

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Efecto tóxico del lufenuron sobre seis organismos
bioindicadores de calidad ambiental”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Jefferson Iván Manrique Guillén

Asesor: Dr. José Iannacone Oliver

Director del proyecto de tesis

Lima, Perú,

Noviembre de 2016

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi mamá Ana, mi papá Percy, mis abuelos y a mi hermano Alan por su constante motivación y confianza depositada en mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. José Iannacone Oliver, por su asesoramiento en la realización de esta investigación. Al Lic. Alfonzo Alegre Navarro por su constante apoyo durante la realización de la tesis. Finalmente, agradecer a mi mamá Ana, mi papá Percy, mis abuelos y mi hermano Alan por su constante motivación y confianza depositada en mi carrera profesional.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Identificación y descripción del problema	11
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	15
3.1. MARCO TEÓRICO	15
3.1.1. TOXICOLOGÍA	15
3.1.2. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	15
3.1.3. ECOTOXICOLOGÍA AMBIENTAL	16
3.1.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD (BIOENSAYOS)	17
3.1.5. Índices de toxicidad	18
3.1.6. LUFENURON	19
3.1.7. ORGANISMOS BIOINDICADORES	20
3.1.8. CALIDAD AMBIENTAL	24
3.2. ANTECEDENTES	24
IV. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos específicos	31
V. HIPÓTESIS	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Lugar de Ejecución	33
6.2. Materiales	33
6.2.1. Reactivo	33
6.3. Métodos	33
6.3.1. Bioensayo de toxicidad en <i>C. vulgaris</i>	33
6.3.2. Bioensayo de toxicidad en <i>A. franciscana</i>	34
6.3.3. Bioensayo de toxicidad aguda en <i>D. magna</i>	34

6.3.4.	Bioensayo de toxicidad crónica en <i>D. magna</i>	35
6.3.5.	Bioensayo de toxicidad en <i>C. auratus</i>	35
6.3.6.	Bioensayo de toxicidad en Microorganismos de Suelo	36
6.3.7.	Bioensayo de toxicidad en <i>E. foetida</i>	37
6.3.8.	Consideraciones Éticas	37
6.3.9.	Operacionalización de variables	38
6.3.10.	Procesamiento y análisis de datos	39
VII.	RESULTADOS	40
7.1.	Determinación de la toxicidad del lufenuron en <i>Chlorella vulgaris</i>	40
7.2.	Determinación de la toxicidad del lufenuron en <i>Artemia franciscana</i>	41
7.3.	Determinación de la toxicidad aguda del lufenuron en <i>Daphnia magna</i>	42
7.4.	Determinación de la toxicidad crónica del lufenuron en <i>Daphnia magna</i>	43
7.5.	Determinación de la toxicidad crónica del lufenuron en <i>Carassius auratus</i>	46
7.6.	Toxicidad del lufenuron por formación de nitratos en los microorganismos del suelo	48
7.7.	Toxicidad del lufenuron sobre <i>E.foetida</i>	49
VIII.	DISCUSIÓN	51
IX.	CONCLUSIONES	56
X.	RECOMENDACIONES	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del lufenuron _____	19
Figura 2. Ritmo de mortalidad de <i>D. magna</i> durante los 21 días de exposición con las cinco concentraciones de lufenuron y el control. _____	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables en el efecto toxico del lufenuron sobre seis organismos bioindicadores de calidad ambiental _____	38
Tabla 2. Métodos estadísticos usados para los bioensayos realizados con los organismos bioindicadores de calidad ambiental. _____	39
Tabla 3. Efecto del lufenuron sobre la inhibición del crecimiento algal de <i>Chlorella vulgaris</i> a 24 h ,48 h, 72 h, 96 h de exposición. _____	40
Tabla 4. Efecto del lufenuron sobre la mortalidad de <i>A. franciscana</i> a 24h y 48h de exposición _____	42
Tabla 5. Efecto del lufenuron sobre la mortalidad de <i>D. magna</i> a 24 h y 48 h de exposición. _____	43
Tabla 6. Efecto del lufenuron en el número de crías vivas, en la mortalidad de los padres y en la longitud de las hembras de <i>Daphnia magna</i> a 21 días de exposición. _____	44
Tabla 7. Efecto del Lufenurón en la mortalidad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de <i>Carassius auratus</i> (Cyprinidae) "Goldfish" con comportamiento anormal a exposición. _____	47
Tabla 8. Efecto del lufenuron sobre la las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición. ____	48
Tabla 9. Efecto del Lufenuron sobre la mortandad de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> a 7 días y 14 días de exposición. _____	49
Tabla 10. Resumen de los parámetros ecotoxicologicos obtenidos en los bioensayos con lufenuron a los seis organismos bioindicadores de calidad ambiental. A= Acuatico, T= Terrestre, Ag= Ensayo agudo, Cro= Ensayo crónico. Las casillas marcadas con "X" indican que tipo de ensayo se realizó para cada modelo biológico _____	50

RESUMEN

El lufenuron un insecticida del grupo de los benzilureas, el cual interfiere con la síntesis de la quitina que causa una inhibición en la muda de los insectos. Se evaluó el efecto tóxico del lufenuron sobre seis organismos bioindicadores de calidad ambiental. Se desarrollaron los bioensayos con el lufenuron sobre seis organismos bioindicadores de calidad ambiental: *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890), *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), *Daphnia magna* (Straus, 1820), *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), Microorganismos de Suelo y *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). Se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) con prueba de Tukey y con el Probit se calcularon los parámetros ecotoxicológicos. Los resultados son los siguientes, *C. vulgaris* ($CI_{50} < 2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 96 h), *A. franciscana* ($CL_{50} = 11,41 \text{ }\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h), *D. magna* ($CL_{50} = 0,05 \text{ }\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48h), *D. magna* (NOEC= $0,00005 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ / LOEC= $0,0001 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ para el numero de crías vivas a 21 d), *C. auratus* (NOEC= $0,061 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ / LOEC= $0.122 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ para el porcentaje de mortalidad acumulada a 26 d), Microorganismos de Suelo (NOEC= $1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ / LOEC > $1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$) y *E. foetida* ($DL_{50} = 206,31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ a 14 d ; NOEC < $21,2 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ / LOEC= $21,2 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ a 14 d). Se observó la siguiente secuencia de ecotoxicidad decreciente mediado por los efectos letales y subletales producidos durante los bioensayos con los seis organismos: *D. magna* > *A. franciscana* > *C. vulgaris* > *C. auratus* > *E. foetida* > Microorganismos del suelo. *Daphnia magna* fue el organismo bioindicador más sensible al lufenuron y el más resistente fueron los microorganismos del suelo. El lufenuron presentó mayores porcentajes de mortalidad e inhibición en los organismos acuáticos que en los terrestres. Se concluyó que los seis organismos escogidos para evaluar los posibles daños ambientales del insecticida lufenuron, ayudaron a clarificar que este compuesto daña principalmente la cadena trófica acuática que la terrestre, siendo más sensibles los ecosistemas acuáticos que los terrestres que presentan riesgo bajo.

Palabras claves: lufenuron, calidad ambiental, bioensayos, bioindicadores

ABSTRACT

Lufenuron is an insecticide from the group of benzylureas, which interferes with the synthesis of chitin causing inhibition of insect moulting. The toxic effect of lufenuron on six environmental quality bioindicator organisms was evaluated. Bioassays with lufenuron were developed on six environmental quality bioindicators: *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890), *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), *Daphnia magna* (Straus, 1820), *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) and *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). The analysis of variance (ANDEVA) was used with Tukey's test and with the Probit we calculated the ecotoxicological parameters. The results are as follows: *C. vulgaris* ($IC_{50} < 2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ at 96 h), *A. franciscana* ($LC_{50} = 11,41 \text{ }\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ at 48 h), *D. magna* ($LC_{50} = 0,05 \text{ }\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ at 48 h), *D. magna* ($NOEC = 0,00005 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ / $LOEC = 0,0001 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ for the number of live offspring at 21 d), *C. auratus* ($NOEC = 0,061 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ / $LOEC = 0,122 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ for the percentage of accumulated Mortality at 26 d), Soil Microorganisms ($NOEC = 1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ / $LOEC > 1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$) and *E. foetida* ($LD_{50} = 206,31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{kg}^{-1}$ at 14 d; $NOEC < 21,2 \text{ mg i.a.}\cdot\text{kg}^{-1}$ / $LOEC = 21,2 \text{ mg i.a.}\cdot\text{kg}^{-1}$ at 14 d). The following sequence of decreasing ecotoxicity mediated by the lethal and sublethal effects produced during the bioassays with the six organisms was observed: *D. magna* > *A. franciscana* > *C. vulgaris* > *C. auratus* > *E. foetida* > *Soil microorganisms*. *Daphnia magna* was the most bioindicator organism of lufenuron, and the most resistant soil microorganisms. Lufenuron had higher rates of mortality and inhibition in aquatic organisms than in terrestrial organisms. It was concluded that the six organisms chosen to evaluate the possible environmental damages of the insecticide lufenuron, helped to clarify that this compound damages mainly the trophic chain aquatic that the terrestrial chain, being more sensitive aquatic ecosystems than the terrestrial ones.

