,11 times higher than Chlorpyrifos and 28,42 more than Copper Oxychloride. Finally, both Butachlor and Chlorpyrifos present a environmental risk on *Apohyale grandicornis*. While, Copper Oxychloride was an environmental risk when using the safety factor to calculate the risk quotient.

Keywords: Pesticides, Butachlor, Copper Oxychloride, Chlorpyrifos, Potassium Dichromate, amphipod, *Apohyale grandicornis*, bioassays, LC₅₀, risk quotient, environmental risk.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
I. OBJETIVOS.....	14
II. HIPÓTESIS	15
III. ANTECEDENTES	16
IV. MARCO TEORICO	21
5.1 Plaguicidas y su uso en la Agricultura.....	21
5.2 Situación de los plaguicidas en el Perú	23
5.4 Plaguicidas empleados en este estudio	25
5.4.1 Oxicloruro de Cobre	25
5.4.2 Butaclor	28
5.4.3 Clorpirifos.....	30
5.5 Ensayos ecotoxicológicos.....	32
5.6 Evaluación de riesgo ambiental (ERA)	33
5.7 Crustáceos (Amphipoda)	35
5.7.1 Generalidades	35
5.7.2 Morfología	36
5.7.3 Importancia.....	38
5.8 Genero Apohyale.....	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
6.1 Área de Estudio	43
6.2 Apohyale grandicornis.....	44
6.3 Plaguicidas empleados.....	45

6.4	Metodología.....	45
6.4.1	Aclimatación.....	45
6.4.2	Bioensayo de Toxicidad aguda.....	46
6.4.3	Test de sensibilidad con Dicromato de Potasio.....	49
6.4.4	Medición de parámetros fisicoquímicos.....	49
6.4.5	Evaluación del riesgo ambiental (ERA).....	50
6.4.5.1	Estimación de la concentración ambiental estimada (CAE).....	50
6.4.5.2	Estimación de la concentración prevista sin efecto (PNEC).....	50
6.4.5.3	Cálculo de los Coeficientes de riesgo (CR).....	51
6.4.5.4	Procesamiento de datos.....	51
6.5	Lugar de Ejecución.....	52
VI.	RESULTADOS.....	53
7.1	Parámetros fisicoquímicos.....	53
7.2	Bioensayos de Toxicidad aguda.....	54
7.2.1	Butaclor.....	54
7.2.2	Clorpirifos.....	56
7.2.3	Oxicloruro de cobre.....	57
7.2.4	Prueba con Dicromato de Potasio.....	59
VII.	DISCUSIÓN.....	63
8.1	Butaclor.....	63
8.2	Oxicloruro de Cobre.....	65
VIII.	CONCLUSIONES.....	72
IX.	RECOMENDACIONES.....	73
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
XI.	ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROMEDIO DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS BÁSICOS	53
TABLA 2. TOXICIDAD DEL HERBICIDA BUTACLOR A LAS 24-96H SOBRE <i>APOHYALE GRANDICORNIS</i>	55
TABLA 3. TOXICIDAD DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS A LAS 24-96H SOBRE <i>APOHYALE GRANDICORNIS</i>	56
TABLA 4. TOXICIDAD DEL FUNGICIDA OXICLORURO DE COBRE A LAS 24-94H SOBRE <i>APOHYALE GRANDICORNIS</i>	58
TABLA 5. TOXICIDAD DEL DICROMATO DE POTASIO A LAS 24-96H SOBRE <i>APOHYALE GRANDICORNIS</i>	59
TABLA 6. RESUMEN DE LA EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES (ERA) DE TRES PLAGUICIDAS SOBRE <i>APOHYALE GRANDICORNIS</i>	61
TABLA 7. RESUMEN DEL ERA TOMANDO EN CUENTA FACTOR DE RIESGO Y PNEC.....	62

ÍNDICE DE IMÁGENES

ESTRUCTURA QUÍMICA DEL OXICLORURO DE COBRE	26
ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BUTACLOR.....	29
ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CLORPITIFOS	30
APOHYALE GRANDICORNIS (KROYER, 1845)	40
“PLAYA LA ARENILLA” LA PUNTA-CALLAO	43
UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	43
RECOLECCIÓN DE ANFÍPODOS EN BALDES	44
BIOENSAYO DE TOXICIDAD INSTALADO	46
DETERMINACIÓN DE LA MUERTE DEL ANFÍPODO.....	47

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se definen como sustancias químicas de origen natural o sintético, que se pueden utilizar solas, combinadas o en mezclas para la protección o destrucción de las diferentes plagas que afectan a los cultivos y productos agrícolas. Desde hace siglos estos plaguicidas han sido utilizados para controlar diferentes tipos de plagas que han afectado la vida del ser humano a lo largo de la historia; siendo fundamentales en el desarrollo de la misma.

El aumento en las necesidades de producción de alimentos y de otros productos de la agricultura, debido al crecimiento poblacional, entre otros factores, ha llevado a la producción y aplicación masiva de productos químicos para el control de las plagas, originando así problemas de tipo ambiental.

En el presente trabajo, se toma tres tipos de plaguicidas: un herbicida (Butaclor), un insecticida (Clorpirifos) y un fungicida (Oxicloruro de cobre), que según el proyecto “Plan Nacional de implementación del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes Orgánicos persistentes”, están dentro de los principales plaguicidas formulados e importados en el Perú desde el 2004.

Todos estos plaguicidas, transportados por los ríos, llegan finalmente a las zonas marinas que poseen una gran importancia, debido a que son fuente de alimento y hábitat para la fijación y desarrollo de una gran diversidad de organismos bentónicos.

Dentro de estos, encontramos a los anfípodos peracáridos. Estos, frecuentemente, en ambientes marinos, exceden a todos los otros crustáceos en abundancia y diversidad de especie. Así también, juegan un relevante rol ecológico ya que están involucrados en la conversión de

energía facilitando su flujo entre los productores primarios (algas, plantas epífitas), detritos y los consumidores superiores.

En el Perú son escasos los trabajos de esta índole, por lo que la presente tesis busca, entre otras cosas, estandarizar un método para la especie *Apohyale grandicornis*., necesario para ahorrar recursos en futuras investigaciones, además de generar nuevos datos sobre la toxicidad de estos tres plaguicidas de tanta importancia en el Perú como son el Butaclor, el Clorpirifos y el Oxicloruro de cobre; en organismos como los anfípodos.

La evaluación de los efectos de estos plaguicidas ayudará a conocer como estos organismos podrían verse afectados. Así los resultados obtenidos permitirán establecer criterios de calidad y legislación para la protección de los ambientes acuáticos donde residen estos organismos. Por lo señalado, el objetivo de esta tesis se enmarcará en esta problemática y buscará determinar la toxicidad aguda de tres plaguicidas comerciales en el Perú: Butaclor, Clorpirifos y Oxicloruro de Cobre, en el anfípodo bentónico marino *Apohyale grandicornis*.

I. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la Toxicidad aguda de tres plaguicidas: Butaclor, Oxicloruro de Cobre y Clorpirifos, en el anfípodo bentónico marino *Apohyale grandicornis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración letal media (CL_{50}) a las 96 h del Herbicida Butaclor en *Apohyale grandicornis*.
- Encontrar la concentración letal media (CL_{50}) a las 96h del Funguicida Oxicloruro de cobre en *Apohyale grandicornis*.
- Establecer la concentración letal media (CL_{50}) a las 96h del Insecticida Clorpirifos en *Apohyale grandicornis*.
- Hallar la concentración letal media (CL_{50}) a las 96h para el tóxico de referencias Dicromato de Potasio.
- Comparar la toxicidad aguda de los tres plaguicidas.

II. HIPÓTESIS

- Ho: Los plaguicidas (Butaclor, Clorpirifos y Oxicloruro de cobre) ocasionan efectos tóxicos agudos sobre *Apothyale grandicornis* en base a la CL₅₀ a 96h de exposición.
- Ha: Los plaguicidas (Butaclor, Clorpirifos y Oxicloruro de cobre) no ocasionan efectos tóxicos agudos sobre *Apothyale grandicornis* en base a la CL₅₀ a 96h de exposición.

III. ANTECEDENTES

Leight & Van Dolah (1998). Los efectos agudos de tres plaguicidas de uso común se evaluaron utilizando al anfípodo epibentónico estuarino *Gammarus palustris*. Los bioensayos de laboratorio se realizaron bajo condiciones de renovación estática y estática. Las CL₅₀ de Endosulfán y Clorpirifos fueron mucho más bajas que las del Malatión en las exposiciones estáticas (Ej. CL₅₀ 96h 0,43 mg•L para Endosulfán; 0,30 mg•L para Clorpirifos y 4,65 mg•L para Malatión) También observaron un patrón similar de toxicidad en las exposiciones estáticas de renovación. Así concluyeron que la sensibilidad de *G. palustris* fue en general comparable a los valores de CL₅₀ encontrados en la literatura para otros crustáceos, particularmente para las exposiciones a las 96h, por lo que podría ser usado como un bioindicador de estrés contaminante para hábitats de marismas saladas.

Iannacone & Alvariño (2000). Evaluaron la ecotoxicidad de los plaguicidas de suelo Lindano y Clorpirifos sobre dos invertebrados: la lombriz roja *Chironomus calligraphus* y la pulga de agua *Moina macrocopa* Obteniendo para el caso de *M. macrocopa* un CL₅₀ a las 48h de 0,01048 ± 0,0016 mg•L⁻¹. Según sus resultados concluyeron que el Clorpirifos es más tóxico que el Lindano, y que la pulga de agua muestra mayor sensibilidad.

Abessa & Souza (2003). Determinaron la sensibilidad del anfípodo *Tiburonella viscana* hacia el Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇), mediante 18 test de toxicidad con solo agua. Así, estimaron un CL₅₀ a las 48h de 11,217 ± 3,768 mg•L. Calcularon también los límites de advertencia que estuvieron entre 3,68 y 18,75 mg•L. Los autores recalcaron que estos resultados son basales y que serían de utilidad para posteriores estudios comparativos.

Cyrino et al. (2004). Compararon la toxicidad de los plaguicidas a base de cobre (oxicloruro de cobre, óxido cuproso y sulfato de cobre) sobre diferentes organismos objetivo (*Raphidocelis subcapitata* y *Biomphalaria glabrata*) y no objetivo (*Daphnia similis* y *Danio rerio*). Determinando para el Oxicloruro de Cobre un CL₅₀ a las 96h para *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata* y *Daphnia similis* de 0,152; 1,433 y 0,065 mg•L⁻¹ respectivamente.

Ferreira et al. (2004). Determinaron la toxicidad aguda del cobre en renacuajos de *Rana catesbeiana* así como su bioacumulación en exposiciones crónicas. Como resultado de sus ensayos agudos hallaron una CL₅₀, utilizando oxicloruro de cobre, a las 96h de 2.4 mg•L. Teniendo una bioacumulación dependiente de la dosis e inversamente proporcional al tiempo de exposición.

King et al. (2006). Compararon las sensibilidades de ocho anfípodos bentónicos: *Chaetocorophium lucasi*, *Corophium colo*, *Grandidierella japonica*, *Hyale crassicornis*, *Hyale longicornis*, *Melita awa*, *Melita matilda* y *Melita plumulosa*, al cobre y zinc (en agua y sedimentos enteros). Encontraron que los anfípodos epibentónicos *M. awa* y *M. plumulosa* eran los más sensibles al cobre acuoso, con un valor CL₅₀ a las 96h de 120 mg Cu•L para los juveniles. Asimismo concluyeron que los anfípodos juveniles (de 7 días) eran más sensibles que los anfípodos adultos (> 30 d), y que los anfípodos epibentónicos son más sensibles que los anfípodos que viven en tubos infaunales.

Tilak et al. (2007). Realizaron estudios de toxicidad en el pez *Channa punctata* empleando sistemas de flujo continuo y estático, para el Butaclor (grado técnico) y su formulación comercial (machete 50% EC). Encontrando valores de CL₅₀ de 297,89 ppb y 247,46 ppb durante 24 y 48 h en estático para el grado técnico, y 636,45 ppb y 546,09 ppb para el formulado machete. Asimismo, en el flujo continuo encontraron valores de 270,05 ppb y 233,52 ppb para el técnico y 567,85 ppb y 481,49 ppb para el formulado. También hallaron que los tejidos mostraban acumulación cualitativa.

Lasheidani et al. (2008). Evaluaron morfológicamente la madurez sexual de *Rutilus frisii kutum Kamenskii* 1901, determinando el volumen de esperma, el recuento total de espermatozoides y la concentración espermática de espermatozoides anormales después de exponer los reproductores al herbicida Machete (Butaclor 60%). Encontrando a partir de sus resultados que existe una disminución en el volumen de esperma, así como en el aumento del porcentaje de espermatozoides anormales, al aumentar el nivel de contaminación con Butaclor.

Palma et al. (2008). Evaluaron los efectos ecotoxicológicos del herbicida Atrazina y los insecticidas Sulfato de endosulfán y Clorpirifos utilizando una batería de pruebas que comprendieron organismos acuáticos de diferentes niveles tróficos. Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda en Clorpirifos mostraron que la sensibilidad de los organismos era la siguiente: *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*. Asimismo acotaron que el Clorpirifos puede actuar como un compuesto tóxico en el ambiente acuático.

Yin et al. (2008). Evaluaron el daño del ADN en el sapo chino utilizando un ensayo cometa. Con ese fin tuvieron como primer paso determinar la toxicidad aguda de diferentes herbicidas, entre los cuales estuvo el Butaclor. En pruebas agudas, los renacuajos estuvieron expuestos a una serie de concentraciones relativamente altas durante 96h siendo su CL₅₀, para el Butaclor, de 0,76 mg·L⁻¹. Además, se observaron efectos negativos sobre el comportamiento de los renacuajos con este herbicida.

Iannacone & Alvariño (2009). Tuvieron como objetivo evaluar el efecto ecotoxicológico agudo de siete productos farmacéuticos ampliamente usados en el Perú, sobre la pulga del agua *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustacea: Daphniidae), y su relación con las principales características fisicoquímicas y de

relación de componentes de la molécula, y a partir de estos resultados evaluar su riesgo ambiental acuático (ERA).

Liu et al. (2011). Documentaron los impactos negativos del Butaclor sobre la supervivencia, desarrollo y tiempo de metamorfosis de renacuajos. La CL₅₀ a las 96h para los renacuajos fue de 0,87 mg•L, mucho más baja que la dosis recomendada de 4,8 mg•L para la aplicación de arroz a los campos. También evidenciaron daños en el ADN (genotoxicidad) en renacuajos expuestos a Butaclor en concentraciones de un orden de magnitud menor que la dosis recomendada.

He et al. (2012). Investigaron la toxicidad única y conjunta de la Atrazina y Butaclor para el alga *Scenedesmus obliquus* y el cladocero *Daphnia carinata*. Los valores de CL₅₀ a las 48h para *D. carinata* fueron, en el caso del Butaclor, de 3,40 mg•L⁻¹. Según sus resultados, los autores sugieren que el Butaclor presenta una toxicidad moderada para ambos organismos.

Nwani et al (2013). Mediante un ensayo semi-estático estudiaron la toxicidad aguda del Butaclor sobre *Tilapia zillii*. Obteniendo valores de CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h de 3,13 (2,88 a 4,61), 1,93 (0,63 a 4,41), 1,27 (0,59 a 1,92) y 1,25 (0,60 a 1,85) mg•L⁻¹ respectivamente. Observaron signos de estrés en forma de hiperactividad, natación errática, decoloración de la piel, sacudidas vigorosas del cuerpo seguidas de agotamiento y muerte. El CL₅₀ a las 96h de 1,25 mg•L⁻¹ que hallaron, indica que el herbicida es tóxico para *T. zillii*, por lo que aconsejan se restrinja su uso cerca de cuerpos de agua.