Key words: lufenuron, environmental quality, bioassays, bioindicators

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se definen como sustancias químicas de origen natural o sintético, que se pueden utilizar solas o en combinación para el combate y protección de las distintas plagas que afectan los cultivos agrícolas. También son ampliamente utilizados en la salud pública para el control de las enfermedades transmitidas por vectores o huéspedes intermediarios.

Dentro la amplia gama de plaguicidas se encuentran los reguladores del crecimiento de insectos (IGR), los cuales son insecticidas de tercera generación menos tóxicos y compatibles con el manejo de plagas de insectos que se desarrollaron para reducir la contaminación de los alimentos y el medio ambiente. Estos compuestos tienen un modo de acción específico en los insectos y una menor toxicidad contra vertebrados que los insecticidas convencionales. IGR incluyen compuestos que afectan a la muda y la metamorfosis al imitar la hormona juvenil (JH agonistas) o antagonizar la actividad por lo general JH (agonistas ecdiesteroides) o al interferir con la formación de la cutícula (la síntesis de quitina).

Dentro de los IGR se encuentra el plaguicida lufenuron, el cual es un insecticida que inicialmente fue registrado para su uso en una amplia gama de cultivos para el control de las larvas de muchas plagas de insectos, ya que este inhibe la síntesis de la quitina, probablemente a través de la interferencia enzimática, y evita que las larvas realicen la muda. Sin embargo, hay muy poca información de estudios toxicológicos que hayan llevado a cabo la evaluación de los efectos de toxicidad aguda y crónica del lufenurón en organismos bioindicadores, siendo los de este estudio los siguientes, que son utilizados en ecotoxicología:

Chlorella vulgaris (Beijerinck, 1890) es una microalga que presenta una tasa de crecimiento rápido, la cual es ideal para la producción, ya que es muy resistente a las duras condiciones y a los invasores.

Artemia franciscana (Kellogg, 1906) es una especie de pequeño crustáceo, braquiópodo perteneciente al orden Anostraca que habita en aguas con altas concentraciones de sal.

Daphnia magna (Straus, 1820) es un crustáceo de agua dulce que mide 2 mm en el caso del macho y 6 mm la hembra. Tiene la particularidad de poder vivir solamente bajo unas condiciones ambientales muy determinadas (son animales estenoicos) es la que les hace útiles a las dafnias como indicadores de las condiciones en las que se encuentran los medios donde viven.

Carassius auratus (Linnaeus, 1758) es un ciprínido que raramente supera los 30 cm de longitud. Es un pez resistente que puede subsistir en condiciones muy desfavorables como contaminación de aguas, falta de oxígeno y temperaturas gélidas, que no pueden soportar otras especies.

Eisenia foetida (Savigny, 1826) son oligoquetos terrestres miden de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 mm de diámetro, y pesa hasta aproximadamente 1,4 g de color rojo oscuro, poseen respiración cutánea y no toleran la luz solar.

Microorganismos de suelo son las comunidades microscópicas descomponedoras de restos orgánicos transformándolos en compuestos inorgánicos, cerrando el ciclo de los elementos. Constituyen cerca del 85% de la fracción viva del suelo. Muchas de estas son nitrificadoras mediante la vía autótrofa o heterótrofa (Both *et al.* 1990; Norton, 2008).

Por esta razón, el objetivo principal de este estudio es el de evaluar el efecto tóxico del lufenuron sobre seis bioindicadores de calidad ambiental.

1.1. Identificación y descripción del problema

¿Cuáles son los efectos tóxicos que provoca la exposición del plaguicida lufenuron en los seis organismos bioindicadores de calidad ambiental en condiciones controladas de laboratorio?

El insecticida lufenuron es un inhibidor del desarrollo, el cual interfiere con la síntesis de la quitina que causa una inhibición en la muda de los insectos. Pertenece al grupo de las benzoilureas, y se utiliza ampliamente en la agricultura para el control de larvas de lepidópteros y coleópteros en algodón, maíz y hortalizas; la mosca blanca de los cítricos y ácaros del moho en las frutas cítricas, además de uso veterinario para el control de

pulgas en animales domésticos. Sin embargo, la posibilidad de entrar este plaguicida a través de la cadena alimentaria y producir efectos no deseados en organismos no objetivo, incluyendo los seres humanos, no se puede descartar (Pinakin *et al.* 2011). Por otra parte el destino final de los residuos de plaguicidas y su daño potencial para la salud humana sigue siendo generalmente no muy conocido. Los bioindicadores ambientales son organismos no destinatarios cuya presencia o fisiología permiten conocer algunas circunstancias del lugar, por ejemplo nos ayudan a conocer si hay alteraciones a nivel de las cadenas tróficas, permitiéndonos saber la calidad ambiental de una zona estudiada; además estos organismos son fáciles de coleccionar, criar, reproducir y cuantificar algún efecto que se quiera indicar. Por esta razón, se tiene la necesidad del estudio de la toxicidad del lufenuron, debido a que no hay mucha información publicada acerca de bioensayos con organismos no destinatarios “bioindicadores ambientales” para optar por mejores alternativas para combatir las plagas que afectan la agricultura como la sanidad de animales domésticos, además de los posibles riesgos de contaminación del agua y suelo que contribuirían a posibles daños a la salud humana y ambiental en el Perú.

II. JUSTIFICACIÓN

1. Socioeconómica

Se establecen límites permisibles para delimitar el uso de plaguicidas en los alimentos que son destinados para el consumo humano, debido a que estos productos son tóxicos, por lo que se podría optar por nuevas clases de plaguicidas que no dejen residuos en los alimentos ni en los campos de cultivo (Chung, 2008).

2. Salud pública

Muchos insecticidas sintéticos generan daños a la salud humana cuando hay un uso inadecuado y se generan intoxicaciones y enfermedades a largo plazo. Por lo que se debe evaluar el efecto crónico del lufenuron sobre los bioindicadores para establecer que tan dañino puede ser (Karam, 2015).

3. Salud ambiental

Los insecticidas son empleados en la agricultura como una solución al control de plagas de insectos, sin embargo su uso también puede afectar a otros organismos no diana o no destinatarios. Por otro lado su uso indiscriminado ha traído consecuencias negativas para el medio ambiente, como la contaminación del suelo y mantos freáticos y de causar toxicidad en animales y el hombre. Es por esto que se debe determinar la calidad ambiental (Devine *et al.* 2008).

4. Científico-tecnológica

Se deben seguir creando nuevos protocolos o bioensayos, debido a que estos tienen una vigencia expirable, lo cual nos ayuda a innovar en nuevas evaluaciones para evaluar la calidad ambiental (Jaksic & Ojeda, 1993).

5. Normativa

En el Perú, el manejo de los plaguicidas en materia legislativa está regulada por algunas disposiciones y la publicación del reglamento de la Ley de Sanidad Agraria (2008), que dispone que el uso de plaguicidas para su uso y comercialización en el agro sean registrados en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), además de su registro, autorizaciones sanitarias, de las emergencias fitosanitarias, derechos de tramitación, entre otros (Ley N°29157).

III. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1. MARCO TEÓRICO

3.1.1. TOXICOLOGÍA

La toxicología estudia los efectos nocivos de agentes físicos, químicos y biológicos, las alteraciones en la estructura y respuesta de los organismos vivos. Esta rama de la ciencia se centra en las sustancias que son tóxicas para el hombre.

En toxicología es fundamental conocer el potencial tóxico de la sustancia que está generando el efecto adverso para evaluar el peligro que representa. El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad, que se manifiesta por cambios biológicos.

Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico (Pulgarín & Martínez, 2012).

3.1.2. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

La toxicología ambiental estudia los efectos que causan los agentes tóxicos sobre organismos individuales al ser expuestos a una duración, intensidad y frecuencia determinadas para prevenir los riesgos que se puedan presentar en los ecosistemas intervenidos. Estos efectos dependen de si la toxicidad se presenta directamente sobre el organismo o en el ambiente en el que éste se desarrolla.

En el área de la toxicología ambiental, los componentes químicos se estudian más por el reflejo de la peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicándolos más bien a determinadas condiciones de exposición, puesto que, de lo contrario, no tendría significado (Escobar & Londoño, 2010).

3.1.3. ECOTOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Se puede decir que la ecotoxicología ambiental estudia los efectos nocivos de sustancias altamente tóxicas (químicas o físicas) presentes en el ambiente sobre organismos vivos, los cuales son parte esencial en los ecosistemas (vegetales, microorganismos, animales y el hombre). En la ecotoxicología interviene la toxicología y la ecología. Su finalidad es evaluar el riesgo ecológico que se puede presentar por la presencia de sustancias potencialmente tóxicas en un ambiente acuático, reuniendo así la suficiente información para la protección de los ecosistemas. Entre las características que se deben valorar están: la distribución en el ambiente, los patrones de descarga, los efectos en organismos vivos, la degradación, la actividad biológica, las formas de bioacumulación etcétera, así como las características y propiedades de los ecosistemas.

Con esta valoración se evalúa la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos que pueden surgir o están surgiendo en ecosistemas que se encuentran en exposición a sustancias de interés sanitario que producen estrés en los organismos, evaluación que está determinada en dos elementos:

- Exposición de organismos en estudio con agentes contaminantes: interacción entre frecuencia intensidad y respuesta de los organismos frente a sustancias que alteran su ecosistema.
- Características de los efectos producidos por sustancias tóxicas: relación dosis-respuesta entre la sustancia química contaminante y los efectos que produce en el organismo.

Las sustancias ecotóxicas son aquellas que, al ser liberadas en el ambiente, producen un impacto ambiental significativo, de naturaleza reversible o irreversible, debido a procesos conocidos de toxicidad como la bioacumulación, la persistencia y la residualidad. Por consiguiente, la ecotoxicología no se enfoca a que cierto agente haga desaparecer a la mitad de los individuos de una especie, sino a determinar el impacto ecológico que produce, ya que muchos contaminantes no tienen efectos sobre los organismos individualmente, pero aun así su consecuencia ecológica es digna de tenerse en cuenta (Martí, 2007).

3.1.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD (BIOENSAYOS)

Los ensayos de toxicidad están definidos con el objeto de evaluar y reconocer la reacción que puede producir sobre organismos vivos una sustancia altamente tóxica en un período determinado, permitiendo establecer la respuesta de un organismo (miembro de un ecosistema presente en cualquier recurso) a cambios específicos en su hábitat, hace de este método una opción para determinar los límites de tolerancia de diferentes sustancias de interés sanitario y evaluar los efectos potenciales e impactos en los cuerpos de agua, biota acuática y ecosistemas presentes (Pinto & Sánchez, 2012).

La finalidad primordial de las pruebas de toxicidad es establecer la concentración suficiente en la cual un contaminante dado produce efectos tóxicos en organismos vivos, que determinan la relación dosis – respuesta. Esta se puede manifestar con la muerte, inmovilización, pérdida del equilibrio, deterioro de la facultad de reproducción, de desarrollo o natatoria, cambios histológicos o bioquímicos, etc., dependiendo de las características del bioensayo y del ciclo de vida del organismos que se estén utilizando en él (Pulgarín & Martínez, 2012).

Existen ciertas características de los ensayos de toxicidad con organismos. Según la EPA (Environmental Protection Agency) (1999), son:

- Suministran información sobre los posibles efectos y probable deterioro de los ecosistemas acuáticos.
- Su predicción es alta cuando en el ambiente acuático existen descargas con altas magnitudes de toxicidad.
- Se han entregado concentraciones confiables para muchas sustancias altamente tóxicas que causan efectos de bioacumulación en ecosistemas acuáticos.
- Proveen resultados confiables por estar altamente estandarizados con alta calidad y específica, controles, réplicas y comparaciones con otros bioensayos.
- Proporcionan una anticipada señal de alerta para minimizar impactos negativos y tomar medidas sobre ella.

- Al ser interpretados en forma rápida y a corto plazo, permiten la acumulación de dosis – respuesta, caracterizando las aguas residuales o sistemas ambientales.

Al encontrar la relación dosis-respuesta, se puede establecer una curva de toxicidad que permita un análisis estadístico de los resultados para así obtener la concentración letal media (CL₅₀) de los organismos prueba, expresada en partes por millón (Cruz *et al.* 1996).

Cuando se implementan las pruebas de toxicidad, se debe realizar la estandarización de estas, en la cual establece la sensibilidad de las especies y su secuencia de efectos frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones del experimento. Con esto se certifica que la respuesta de la población en estudio se debe al efecto del tóxico de referencia y no a las variaciones de sensibilidad de los organismos o a fallas operacionales en la aplicación del método, lo que permite elaborar cartas de vigilancia, teniendo en cuenta la precisión y exactitud que se debe y puede obtenerse en los resultados generados por un determinado bioensayo.

Este tóxico de referencia debe cumplir con las siguientes características:

- Amplio espectro tóxico
- Facilidad de obtención en forma pura
- Alta solubilidad en agua
- Persistencia y estabilidad en solución
- Facilidad de acumulación

Determinando el rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados, así como el rango de sensibilidad frente al tiempo de exposición, tóxico de referencia y manifestación de organismos (Pinto & Sánchez, 2012).

3.1.5. Índices de toxicidad

CL₅₀: Concentración letal media (50) es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o

en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo de 48 o 96 h. El valor de la CL_{50} se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, $mg.L^{-1}$) (Pulgarín & Martínez, 2012).

DL_{50} : Dosis letal media (50) de una sustancia es la que provoca la muerte del 50% de la población animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal (Escobar & Londoño, 2010).

CE_{50} : La concentración efectiva media (50) es calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50 % de la población de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones dadas (Pica, 2004).

3.1.6. LUFENURON

Es un plaguicida del grupo de los benzilureas de nombre común según la IUPAC (RS) - 1- [2,5-dicloro-4 (1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi) fenil] -3- (2,6-difluorobenzoil) urea. Es un inhibidor del desarrollo de los insectos, el cual interfiere con la síntesis de la quitina que causa una inhibición en la muda de los insectos. Se utiliza ampliamente en la agricultura para el control de larvas de lepidópteros y coleópteros en algodón, maíz y hortalizas; la mosca blanca de los cítricos y ácaros del moho en las frutas cítricas, además de uso veterinario para el control de pulgas en animales domésticos (Vazquez *et al.* 2014).

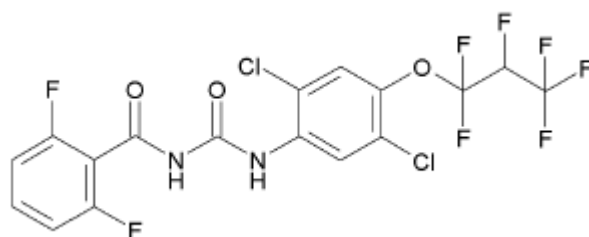


Figura 1. Estructura molecular del lufenuron

3.1.7. ORGANISMOS BIOINDICADORES

- *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890)

Chlorella vulgaris es un alga microscópica esférica con 2-10 micras de diámetro y tiene muchos elementos estructurales similares a las plantas.

Es una célula reproductiva no móvil (autoespora) que se reproduce asexualmente y rápidamente. Por lo tanto, dentro de 24 h, una célula de *C. vulgaris* cultivada en condiciones óptimas se multiplicará por autoesporación, que es la reproducción asexual más común en las algas.

De esta manera, se forman cuatro células hijas que tengan su propia pared celular dentro de la pared celular de la célula madre. Después de la maduración de estas células recién formadas, las rupturas de la pared celular madre, lo que permite la liberación de las células hijas y los escombros restante de la célula madre se consumen para alimentar a las células hijas recién formadas (Safi *et al.*,2014).