Giddings et al. (2014). Centrarón su investigación en los efectos potenciales del Clorpirifos en organismos acuáticos y ecosistemas; basados en las propiedades y los usos actuales de este. Hallando el riesgo ambiental del Clorpirifos mediante el análisis de diferentes datos, entre ellos los CL₅₀ de diferentes organismos,

dentro de los cuales consideraron 23 especies de crustáceos. Asimismo comentaron el mecanismo de acción del Clorpirifos dentro del organismo.

Abigail et al. (2015). Elaboraron una revisión informando los diferentes aspectos toxicológicos, estudios realizados hasta el momento sobre el Butaclor, así como las tecnologías de eliminación disponibles para su descontaminación. Dentro de su investigación hablan sobre la toxicidad aguda y crónica del Butaclor en algunos organismos, así como su mecanismo de acción.

Gradila (2015). Presenta datos que demuestran la funcionalidad de los sistemas biológicos reconstituidos con organismos acuáticos desarrollados en Buenas Prácticas de Laboratorio en el Instituto de Investigación para la Protección Vegetal de Bucarest para la evaluación del riesgo ambiental de cuatro fungicidas basados en cobre. Después de probar la toxicidad aguda de estos fungicidas en *Cyprinus carpio* y *Daphnia magna*, encontraron que tres de ellos (oxicloruro de cobre, hidróxido de cobre y sulfato de cobre) mostraron eficiencia ecológica, es decir, baja toxicidad.

Paredes & Anaya (2015). Determinaron el efecto agudo de dos agroquímicos: Oxicloruro de Cobre y el Butaclor sobre juveniles de camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina 1782). Además, incluyeron una sustancia de referencia como control positivo (Dicromato de potasio). Encontrando que el Dicromato de potasio muestra un rango de CL₅₀ de 0,3 – 3 mg•L. Del mismo modo, en el caso de Butaclor, a las 96 h, obtuvieron un rango de CL₅₀ de 3,18 – 6,25 mg•L, mientras que para el oxicloruro de cobre fue un CL₅₀ de 2,607.72 mg•L.

Lewis et al. (2016). Diseñaron una base de datos (PPDB) completa con información sobre la identidad química de pesticidas, sus características fisicoquímicas, lo relacionado con la salud humana y sus datos ecotoxicológicos (Bioensayos agudos y crónicos en diferentes organismos). Con el fin de ayudar a los trabajos de investigación sobre riesgo ambiental.

IV. MARCO TEORICO

5.1 Plaguicidas y su uso en la Agricultura

Los plaguicidas según la (FAO, 1990) se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

Estos pueden clasificarse según diversos criterios, sin embargo, la mayoría de autores (Henao & Nieto, 1992; Ramírez & Lacasaña, 2001; Milla & Palomino, 2002; Fernández, 2005) coinciden en clasificarlos de la siguiente forma:

- Según el tipo de organismo que se desea controlar.
- El grupo químico del principio activo.
- Su vida media.
- Su toxicidad aguda.

Esta última, establecida en 1975 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a los plaguicidas según su peligrosidad o toxicidad aguda; es decir el riesgo de una o múltiples exposiciones a un plaguicida durante un período relativamente corto de tiempo (WHO, 2009). Esta

información también es necesaria para que un plaguicida pueda comercializarse en un país.

Muchos autores (Albert, 2005; Lafuente & Navia, 2005; Mantilla & Duran, 2007) concuerdan que al auge del uso de plaguicidas en la agricultura se generaría en el siglo XX. Tras la llamada “Revolución verde”, nacida de la importancia a gran escala que adquiriría la agricultura en todo el mundo luego de la segunda guerra mundial. Esta revolución traería consigo hasta el día de hoy el uso de tecnología aplicada a la maquinaria agrícola, semillas híbridas, así como uso intensivo de pesticidas sintéticos de amplio espectro.

Estos plaguicidas provocan un desequilibrio en todos los ecosistemas donde son aplicados, provocando una resistencia cada vez mayor de las plagas lo que conlleva a su uso más frecuente y prologando, así como la generación de nuevos productos, entrando así en un círculo vicioso.

Los posibles daños que estos agroquímicos pudieran causar no fueron tomados en cuenta sino hasta 1960, cuando la doctora Rachel Carson en su libro “The Silent spring” (La primavera silenciosa) cuestiona por primera vez los beneficios del uso indiscriminado de plaguicidas (Carson. 2010). Lo que generó la alarma de las personas, impulsando varias actividades históricas relacionadas con la protección del medio ambiente.

Entre ellos la promulgación de varias leyes destinadas a regular y limitar la liberación de productos químicos en el medio ambiente (Garza. 2009)

En estos últimos años, en el Perú la agricultura ha retomado gran parte de la generación de ingresos, por ejemplo, en el 2011, según el INEI el aumento en la actividad del Comercio creció (8,7%) en gran parte debido a la actividad agrícola. En este mismo año se vio un aumento del 3,7% de la producción agrícola, el cual se sustenta en el aumento de las hectáreas de cultivo de ciertos productos como son: el algodón en rama, la uva, el cacao, la palta y los espárragos (INEI. 2011). Este aumento en las hectáreas de cultivo trae como consecuencia un mayor uso de plaguicidas.

5.2 Situación de los plaguicidas en el Perú

La llamada “revolución verde” se expandió por todo el mundo, y el Perú no escapó de ella, adquiriendo también sus principios básicos; cambiando así, poco a poco, de una agricultura clásica a una moderna. Siguiendo entonces el mismo dinamismo; uso masivo de maquinaria y el aumento en el uso de agroquímicos.

Esta realidad se ve reflejada en estadísticas. Así, la base de datos de FAOSTAT (2017) por ejemplo, en el año 2014, registró un uso mayoritario de herbicidas en el Perú (9720,1 toneladas), seguido por los fungicidas/bactericidas (4981,01 toneladas) y finalmente los Insecticidas (3943,81 toneladas). De igual forma, el Instituto de estadística e información del Perú (INEI) registró para el 2015 un total de 16 474,2 toneladas de importación en plaguicidas. Dentro de los cuales los picos más altos los obtuvieron los insecticidas, herbicidas y fungicidas con 4 536,1; 10 822,2; 4 867,4 toneladas, respectivamente (INEI. 2016).

En el 2006 el proyecto “Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes COP en el Perú” (Proyecto PNI-COP. 2006) presentó un inventario nacional de plaguicidas COP (Contaminantes Orgánicos Persistentes). Para la realización de este inventario se tuvieron que generar diversos datos relacionados a la importación, formulación, almacenamiento, comercio y uso de plaguicidas a nivel nacional, con énfasis en los COP. Uno de ellos fue la elaboración de una tabla con los principales plaguicidas importados y formulados durante el 2004. Dentro de esta lista podemos encontrar: Al Clorpirifos (importación de 773 894,00 kg de material técnico) que es utilizado como insecticida; el Oxicloruro de Cobre (importación de 1 897

542,00 kg de material técnico) utilizado como fungicida; y el herbicida Butaclor con 343 025,00 toneladas.

5.3. Regulación del uso de plaguicidas en el Perú

El Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) designó al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) como el organismo encargado de la legislación de plaguicidas en el Perú. Para esta función el SENASA creó la Comisión Nacional de Plaguicidas, la cual tiene como objetivo garantizar que los plaguicidas agrícolas que se comercializan en el país, sean eficaces y eficientes para controlar las plagas para las cuales se recomiendan y que su riesgo a la salud humana y al ambiente sea manejable, bajo condiciones de uso y manejo adecuados (SENASA. 2015).

Así tenemos, por ejemplo, que el SENASA redactó una resolución directoral (Resolución directoral N° 0005, 2014), en donde elaboró una lista de plaguicidas agrícolas con registro vigente y de plaguicidas químicos con registro. Se puede observar en la lista de plaguicidas agrícolas con registro vigente, que existen 7 marcas comerciales autorizadas para Oxiclورو de Cobre y 30 para Clorpirifos, estando entre ellas, las marcas consideradas en el presente estudio (Ver Anexo). Para el caso del Butachlor, este se encuentra junto con otras 11 marcas en la lista de plaguicidas químicos con registro (Ver Anexo).

Por otro lado, en el 2015, MINAGRI aprobó el Reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola, propuesto por SENASA. Este reglamento tiene como objetivo crear el Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola con la finalidad de prevenir y proteger la salud humana y el ambiente, garantizar la eficacia biológica de los productos, así como orientar su uso y manejo adecuado mediante la adopción de buenas

prácticas agrícolas en todas las actividades del ciclo de vida de los plaguicidas.

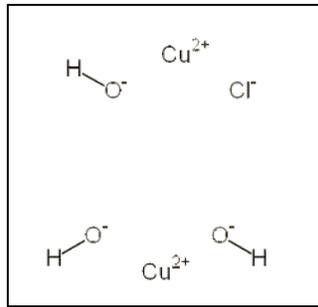
En este mismo reglamento se establece que para la obtención del registro comercial el plaguicida deben, entre otras cosas, pasar por ensayos toxicológico y ecotoxicológicos, tomando en consideración las Directrices de la FAO sobre “Criterios Ecológicos para el Registro de Plaguicidas”, y cuando se estime conveniente se podrán utilizar como referencia otros métodos reconocidos por organismos internacionales, como las guías de la EPA, OPPTS, FIFRA (Decreto supremo N° 001, 2015)

5.4 Plaguicidas empleados en este estudio

Para el siguiente estudio se utilizaron plaguicidas comerciales con registro vigente en el Perú. Dentro de los cuales se optó por un Insecticida (Clorpirifos), un Herbicida (Butaclor) y un Fungicida (Oxicloruro de Cobre), que como hemos visto anteriormente, tienen gran acogida en nuestro país.

5.4.1 Oxicloruro de Cobre

Como todos los fungicidas el Oxicloruro de cobre ($\text{Cl}_2\text{Cu}_4\text{H}_6\text{O}_6$) es un compuesto químico que se encarga de eliminar o evitar el desarrollo de hongos (Pérez & Forbes, 2007).



Estructura química del Oxicloruro de Cobre

Fuente: Pesticide Properties DataBase (2016)

El Oxicloruro de cobre según su familia química es un compuesto orgánico de cobre (Routt & Roberts, 1999), por su momento de su aplicación se considera un fungicida de contacto o preventivo, dado que actúan solamente sobre la superficie de la planta actuando en las fases de germinación y penetración del hongo. Así mismo, al ser un compuesto cúprico, actúa sobre diversos sitios en la célula del patógeno, por tanto, es considerado como un inhibidor multisitio (Orozco, 2008).

Los fungicidas a base de cobre, trabajan liberando pequeñas cantidades de iones Cu⁺² cuando entran en contacto con el agua. (Ossana, 2011) manifiesta que el cobre es un metal pesado comúnmente encontrado en los ecosistemas acuáticos, debido a su amplia y diversa utilización. Además, recalca que a pesar de ser un metal esencial en las plantas y los animales, en concentraciones elevadas ejercen una amplia gama de efectos adversos en los organismos acuáticos.

Entre los fungicidas de contacto, los cúpricos tienen la ventaja de tener una buena tenacidad. (Fernández, 2001) manifiesta que su mecanismo de acción recae en los esporangios y las zoosporas, donde desnaturalizan enzimas de la cadena respiratoria. Si, a esta

ventaja se le añade el amplio espectro que poseen estos compuestos cúpricos, actuando de forma preventiva y curativa sobre diversas enfermedades causadas por hongos, no es extraño que estos compuestos a base de cobre tengan una alta demanda en el mercado de los plaguicidas.

La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) ha clasificado al Oxicloruro de Cobre como un plaguicida nivel II, que son aquellos plaguicidas con una toxicidad moderada.

Así mismo, otros autores han realizado estudios de la toxicidad de este plaguicida sobre diversos organismos.

Concentración o efecto letal medio (CL₅₀) del Oxicloruro de Cobre frente a organismos acuáticos.

Orden	Organismo	Tiempo de Exposición	CL ₅₀ /*EC ₅₀ (mg·L ⁻¹)	Referencia
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i> (Hamilton-Buchanan, 1822)	96h	0,152	Cyrino <i>et al.</i> (2004)
Cypriniformes	<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)	96h	0,20	Gradila (2015)
Pulmonata	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)	48h	1,433	Cyrino <i>et al.</i> (2004)
Anura	<i>Rana catesbeiana</i> (Shaw, 1862)	96h	2,4	Ferreira <i>et al.</i> (2004)
Anura	<i>Rana catesbeiana</i> (Shaw, 1862)	96h	2,8	Fryday & Thompson (2012)
Decapoda	<i>Cryphiops caementarius</i> (Molina 1782)	96h	2 607,72	Paredes & Anaya (2015)
Cladocera	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	48h	*0,29	Lewis <i>et al.</i> (2016)
Cladocera	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	48h	*0,10	Gradila (2015)
Cladocera	<i>Daphnia similis</i> (Claus, 1876)	48h	* 0,065	Cyrino <i>et al.</i> (2004)

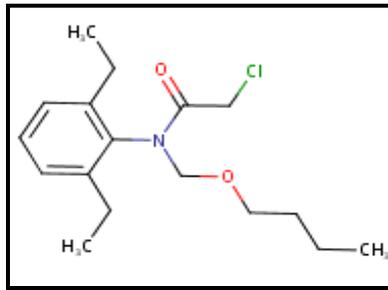
Fuente: Elaboración propia

5.4.2 Butaclor

Mendoza (2011) define a los herbicidas como sustancias o mezcla de sustancias utilizadas para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como indeseables (malezas o malas hierbas).

Guerrero (2007) comenta que el Butaclor (N-butoximetil-2-cloro-2',6'-dietilacetanilida) es un herbicida residual, de acción pre-emergente que controla malezas anuales, monocotiledóneas como ciperáceas, commelináceas y gramíneas, además de alguna hoja ancha, en el cultivo de arroz. Así mismo (Ware & Whitacre, 2004) manifiestan que el butaclor es un herbicida orgánico, de la familia de las cloroacetemidas (antiguamente conocidas como acetanilidas) que actúa inhibiendo el crecimiento meristemático. En este aspecto (Labrada *et al.*, 1996) comenta que la actividad meristemática se detiene en las puntas de las raíces y tallos, mientras que en las gramíneas generalmente se inhibe la emergencia de las hojas a partir de la vaina foliar, por lo que las malezas no emergen. Sin embargo, no está bien definido el mecanismo de acción de estos compuestos; (Macías, 2012) manifiesta que podría ser que se afecten la síntesis de lípidos y proteínas en las plántulas.

Labrada también comenta que el Butaclor posee una baja solubilidad en el agua, fijándose fuertemente a los colides del suelo, y su persistencia en el suelo es de 5 a 12 semanas. En lo referente a este último punto existe mucha discusión ya que como argumenta (Macas, 2009) la persistencia del Butaclor en el medio depende mucho del tipo de suelo y las condiciones climáticas. Siendo degradado por acción microbiana (80%) y química (20%).



Estructura química del Butaclor

Fuente: Toxnet (2005).

Por otro lado, la WHO, clasifica al Butaclor como un plaguicida ligeramente peligroso. Asimismo, diversos autores han determinado la concentración letal media (CL₅₀) en diversos organismos. Estos estudios ayudan a regularizar el uso de este plaguicida en el ambiente.

Concentración o Efecto letal media (CL₅₀) del Butaclor frente a organismos acuáticos.