Esta microalga tiene una tasa de crecimiento rápido y responde a cada conjunto de condiciones de crecimiento mediante la modificación del rendimiento de un componente específico; *C. vulgaris* es ideal para la producción, ya que es muy resistente a las duras condiciones y los invasores.

- *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)

Es un ciprínido que raramente supera los 30 cm de longitud. La talla máxima conocida es 45 cm de longitud total y 2 kg de peso y la edad máxima de 30 años. El tamaño de la cabeza es relativamente grande comparado con el tamaño del cuerpo. La boca pequeña y terminal no tiene barbillas sensoriales. Su aleta dorsal es alargada y suavemente cóncava y tiene entre 25 y 35 escamas en la línea lateral. El color varía en las formas silvestres entre un tono castaño-verdoso y dorado, existiendo formas con colores y aspectos llamativos empleadas como ornamentales. Las características externas son muy similares a las de *Carassius carassius*, especie que no está presente en nuestras aguas y de la que se diferencia por el número de branquispinas: 39-50 en *C.auratus* y 22-33 en *C. carassius*. El número de cromosomas es $2n=100$ (Martínez, 2013).

Algunos autores consideran que las poblaciones de *C.auratus* de Europa y Siberia pertenecen a una especie diferente *Carassius gihhelio* (Bloch, 1782) fundamentándose más en la distribución que en características morfológicas propias. Se ha considerado *C. gihhelio* un sinónimo de *C. auratus* en espera de trabajos que aclaren su taxonomía. Prefiere aguas poco profundas de lagunas y ríos de corriente lenta, con abundante vegetación y fondos blandos, encontrándose generalmente en las orillas. Es un pez resistente que puede subsistir en condiciones muy desfavorables como contaminación de aguas, falta de oxígeno y fríos invernales, que no pueden soportar otras especies. Durante el invierno, al igual que las carpas, permanecen casi completamente enterrados en el barro, limitando mucho su actividad hasta que llega la primavera. Su alimentación es diversa, abarcando desde algas a invertebrados bentónicos. El desove se produce en aguas con densa vegetación sumergida en mayo-junio. Se conocen poblaciones que son todas hembras. En estas poblaciones la reproducción se realiza por gimnogenesis, los huevos necesitan para su desarrollo sólo el estímulo del esperma de un macho de otra especie. Los individuos que nacen son por tanto clones de sus madres (Martínez, 2013).

- *Daphnia magna* (Straus, 1820)

La pulga de agua *D. magna* es un crustáceo de agua dulce que mide 2 mm en el caso del macho y 6 mm la hembra, es la especie de dafnia más frecuente. Esta especie vive de forma salvaje en Europa, África, Asia y América del Norte, se dice que es una especie cosmopolita (Clare, 2002). Estos crustáceos tienen una vida corta, puesto que la longevidad de la pulga de agua es de apenas 1 semana de vida. Habitan en medios acuáticos desde charcos a ríos y se alimentan esencialmente de fitoplancton, pudiendo también ingerir varias clases de detritus orgánicos como protistas y bacterias, así como materia orgánica particulada o disuelta. La división del cuerpo en segmentos es casi invisible (Clare, 2002). La cabeza está fundida, y doblada generalmente hacia abajo, hacia el cuerpo, con una muesca visible que separa los dos. Poseen un único ojo compuesto y un par de antenas.

La pulga de agua es un alimento ideal para peces de agua dulce. De hecho, las pulgas de agua o dafnias constituyen la parte más importante del zooplancton de agua dulce, por lo que son la base de la cadena alimentaria de muchos peces de agua dulce. Por otro lado, las pulgas de agua dulce tienen un contenido en ácidos grasos Omega 3 nada despreciable. Los ácidos grasos Omega 3 son importantes para el desarrollo de los

peces, sobre todo del sistema nervioso, durante las fases de crecimiento. Otra utilidad de las dafnias, es la utilización de estos crustáceos por parte del ser humano como indicador natural de la contaminación del medio ambiente (bioindicador). La pulga de agua de la especie *D. magna* se utiliza en el desarrollo de tests para determinar la contaminación de las aguas (Clare, 2002). La particularidad de las pulgas de poder vivir solamente bajo unas condiciones ambientales muy determinadas (son animales estenoicos) es la que les hace útiles a las dafnias como indicadores de las condiciones en las que se encuentran los medios donde viven (Clare, 2002).

La *Daphnia* se reproduce de varias formas, de acuerdo con las estaciones y la densidad de población. Puede tener un tipo de reproducción partenogenética (asexual) donde no suelen aparecer machos. Esta es la reproducción más rápida porque no necesita de fecundación. En el plazo de pocos días se descargan en el agua jóvenes pulguitas (la *Daphnia* no presenta una fase de larva) y así sucesivamente. La reproducción por partenogénesis se lleva a cabo cuando las condiciones del medio son las más adecuadas para la vida de las pulgas de agua y es la responsable de la formación de grandes números de dafnias agrupados en enjambres. También se puede multiplicar de forma sexual (aquella en la que hay fecundación y la participación de ambos sexos) como sistema de defensa frente a las condiciones adversas del medio, por ejemplo cuando la cantidad de comida disminuye o cuando la charca donde viven está demasiado poblada, y como método para su dispersión hacia otros puntos de agua. En determinadas épocas, el observador atento puede descubrir en sus capturas otro tipo de huevo. Los llamados huevos latentes o permanentes, que no se desarrollan tan rápidamente como el anterior. Estos huevos pueden aguantar mucho tiempo sin agua y son capaces de resistir el ataque de los jugos gástricos de los animales gracias a que las dafnias desarrollan a partir de la cámara incubadora el efipio, una estructura que sirve para proteger a los huevos. El efipio de las pulgas de agua permite además que los huevos queden adheridos a las plumas de las aves que van a beber en la charca donde viven estos animales. En este tipo de reproducción aparece un mayor porcentaje de machos (Clare, 2002).

- *Eisenia foetida* (Savigny, 1826)

Estos oligoquetos terrestres miden de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 mm de diámetro, y pesa hasta aproximadamente 1,4 g. Color rojo oscuro, poseen respiración cutánea y no toleran la luz solar. Viven aproximadamente unos 4,5 años, y puede llegar a producir,

bajo ciertas condiciones, hasta 1300 lombrices al año. Otra característica de la lombriz californiana es que cuando avanza excavando en el terreno, a medida que come, va depositando sus deyecciones y convirtiendo ese terreno en uno mucho más fértil que el que pueda lograrse con los mejores fertilizantes artificiales.

- *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906)

Es una especie de pequeño crustáceo, branquiopodo perteneciente al orden Anostraca. Es conocida vulgarmente como “artemia”. Habitan en aguas con altas concentraciones de sal como las salinas (Sarabia Alvarez, 2002).

Artemia franciscana se caracteriza por tener una tasa de crecimiento superior a otras especies de *Artemia*, por esta razón es muy usada en la acuicultura a nivel mundial. *Artemia* es un crustáceo filtrador o fagotrofo obligado. Mediante la actividad filtradora de sus toracópodos captura bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritus del medio. Las partículas son arrastradas en dirección al atrio bucal e ingresan en el esófago y, de ahí, a un par de ventrículos globulares, asimilables a un estómago, donde se cree que pueden sufrir la acción digestiva. Posteriormente, el alimento ingresa en el tubo intestinal, formado por una capa sencilla de células epiteliales y una membrana peritrófica. Finalmente, los restos son eliminados por el ano en forma de cordones de heces de distinta coloración y consistencia, en función del alimento ingerido (Sarabia Alvarez, 2002).

El éxito en la inoculación de *Artemia* en diferentes zonas de todo el mundo y su amplia distribución natural en diferentes ambientes continentales y litorales permite atribuirle una gran capacidad de adaptación y tolerancia a muy diversas situaciones y a un amplio rango de características medioambientales. Uno de los rasgos más notables de *Artemia* es su capacidad para habitar aguas de salinidades extremas, tanto aguas dulces como salinas saturadas de cloruro sódico (desde 10-20 g·L⁻¹ a más de 300 g·L⁻¹), lo cual implica unas peculiaridades fisiológicas muy interesantes en lo que respecta al control de la concentración osmótica. Otra de las peculiaridades de *Artemia* es la capacidad de producir huevos císticos, de duración o de resistencia, también llamados quistes. Dichos quistes se forman a partir de una secreción de las glándulas de la cáscara, relacionada con la hematina, que cubre al huevo y forma una corteza de protección, lo que permite mantener al embrión durante largo tiempo en criptobiosis. En ocasiones, la actividad de

las glándulas de la cáscara es menor, produciendo una secreción menos copiosa, dando como resultado quistes (subitáneos) de los que se originan nauplios después de cortos periodos de tiempo, tras la emisión. No se sabe con certeza cuáles son los factores que inducen la formación de quistes, aunque parece ser que la causa más probable es la existencia de condiciones extremas del medio (bajo nivel de oxígeno, falta de alimento, alta salinidad, etc.). Los quistes, una vez desecados y mantenidos en condiciones adecuadas, pueden mantenerse viables durante largos periodos de tiempo (Sarabia Alvarez, 2002).

3.1.8. CALIDAD AMBIENTAL

Se puede basar el concepto “calidad ambiental” como el conjunto de características del ambiente, en función a la disponibilidad y facilidad de acceso a los recursos naturales y a la ausencia o presencia de agentes nocivos. Todo esto necesario para el incremento de la calidad de vida de los seres humanos. Asociados a este concepto, se encuentran los términos “estándar de calidad ambiental” y “límite máximo permisible”, instrumentos de gestión ambiental que buscan regular y proteger la salud pública y la calidad ambiental, permitiéndole a la autoridad ambiental desarrollar acciones de control, seguimiento y fiscalización de los efectos causados por las actividades humanas (Luengo, 1998).

3.2. ANTECEDENTES

Viñuela *et al.* (1991) recopilan que los insecticidas que son inhibidores de la síntesis de quitina actúan específicamente sobre la cutícula de los insectos, evitando la incorporación de las unidades de N-acetilglucosamina, en el polímero de la quitina, y tienen una acción citostática sobre las células epidérmicas que producen quitina. Se mencionaron los siguientes insecticidas inhibidores de síntesis de quitina más usados: Clorfluazurón, Diflubenzurón, Teflubenzurón y Triflumurón.

Rodríguez *et al.* (2001) Indican que el incremento en la producción y uso de compuestos químicos en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas

terrestre y acuático. Debido a sus características químicas, los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada.

Evangelista *et al.* (2002) investigaron la susceptibilidad del depredador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) al lufenurón utilizando diferentes concentraciones del insecticida y métodos de exposición (tópica e ingestión). Sus resultados muestran la importancia de utilizar lufenurón a la dosis más baja recomendada ($10 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), como una estrategia de conservación para *P. nigrispinus*.

Iannacone & Lamas (2003) evaluaron la rotenona y la azadiractina, productos de origen botánico y el plaguicida carbámico cartap de origen animal sobre adultos y formas inmaduras de tres microavispa en bioensayos toxicológicos bajo condiciones de laboratorio. La rotenona, azadiractina y cartap a las máximas dosis empleadas para el control de plagas causaron efectos estadísticamente significativos en el porcentaje de mortalidad de adultos de *Trichogramma pintoi* (Voegelé, 1982), *Copidosoma koehleri* (Blanchard, 1940) y *Dolichogenidia gelechiidivoris* (Marsh, 1979).

Braga da Silva *et al.* (2003) evaluaron el control de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) con diferentes productos reguladores del crecimiento y concluyeron que todos (Diflubenzuron, Lufenuron, Metoxifenocida y Teflubenzuron) fueron eficientes en el control y no permitieron que la plaga alcanzara el nivel de daño económico; las parcelas tratadas con Metoxifenocida fueron las que presentaron menor defoliación y mayor productividad. Esto es debido a la rápida acción, sobre las larvas, que poseen los productos a base de este principio activo.

Iannacone & Alvarino (2005) evaluaron la ecotoxicidad del cartap (Bala® 50 PS) sobre ocho organismos animales no destinatarios y evaluar la selectividad de *este* insecticida. Los parámetros de toxicidad aguda evaluados fueron la concentración letal media (CL_{50}) (mg o $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), la dosis letal media (DL_{50}) (mg o $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) y el tiempo letal medio (TL_{50}) (h). El cartap mostró selectividad sobre siete de las ocho especies analizadas, lo cual podría contribuir a tomar las medidas más apropiadas para su adecuado empleo en el manejo integrado de plagas (MIP).

Pérez-moreno *et al.* (2006) utilizaron a la polilla *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermuller, 1775) frente al lufenuron, donde observaron que los adultos que se les

administro $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de lufenuron reduciendo su fecundidad y fertilidad, pero no afectó la longevidad de adultos. Además de una elevada actividad ovicida con mayor efecto sobre los huevos de 1 día de edad que en los otros grupos de edad y en los huevos tratados por contacto directo en lugar de los previstos en una superficie previamente tratada. Por último presento actividad larvicida con valores similares de CL_{50} para diferentes estadios.

Das *et al.* (2008) investigaron la degradación del insecticida novalurón (benzoilurea regulador del crecimiento de insectos) en condiciones controladas de laboratorio. Las vidas medias de novalurón en suelos no esterilizados oscilaron entre 17,0-17,8 días (suelo aluvial) y 11,4-12,7 días (suelos salinos costeros), mientras que los valores en el caso de los suelos esterilizados fueron 53,7-59,0 días (suelo aluvial) y 28,9-29,8 días (suelo salino costera), respectivamente. Se encontró que los patrones de degradación del novalurón son altamente influenciados por los tipos de suelo, las tasas de aplicación y factores abióticos bióticos.

Pino & Jorge (2010) señalan que el uso combinado de ensayos biológicos como el de *Artemia* con las tecnologías de separación y elucidación estructural actuales guiará a los químicos de productos naturales en el descubrimiento de compuestos altamente promisorios para su desarrollo como plaguicidas de origen natural. Su aplicación en nuestro país, proporcionará un valioso instrumento que contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas en la agricultura, centrando las investigaciones y los recursos disponibles en los candidatos más prometedores.

Matsumura, F. (2010) realizó una revisión sobre el mecanismo de acción de diflubenzurón (DFB), el prototipo de los insecticidas químicos de tipo benzoilurea. Recientemente ha habido un gran avance en este campo, cuando se identificó el receptor de sulfonilurea (SUR) en *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830). Esta información fue crucial, ya que probablemente es el sitio de destino del DFB para causar la inhibición de la síntesis de quitina.

Iannacone *et al.* (2011a) evaluaron el efecto ecotoxicológico del Furadán 4F® (ingrediente activo (i.a.) carbofurano) y Monofos® (i.a. metamidofos) en mezclas heterotóxicas y equitóxicas sobre los alevinos de la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), y a partir de estos resultados evaluar el riesgo ambiental acuático de

estos dos insecticidas. Sus resultados indican que el Furadán 4F® y el Monofos® exhiben una toxicidad sinérgica o aditiva parcial cuando se presentan en concentraciones equitópicas.

Pinakin *et al.* (2011) estudiaron el efecto del lufenurón en la embriogénesis de los vertebrados utilizando como modelo *Gallus domesticus* (Linnaeus, 1758). Llegaron a la conclusión de que el regulador del crecimiento de insectos, lufenurón a una dosis muy baja (100 µl de 54ppm) fue embriotóxico y teratogénico a un organismo no diana, el pollo, lo que reveló que la exposición a lufenurón en la cadena alimentaria puede llevar a consecuencias indeseables en los vertebrados. Por ello se recomienda que lufenurón debe utilizarse con precaución, ya que puede ser peligroso para los animales domésticos y los seres humanos.

Sánchez-Bayo (2012) menciona que incluso si los ecosistemas naturales son resistentes y poblaciones de organismos pueden recuperarse relativamente rápido, el uso constante de insecticidas en las tierras agrícolas y bosques, año tras año hay una creciente reducción de los suministros de alimentos para muchas especies de vertebrados, es decir, las aves y, posiblemente, ranas, lagartos y pequeños mamíferos insectívoros.

Wang *et al.* (2012) revisaron que el plaguicida lufenurón y un organofosforado, acefato, eran relativamente no tóxicos (es decir, todos los valores de $LC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) contra el *E.foetida*. El orden de toxicidad para *E. foetida* basado en valores de LC_{50} fue el siguiente: clotianidina > piridafentión y carbaril > malatión > acefato, buprofezin, flonicamid, fufenozide, y lufenurón.