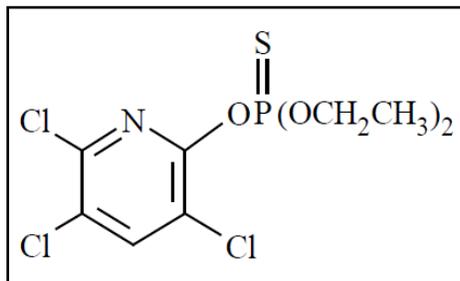
Orden	Organismo	Tiempo de Exposición	CL ₅₀ /*EC ₅₀ (mg·L ⁻¹)	Referencia
Sphaeropleales	<i>Scenedesmus obliquus</i> (Kützing, 1833)	96h	*2,31	He <i>et al.</i> (2012)
Perciformes	<i>Channa punctata</i> (Bloch, 1793)	48h	*0,25	Tilak <i>et al.</i> (2007)
Perciformes	<i>Tilapia zillii</i> (Gervais, 1848)	96h	1,25	Nwani <i>et al.</i> (2013)
Anura	<i>Fejervarya limnocharis</i> (Gravenhorst, 1829)	96h	0,87	Liu <i>et al.</i> (2011)
Anura	<i>Bufo gargarizans</i> (Cantor, 1842)	96h	1.32	Yin <i>et al.</i> (2008)
Anura	<i>Fejervarya limnocharis</i> (Gravenhorst, 1829)	96h	1,30	Geng <i>et al.</i> (2005)
Anura	<i>Bufo melanostictus</i> (Schneider, 1799)	48h	1,18	Geng <i>et al.</i> (2005)
Anura	<i>Polypedates megacephalus</i> (Hallowell, 1861)	96h	1,52	Geng <i>et al.</i> (2005)
Anura	<i>Microhyla ornata</i> (Duméril and Bibron 1841)	96h	0,53	Geng <i>et al.</i> (2005)
Decapoda	<i>Cryphiops caementarius</i> (Molina 1782)	96h	3,18 – 6,25	Paredes & Anaya (2015)
Cladocera	<i>Daphnia carinata</i> (King, 1852)	48h	3,40	He <i>et al.</i> (2012)

Fuente: Elaboración propia

5.4.3 Clorpirifos

El Clorípfos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) es considerado un insecticida organofosforado de amplio espectro. Originalmente tenía un uso residencial, para el control de plagas en césped y plantas ornamentales. Sin embargo, a partir de la década de los setenta este uso se ampliffo al sector agrícola; siendo utilizado en granos, campos, frutas, nueces y vegetales.

Además de su uso agrícola, el Clorpirifos también fue usado en la clínica veterinaria, y para el control de mosquitos en lagunas y estanques. Ya en los últimos diez años estos usos, además del agrícola, han sido restringidos debido a que su constante aplicación en las áreas inundadas o temporales, los vertidos accidentales, la lixiviación y la escorrentía de sus aplicaciones terrestres tiene el potencial para exponer la biota acuática a residuos.



Estructura química del Clorpirifos

Fuente: FAO (2004)

La acción toxica del Clorpirifos radica en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), por el metabolito activo, Oxón Clorípfos, La enzima AChE es clave en el sistema nervioso de muchos animales, la inactivación de esta provoca una sobreexcitación del

sistema nervioso periférico que puede causar convulsiones, parálisis o la muerte (CCME, 2008).

Concentración o Efecto letal media (CL₅₀) del Clorpirifos frente a organismos acuáticos.

Orden	Organismo	Tiempo de Exposición	CL ₅₀ /*EC ₅₀ (mg·L ⁻¹)	Referencia
Diptera	<i>Chironomus calligraphus</i> (Goeldi, 1905)	48h	0,01556 ± 0,00406	Iannacone & Alvaríño (2000)
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus clarkii</i> (Richardson, 1836)	96h	0,0054	¹ CCME (2008)
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	96h	0,0071	¹ CCME (2008)
Perciformes	<i>Stizostedion vitreum</i> (Mitchill, 1818)	48h	0,0125	¹ CCME (2008)
Perciformes	<i>Lepomis cyanellus</i> (Rafinesque, 1819)	36h	0,0225	¹ CCME (2008)
Mysida	<i>Neomysis integer</i> (Leach, 1814)	96h	0,00016	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Harpacticoida	<i>Amphiascus tenuiremis</i> (Brady, 1880)	96h	0,00147	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Palaemonetes pugio</i> (Holthuis, 1949)	96h	0,00015	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Neocaridina denticulata</i> (De Haan, 1844)	96h	0,457	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man, 1879)	24h	0,00030	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Paratya australiensis</i> (Kemp, 1917)	96h	0,00033	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Procambarus</i> sp	96h	0,00155	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Orconectes immunis</i> (Hagen, 1870)	96h	0,006	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Decapoda	<i>Trichodactylus borellianus</i> (Nobili, 1896)	96h	0,04553	Montagna (2010)
Cladocera	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	48h	0,00074	Palma <i>et al.</i> (2008)
Cladocera	<i>Daphnia ambigua</i> (Scourfield, 1947)	48h	0,000035	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Richard, 1894)	96h	0,000054	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Moina australiensis</i> (Sars, 1896)	48h	0,00010	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Daphnia pulex</i> (Linnaeus, 1758)	72h	0,00012	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Daphnia longispina</i> (O. F. Müller, 1776)	96h	0,00030	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Daphnia carinata</i> (King, 1852)	24h	0,00019	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Simocephalus vetulus</i> (Muller, 1776)	96h	0,00050	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	96h	0,00082	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Cladocera	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	48h	*0,00016	³ FAO (2002)
Cladocera	<i>Moina macrocopa</i> (Straus, 1820)	48h	0,01048 ± 0,0016	Iannacone & Alvaríño (2000)
Isopoda	<i>Asellus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	96h	0,00858	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Gammarus pulex</i> (Linnaeus, 1758)	96h	0,00007	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Hyalella azteca</i> (Saussure, 1858)	48h	0,00010	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Gammarus fossarum</i> (Koch, 1836)	96h	0,00290	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Gammarus palustris</i> (Linnaeus, 1758)	96h	0,00019	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Gammarus lacustris</i> (G. O. Sars, 1863)	96h	0,00011	² Giddings <i>et al.</i> (2014)
Amphipoda	<i>Gammarus palustris</i> (Linnaeus, 1758)	96h	0,00521-0,0003	Leight & Van Dolah (1998)

Fuente: Elaboración propia

A pesar de que este Insecticida es fácilmente hidrolizado, su acción ecotóxica radica en que es fácilmente absorbido por la materia orgánica presente en la columna de agua y los sedimentos, donde es consumido accidentalmente por organismos marinos (Giddings *et al.* 2014). Por estas razones, diferentes autores han realizado estudios de la toxicidad de este plaguicida sobre diversos organismos acuáticos, siendo de los plaguicidas con más ensayos dentro de los tres presentados en esta tesis.

5.5 Ensayos ecotoxicológicos

Duffus (1986) dentro del documento “Environmental toxicology and ecotoxicology”, define a la toxicología ambiental y la ecotoxicología como términos que se utilizan para describir los estudios científicos sobre los efectos adversos que ciertas sustancias pueden tener en los organismos vivos, cuando se relacionan en el ambiente natural. Siendo la ecotoxicología un término sólo referido al estudio de los efectos de los químicos en los ecosistemas y sus componentes no humanos. Otra definición es la que presenta el libro “A textbook of modern toxicology” (Hodgson, 2004) la cual plantea a la ecotoxicología como una subdivisión de la toxicología ambiental, y la cual se centra en los efectos de los contaminantes ambientales sobre los ecosistemas y los componentes de los mismos (que van desde los microorganismos hasta los predadores superiores).

De todos los ecosistemas, el acuático cobra gran importancia en estos estudios toxicológicos debido a la gran variedad de químicos que se diluyen en él. Estos estudios facilitan datos que permiten el

establecimiento de criterios de calidad para la protección de la vida acuática, así como estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Iannacone *et al*, 2011).

Para medir la peligrosidad de un plaguicida o cualquier otra sustancia, es necesario conocer su toxicidad aguda. Para esto la ecotoxicología utiliza test o ensayos de toxicidad, los cuales consisten en someter a organismos (especies que sirven como representantes de determinados niveles de organización trófica dentro de un ecosistema) en diferentes concentraciones de la sustancia prueba en un periodo corto de tiempo. Cuantificándose comúnmente como la CL₅₀ o DL₅₀, que se refiere a una mortandad del 50% de los individuos sometidos a la sustancia. Para estos test de toxicidad es necesaria la utilización de organismos bio-indicadores, que deben ser individuos no destinatarios, de fácil colección y medición cuantificable.

5.6 Evaluación de riesgo ambiental (ERA)

US EPA (1998) considera la ERA como un proceso que utiliza el procesamiento de datos, la información y las suposiciones para evaluar la probabilidad de que se produzcan o se estén produciendo efectos ambientales perjudiciales, como resultado de la exposición a uno o más estresores, los cuales pueden ser de naturaleza química como es el caso de los plaguicidas. INE (2003) comparte este concepto y añade que la evaluación del riesgo se vale de diferentes disciplinas para recoger información, así la toxicología, la epidemiología, la ecología, la química, la física, las matemáticas, la ingeniería y las ciencias ambientales son una ayuda importante y constante en este tipo de trabajos.

Para una evaluación del riesgo primero se debe identificar el riesgo (que evalúa la peligrosidad de una sustancia) y posteriormente valorarlo (ver la probabilidad de que cause efectos adversos).

En la identificación de la sustancia nos dice que la peligrosidad de esta se establece en función de sus propiedades intrínsecas, considerando la toxicidad para los organismos del medio (por ejemplo, la CL_{50}), su capacidad de bioacumulación y degradabilidad.

Mientras que para la valoración la literatura presenta dos formas. Una de ellas nos presenta Jerez *et al.* (2006) los cuales indican que para la valoración se debe enfrentar la tasa de toxicidad-exposición (que son por ejemplo los datos de CL_{50} , EC_{50} , NOEC, etc) versus la concentración ambiental esperada (que es la concentración, en el ambiente que se está estudiando, de la sustancia a la que estarían expuestos los receptores biológicos). Para que no exista riesgo el CL_{50}/CAE no debe exceder el nivel crítico o LOC (Level of Concern para el ambiente estudiado. Mientras que De la Torre *et al.* (2004) expresan que la valoración del riesgo sigue los siguientes pasos:

- Evaluación de efectos: Se refiere al cálculo de la concentración prevista sin efecto o PNEC (Predicted no effect concentration), por sus iniciales en inglés. El cual requiere hallar una concentración umbral sin efectos para diferentes organismos.
- Estimación de exposición: Que es cálculo de la concentración de las sustancias en el medio que se estudia (La CAE).
- Cuantificación del riesgo: este se logra mediante los anteriores datos calculados (exposición y efecto) de tal manera que la exposición debe ser superior al PNEC, E igual que en la anterior forma el $CAE/PNEC$ no debe exceder el LOC correspondiente para el ambiente estudiado.

5.7 Crustáceos (Amphipoda)

5.7.1 Generalidades

Los Perecarida son pequeños crustáceos que se encuentran englobados dentro de la clase Malacostraca. Incluyen a varios órdenes entre los cuales destacan: Amphipoda, Isopoda y Cumacea, siendo los anfípodos el grupo más diverso en cuanto a forma de vida, habitat, tamaño y alimentación. Este grupo posee una alta abundancia, riqueza de especies y amplia distribución; llegando a estar distribuidos por todo el mundo y adaptándose a todo tipo de ambientes acuáticos, tanto marinos como salobres y dulceacuícolas (Pérez, 2009; Thiel & Hinojosa, 2009, Guerra *et al.*, 2009; Mazé, 2015). Sin embargo, son los marinos los de mayor abundancia, pudiéndose encontrar en todo tipo de hábitats; tanto pelágicos como bentónicos, de sustrato duro o blando y desde la zona supralitoral hasta las profundidades abisales (Navarro, 2015)

Una de las características que poseen los anfípodos, y que les permiten adaptarse a todo tipo de hábitats es su alimentación variada; pudiendo alimentarse de detritus, animales (crustáceos, poliquetos, oligoquetos, kinorricos, hidroideos), macroalgas, microalgas, dinoflagelados y foraminíferos (Mazé, 2015).

En los Perecarida, como lo son los anfípodos, la reproducción se caracteriza por realizarse la fecundación y el desarrollo de las crías dentro del marsupio de la hembra. Estos organismos presentan sexos separados y muchas especies están caracterizadas por un fuerte dimorfismo sexual, es por ejemplo común ver en los machos un

gnatopodo muy desarrollado, el cual utilizan para agarrar a la hembra en el llamado “abrazo precopulatorio”.

Aunque gran parte de las especies pueden tener varias camadas a lo largo de su vida. Tanto la fecundidad como la duración del desarrollo embrionario son específicas para cada especie (Thiel & Hinojosa, 2009). Jiménez *et al.* (2015) comentan que por ejemplo, en los anfípodos, los caprélidos y gammáridos tienen un ciclo biológico que se caracteriza por tasas de crecimiento rápidas, maduración sexual temprana al alcanzar el mes de vida, reproducción continuada desde la maduración y aumento progresivo del número de juveniles emergidos con la longitud corporal de la hembra.

5.7.2 Morfología

Morfológicamente los anfípodos son muy variados sin embargo, como todos los crustáceos, siguen un patrón general que consta de un cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, pudiéndose este último dividir en dos partes.

La región cefálica (o cefalón) de un anfípodo está provista de dos pares de antenas, un par de mandíbulas (que posee la lacinia mobilis el cual es un proceso articulado y móvil), dos pares de maxilas y un par de maxilípedos. Estos dependiendo del tipo de alimentación pueden verse notablemente modificados. Los ojos en estos organismos presentan un tipo distinto de desarrollo, estando relacionado con el grupo y el hábitat de la especie.

La siguiente región es el tórax (o pereión), esta región está conformada por siete segmentos, cada uno de los cuales llevan consigo apéndices locomotores unirameos denominados pereiópodos; de los cuales los primeros dos pares, por su forma peculiar, son denominados gnatópodos; estos tienen una función de quelas, para sostener y ramonear. Todos los pereiópodos están formados por siete segmentos, los cuales poseen nombres especiales (desde la base del apéndice), estos son: coxopodito, basopodito, isquiopodito, meropodito, carpopodito, propodito y dátilopodito; este último usualmente lleva una uña apical. Otro dato importante de los pereiópodos es que en la cara interna de las coxas 2-7 poseen branquias, y en el caso de las hembras llevan los oostegitos; estas estructuras forman en el vientre el “marsupio” donde se depositan los huevos.

La última región del cuerpo de los anfípodos es el abdomen (o pleosoma) que consta de 3 partes: El pleosomito, el Urosoma y el Telson. En la primera región se insertan los pleopodos, los cuales son estructuras natatorias; seguidamente está el urosoma en la cual se insertan los uropodos. Estas estructuras están dirigidas hacia atrás y son mucho más rígidas, pues ayudan al anfípodo en la dirección del nado (como si fuera un timón). La última región del pleosoma corresponde al telson, el cual está insertado en el último urosomito, sobre la abertura anal. (Thiel & Hinojosa, 2009; Pérez, 2009; Mazé, 2015).

5.7.3 Importancia

Los anfípodos, con más de 7000 especies descritas, son de alta importancia tanto para el ecosistema como también para la industria. Su relevancia para el ecosistema radica en que se ubica sobre la base de la cadena trófica, como dicen Jimenez *et al*, (2015) los anfípodos son un grupo de alta abundancia, gran riqueza de especies y amplia distribución, por lo que juega un papel relevante en la ecología de hábitats rocosos y fondos blandos. Forman parte importante del intercambio energético de la cadena trófica como recurso de muchos depredadores, siendo un vínculo entre los productores primarios y secundarios y niveles tróficos superiores como peces, aves y mamíferos.

Asimismo, es importante recalcar que, por su gran resistencia a condiciones adversas, presentan una gran adaptabilidad que los hace capaces de habitar en casi cualquier parte del mundo marino. Ortega & Martin (2013) comentan que los crustáceos peracáridos son un grupo muy diverso y son uno de los taxones dominantes en el suprabentos, y que dentro de los peracáridos y entre la fauna macrobentónica, los anfípodos representan un substancial elemento taxonómico en términos de densidad y diversidad, pudiendo habitar fondos marinos suaves de áreas polares a tropicales y de la marea a la zona abisal.