Badawy *et al.* (2013) realizaron con el fin de investigar la toxicidad de los tres reguladores de crecimiento de insectos (IGR) buprofezin, lufenurón, y triflumurón, en diferentes proporciones de aplicación y tiempos de exposición en lombrices maduras de la especie *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826). Se evaluaron los efectos de estos pesticidas sobre la tasa de crecimiento en relación con las actividades de la acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión S-transferasa (GST) como indicadores bioquímicos para dilucidar los mecanismos de acción. Los estudios de toxicidad indicaron que lufenurón fue el plaguicida más dañino para madurar las lombrices de tierra, seguido en orden decreciente por buprofezina y triflumurón.

Mayer *et al.* (2013) describe la efectividad del lufenurón para tratar peces de un estanque infestados con el ectoparásito *Argulus* sp. Acotan que se debe tener precaución con respecto a la contaminación ambiental del agua con lufenuron, ya que podría causar efectos perjudiciales en las aguas residuales de crustáceos salvajes que viven en el medio ambiente circundante.

Iannacone *et al.* (2014) evaluaron el riesgo ecotoxicológico (REA) del bioplaguicida *Hura crepitans* L. “catahua”. En un procedimiento para la determinación del REA, se tomaron los valores de CL₅₀ a 48 h de la larva de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), plaga en los cultivos de maíz y caña de azúcar, y se contrastó con los niveles de toxicidad para las especies acuáticas y terrestres no destinatarias, observándose riesgo sobre cuatro especies acuáticas (50%), y sobre cinco especies terrestres (27,77%). Las saponinas y los flavonoides son los posibles grupos funcionales de importancia relacionados con la toxicidad de la catahua.

Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón (2015) concluyeron que malation y metamidofos, compuestos organofosforados, alteran la morfología externa provocando una baja significativa en el peso corporal y expresando contracción muscular en forma de cola enrollada en *Eisenia foetida*.

Rubio Bellido (2015) muestra que en los estudios de mineralización en su primera fase, en primer lugar, la completa mineralización del herbicida a las concentraciones más bajas utilizadas (10 mg·L⁻¹), tanto para el ensayo en solución, como para el ensayo en solución con suelos. En segundo lugar, los resultados obtenidos para los estudios con diurón a 100 mg·L⁻¹, marcan el límite entre la toxicidad del herbicida y la efectividad de las bacterias degradadoras específicas para mineralizar elevadas concentraciones, puesto que se han conseguido tasas cercanas al 50% tras reinocular.

Ruiz-Suarez (2015) utilizó pruebas de toxicidad aguda empleando *Daphnia pulex* (Linnaeus, 1758) como bioindicador, con las cuales se logró determinar la concentración letal media (CL_{50-48h}) en un tiempo de 48 h en las ocho estaciones de la cuenca alta del río Bogotá, siendo de un valor de 36,54%, lo cual interpretan que posiblemente influyo las altas concentraciones de fungicidas que presentan en la zona, por los cultivos de duraznos y pastos.

Sabra & Mehana (2015) señalaron que los peces son particularmente sensibles a la contaminación del medio ambiente de agua. Por lo tanto, estos contaminantes tales como insecticidas pueden dañar significativamente cierta fisiología y procesos bioquímicos que diferentes tipos de insecticidas pueden provocar un deterioro grave del estado fisiológico y la salud de los peces.

Sun *et al.* (2015) indican que las benzoilfenilureas son inhibidores de la síntesis de quitina que poseen la valiosa propiedad de tener un modo de acción no neurotóxico en un sitio diana que está ausente en los vertebrados, lo que significa a su vez que son generalmente seguros para los mamíferos. La disponibilidad de un sitio diana que es distinta de los insecticidas neurotóxicos empleados más comúnmente también permite que estas moléculas puedan ser utilizadas como herramientas importantes en los programas de gestión de resistencia a los insecticidas (IRM).

Valderrama *et al.* (2015) hallaron la degradación hidrolítica del clorpirifos (CPF) y la toxicidad de una muestra única sobre *D. pulex* luego de un proceso de 24 h de degradación. Los ensayos de toxicidad, mostraron la inmovilidad de la totalidad de los neonatos de *D. pulex* expuestos a la muestra degradada. Estos resultados indican que bajo pH similares a los evaluados, el CPF es transformado a 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP) y que los productos de degradación pueden incrementar los efectos tóxicos del CPF en el ambiente.

Iannacone *et al.* (2016) evaluaron la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana* para establecer la concentración prevista que no causa efectos (PNEC) sobre los organismos marinos y obtener los niveles guía para la protección de la vida acuática. Tres sustancias químicas calificadas como muy tóxicas y que presentaron los niveles guía más bajos para la protección de la vida acuática fueron Triclosan ($0,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Cipermetrina ($0,84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y Clotrimazol ($0,97 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se observó que diez (71,42%) de las sustancias químicas mostraron fuerte actividad citotóxica.

Soares *et al.* (2016) midieron los efectos tóxicos agudos y crónicos con el plaguicida lufenuron sobre los parámetros biológicos de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) “Tambaqui”. En el ensayo de toxicidad aguda, los juveniles de Tambaqui se dividieron en grupo control y cinco grupos experimentales con la exposición de 0,1 a $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de

lufenurón para 96 h. La presencia de hemorragias se observó en los ojos, las aletas y el opérculo de peces expuestos a 0,7 y 0,9 mg·L⁻¹ de lufenurón.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto tóxico del lufenuron sobre seis organismos bioindicadores de calidad ambiental.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto tóxico del lufenuron a 96 h de exposición en la microalga *C.vulgaris*.
- Encontrar el efecto tóxico del lufenuron a 48 h de exposición en el camarón salino *A.franciscana*.
- Precisar el efecto tóxico del lufenuron a 48 h de exposición empleando un ensayo de toxicidad aguda con la pulga del agua *D.magna*.
- Hallar el efecto tóxico del lufenuron a 21 días de exposición utilizando un ensayo de toxicidad crónica con *D.magna*.
- Calcular el efecto tóxico del lufenuron a 26 días de exposición sobre la reproducción y tasa crecimiento en peces, en especial en los estadios tempranos de *C.auratus*.
- Establecer el efecto tóxico del lufenuron en la nitrificación a cinco días (120 h) en las comunidades microbianas del suelo.
- Delimitar el efecto tóxico del lufenuron a 14 días de exposición en la lombriz de tierra *E.foetida*.

V. HIPÓTESIS

Hipótesis Principal:

H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos sobre todos los bioindicadores de calidad ambiental.

Hipótesis secundarias:

- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos durante las 96 h de exposición en la microalga *C.vulgaris*.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos durante las 48 h de exposición en el camarón salino *A.franciscana*.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos a 48 h de exposición empleando un ensayo de toxicidad aguda con la pulga del agua *D.magna*.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos durante los 21 días de exposición utilizando un ensayo de toxicidad crónica con *D.magna*.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos durante los 26 días de exposición sobre *C.auratus*.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos a cinco días (120 h) generando nitrificación en las comunidades microbianas del suelo.
- H₀: El insecticida lufenuron ocasiona efectos tóxicos durante los 14 días de exposición en la lombriz de tierra *E.foetida*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Lugar de Ejecución

Se desarrolló en el Laboratorio de Invertebrados (201) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

6.2. Materiales

6.2.1. Reactivo

Lufenuron (RS) -1- [2,5-dicloro-4 (1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi) fenil] -3- (2,6-difluorobenzoil), PM= 511.1502. Se utilizó la formulación concentrada-emulsionable (MAGISTRAL®50 EC, RED SUN CORPORATION, China). Se realizaron diluciones con agua embotellada y declorinada (Iannacone *et al.* 2011b).

6.3. Métodos

6.3.1. Bioensayo de toxicidad en *C. vulgaris*

La muestra concentrada inicial se obtuvo del laboratorio de Biología Marina y Acuicultura de la Universidad Ricardo Palma. Se empleó *C.vulgaris* a una concentración inicial de 40000 células.mL⁻¹ al inicio del bioensayo. Se utilizaron cinco concentraciones (2.46; 4.92; 9.84; 19.68 y 39.37 mg de i.a.·L⁻¹). Se realizó el aislamiento, cultivo y caracterización de esta especie de microalgas. Se emplearon tubos de ensayo de 12mL a los que se agregó 10mL de volumen de prueba de cada concentración. Las lecturas fueron a las 96 h de exposición en cel.mL⁻¹, obteniéndose la concentración de inhibición media (CI₅₀) a 96h en base a conteos de densidad con microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer (Iannacone *et al.* 2014).