También cabe resaltar que su relevancia en los ecosistemas es un tópico bastante estudiado en todo el mundo, por ejemplo, Navarro (2015) analiza en su tesis la importancia de los anfípodos que habitan en las cavernas submarinas de la península Ibérica, él mismo afirma: Se ha estudiado, por ejemplo, el significativo papel de los anfípodos ramoneadores en el control de la biomasa de macroalgas o su

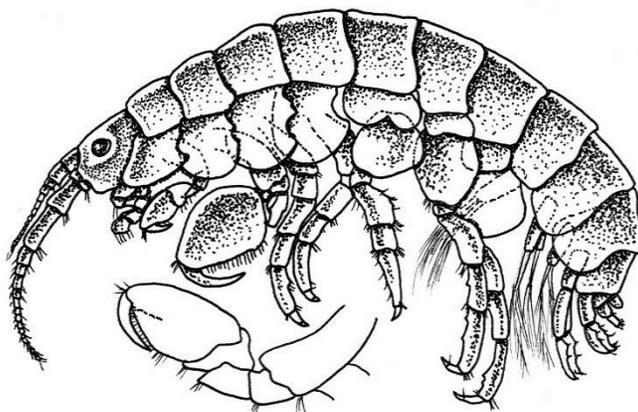
relevancia en la regulación del asentamiento de algas epífitas o invertebrados sésiles.

Entre otras cosas, se debe resaltar ante todo la importancia de su función de consumidores primarios en la cadena trófica y la transformación de energía, asimismo resultan importantes para el monitoreo ambiental en cuanto son organismos sésiles y sensibles a los cambios ambientales. Como afirma Pérez (2009) debido a su ubicuidad y particulares características biológicas, los anfípodos son importantes bioindicadores y en consecuencia suelen ser utilizados rutinariamente en programas de monitoreo ambiental. De igual forma Ortega & Martin (2013) afirman que los anfípodos son bioindicadores útiles de la calidad del agua de mar y de los sedimentos, pudiendo reflejar cambios en las condiciones ambientales que resultan de alteraciones naturales antropogénicas

Finalmente cabe resaltar la gran importancia de estos anfípodos en la industria, debido a su alto valor nutricional, su capacidad reproductiva, biomasa y capacidad de adaptación para diferentes entornos. Como bien afirma Jimenez (2015) los anfípodos son crustáceos con un alto valor nutricional y gran potencial para ser cultivados como alimento; existen muchas especies en las que los anfípodos juegan un papel fundamental en su cultivo, como son *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, *Solea solea* Linnaeus, 1758, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 y *M. barbatus* Linnaeus, 1758, además del género *Hippocampus*, de gran interés en acuariofilia. Así, es necesario intensificar la investigación de estos crustáceos para evaluar adecuadamente su importancia como presas en el medio natural y para cuantificar su valor nutricional como fuente alternativa de alimento.

5.8 Genero Apohyale

Este es un género relativamente nuevo (creado en 2002), que alberga unas 24 especies, con una distribución por todo el mundo, pero con una mayor concurrencia en el Pacífico. Se encuentra dentro de la familia Hyalidae, los cuales son herbívoros marinos y estuarinos intermareales.



Apohyale grandicornis (Kroyer, 1845)

Fuente: Fortini, A. (2010).

Algunos autores (Serejo, 2003; Chapman, 2007; Pérez, 2009) proponen algunas características para el reconocimiento rápido de la familia. Así tenemos que los organismos pertenecientes a la familia Hyalidae presentan un cuerpo comprimido lateralmente, la antena 1 más larga que el pedúnculo de la antena 2; pero más corta que la antena 2 completa, esta antena 2 no presenta dimorfismo sexual, presenta en la mandíbula un molar triturativo, una lactinia mobilis con 5-6 dientes en el lado izquierdo. En los machos el Gnatópodo 2 presenta dimorfismo sexual (el cual les permite agarrar a las hembras en el momento de la copulación), carpo triangular reducido y carente

lóbulo en machos adultos. Mientras que en las hembras, en el Gnatópodo 2, el lóbulo carpal es corto, alcanzando un máximo de 1/4 del margen posterior del própodo. En ambos sexos el telson es carnoso y partido hasta la base, en dos lóbulos triangulares.

Una vez identificada la familia prosigamos con la redacción sobre la identificación del género; para lo cual Cadien (2015) propone un examen detallado, el cuál costa de lo siguiente:

Cuerpo de mediano a grande, robusto, liso, a menudo sorprendentemente pigmentado. Ojos medianos grandes, generalmente ampliamente reniformes, que casi se encuentran en el medio dorsal. Antenas cortas. Antena 2: segmentos pedunculares 4 y 5 gruesos, casi desnudos, flagelo corto (<20 segmentos). Mandíbula posterior débilmente (o no) setosa, lacinia izquierda 5-6 dentada. Maxila 1: palpo I segmentado, de corto a mediano, que no se extiende más allá de la base de las espinas apicales de la placa exterior. Maxila 2: placas delgadas, placa interior con una sola seta marginal interna. Palpo del maxilipedo grueso, segmento 2 más ancho que largo, dáctilo normal, no dimorfo sexual (sin lazo apical en macho). Branquias coxales en forma de placa, gnatopodo I normal, ligeramente sexualmente dimórfico. Bases: lóbulo hidrodinámico débil o carente, lóbulo carpal distinto, ancho. Propodio ligeramente ensanchando distalmente, carente de la espina dorsal mediofacial.

Gnathopod 2 fuertemente dimórfico sexualmente; base (macho) con lóbulo hidrodinámico débil a medio; Carpo corto, lóbulo posterior generalmente carente (a menudo muy fino, corto); propodio grande, variable. Pereopodos 3-7 sólidos, dactilos cortos, con seta marginal interna distinta. Pereopodos 5-7: bases anchas, margen casi liso, muesca y surge seta desarrollado diversamente. Segmento 4

relativamente corto y ancho. Segmento 6, espina dorsal distal interna desarrollada diversamente, raramente estriada. Placas epimerales 2-3 lisas abajo, esquinas traseras acuminadas. Pleopodos normales. Uropodo I: espinas distomediales y laterales pedunculares típicamente cortas, débiles. Rama con espinas apicales marginales y fuertes. Uropodo 2: rama externa más corta, con pocas espinas marginales. Uropod 3 uniramia: Ramo corto, romo, no más largo que el pedúnculo, con columna apical, y ocasionalmente posterodorsal, espina (s) marginal (es). Lóbulos de telson subtriangulares, usualmente cortos, márgenes apicales desarmados.

Según el mismo autor, en las hembras de este género, cabe resaltar las siguientes características: gnatopodo I, carece de lóbulos hidrodinámicos. Propodio profundo. Gnatopodo 2 siempre más grande, a menudo fuerte; base con lóbulo hidrodinámico débil. Placa de cría muy grande, proximalmente ancha, estrechándose distalmente al ápice agudo; Setas marginales muy cortas, numerosas. Ranura unguisial carente o muy corta. Pereon 2: lóbulo posteroventral mediano a grande.

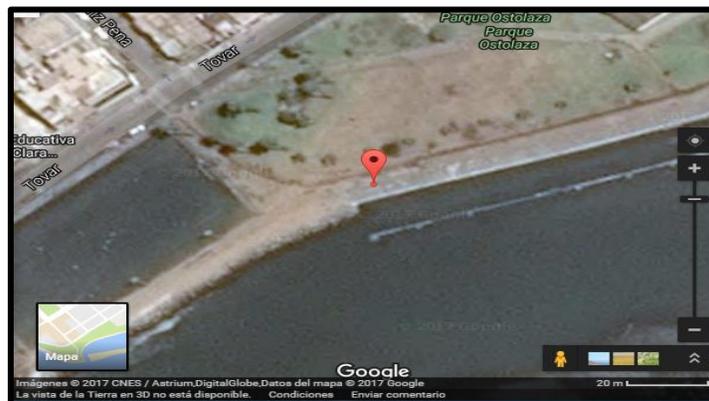
V. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de Estudio



“Playa la Arenilla” La Punta-Callao

Los ejemplares de *Apohyale grandicornis* fueron colectados en la playa “La arenilla” ($12^{\circ}04'26.34''S$, $77^{\circ}09'44.18''O$), en el distrito de la Punta. Provincia constitucional del Callao. Cuando el nivel de mareas oscilaba entre una altitud de 10-20 cm. En un ambiente rocoso, de grava mediana y con presencia de algas.



Ubicación del área de estudio



Recolección de anfípodos en baldes

6.2 *Apohyale grandicornis*.

El género del organismo prueba fue identificado por la Mg. Analí Jiménez Campeán en el laboratorio de bentos marino, del Instituto de Mar del Perú, quién se basó en las claves taxonómicas de Chapman (2007) y Bousfield & Hendrycks (2002). Se complementó la identificación de la especie en el Laboratorio de Parasitología (Lab-79) de la Universidad Ricardo Palma, utilizando la clave taxonómica propuesta por Gonzales (1991).

La colecta de los ejemplares se realizó mediante tamices de 300 y 500 micras, donde quedaron retenidos los anfípodos junto con la fauna y flora acompañantes presentes en la zona de muestreo. Posteriormente los organismos fueron colocados en baldes de plástico, con agua de mar, para su traslado al laboratorio húmedo de Ecotoxicología acuática del Instituto del Mar del Perú (IMARPE); en donde se separaron y aclimataron.

6.3 Plaguicidas empleados

Se utilizaron tres tipos diferentes de plaguicidas, representativos del mercado Nacional (Proyecto PNI-COP. 2006). El fungicida a base de Oxicloruro de cobre: Cupravit OB21; el herbicida Arroba 600EC, a base de Butachlor y el insecticida Tifón 2,5 PS a base de Clorpirifos (Ver anexo). Estos fueron adquiridos en la tienda “Inversiones Agrícola M&V S.A.C”, ubicada de la calle Enrique Nerini N° 719 – San Luis – Lima.

6.4 Metodología

6.4.1 Aclimatación

Esta se llevó a cabo en el laboratorio de Ecotoxicología del IMPARPE, donde se procedió a separar manualmente la fauna y flora acompañante. Los anfípodos se separaron en 3 piscinas de 10 L de la siguiente manera: hembras y machos (adultos), machos y hembras (juveniles) y hembras grávidas. Para una mejor aclimatación se siguió lo propuesto por Peluso (2011), manteniendo a los anfípodos con agua del lugar de colecta, que gradualmente se fue reemplazando por agua de mar filtrada obtenida en el IMARPE. Se dio un tiempo de aclimatación de 7 días, siendo los organismos alimentados con la microalga *Nannochloropsis oculata* D.J. Hibberd. 1981 hasta un día antes del bioensayo. Esta microalga fue dada por el Laboratorio de cultivo de microalgas del IMARPE.

Los organismos se mantuvieron a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ y con oxigenación constante no menor a 6 mg.L.

6.4.2 Bioensayo de Toxicidad aguda

Los bioensayos de toxicidad aguda, se basaron en la metodología estandarizada propuesta por la Agencia Ambiental de EEUU (U.S EPA, 1994), así como en otros trabajos realizados con anfípodos (Cesar *et al*, 2004; Fairchild *et al*, 2010; Peluso, 2011).

La prueba de toxicidad aguda para *Apothyale grandicornis* se evaluó en 5 concentraciones con cuatro réplicas, incluyendo el control, en un “Diseño en Bloques Completamente Randomizado” (DBCR). Los bioensayos tuvieron una duración de exposición de 96 h, en condiciones semi-estáticas. Manteniéndose una temperatura $> 19\text{ }^{\circ}\text{C}$, mediante una mesa de agua de temperatura controlada; así como una oxigenación suave ($> 6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), mediante un sistema de aireación.

Para las diluciones se utilizó agua de mar filtrada, proporcionada por IMARPE. Cabe resaltar que los organismos no fueron alimentados durante el periodo de exposición.



Bioensayo de toxicidad instalado

Se utilizaron envases de vidrio de 200 mL, conteniendo 54 g de sedimento (grava mediana a grande, debidamente esterilizada con Hipoclorito de Sodio al 10%) y 150 mL de los pesticidas diluidos. En cada envase se colocaron 10 anfípodos con tallas de 3 a 5 mm. Estos fueron expuestos a los tres tipos de plaguicidas en las siguientes concentraciones: Para el Oxicloruro de cobre: 500, 50, 5 y 0,5 mg•L⁻¹ (Güven *et al*, 1999; Cyrino *et al*, 2004; Ferreira *et al*, 2004; Fryday & Thompson, 2012). Para el Butaclor: 4; 0,4; 0.004 y 0.0004 mg•L⁻¹ (Tilak *et al*, 2007; Liu *et al*, 2011; He *et al*, 2012; Nwani *et al*, 2013). Mientras que para el Clorpirifos fueron de: 1; 0,1; 0.001 y 0.0001 mg•L⁻¹ (Leight & Van Dolah, 1999; Iannacone *et al*, 2002; CCME, 2008; Montagna, 2010).



Determinación de la muerte del anfípodo

Además de las 4 concentraciones, todos los bioensayos contaron con un control, a base de agua de mar filtrada, con sus respectivas 4 réplicas.

El indicador de la prueba de toxicidad aguda fue la mortalidad de los especímenes, los cuales al presentar inmovilidad fueron extraídos, con la ayuda de una pipeta de plástico, y observados en el estereoscopio por un lapso de 1 min aproximadamente. Sólo aquellos individuos que no realizaron movilidad fueron considerados muertos. Se monitoreó diariamente la mortalidad de los individuos en una tabla para su posterior análisis estadístico (Ver anexo). Los bioensayos se consideraron válidos cuando la mortandad no superó al 10%, según lo descrito por (U.S EPA, 1994; Iannacone & Alvarino, 2004). En la siguiente tabla se presenta un resumen de las condiciones de los bioensayos de toxicidad.

Resumen de condiciones del ensayo con *Apohyale grandicosrnis*.

Agitación	No
Tiempo de exposición	96h
Aireación	Constante
Agua de dilución	Agua de mar estéril
Número de organismos por unidad de prueba	10 organismos
Número de réplicas por concentraciones	4 réplicas
Número de organismos por concentración	40 individuos
Alimentación	No requiere alimentación
Concentraciones de prueba	5 y 1 control negativo
Respuesta	Muerte (inmovilización total por 15 s)
Criterio de aceptabilidad de la prueba	>90 % sobrevivientes en los controles.

6.4.3 Test de sensibilidad con Dicromato de Potasio

Para la elaboración del control positivo se utilizó, el tóxico de referencia, Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (U.S EPA, 2002). Se realizaron cinco diluciones a concentraciones de 1000, 100, 10, 1, 0,1 $mg \cdot L^{-1}$ (Rudolph *et al*, 2011); además de un control, el cual constó de agua de mar filtrada. Cada dilución, incluido el control, constó de cuatro réplicas.

6.4.4 Medición de parámetros fisicoquímicos

Se tomaron los siguientes parámetros básicos: pH, salinidad, oxígeno disuelto (OD) y temperatura. El pH, la temperatura y el OD se monitorearon mediante un multiparámetro HANNA con dos sensores (OD/T° y pH/T°). La salinidad por otro lado se midió con un refractómetro HAND HELD.

Tanto el pH como la salinidad se midieron al inicio (instalación) y al término del bioensayo. Mientras que la temperatura y el OD se midieron diariamente.

Todos los parámetros fueron registrados en tablas (ver anexo) para su posterior análisis.

6.4.5 Evaluación del riesgo ambiental (ERA)

Se empleó esta técnica para determinar la naturaleza y magnitud de riesgo de los plaguicidas evaluados, empleando los escenarios más críticos y de mayor exposición, utilizando al anfípodo *Apothyale grandicornis* para determinar el riesgo en organismos acuáticos.

6.4.5.1 Estimación de la concentración ambiental estimada (CAE)

Para estimar el valor de CAE se utilizó la tabla (Ver anexo), elaborada por en la (Comunidad andina. 2002), para lo cual se necesitó estimar la dosis máxima recomendada (en kg i.a•ha.) para cada uno de los productos agrícolas utilizados. Del mismo modo se tomó la profundidad recomendada por el manual de 2 metros.

6.4.5.2 Estimación de la concentración prevista sin efecto (PNEC)

Se calculó el valor de PNEC utilizando la fórmula propuesta por Planes y Fuchs (2015), la cual es siguiente:

$$\frac{\text{Concentración letal media (CL}_{50})}{\text{Factor de seguridad}} = \text{PNEC}$$

Donde se tomó el CL₅₀ de los diferentes plaguicidas, a las 96 h, para *Apohyale grandicornis*. En cuanto al factor de seguridad se tomó el valor de 1000.

6.4.5.3 Cálculo de los Coeficientes de riesgo (CR)

Se calculó dos coeficientes de riesgo uno utilizando la concentración ambiental estimada y otro mediante los valores de PNEC y el factor de seguridad.

Para hallar el CR mediante el CAE y el CL₅₀ se siguió la recomendación de diferentes autores (Iannacone & Alvariño, 2002; Comunidad Andina, 2002) quienes emplean la siguiente formula:

$$\frac{\text{Concentración ambiental estimada (CAE)}}{\text{Concentración letal media (CL}_{50})} = \text{CR}$$

Mientras que para el cálculo del CR por medio del PNEC se usó la fórmula utilizada por (Planes y Fuchs, 2015), la cual es la siguiente:

$$\frac{\text{Concentración ambiental estimada (CAE)}}{\text{PNEC}} = \text{CR}$$

6.4.5.4 Procesamiento de datos

Para el análisis de la concentración letal media se recurrió a la 2^{da} edición de la hoja de cálculo Excel Probit basado en Finney (1952), En

aquellos casos donde los datos arrojados fueron anómalos se procedió a usar el programa de análisis de relación de toxicidad (TRAP).

Para la validación de los ensayos de toxicidad individual se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 24,0 para Windows 8. De este modo, se calculó la homogeneidad de los parámetros evaluados mediante el factor ANOVA y a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Asimismo, se calcularon los valores de LOEC (Concentración más baja con efecto observado) y NOEC (Concentración sin efecto observado) para cada plaguicida usado, a las 24, 48,72 y 96 horas; en base a la prueba de Turkey.

6.5 Lugar de Ejecución

La parte experimental de la tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecotoxicología acuática del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), ubicado en la esquina de Gamarra y General Valle S/N Chucuito-Callao. Con ubicación geográfica: Lat. 12° 04' 1.197" S Long. 77° 09' 28.331" W a una elevación de 6 msnm.

Mientras que el trabajo de gabinete se realizó en el Laboratorio de Parasitología (Lab-201) de la Universidad Ricardo Palma. Ubicando en Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco. Con ubicación geográfica: Lat. 12° 7' 59.16" S, Long. 76° 58' 49.8" W.

VI. RESULTADOS

7.1 Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 1, se muestran los promedios registrados de las condiciones fisicoquímicas básicas a las que fueron sometidos los anfípodos en los diferentes bioensayos.

Se observó para el caso de la temperatura rangos entre $17,94 \pm 1,94$ y $21,82 \pm 2,64^{\circ}\text{C}$ que correspondieron al Oxicloruro y al Clorpirifos respectivamente. De igual forma se observa que el oxígeno disuelto varió poco presentando rangos entre $6,78 \pm 0,44$ y $7,01 \pm 0,08$ mg•L Oxicloruro de Cobre y el Dicromato de Potasio. El pH también mostró poca variación con rangos de $8,05 \pm 0,05$ y $8,46 \pm 0,08$ del Butaclor y Clorpirifos. Por último la salinidad si mostró variación entre los ensayos con un rango de $29,58 \pm 0,65$ y $40,06 \pm 3,92$ ‰ del oxicloruro de cobre y el Butaclor.

TABLA 1. Promedio de parámetros fisicoquímicos básicos

		Butaclor	Clorpirifos	Oxicloruro de Cobre	Dicromato de Potasio
Temperatura	°C	$20,21 \pm 0,21$	$21,82 \pm 2,64$	$17,94 \pm 1,94$	$21,06 \pm 1,74$
Oxígeno Disuelto	mg•L	$6,83 \pm 0,15$	$6,83 \pm 0,25$	$6,78 \pm 0,44$	$7,01 \pm 0,08$
pH		$8,05 \pm 0,05$	$8,46 \pm 0,08$	$8,15 \pm 0,13$	$8,09 \pm 0,64$
Salinidad	‰	$40,06 \pm 3,92$	$34,33 \pm 2,98$	$29,58 \pm 0,65$	$31,52 \pm 0,74$

7.2 Bioensayos de Toxicidad aguda

Los tres plaguicidas evaluados en los bioensayos presentaron un efecto tóxico sobre el anfípodo *Apothyale grandicornis* a las 24, 48, 72 y 96 h. En ninguno de los casos la mortandad fue superior al 10%

7.2.1 Butaclor

En la tabla 2 se señalan los porcentajes de mortandad de *Apothyale grandicornis*, en las seis concentraciones del herbicida Butaclor a las diferentes horas (24-96 h), indicando las diferencias significativas en la mortalidad entre las concentraciones evaluadas, la concentración letal media (CL₅₀), así como los valores de NOEC y LOEC.

TABLA 2. Toxicidad del herbicida Butaclor a las 24-96h sobre *Apohyale grandicornis*

mg•L ⁻¹	%			
	24h	48h	72h	96h
0	0a	0a	0a	0a
0,0004	0a	10a	15 ^a	15a
0,004	13a	15ab	28ab	33ab
0,04	28a	43b	50b	58b
0,4	100b	100c	100c	100c
4	100b	100c	100c	100c
CL ₅₀	0,47	0,13	0,04	0,019
CL ₅₀ inf	0,07	0,03	0,01	0,00
CL ₅₀ sup	2,58	0,64	0,24	0,09
NOEC	0,04	0,004	0,004	0,004
LOEC	0,4	0,04	0,04	0,04
F	59,23	52,96	35,18	33,97
Sig.	0,000	0,000	0,000	0,000

Letras minúsculas iguales en una misma columna representan que no hay diferencia significativa entre los valores por la prueba de Turkey ($p \leq 0,05$). NOEC= Concentración sin efecto observado. LOEC= Concentración mínima con efecto observado. CL₅₀ = Concentración letal media. Inf.= Límite inferior. Sup.= Límite superior. F= Prueba de Fisher. Sig.= Nivel de significancia.

De este modo se apreció que el Butaclor tuvo efectos significativos ($\leq 0,05$) sobre la mortandad a las 24, 48, 72 y 96 h, siendo la concentración de 0,4 mg•L⁻¹ donde se evidenció el efecto tóxico del Butaclor a las 24 h y de 0,04 mg•L⁻¹ en el resto de horas. Se observó el 100% de mortandad en todas las horas, a partir de la concentración de 0,4 mg•L⁻¹. Asimismo los menores valores de NOEC y LOEC fueron de 0,004 y 0,04 mg•L⁻¹ a las 48, 72 y 96 h, mientras que los valores más altos fueron de 0,04 y 0,4 mg•L⁻¹ las 24 h de exposición.

En la misma tabla se aprecian los valores de CL₅₀, y sus límites inferior y superior a las 24, 48, 72 y 96 h, presentando el Butaclor rangos entre 0,47 y 0,02 mg•L⁻¹.

7.2.2 Clorpirifos

La tabla 3 muestra los porcentajes de mortandad de *Apohyale grandicornis*, de las concentraciones del insecticida Clorpirifos a las diferentes horas (24-96 h), indicando las diferencias significativas en la mortalidad entre las concentraciones evaluadas, la concentración letal media (CL₅₀), así como los valores de NOEC y LOEC.

TABLA 3. Toxicidad del insecticida Clorpirifos a las 24-96h sobre *Apohyale grandicornis*

mg•L ⁻¹	%			
	24h	48h	72h	96h
0	0a	0a	0a	2,5a
0.0001	0a	0a	0a	2,5a
0.001	0a	5a	8a	10a
0.01	0a	8a	8a	13a
0.1	50b	93b	98b	98b
1	78c	98b	98b	100b
CL ₅₀	0,10	0,02	ND	0,021
CL _{50inf}	0,03	0,01	ND	0,01
CL _{50sup}	0,37	0,05	ND	0,05
NOEC	0,01	0,01	0,01	0,01
LOEC	0,1	0,1	0,1	0,1
F	65,47	224,63	339,12	233,23
Sig.	0.000	0.000	0.000	0.000

Letras minúsculas iguales en una misma columna representan que no hay diferencia significativa entre los valores por la prueba de Turkey ($p \leq 0,05$). NOEC= Concentración sin efecto observado. LOEC= Concentración mínima con efecto observado. CL₅₀ = Concentración letal media. Inf.= Límite inferior. Sup.= Límite superior. F= Prueba de Fisher. Sig.= Nivel de significancia. ND= No determinado.

De tal manera se observó que el Clorpirifos tuvo efectos significativos ($\leq 0,05$) sobre la mortandad a las 24, 48, 72 y 96 h, siendo la concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ donde se evidenció el efecto tóxico del Clorpirifos en todas las horas analizadas. Se observó el 100% de individuos muertos a las 96h a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Asimismo los valores de NOEC y LOEC fueron de 0,01 y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para todas las horas evaluadas.

En la misma tabla se aprecian los valores de CL_{50} , y sus límites inferior y superior a las 24, 48 y 96 h, presentando el Clorpirifos rangos entre 0,10 y $0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.2.3 Oxicloruro de cobre

En la tabla 4 se señalan los porcentajes de mortandad de *Apothyale grandicornis*, de las seis concentraciones del fungicida Oxicloruro de Cobre a las diferentes horas (24-96 h), indicando las diferencias significativas en la mortalidad entre las concentraciones evaluadas, la concentración letal media (CL_{50}), así como los valores de NOEC y LOEC.

TABLA 4. Toxicidad del fungicida Oxicloruro de Cobre a las 24-94h sobre *Apophyale grandicornis*.

mg•L ⁻¹	%			
	24h	48h	72h	96h
0	0a	0a	2.5a	2.5a
0.05	18a	25ab	30ab	42.5ab
0.5	13a	30ab	43ab	48ab
5	33a	43ab	60ab	63b
50	35a	58ab	65ab	78b
500	38a	65b	75b	88b
CL₅₀	>500*	17,87	3,30	0,54
CL₅₀inf	107,22	0,98	0,20	0,05
CL₅₀sup	>500	326,59	54,13	6,46
NOEC	500	50	50	0,5
LOEC	>500	500	500	5
F	2,11	3,37	3,52	8,84
Sig.	0,111	0,025	0,021	0,000

Letras minúsculas iguales en una misma columna representan que no hay diferencia significativa entre los valores por la prueba de Turkey ($p \leq 0,05$). NOEC= Concentración sin efecto observado. LOEC= Concentración mínima con efecto observado. CL₅₀ = Concentración letal media. Inf.= Límite inferior. Sup.= Límite superior. F= Prueba de Fisher. Sig.= Nivel de significancia. *Se obtuvo un valor demasiado alto porque no se obtuvo más del 50% de mortandad.

Así, se apreció que el Oxicloruro de Cobre tuvo efectos significativos ($\leq 0,05$) sobre la mortandad a las 48, 72 y 96 h, siendo la concentración de 0,05 mg•L⁻¹ donde se evidenció el efecto tóxico de este a las 48, 72 y 96 h. La mayor mortandad (88%) se obtuvo 96 h a una concentración de 500 mg•L⁻¹, no llegando al 100% de individuos muertos en ningún tratamiento. Asimismo, los valores de NOEC y LOEC fueron de 50 y 500 mg•L⁻¹ para las 48 y 72 h, mientras que a las 96h fueron de 0,5 y

5 mg•L⁻¹. No se obtuvieron diferencias significativas (Sig.= 0,11) a las 24 h. En esta tabla también se aprecian los valores de CL₅₀, y sus límites inferior y superior a las 24, 48, 72 y 96 h, presentando el Oxidloruro de Cobre rangos entre >500 y 0,54 mg•L⁻¹.

7.2.4 Prueba con Dicromato de Potasio

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad con Dicromato de Potasio en los ensayos de *Apohyale grandicornis* se muestran en la tabla 5.

TABLA 5. Toxicidad del Dicromato de Potasio a las 24-96h sobre *Apohyale grandicornis*.

mg•L ⁻¹	%			
	24h ^a	48h ^a	72h	96h
0	0a	0a	0a	2,5a
0.1	0a	5a	5a	5ab
1	0a	8a	8a	10ab
10	3a	8a	13a	20b
100	0a	25b	78b	98c
1000	100b	100c	100c	100c
CL ₅₀	550,94	167,17	41.698	13,04
CL ₅₀ inf	ND	ND	11.378	4,71
CL ₅₀ sup	ND	334,75	152.820	36,08
NOEC	100	10	10	1

Letras minúsculas iguales en una misma columna representan que no hay diferencia significativa entre los valores por la prueba de Turkey ($p \leq 0,05$). NOEC= Concentración sin efecto observado. LOEC= Concentración mínima con efecto observado. CL₅₀ = Concentración letal media. Inf.= Límite inferior. Sup.= Límite superior. F= Prueba de Fisher. Sig.= Nivel de significancia. ND=no determinado. *Se obtuvo un valor excesivamente alto debido a que no se obtuvo más del 50% de mortandad. ^a= Se Utilizó el paquete estadístico TRAP.

Se encontraron efectos significativos ($\leq 0,05$) sobre la mortandad a las 24, 48, 72 y 96 h, siendo la concentración de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ donde se evidenció el efecto tóxico de este a las 24 h; de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 48 y 72 h y de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 96 h. Se observó el 100% de individuos muertos a una concentración de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en todas las horas analizadas. De igual forma, los mayores valores de NOEC y LOEC fueron de 100 y $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 24 h, mientras que los valores más bajos se obtuvieron a las 96 h a concentraciones de 1 y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Asimismo, se aprecian los valores de CL_{50} , y sus límites inferior y superior a las 48, 72 y 96 h, mostrando el Dicromato de Potasio rangos entre 550,94 y $13,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.2.5 Análisis Comparativo de toxicidad a las 96 h

De acuerdo con el análisis de las CL_{50} a las 96 h, la toxicidad de los plaguicidas para *A. grandicornis* ordenados en forma descendente respecto a su toxicidad, fue: Butaclor > Clorpirifos > Oxicloruro de Cobre (ver tablas 2, 3, 4). De esta manera, se encontró que a las 96 h, el Butaclor es 1,11 veces más tóxico que el Clorpirifos y un 28,42 veces más que el Oxicloruro de Cobre. Mientras que el Clorpirifos presentó 25,71 veces más toxicidad que el Oxicloruro de Cobre.

Utilizando la misma lógica (mayor-menor toxicidad) se ordenaron los valores de NOEC y LOEC, obteniendo para el LOEC la siguiente secuencia: Butaclor ($0,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Clorpirifos ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Oxicloruro de Cobre ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Y para el NOEC: Butaclor ($0,004 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Clorpirifos ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Oxicloruro de Cobre ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

7.3 Riesgo ambiental

La tabla 6 y 7 muestran un resumen de la evaluación del riesgo ambiental (ERA) de los tres plaguicidas investigados sobre *A. grandicornis*.

En la tabla 6, tomando como base ensayos agudos, se encontró que tanto el Butaclor como el Clorpirifos presentan un elevado riesgo ambiental sobre *Apohyale grandicornis*. Mientras que, el Oxicloruro de Cobre no mostró riesgo a nivel del ambiente acuático, pues el cociente de riesgo (CR) fue menor a 0,5

TABLA 6. Resumen de la evaluación de riesgos ambientales (ERA) de tres plaguicidas sobre *Apohyale grandicornis*.