6.3.2. Bioensayo de toxicidad en *A. franciscana*

Los huevos enquistados para eclosionar en condiciones de laboratorio se obtuvieron de un acuario procedente de Lima, Perú. Una vez obtenidos los nauplios II de *A. franciscana* se procedió a realizar los bioensayos preliminares de toxicidad aguda por 8 h de exposición para determinar las concentraciones de los ensayos definitivos (USEPA 2002). Para los ensayos definitivos se siguieron las recomendaciones de la USEPA (2002) para las pruebas de toxicidad aguda con *A. franciscana*. Sin embargo, se realizaron algunos ajustes según el procedimiento estandarizado en nuestro Laboratorio para una adecuada obtención de la Concentración Letal media (CL₅₀). Para la prueba de toxicidad aguda se utilizó 8 concentraciones. Se utilizó mayormente un total de 240 individuos de *A. franciscana* para el plaguicida lufenuron; que se distribuyeron al azar diez nauplios de II estadio en cada envase de 30mL de capacidad con 20mL de solución y en cada una de las cuatro replicas por cada dilución. Los nauplios II no fueron alimentados durante el bioensayo. Se contaron el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 h y 48 h de exposición (Iannacone *et al.* 2016).

6.3.3. Bioensayo de toxicidad aguda en *D. magna*

Las hembras maduras y oviplenas se obtuvieron de un acuario procedente de Lima, Perú. Los cultivos parciales con las hembras partenogenéticas se mantuvieron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un fotoperiodo de 12:12 con luz blanca fluorescente 18W 3500k. El oxígeno disuelto se mantuvo sobre $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para la prueba de toxicidad aguda se empleó cinco concentraciones (9,26; 4,63; 2,31; 1,15 y $0,57\ \mu\text{g de i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$) cohortes de neonatos (<24 h de nacidos). La duración de la prueba fue de 48 h de exposición. A cada envase circular de 30mL se agregó 20mL de cada una de las concentraciones, a los cuales se transfirió diez neonatos. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 15 seg de observación al microscopio estereoscópico (Iannacone *et al.* 2014).

6.3.4. Bioensayo de toxicidad crónica en *D. magna*

Las hembras maduras y ovíparas se obtuvieron de un acuario procedente de Lima, Perú. Para el ensayo de toxicidad crónica se utilizaron las siguientes cinco concentraciones decrecientes del lufenuron en agua embotellada: 0,122; 0,061; 0,031; 0,0001 y 0,00005 $\mu\text{g de i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$. La alimentación de las hembras-neonatas fue a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario. La frecuencia de recambio del medio fue tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron 5 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 300mL, con 200mL de medio de cultivo. Los bioensayos se iniciaron con un neonato de menos de 24 h, sin aireación. Se emplearon como medio de ensayo agua embotellada y declorinada con dos gotas de alimento. Se emplearon cinco concentraciones y un total de 10 neonatos por concentración. Los neonatos fueron colocados individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad crónica fue de 21 días. Al final del ensayo, el número de crías vivas producidas por hembra viva (“animal padre”) fue evaluada. Los juveniles producidos por los adultos hembras que murieron durante el ensayo fueron excluidos del análisis. En adición, se determinó el número y la mortalidad de los padres al momento de producción de la primera camada y la longitud de las hembras a los 21 días de exposición. Para la validez del ensayo, la mortalidad en el control no fue mayor al 20 % y produjo más de 60 crías vivas al final del bioensayo.

6.3.5. Bioensayo de toxicidad en *C. auratus*

Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 210 OECD (1992). Se empleó individuos provenientes de un acuario de Lima, Perú que tiene un cultivo estable y saludable por más de dos años. Se cultivaron en el Laboratorio en un medio denominado ADAM y se aclimataron en el Laboratorio por dos semanas previas al bioensayo. La alimentación de las larvas fue a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario y de *A.franciscana*. La frecuencia de recambio fue tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron de 20 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 1000 mL, con 800 mL de medio de cultivo. Los bioensayos iniciaron con huevos de estado

embrionario-temprano de desarrollo. La eclosión de los huevos y la supervivencia fue evaluada diariamente. Los embriones, las larvas y los juveniles muertos se retiraron de los envases para evitar que su descomposición pueda afectar a los supervivientes. Se empleó como medio de ensayo agua embotellada y declorinada. Se aplicaron sobre los huevos, las siguientes cinco concentraciones decrecientes del lufenurón en agua embotellada: 0,122; 0,061; 0,031; 0,0001 y 0,00005 mg de i.a. \cdot L⁻¹ con cuatro réplicas por concentración y un total de 40 huevos por concentración. Los bioensayos se iniciaron colocando huevos individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad fue de 26 días. Al final del ensayo, en *C. auratus* se evaluó: 1) la mortalidad acumulada (embriones, larvas y juveniles), 2) N° días que inicia la eclosión de los huevos, 3) la longitud y el peso de los sobrevivientes (juveniles), 4) número de larvas deformadas y 5) comportamiento anormal (nado anormal e hiperventilación). Para la validez del ensayo, el éxito en la eclosión tuvo que ser sobre 80% y el éxito en la post-eclosión de 70% en el bioensayo (Iannacone *et al.* 2014).

6.3.6. Bioensayo de toxicidad en Microorganismos de Suelo

Este bioensayo tuvo como condiciones ambientales una temperatura: 22±1°C y humedad relativa del 70%. Se usaron cinco concentraciones de lufenurón (110; 220; 450; 910 y 1820 mg de i.a. \cdot g⁻¹ de suelo artificial) y un control, con cinco réplicas por concentración a 120 h de exposición. Se realizó la cobertura con parafilm a las unidades del ensayo bajo oscuridad total. El pH se mantuvo a 6±2. El suelo artificial siguió lo señalado según el protocolo de la EPA. El suelo artificial tuvo la siguiente caracterización: pH=7,16; C.E=1,56 dS \cdot cm⁻¹; CaCO₃= 4,1%; Materia orgánica= 9,1; P=13,7 ppm; K=372 ppm; Clase Textural: Arenoso (92%); Limo (4%); Arcilla (4%) y CIC=4,16. Para evaluar la nitrificación en las comunidades microbianas del suelo, se agregó 80mL de KCl a 1N a cada unidad de muestra y por un lapso de una hora en movimiento frecuente. Seguidamente se filtró y se añadió un sachet de kit Hanna de medición de nitratos por el método colorimétrico, en unidades de mg.L⁻¹, y posterior transformación a ug.g⁻¹ de suelo. Se realizaron cinco replicas por concentración (Iannacone *et al.* 2014).

6.3.7. Bioensayo de toxicidad en *E. foetida*

Los oligoquetos para nuestro ensayo se obtuvieron de la Universidad Agraria La Molina. La colecta, aclimatación y cría del oligoqueto *E.foetida* siguió lo descrito por (Iannacone & Alvarino, 2005). Las pruebas ecotoxicológicas con los oligoquetos se realizaron con cohortes de especímenes de *E.foetida* que se obtuvieron del envase de cultivo masivo. Se utilizaron en los ensayos lombrices de longitud total entre 9 a 11cm con clitelo. Los bioensayos de toxicidad se realizaron en envases cilíndricos de plástico de 12cm de altura y 10 cm de diámetro y con un área superficial de 79,53cm², empleando aproximadamente 140 g de suelo más 70 g de humus de lombriz como sustrato en donde se incorporó el lufenuron en ensayos estáticos de 7 días de exposición. Las lombrices fueron colocadas en estos envases bajo condiciones de oscuridad para evitar el efecto de fotolisis del producto químico. Las lombrices fueron lavadas en agua destilada y luego secadas en papel absorbente para eliminar el exceso de agua durante las lecturas. Los ensayos agudos fueron considerados validos cuando la mortalidad no sobrepasó el 10% y un incremento de peso mayor de 20% en el grupo control. En los ensayos agudos fueron considerados muertos los organismos que al ser pinchados con un alfiler entomológico, durante 10 segundos de observación no realizaron ningún movimiento coordinado. Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de temperatura de 22°C±2°C y las concentraciones fueron cinco (402; 201; 100,5; 50,3 y 21,2 mg·kg⁻¹) con tres réplicas por concentración. El fotoperiodo empleado fue de oscuridad total y la humedad relativa fluctuó entre 75% y 80%. (Iannacone et al. 2014).