PLAGUICIDA	ORGANISMO	EFECTO	CL ₅₀ mg•L ⁻¹	CAE* mg i.a•L	COCIENTE DE RIESGO ¹ (CR)	LOC*	RIESGO
BUTACLOR	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,019	0,10	5,26	0,5	SI
CLORPIRIFOS	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,021	0,05	2,38	0,5	SI
OXICLORURO DE COBRE	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,54	0,15	0,28	0,5	NO

¹Cociente de Riesgo (CR) = CAE/CL₅₀

*CAE= Concentración ambiental estimada

*LOC= Level of Concern (Nivel Crítico)

Mientras que en la tabla 7 encontramos que, al tomar en cuenta el factor de seguridad y el PNEC, si se encontró un elevado riesgo a nivel de ambiente acuático para todos los plaguicidas investigados.

TABLA 7. Resumen del ERA tomando en cuenta Factor de Riesgo y PNEC.

¹PNEC (Predicted No-Effect Concentration) = CL₅₀/Factor de seguridad.

*CAE= Concentración ambiental estimada

PLAGUICIDA	ORGANISMO	EFEECTO	CL ₅₀ mg·L ⁻¹	FACTOR DE SEGURIDAD*	PNEC ¹	CAE* mg i.a·L	COCIENTE DE RIESGO* (CR)	LOC*	RIESGO
BUTACLOR	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,019	1000	0,000019	0,10	5263,16	0,5	SI
CLORPIRIFOS	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,021	1000	0,000021	0,05	2380,95	0,5	SI
OXICLORURO DE COBRE	<i>Apohyale grandicornis</i>	Agudo	0,54	1000	0,00054	0,15	277,78	0,5	SI

* Cociente de Riesgo (CR) = CAE/Pnec

*LOC= Level of Concern (Nivel Crítico)

VII. DISCUSIÓN

8.1 Butaclor

En la prueba de toxicidad aguda con *A. grandicornis* a las 96 h se halló un CL_{50} de $0,019 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor que refleja una alta toxicidad al ser comparado con los reportados por otros autores como los de Nwani *et al.* (2013) que trabajaron con el pez *Tilapia zillii* Gervais, 1848 en un ensayo de toxicidad a las 96 h obteniendo un CL_{50} de 1,25 (0,60 a 1,85) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O los de Tilak *et al.* (2007) que obtuvieron un Cl_{50} de 0,25 y 0,55 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Grado técnico y formulado machete 50%) a las 48 h en la especie de pez *Channa punctata* Bloch, 1793.

La mayor cantidad de investigaciones que se hacen sobre la toxicidad del Butaclor son utilizando a los renacuajos como targets, los que registran valores de CL_{50} que van de 0,53 a 1,52 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Liu *et al.* 2011, Ying *et al.* 2008, Geng *et al.* 2005).

Aunque no se han encontrado reportes de estudios con anfípodos, si los hay sobre otros parientes dentro de los crustáceos; así tenemos el estudio de Paredes & Anaya (2015) con camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1782 a las 96 h, donde obtuvieron rangos de CL_{50} de 3,18 – 6,25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los realizados por He *et al.* (2012) que obtuvo un Cl_{50} de 3,40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 48 h sobre el cladocero *Daphnia carinata* King, 1852. Del mismo modo en la base de datos de pesticidas de la Universidad de Hertfordshire se presenta para el Butaclor un valor de CL_{50} , a las 96 h de $<0,19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en pruebas con el crustáceo *Americamysis bahía* Molenock, 1969 (Lewis *et al.* 2016). Tomando estos datos en consideración se podría

decir que *A. grandicornis* presenta una mayor sensibilidad a este herbicida que otros crustáceos.

Los efectos tóxicos del Butaclor son variados dependiendo el individuo afectado, Geng *et al* (2010) comenta que a una concentración de 0,88 mg•L⁻¹ los renacuajos de *Rana zhenhaiensis* Ye, Fei and Matsui, 1995 presentan aumentos muy significativos en el daño de su ADN. Esta proporcionalidad entre concentración y genotoxicidad también fue encontrada en el bagre *Clarias batrachus* Linnaeus, 1758 por Abigail *et al* (2015), quienes además citan otros daños causados por el Butaclor en peces tales como: pérdida proteica, efectos adversos en el proceso reproductivo normal e inducción de estrés oxidativo en diversos tejidos debido al descenso del sistema de desintoxicación del glutatión.

Estos mismos, recogieron diferentes datos sobre los impactos ambientales del Butaclor en el ambiente acuático, describiendo además que en el caso de *D. carinata* este herbicida actúa inhibiendo la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga.

A pesar de la variedad de estudios sobre sus efectos en organismos acuáticos no se encontraron antecedentes sobre sus efectos en anfípodos.

El Butaclor, debido a su ecotoxicidad a concentraciones bajas, a sus aplicaciones frecuentes y al poseer una amplia gama de usos, probablemente represente una amenaza para los organismos que habitan en los cuerpos de agua que reciben la esorrentía con pesticidas.

8.2 Oxiclورو de Cobre

En la prueba de toxicidad aguda con *A. grandicornis* a las 96 h se halló un CL_{50} de $0,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor que refleja una alta toxicidad al ser comprado con los reportados por otros autores (Ver tabla 1). Ferreira *et al.* (2004) y Fryday & Thompson (2012) reportaron para renacuajos de *Rana catesbeiana* Shaw, 1862 valores similares de CL_{50} a las 96 h ($2,4$ y $2,83 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$). Se encuentran también trabajos de toxicidad con juveniles de peces (Gradila 2015 y Cyrino *et al.* 2004): Con la carpa común *Teleostei cyprinidae* Heckel, 1843 ($CL_{50}= 0,20 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$) y el pez cebra *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 ($CL_{50}= 0,152 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$). Los mismos Cyrino *et al.* (2004) encuentran valores de CL_{50} de $1,433 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ para el caracol de agua dulce *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 en un ensayo de 48 h.

A pesar de que no se encuentran trabajos sobre la toxicidad del Oxiclورو de Cobre en anfípodos si los hay sobre otros crustáceos. De esta manera encontramos los trabajos de Paredes & Anaya (2015) quienes trabajaron con camarón el camarón de río *Cryphiops caementarius* determinando un valor muy alto de CL_{50} ($2\ 607,72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para esta especie. Otros trabajos son los que se realizaron sobre *Daphnia similis* Claus, 1876 y *Daphnia magna* Straus, 1820; Gradila (2015) en su ensayo agudo de 48 h halló un EC_{50} de $0,10 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ para *D. magna*, mientras que Cyrino *et al.* (2004) hizo lo mismo para *D. similis* encontrando un valor similar de EC_{50} de $0,065 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$. Mostrándose *A. grandicornis* más tolerante al Oxiclورو de Cobre que otros crustáceos.

Si bien no hay bioensayos específicos con anfípodos utilizando al Oxiclورو de Cobre como tóxico, si existen trabajos sobre toxicidad del

Cobre sobre estos. De tal forma, tenemos que para *Gammarus pulex* Linnaeus, 1758 el CL₅₀ calculado fue de 0,1 mgCu⁺²•L (Güven *et al.* 1999), para la especie *Echinogammarus olivii* H. Milne Edwards, 1830 fue de 0,25 mgCu•L (Bat *et al.* 1999). Tenemos que Ahsanullah & Florence (1984) calcularon las CL₅₀ para los juveniles y adultos de *Allorchestes compressa* Dana, 1852 encontrando valores de 0,11 y 0,5 mgCu•L, mostrando los juveniles presentan 4,5 veces más sensibilidad que los adultos. Asimismo, King *et al.* (2006) realizaron pruebas con *Melita awa* Barnard, 1972 y *Melita matilda* Barnard, 1972 obteniendo valores de CL₅₀ de 0,12 y 0,18 mgCu•L; los mismos autores también hallaron los valores de CL₅₀ >0,1 mgCu•L para *Hyale longicornis* Haswell, 1879 y *Hyale crassicornis* Haswell, 1879 que pertenecen a la misma familia que *Apothyale grandicornis*.

El oxiclорuro de Cobre debe su toxicidad al cobre en su estructura, pues a pesar que es esencial para el funcionamiento correcto del organismo un exceso de este puede ser perjudicial. Por ello es necesario entender cómo actúa y cuáles son los efectos del cobre en el anfípodo. Güven *et al.* (1999) encontraron que la concentración de cobre en el cuerpo del anfípodo *G. pulex* aumenta en proporción a la concentración de cobre en el agua, y comenta que esto puede deberse a una estrategia de acumulación de metales esenciales muy común en crustáceos. King *et al.* (2006) en sus ensayos llega a la misma relación proporcionar entre concentración y acumulación en el cuerpo del anfípodo, agregando que las especies que acumulan más cobre son las epibentónicas, como lo es *A grandicornis*; sin embargo, recalcan que entender concretamente la razón de estas relaciones es difícil, puesto que estaría vinculado con las vías de absorción relativas y con la fisiología de las especies de prueba.

Kiaune & Singhasemanon (2011) comentan que las vías de toxicidad de cobre mejor estudiadas implican la inhibición de las bombas impulsadas

por ATP y los canales iónicos, como en el caso de bioensayos realizados con *Artemia*, donde el cobre inhibía la actividad de la enzima Na/K ATPasa y Mg² ATPasa. En esta misma línea Brooks & Mills (2003) analizaron los efectos del cobre sobre la osmoregulación del anfípodo *G. pulex*, encontrando que a niveles de cobre de 10 mg•L⁻¹ o más se reduce significativamente la acción de la Na/K ATPasa en las branquias, cosa contraria a lo que hallaron con la actividad aglutinante de la Mg² ATPasa que se vio menos afectada.

8.3 Clorpirifos

En la prueba de toxicidad aguda con *A. grandicornis* a las 96 h se halló un CL₅₀ de 0,021 mg•L⁻¹, un valor que refleja una toxicidad baja al ser comprado con los reportados para otros organismos acuáticos. Diversos estudios se han realizado en peces, anfibios, insectos, etc, para hallar la dosis letal media del Clorpirifos, pero es de nuestro interés los estudios realizados con crustáceos u otros anfípodos.

Trabajos en crustáceos menores como la pulga de agua (Iannacone & Alvariño, 2000; Palma *et al.* 2008; CCME, 2008; FAO, 2002 y Giddings *et al.* 2014) han proporcionado valores de CL₅₀ que van desde 10,48 (*Moina macrocopa* Straus, 1820) a 0,035 ug•L (*Daphnia ambigua* Scourfield, 1947), los que han permitido entender la gran toxicidad que tiene el Clorpirifos en ambientes acuáticos. Otro trabajo sobre crustáceos es el ejecutado por Montagna (2010) quien halló un CL₅₀ de 0,046 mg•L⁻¹ para los juveniles del cangrejo *Trichodactylus borellianus* Nobili, 1896; y en su recopilación de información comentan las CL₅₀ encontradas en otros crustáceos menores como los anfípodos *Ampelisca abdita* Mills, 1964 (0,00016 mg•L) y *Gammarus palustris* Bousfield, 1969 (0,0003 mg•L). Indicando que estas diferencias podrían deberse a la dureza del

exoesqueleto y al tamaño de las aberturas de las cámaras branquiales, pues influiría en el ingreso de tóxicos al organismo.

Existen más trabajos sobre la toxicidad del Clorpirifos en anfípodos. Como los realizados Leight & Van dolah (1999) quienes hallaron para el anfípodo estuarino *G. palustris* rangos de CL₅₀ a las 96 h de 0,0003 a 0,0053 mg•L, y comparando sus resultados con otros estudios realizados en *Gammarus lacustris* G.O. Sars, 1864 (0,00011 mg•L), *Hyalella azteca* Saussure, 1858 (0,00015 mg•L), *Gammarus pseudolimnaeus* Bousfield, 1958 (0,00018 mg•L) y *Gammarus fasciatus* Say, 1818 (0,00032 mg•L) encontraron que este anfípodo estuarino poseía menor sensibilidad. A su vez, Giddings *et al.* (2014) para la elaboración de su informe sobre los riesgos para los organismos acuáticos por el uso de Clorpirifos en los Estados Unidos recolectaron información sobre diferentes ensayos en organismos acuáticos, dentro de ellos los anfípodos, sacando una media geométrica para calcular el CL₅₀ en los estudios que usaban la misma especie. De esta manera encontraron rangos de CL₅₀ entre 0,00007 mg•L en *G. pulex* y 0,0029 mg•L en *Gammarus fossarum* Koch, 1836, valores mucho menores que los encontrados en este estudio para *A. grandicornis* (0,021 ug•L). *A. grandicornis* se mostró unas 210 veces más resistente que *H. azteca* con quien comparte familia; un resultado similar se encuentra en el estudio elaborado por CCME (2008) con la misma especie, mostrando a *A. grandicornis* unas 250 veces más resistente. Estas diferencias podrían deberse al hábitat en el que habitan estas especies estudiadas, pues son especies de agua dulce mientras que la usada en el presente trabajo es marina, aunque Giddings *et al.* (2014) advierte que las diferencias en la sensibilidad entre estos grupos son mínimos; por lo que se deberían hacer más estudios sobre esta especie.

El Clorpirifos trabaja mediante su metabolito activo, clorpirifós oxón, el cual inhibe la actividad de la enzima colinesterasa (AChE), esta inhibición

provoca la acumulación de acetilcolina en las terminales sinápticas, causando cambios en la transmisión normal de los impulsos nerviosos. En vertebrados e invertebrados acuáticos fueron reportadas distintas expresiones neurológicas tales como irritabilidad, temblores musculares, movimientos bruscos de los apéndices y convulsiones que terminan en insuficiencia respiratoria y la muerte del animal (Montagna. 2010). Sin embargo Giddings *et al.* (2014) expone que la inhibición de AChE por Clorpirifos es reversible y que en el caso de exposiciones subletales se puede producir una recuperación de esta enzima.

8.4 Dicromato de Potasio

En la prueba de sensibilidad con Dicromato de Potasio el valor de la CL_{50} para *A. grandicornis* fue de $13,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ siendo semejante a lo reportado por otros autores. Como Abessa y Sousa (2003) quienes a las 48 h determinaron un CL_{50} para el anfípodo *Tiburonella viscana* J.L. Barnard, 1964 de $11,217 \pm 3,768 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; o los obtenidos por Cesar *et al* (2004 y 2002), también a las 48 h para el anfípodo *Gammarus aequicauda* Martynov, 1931: $EC_{50} = 9,5 \pm 2,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $EC_{50} = 9,52 \pm 4,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

A pesar que el bioensayo que realizaron Rudolph *et al.* (2011) es el que más se ajusta al realizado en esta investigación, es a su vez el que presenta valores más lejanos; los autores trabajaron en un bioensayo de 96 h, con el anfípodo *Ampelisca araucana* Gallardo, 1963 obteniendo un CL_{50} de $55,37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

8.5 Riesgo Ambiental

Torres (2008), expresa que uno de los problemas ambientales en casi todas las áreas agrícolas del mundo, es el de los efectos negativos derivados del uso inadecuado de agroquímicos. Por lo que evaluar los posibles efectos adversos que causan sobre el ambiente es indispensable para ayudar a la regulación de estos. Reforzando esta idea Iannacone & Alvarino (2009), mencionan que la investigación del efecto ecotoxicológico proporciona más solidez a la evaluación de la calidad de agua, ayudando a que se establezcan mejores criterios de calidad para la protección de la vida acuática.

Así, la evaluación de riesgos se perfila según Torres (2008) como una herramienta que puede utilizarse para estimar y jerarquizar la importancia ambiental de una medida, calculando cuantitativamente y/o cualitativamente los daños a los ecosistemas derivados de la exposición a un contaminante ambiental. Por su parte Vassiliou (2016) en su estudio advierte la importancia de, además de los factores de exposición, toxicidad y las características del ecosistema, incluir los que afectan la fuente, el patrón de aplicación, la carga y la disponibilidad de plaguicidas, para la evaluación del riesgo de los plaguicidas en cuerpos de agua.

La evaluación del riesgo realizado en esta investigación entra en lo que Petterson (2006) categoriza como los de Nivel 1; que si bien se caracterizan por suposiciones de toxicidad y exposición muy conservadoras, y que se utilizan principalmente para descartar riesgos insignificantes en la toma de decisiones regulatorias, son valiosos para hacer comparaciones directas del riesgo cuantitativo entre plaguicidas.

Referente a esto Vassiliou (2016) comenta que es tan complejo y variados los escenarios y factores que afectan el riesgo, que las nuevas tendencias

en las pruebas de toxicidad tienden a modificar el enfoque clásico de un procedimiento de evaluación de riesgos.

Dada la importancia mencionada en la utilización de uso del cociente de riesgo y otros factores dentro de la evaluación del riesgo, para determinar la peligrosidad de una sustancia, es contradictorio que en el Perú no se tome en cuenta esto para la regulación de plaguicidas; pues en el decreto supremo (DS.Nº001, 2015) extendido por el MINAGRI, donde se habla sobre los requisitos generales para la evaluación o reevaluación de plaguicidas químicos de uso agrícola, se mencionan las especificaciones para los ensayos agudos y crónicos, sin embargo para la evaluación del riesgo en plaguicidas no hay especificaciones. Lo que podría ser fruto del poco manejo, conocimiento e importancia de este tipo de pruebas en nuestra regulación de plaguicidas.

VIII. CONCLUSIONES

- Se evidenció la sensibilidad del anfípodo *Apothyale grandicornis* frente a los plaguicidas estudiados (Butaclor, Clorpirifos y Oxicloruro de Cobre) en un ensayo agudo. Perfilándose, así como una buena opción de bioindicador para ensayos de este tipo.
- Se encontró que, según su toxicidad, a las 96 h, los plaguicidas evaluados pueden ser ordenados de manera descendente de la siguiente manera: Butaclor ($0,019 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Clorpirifos ($0,021 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > Oxicloruro de Cobre ($0,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Se halló que el herbicida Butaclor es el más tóxico dentro de los plaguicidas estudiados; siendo 1,11 veces más tóxico que el Clorpirifos y unas 28,42 veces más tóxico que el Oxicloruro de Cobre.
- Se demostró que el Dicromato de Potasio afecta a la mortandad de *A. grandicornis* a las 24, 48,72 y 96 h. Presentando a las 96 h un CL_{50} de $13,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. De lo que se concluye que este tóxico de referencia puede utilizarse para test de sensibilidad en *A. grandicornis*.

IX. RECOMENDACIONES

- Se deben efectuar más bioensayos de toxicidad aguda y crónica con Butaclor sobre anfípodos, debido a la escasa bibliografía referido a esto.
- Es conveniente realizar trabajos sobre la toxicidad del cobre en *A grandicornis* utilizando otros compuestos cúpricos.
- Sería bueno desarrollar más pruebas con *A grandicornis* usando otras sustancias químicas.
- Se debe comprobar si la zona de muestreo de *A. grandicornis* afecta, de alguna manera en su sensibilidad a ciertos tóxicos.
- Es necesario complementar estos estudios de toxicidad aguda del Butaclor con trabajos sobre su efecto en la fisiología y comportamiento de *A grandicornis*.
- Hay que realizar bioensayos de sensibilidad con *A. grandicornis* usando otras sustancias de referencias, para poder comparar a mayor escala su sensibilidad.
- Se deben realizar estudios más profundos sobre el riesgo ambiental que implica el uso de estos plaguicidas en el ambiente acuático.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abessa, D., & Souza, E. (2003). S activity of the Amphipod *Tiburonella viscana* (Platyischnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(1): 53-55.
2. Abigail, M., Samuel, S., & Ramalingam, C. (2015). Addressing the environmental impacts of butachlor and the available remediation strategies: a systematic review. International Journal of Environmental Science and Technology, 12: 4025-4036.
3. Ahsanullah, M., & Florence, T. (1984). Toxicity of copper to the marine amphipod *Allorchestes compressa* in the presence of water- and lipid-soluble ligands. Marine Biology, 84:41-45.
4. Albert L., A. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. Revista de toxicología en línea. Recuperado de: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.
5. Bat, L., Gündogdu, A., Sezgin, M., Çulha, M., Gönlügür, G., Akbulut, M. (1999). Acute toxicity of zinc, copper and lead to three species of marine organisms from the Sinop Peninsula, Black Sea. Tr. Journal of Biology, 23: 537-544.
6. Bousfield, E. L. & Hendrycks, E. A. (2002). The Talitroidean Amphipod family Hyalidae revised, with emphasis on the North Pacific fauna: systematics and distributional ecology. Amphipacifica, 3 (3): 17-134.

7. Brooks, S., J., & Mills, C., L. (2003). The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135: 527–537.
8. Cadien, D. (2015) Amphipoda of the Northeast Pacific (Equator to Aleutians, intertidal to abyss): II. Talitroidea - a review. Southern California. Association of Marine Intertidal Taxonomists. 45pp.
9. Carson, R. (2010). Primavera Silenciosa. (R. Joandomènec, Trans.). Barcelona: Crítica, S.L. (Trabajo original publicado en 1960).
10. CCME (Canadian council of ministers of the environment). (2008). Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Chlorpyrifos. Canadian Environmental Quality Guidelines.
11. Cesar, A., Marín-Guirao, L., Vita, R., & Marín, A. (2002). Sensibilidad de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a sustancias tóxicas de referencia. *Ciencias Marinas*, 28: 407-417.
12. Cesar, A., Marín, A., Marín-Guirao, L., & Vita, R. (2004). Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Scientia Marina*, 68 (Suppl. 1): 205-213.
13. Comunidad Andina. (2002). Manual técnico andino para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola. *Gaceta Oficial*. 169pp.
14. Cyrino, E., Matos, R. & Roma. F., (2004). Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56: 369-374.
15. Chapman, J.W. (2007) Gammaridea. En: J. T. Carlton (Ed), *The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*,

fourth edition. University of California Press, Berkeley, California, 545–611 pp.

16. Decreto supremo DS. N° 001. (2015). MINAGRI. Diario “El Peruano”: Normas Legales. 29 de Enero del 2015.
17. De la Torre, A., Nuñez, J. & Carballo, M. (2004). Curso sobre toxicología ambiental y seguridad química. Sanidad Ambiental. CISA. Murcia.
18. Duffus, J.H. (1986). Environmental toxicology and ecotoxicology. En: Environmental toxicology and ecotoxicology-Environmental health N°10. World Health Organization. Regional office for Europe. Programme on Chemical safety. Copenhagen.
19. Fairchild, W. L., Doe, K. G., Jackman, P. M., Arsenault, J. T., Aubé, J. G., Losier, M., & Cook, A. M. (2010). Acute and chronic toxicity of two formulations of the pyrethroid pesticide deltamethrin to an amphipod, sand shrimp and lobster larvae. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 2876: 34p.
20. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (1990). International code of conduct on the distribution and use of pesticides (amended version). Rome.
21. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2002). FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides : Chlorpyrifos.
22. FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (5 septiembre, 2017). Cantidad de plaguicidas usados en el Perú (Base de datos). Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

23. Fernández E. 2001. Fungicidas: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control del Tizón. Proceedings of the International workshop on complementing resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) in the Andes. GILB Latin american workshops 1. pp: 67-76.
24. Fernández, N., Viciano V., Drovandi A. (2005). Valoración del impacto ambiental total por agroquímicos en la cuenca del Río Mendoza. Proyecto OEI/DGI. Argentina.
25. Ferreira, C., Lombardi, J., Machado, J., Bueno, H., Soares, S., & Saldiva, P. (2004). Effects of copper oxychloride in *Rana Catesbeiana* tadpoles: toxicological and bioaccumulative aspects. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 73: 465-470.
26. Finney, D.J. (1952). Probit Analysis (2nd Ed). Journal of the Institute of Actuaries, 78 (3): 388-390.
27. Fortini, A. (8 de Febrero del 2010). *Hyale Grandicornis* [Mensaje en un blog]. Anahi Fortini. Recuperado de: <http://afortini.blogspot.pe/2010/02/>.
28. Fryday, S., & Thompson, H. (2012). Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. EFSA Publications, EN-343, 9:9.
29. Garza, V. (2009). La escritura de lo ambiental. CULCyT,: 33-34.
30. Geng, B., Yao, D., & Xue, Q. (2005). Acute toxicity of the pesticide dichlorvos and the herbicide butachlor to tadpoles of four anuran

species. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 75: 343-349.

31. Geng, B., Lin, L., Zhang, Q., & Zhong, B. (2010). Genotoxicity of the Pesticide Dichlorvos and Herbicide Butachlor on *Rana zhenhaiensis* Tadpoles. Asian Herpetological Research, 1(2): 118-122.
32. Giddings, J. M. Williams, W. M. Solomon, K. R. & Giesy, J. P. (2014). Risks to Aquatic Organisms from Use of Chlorpyrifos in the United States. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 231: 119-162.
33. González, E. R. (1991). The genus *Hyalé* in Chile. Spixiana, 14:125-142.
34. González, E. R., Haye, P. A., Balanda, M. J., & Thiel, M. (2008). Lista sistemática de especies de peracáridos de Chile (Crustacea, Eumalacostraca). Gayana (Concepción), 72: 157-177.
35. Gradila, M. (2015). Environmental risk assessment of some copper based fungicides according to the requirements of good laboratory practice. AgroLife Scientific Journal. 4(1) : 74-78.
36. Guerra, J. M., Ros, M., & Sánchez, J. A. (2009). Isopods, tanaids and cumaceans (Crustacea, Peracarida) associated to the seaweed *Stypocaulon scoparium* in the Iberian Peninsula. Zoológica baetica, 20:35-48.
37. Guerrero, J. (2007). Estudio comparativo de tratamientos herbicidas post – emergentes sobre el complejo de malezas en arroz de riego (Tesis de grado). Universidad técnica de Babahoyo. Babahoyo. Ecuador.

38. Güven, K., Özbay, C., Ünlü, E., & Satar, A. (1999). Acute lethal toxicity and accumulation of copper in *Gammarus pulex* (L.)(Amphipoda). Turkish Journal of Biology, 23: 513-522.
39. He, H., Yu, J., Chen, G., Li, W., He, J., & Li, H. (2012). Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. Ecotoxicology and environmental safety, 80: 91-96.
40. Henao, S. & Nieto, O. (1992). Aspectos generales sobre los plaguicidas y su efecto sobre el hombre y el ambiente. INCAP MD-025.
41. Herkovits, J. & Perez, C. (2006). Ecotoxicología: Su importancia para la protección del medio ambiente, la salud humana y la comprensión del proceso evolutivo. Instituto de ciencias ambientales y saludables, 8: 14-29.
42. Hodgson, E. (2004). Introduction to Toxicology .A textbook of modern toxicology. Edition 3, 1: 3-12.
43. Iannacone, J., & Alvaríño, L. (2000). *Chironomus calligraphus* Goeldi y *Moina macrocopa* Sars como herramientas ecotoxicológicas para la evaluación de Lindano y Clorpirifos. Bol. Sociedad de Biología de Concepción, 71: 73-79.
44. Iannacone, J., Caballero, R., & Alvaríño, I. (2002). Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gould como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas. Agricultura Técnica (Chile), 62: 212-225.

45. Iannacone, J., & Alvarino, L. (2002). Evaluación del riesgo ambiental del insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. *Agricultura Técnica (CHILE)*, 62(3):366-374.
46. Iannacone, J., & Alvarino, L. (2004). *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48: 5-12.
47. Iannacone, J., & Alvarino, L. (2009). Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 8(2): 71-80.
48. Iannacone, J., Alvarino, 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.
49. INE (Instituto Nacional de Ecología). (2003). Introducción al análisis de riesgos ambientales. México DF: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).
50. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2011). Comportamiento de la economía peruana en el año 2011. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú. 15-105.
51. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2016). Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2016. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú. 429.
52. Jerez, J., Peralta, J., Tapia, F., Mejías, J., Jerez, A., & Encina, F. (2006). Estudio de metodologías para la evaluación de riesgo ambiental de la

aplicación de plaguicidas. *Informe final*. Ministerio de agricultura servicio agrícola y ganadero.

53. Jiménez, P., Hachero, I. & Guerra, J. (2015). Importancia de los anfípodos en la dieta de especies de interés acuícola del litoral Andaluz. *Zool. baetica*, 26: 3-29.
54. King, C. K., Gale, S. A., Hyne, R., V., Stauber, L., J., Simpson, S., L., & Hickey, S., W. (2006). Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments. *Chemosphere*, 63:1466–1476.
55. Kiaune, L., & Singhasemanon, N. (2011). En: D.M. Whitacre (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213, Springer Science Business Media.
56. Labrada, R. Caseley, J. & Parker C. (1996). Manejo de Malezas para Países en Desarrollo: Herbicidas. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal-120. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm#cap%C3%ADtulo> 10. Herbicidas.
57. Lasheidani, M., Balouchi, S., Keyvan, A., Jamili,S., Falakrou, K. (2008). Efectos de Butachlor la densidad, el volumen y el número de espermatozoides anormales en Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum* , Kamenskii 1901). *Investigación Revista de Ciencias del Medio Ambiente*, 2:474-482.
58. Lafuente J., & Navia R. (2005). Influencia de los plaguicidas sobre las aves y mamíferos cazables. 139.

59. Leblanc, G. (2004). Basics of Environmental Toxicology. A textbook of modern toxicology. Edición 3, 4: 263-278.
60. Leight, A., & Van Dolah, R. (1999). Acute toxicity of the insecticides Endosulfan, Chlorpyrifos, and Malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). Environmental toxicology and chemistry, 1: 958-964.
61. Lewis, K., Tzilivakis, J., Warner, D. & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 22(4), 1050-1064. <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
62. Liu, W., Wang, C., Wang, T., Fellers, G., Lai, B., & Kam, Y. (2011). Impacts of the herbicide Butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. Ecotoxicology, 20: 377-384.
63. Macas, L. (2009). Determinación de la persistencia biológica y química de los herbicidas Butaclor, Pyrazosulfuron ethyl en el cultivo de arroz de la zona de Daule, provincia del Guayas. Universidad Estatal Península de Santa Elena. Santa Elena. Ecuador.
64. Macías, P. (2012). "Herbicidas orgánicos Vs. Herbicidas químicos" (tesis de Grado). Universidad Veracruzana. Veracruz. México.
65. Mantilla, M. & Duran, V. (2007). Exposición laboral: Pesticidas, un Remedio peor que la Enfermedad. Artículo de difusión Ciencia y Trabajo, 26: 93-99.

66. Mazé, R. (2015). Clase malacostraca, orden Amphipoda. IDEA - SEA, 82: 1–10.
67. Mendoza, A. (2011). Información general sobre los herbicidas (Presentación en PDF). Recuperado de: http://www.inecc.gob.mx/descargas/biosecuridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres1.pdf.
68. MINAGRI (Ministerio de agricultura y riego). (2014). Valor bruto de la producción agropecuaria-VBP Agosto 2014. Ministerio de agricultura y riego-boletín virtual: www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/boletines_electronicos/VBP/2014/VBP-agosto-2014.pdf.
69. Milla O. & Palomino R. (2002) .Nivel de Colisterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Marcos.
70. Mohammad, H., Zabeh, B., Garza, R., Garza, V. & Landeros, J. (2005). Los Indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en ecosistemas acuáticos y asociados. Revista CULCyT, 6: 4-20.
71. Montagna, M. C. (2010). Toxicidad de clorpirifos como elemento activo de un formulado comercial en juveniles del cangrejo *Trichodactylus borellianus*. Natura Neotropicalis, 1: 31-43.
72. Navarro, C. (2015). Anfípodos en cuevas submarinas del sur de la Península Ibérica (Tesis Doctoral). Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

73. Nwani, C., Ama, U., Okoh, F., Oji, U., Ogbonyealu, R., Ibiam, A, & Udu-Ibiam, O. (2013). Acute toxicity of the chloroacetanilide herbicide butachlor and its effects on the behavior of the freshwater fish *Tilapia zillii*. *African Journal of Biotechnology*, 12: 499-503.
74. Orozco, M. (2008). Nuevos mecanismos de acción fungicida en la agricultura (Presentación PDF). Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/130258776/Modos-de-Accion-de-Fungicidas>.
75. Ortega, I. & Martin, A. (2013). Suprabenthic Amphipods from the littoral zone of Barlovento, Venezuela: spatial distribution and seasonal variation. *Crustaceana*, 86 (10):1206-1223.
76. Ossana, N. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
77. Paredes, A. & Anaya, R. (2015). Efecto agudo del Oxicloruro de Cobre y del Butaclor sobre el “Camarón de Río” *Cryphiops caementarius* (Molina 1782). *Ecología Aplicada*. 14(1): 71-74.
78. Palma, P. Palma, V. Fernandes R. Soares, A. & Barbosa I. (2008). Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, 81:485–489.
79. Peluso, M. L. (2011). Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.

80. Pérez, J. (2009). Composición y diversidad de la fauna de Amphipoda (Crustacea, Aeracarida) asociada a instalaciones acuícolas de Bahía Metri, Región de los Lagos, Chile. Centro de Estudios en Biodiversidad (CEBCh). Osorno, Chile.
81. Pérez, W & Forbes, G. (2007). ¿Qué es un Fungicida? División de manejo integrado de cultivos. Hoja divulgativa, 5:4.
82. Peterson, R. K. (2006). Comparing ecological risks of pesticides: the utility of a Risk Quotient ranking approach across refinements of exposure. *Pest Management Science*, 62(1): 46-56.
83. Planes, E. & Fuchs, J. (2015). Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencia e Investigación*, 65(2): 45-62.
84. Proyecto PNI-COP (Plan Nacional de implementación del convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes). (2006). Inventario Nacional de Plaguicidas COP. Proyecto GEF/PNUMA N° GFL-2328 - 2761 – 4747.
85. Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivo. Riesgos Laborales*, 4: 67-75.
86. Routt, J., & Roberts, J. (1999). Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas, Edición 5: 152-171.
87. Rudolph, A., Medina, P., Ahumada, R., & Novoa, V. (2011). Calidad ecotoxicológica de los sedimentos en fiordos del sur de Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 46: 79-84.

88. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria). (2015). Registro y control de plaguicidas agrícolas: Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Recuperado de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/registro-y-control-de-plaguicidas-agricolas/>. Accedido el 18/10/2015.
89. Serejo, C. S. (2003). Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustacea, Gammaridea), with a proposal of a new classification. *Zoologica Scripta*, 33: 551–586.
90. Squibb, K. (2002). Pesticides. Program in Toxicology NURS, 678 - Applied Toxicology. 48.
91. Tilak, K., Veeraiah, K., Bhaskara Thathaji, P. & Butchiram, M. (2007). Toxicity studies of butachlor to the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Journal of Environmental Biology*, 28(2): 485-487.
92. Thiel, M. & Hinojosa, I. (2009). Perecarida-Anfípodos, Isópodos, Tanaidáceos y Cumáceos. En: V. Häussermann & G. Försterra (Ed.), *Fauna marina bentónica de la Patagonia Chilena, guía de identificación ilustrada* (pp, 671-738). Chile: Nature in Focus.
93. Torre, D. A. (2008). Propuesta metodológica para el análisis de riesgo ambiental en sistemas productivos agrícolas bajo invernadero en Colombia (Tesis de Grado). Universidad de la Salle. Bogotá, D.C. Colombia.
94. USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1994). *Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine Amphipods*. Washington: Environmental Agency Proteccion.

95. USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1998). Guidelines for Ecological Risk Assessment. Washington: Environmental Agency Protection.
96. USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2002). Guidelines for Ecological Risk Assessment. Washington: Environmental Agency Protection.
97. Vassiliou, G. (2016). Factors Affecting Risk Assessment of Pesticides in Water Bodies: A Review. *MOJ Toxicology*, 2(1): 00030.
98. Whitacre, D. & Ware, G. (2004). Una introducción a los herbicidas. En George W. Ware (Ed.). *The Pesticide Book*, 6th. Ohio. Estados Unidos de América. Meister Publishing Co.
99. WHO (World Health Organization). (2009). The WHO recommended classification of pesticide by hazard and guidelines to classification. International Program on Chemical Safety, World Health Organization. 173.
100. Yin, X. Li, S. Zhang, L. Zhu, G. & Zhuang H. (2008). Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology*, 17(4): 280-6.

XI. ANEXOS

Plaguicidas a base de Clorpirifos con registro vigente

	N° DE REGISTRO	NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE COMUN	CLASE	PAIS DE ORIGEN	TITULAR DEL REGISTRO
1	009-96-AG-SENASA	VEXTER 4E	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	COLOMBIA	DOW PERU S.A
2	024-96-AG-SENASA	LORSBAN 2.5% PS	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	COLOMBIA/PERÙ	DOW PERU S.A.
3	025-96-AG-SENASA	LORSBAN 4E	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	COLOMBIA	DOW PERU S.A
4	071-96-AG-SENASA	PYRIFOS 48 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	EE.UU. / GRAN BRETAÑA / DINAMARCA / COLOMBIA / ISRAEL	BAYER S.A.
5	239-96-AG-SENASA	PYRINEX 48 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	ISRAEL / PERU / COLOMBIA	PROFIANDINA PERU S.A
6	312-96-AG-SENASA	MATAGUSANO	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	SERFI S.A
7	331-96-AG-SENASA	AGROMIL 48 CE	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	GUATEMALA / DINAMARCA / CHINA / INDIA	NEOAGRUM S.A.C
8	345-97-AG-SENASA	PALADIN	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU / SUD-AFRICA	AGRO KLINGE S.A.
9	408-97-AG-SENASA	TIFON 2.5 PS	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMAGRO S.A.
10	409-97-AG-SENASA	TIFON 4E	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMAGRO S.A.
11	411-97-AG-SENASA	TIFON 1% G	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMAGRO S.A
12	492-97-AG-SENASA	TROYA 4 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	CHILE / PERU / CHINA	HORTUS S.A.
13	559-98-AG-SENASA	POINTER 48 CE	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	GRAN BRETAÑA / CHINA	POINT ANDINA S.A
14	594-98-AG-SENASA	LORPYFOS	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	INDIA / PERU / SUD-AFRICA	TECNOLOGIA QUIMICA Y COMERCIO S.A
15	618-98-AG-SENASA	CLORFOS 1.5 G	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMEX S.A.
16	619-98-AG-SENASA	CLORFOS 2.5 P	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMEX S.A.
17	624-98-AG-SENASA	DORSAN 48 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	DINAMARCA / ISRAEL / CHINA / INDIA	SILVESTRE PERU S.A.C
18	632-98-AG-SENASA	PSYCHLOREX 48 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	BELGICA	HERRERA & MENDOZA S.A.
19	660-98-AG-SENASA	PYRIFOS 2.5% G	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	BAYER S.A. QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU S.A
20	675-98-AG-SENASA	TARGET	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	
21	692-98-AG-SENASA	OLYMPIK	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	AGRO KLINGE S.A
22	742-98-AG-SENASA	MATA GUSANO 2.5	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	SERFI S.A
23	789-98-AG-SENASA	RELAMPAGO	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMEX S.A
24	797-98-AG-SENASA	EXAQ	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	COLOMBIA	DOW PERU S.A.
25	824-99-AG-SENASA	CLORFOS 48 CE	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	PERU	FARMEX S.A
26	887-99-AG-SENASA	BLINK 4 EC	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	COLOMBIA	DOW PERU S.A.
27	894-99-AG-SENASA	CLORVEX 48 CE	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	GRAN BRETAÑA / CHINA	POINT ANDINA S.A.

28	917-99-AG-SENASA	CHEROKEE 48 CE	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	GRAN BRETAÑA / CHINA	INSUMOS AGRICOLAS PERUANOS S.A.C.
29	931-2000-AG-SENASA	PYRINEX 25 CS	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	ISRAEL	PROFIANDINA PERU S.A.
30	941-2000-AG-SENASA	SANPIFOS	CLORPIRIFOS	INSECTICIDA	ECUADOR / COLOMBIA / CHINA	ARIS INDUSTRIAL S.A.

Plaguicidas a base de Butaclor con registro.

N° DE REGISTRO	NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE COMUN	CLASE	PAIS DE ORIGEN	TITULAR DEL REGISTRO	
1	041-SENASA	MARISCAL 60 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA / ECUADOR / PERÚ	ARIS INDUSTRIAL S.A.
2	097-SENASA	DK-CLOR	BUTACHLOR	HERBICIDA	ECUADOR / CHINA	DROKASA PERÚ S.A.
3	098-SENASA	ARROBA 600 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA	SILVESTRE PERÚ S.A.C.
4	136-SENASA	BUTANOX 600 CE	BUTACHLOR	HERBICIDA	ECUADOR	CRYSTAL CHEMICAL DEL PERÚ S.A.
5	211-SENASA	ZABLE 60 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA	COMERCIAL ANDINA INDUSTRIAL S.A.C.
6	230-SENASA	FULLRICE 600 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	ECUADOR / CHINA	QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ S.A.
7	235-SENASA	VERDUGO 60 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	PERÚ.	ARIS INDUSTRIAL S.A
8	356-SENASA	EJECUTOR 60 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	PERÚ	ARIS INDUSTRIAL S.A
9	386-SENASA	CHEM RICE 5 G	BUTACHLOR	HERBICIDA	PERÚ	FARMAGRO S.A.
10	749-SENASA	ARROSAC	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA	HORTUS S.A.
11	815-SENASA	BARBARO	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA	SOC. AN. FAUSTO PIAGGIO
12	836-SENASA	FINIQUITAR 600 EC	BUTACHLOR	HERBICIDA	CHINA	POINT ANDINA S.A.

.Plaguicidas a base de Oxicloruro de Cobre con registro vigente.

	N° DE REGISTRO	NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE COMUN	CLASE	PAIS DE ORIGEN	TITULAR DEL REGISTRO
1	049-96-AG-SENASA	VITIGRAN CONC	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	BAYER S.A.
2	060-96-AG-SENASA	COBOX	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	BASF PERUANA S.A
3	123-96-AG-SENASA	CUPRAVIT OB 21	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	BAYER S.A
4	245-96-AG-SENASA	OXICLOR 88	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	SERFI S.A. TECNOLOGIA QUIMICA Y COMERCIO S.A.
5	296-96-AG-SENASA	RAM-CAF 88	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	
6	388-97-AG-SENASA	SULCOX	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	SULFATO DE COBRE S.A
7	606-98-AG-SENASA	ROXICOP	OXICLORURO DE COBRE	FUNGICIDA	PERU	FARMEX S.A.

Resumen del producto formulado Cupravit OB21

Cupravit Ob21	
Ingrediente activo	Oxicloruro de Cobre (N° CAS: 1332-40-7)
Formulación	Polvo mojable
Concentración	85%
Ingredientes inertes	15%
Número de registro	123-96-AG-SENASA
Laboratorio	BAYER S.A.
Categoría Toxicológica	III, Ligeramente peligroso
Etiqueta	Azul
Descripción	Fungicida a base de cobre preventivo para el control de la racha de la papa; roya, <i>Cercospora</i> y <i>Physalospora</i> en café, té y palto.

Resumen del producto formulado Arroba 600 EC

Arroba 600 EC	
Ingrediente activo	Butachlor (N° CAS: 23184-66-9)
Formulación	Concentrado Emulsionable
Concentración	600 g/L
Ingredientes inertes	c.s.p. 1L
Número de registro	PQUA N° gro098-SENASA
Laboratorio	Silvestre Perú S.A.C.
Categoría Toxicológica	III Moderadamente peligroso
Etiqueta	Amarilla
Descripción	Tifón 2,5
Ingrediente activo	Es un herbicida pre-emergente y post-emergente temprano, selectivo y sistémico perteneciente al grupo de los herbicidas Chloroacetanilide. Clorpirifos (N° CAS: 2921-88-2)
Formulación	Polvo Seco
Concentración	2.5%
Ingredientes inertes	97.5%
Número de registro	408-97-AG-SENASA
Laboratorio	FARMAGRO S.A.
Categoría Toxicológica	III, Ligeramente peligroso
Etiqueta	Azul
Descripción	Insecticida fosforado de amplio espectro de acción, actúa por contacto,

Resumen del
formulado Tifon

ingestión y fumigante. Tiene buen
efecto translaminar, es medianamente 2.5
persistente en el suelo y superficies de
las plantas.

producto

Tabla de registro diario de mortandad

REGISTRO MORTANDAD – ENSAYO AGUDO								
Organismo Prueba:							Fecha instalación:	
Sustancia Prueba:							Hora de instalación:	
Cn	mg/L	R	24h	48h	72h	96h	TOTAL	OBSERVACIONES
		A						
		B						
		C						
		D						
		E						
		A						
		B						
		C						
		D						
		E						
		A						
		B						
		C						
		D						
		E						

Cn: Concentración.

mg/L: Dosis aplicada en miligramos por litro.

R: Replicas.

Tabla de registro diario para parámetros fisicoquímicos

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS										
DIARIOS										
Organismo Prueba:					Fecha de instalación:					
Sustancia Prueba:					Hora de Instalación:					
Cn	mg/L	R	Oxígeno Disuelto (mg/L ⁻¹)				Temperatura (°C)			
			24h		48h		72h		96h	
		A								
		B								
		C								
		D								
		E								
		A								
		B								
		C								
		D								
		E								
OBSERVACIONES										

Tabla de registro Inicial y final para parámetros fisicoquímicos

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS												
INICIALES Y FINALES												
Organismo Prueba: Anfibodo (Apothyale)						Fecha instalación:						
Sustancia Prueba:						Hora de instalación:						
Cn	mg/L	R	pH		Salinidad (%)		O.D (mg/L)		Temperatura (°C)		Observaciones	
			inicio	Fin	inicio	Fin	inicio	Fin	inicio	Fin		
		A										
		B										
		C										
		D										
		A										
		B										
		C										
		D										
		A										
		B										
		C										
		D										
Cn: Concentración. mg/L: Dosis aplicada en miligramos por litro.												

R: Replica.

EEC en mg/L de plaguicida en cuerpos de agua, inmediatamente después de la aplicación de 0,1 A 10,0 Kg de i.a./ha.

Kg/ha	mg/m²	PROFUNDIDAD DEL AGUA EN METROS (m) i.a. en mg/l								
i.a.	i.a.	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	10,0
0,1	10,0	0,02	0,01	0,005	0,003	0,002	0,00	0,001	0,001	0,001
					3	5	2	7	4	
0,2	20,0	0,04	0,02	0,010	0,006	0,005	0,00	0,003	0,002	0,002
					7		4	3	9	
0,25	25,0	0,05	0,02	0,012	0,008	0,006	0,00	0,004	0,003	0,002
			5	5	3	2	5	2	6	5
0,30	30,0	0,06	0,03	0,015	0,01	0,007	0,00	0,005	0,004	0,003
						5	6	0	3	
0,40	40,0	0,08	0,04	0,02	0,013	0,01	0,00	0,006	0,005	0,004
					3		8	7	7	
0,50	50,0	0,10	0,05	0,025	0,016	0,012	0,01	0,008	0,007	0,005
					7	5		3	1	
1,00	100,0	0,20	0,10	0,05	0,033	0,025	0,02	0,016	0,014	0,01
					3			7	3	
2,00	200,0	0,40	0,20	0,10	0,066	0,050	0,04	0,033	0,028	0,02
					7			3	6	

3,00	300,0	0,60	0,30	0,15	0,1	0,075	0,06	0,050	0,042	0,03
									8	
4,00	400,0	0,80	0,40	0,20	0,133	0,10	0,08	0,066	0,057	0,04
					3			7	1	
5,00	500,0	1,00	0,50	0,25	0,166	0,125	0,10	0,083	0,071	0,05
					7			3	4	
10,00	1000,0	2,00	1,00	0,50	0,333	0,250	0,20	0,166	0,142	0,10
					3			7	8	