6.3.8. Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos en animales siguieron los protocolos estándares de las 3Rs (reemplazar, reducir y refinar) aprobados para la experimentación animal, minimizando la angustia durante la experimentación, principalmente en los peces (Pardo, 2005).

6.3.9. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de las variables en el efecto toxico del lufenuron sobre seis organismos bioindicadores de calidad ambiental

Tipo de variable	Variable	Dimensión	Indicador
V. dependiente	Microalgas <i>C.vulgaris</i>	Inhibición de crecimiento de <i>C.vulgaris</i>	% de inhibición del crecimiento en <i>C.vulgaris</i>
V. dependiente	Nauplios II de <i>A.franciscana</i>	Mortalidad	% de Mortalidad
V. dependiente	Neonatos de menos de 24h de <i>D.magna</i>	Mortalidad	% de Mortalidad
V. dependiente	Huevos de estado embrionario-temprano de <i>C.auratus</i>	Respuestas de Mortalidad y subletalidad	-Mortalidad acumulada -N° de días de eclosionados los huevos. -Peso y longitud de juveniles sobrevivientes. -N° de larvas deformadas. -Comportamiento anormal (nado anormal e hiperventilación).
V. dependiente	Comunidades microbianas del suelo	Nitrificación microbiana	Nitrificación en las comunidades microbianas en base al NOEC y LOEC.
V. dependiente	<i>E.foetida</i> sexualmente maduros con clitelo de 9 a 11cm	Mortalidad	% de Mortalidad
V. independiente	Plaguicida lufenuron	Concentraciones	Efectos tóxicos comparado con los controles

6.3.10. Procesamiento y análisis de datos

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evalúa a través de un análisis de Varianza (ANDEVA) de dos vías con prueba a posteriori de Tukey. Los datos fueron previamente normalizados (transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno). Las Concentraciones Letales (efectiva) (inhibición) media [CL(E)(I)_{S50}] fueron determinados empleando el programa Probit versión 1,5.

Se usó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.0 versión 20 para Windows XP para calcular los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 2. Métodos estadísticos usados para los bioensayos realizados con los organismos bioindicadores de calidad ambiental.

ORGANISMOS BIOINDICADORES de CALIDAD AMBIENTAL	MÉTODOS ESTADÍSTICOS
<i>Chlorella vulgaris</i>	ANDEVA (Análisis de varianza) y prueba de Tukey+Probit Versión 1,5
<i>Artermia franciscana</i>	ANDEVA y prueba de Tukey+ Probit
<i>Carassius auratus</i>	ANDEVA y prueba de Tukey
<i>Daphnia magna</i> agudo	ANDEVA y prueba de Tukey+ Probit Versión 1,5.
<i>Daphnia magna</i> crónico	Análisis de varianza (ANDEVA)
Microorganismos de suelo	ANDEVA y prueba de Tukey+ Probit
<i>Eisenia foetida</i>	ANDEVA y prueba de Tukey+Probit

VII. RESULTADOS

7.1. Determinación de la toxicidad del lufenuron en *Chlorella vulgaris*

Las cinco concentraciones de lufenuron evaluadas en los bioensayos con *C. vulgaris*, mostraron que hay efecto inhibitorio en el crecimiento de la microalga entre las 24h y 96h de exposición.

La Tabla 3 nos indica los porcentajes de inhibición del crecimiento algal de *C. vulgaris* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenuron empleadas a 24 h y 96 h de exposición. La prueba de Tukey nos indicó que existe diferencia estadística entre el porcentaje de inhibición del control con las concentraciones evaluadas (Tabla 3). Fue determinada la concentración de inhibición media del lufenuron a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h ($CI_{50} = 17,15 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$; $15,45 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$; $<2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$; $<2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente) (Tabla 3). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC de las concentraciones a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición.

Tabla 3. Efecto del lufenuron sobre la inhibición del crecimiento algal de *Chlorella vulgaris* a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h de exposición.

Concentración mg i.a. \cdot L ⁻¹	% Inhibición			
	24h	48h	72h	96h
0	0 a	0 a	0 a	0 a
2,46	20 a	37,66 ab	54,96 ab	56,38 b
4,92	32,77 ab	40,99 ab	65,06 b	68,74 bc
9,84	53,90 bc	45,71 ab	77,26 b	75,11 bc
19,68	65,39 c	66,42 ab	81,77 b	79,89 c
39,37	77,87 c	78,96 b	87,13 b	81,84 c
NOEC	4,92	19,68	2,46	<2,46
LOEC	9,84	39,37	4,92	2,46
CI ₅₀	17,15	15,45	<2,46	<2,46
F	19,35	3,93	7,20	42,38
Sig	0,00	0,024	0,002	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de inhibición del crecimiento algal son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). CI_{50} = Concentración de inhibición media. LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables. F= Prueba de Fisher. Sig= Nivel de significancia.

7.2. Determinación de la toxicidad del lufenuron en *Artemia franciscana*

Las ocho concentraciones de lufenuron evaluadas en los bioensayos con *A. franciscana*, muestran mortalidad a las 24 h y 48 h de exposición. La Tabla 4 nos indica los porcentajes de mortalidad de con *A. franciscana* obtenidos por acción de ocho concentraciones en orden creciente del lufenuron empleadas a 24 h y 48 h de exposición. La prueba de Tukey nos indicó que existen diferencias estadísticas entre el porcentaje de inhibición del control con las concentraciones de lufenuron evaluadas (Tabla 4). Fue determinada la CL_{50} del lufenuron a 24 h y 48 h. Se determinaron los valores de NOEC y LOEC de las concentraciones a las 24 h y 48 h.

Tabla 4. Efecto del lufenuron sobre la mortalidad de *A. franciscana* a 24h y 48h de exposición

Concentración ug i.a.·L ⁻¹	% de Mortalidad	
	24h	48h
0	0 ab	0 a
1,56	2,7 abc	27,2 b
3,12	0 a	36,3 bc
6,25	10,8 abc	39,3 bcd
12,5	18,9 bcd	57,5 cde
25	8,1 abc	63,6 de
50	19,4 cd	58,3 ef
100	23,6 cd	90,4 fg
200	27,2 d	100 g
NOEC	<50	<1,56
LOEC	100	1,56
CL ₅₀	235,24	11,41
F	8,83	33,55
Sig	0,00	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). CL₅₀= Concentración letal media. LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables. F= Prueba de Fisher. Sig= Nivel de significancia.

7.3. Determinación de la toxicidad aguda del lufenuron en *Daphnia magna*

La Tabla 5 nos indica los porcentajes de mortalidad de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenuron empleada a 24 h y 48 h de exposición. La prueba de Tukey nos indicó que existen diferencias estadísticas entre el porcentaje de mortalidad del control con las concentraciones evaluadas (Tabla 5). Fue determinada la concentración letal media del lufenuron sobre *Daphnia magna* a 24 h y 48 h de exposición (Tabla 5). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a las 24 h y 48 h de exposición.

Tabla 5. Efecto del lufenuron sobre la mortalidad de *D. magna* a 24 h y 48 h de exposición.

Concentración ug i.a.·L ⁻¹	% de Mortalidad	
	24h	48h
0	0 a	0 a
0,57	35 ab	90 b
1,15	37,5ab	90 b
2,31	45 b	93,3 b
4,63	55 b	96,7 b
9,26	57.5b	93,3 b
NOEC	<1,15	<0,57
LOEC	2,31	0,57
CL ₅₀	5,66	0,05
F	5,73	10,12
Sig	0,002	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). CL₅₀ = Concentración letal media. LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables. F = Prueba de Fisher. Sig = Nivel de Significancia.

7.4. Determinación de la toxicidad crónica del lufenuron en *Daphnia magna*

Se evaluó el efecto crónico del lufenuron con el número de crías vivas en el número de crías vivas de los cladóceros *D. magna* durante los 21 d de exposición, encontrándose solo crías vivas en el control y las dos primeras concentraciones, siendo la concentración de 0,0001 mg i.a.·L⁻¹ estadísticamente diferente a la del control. De igual forma al evaluar el efecto crónico del lufenuron sobre la mortalidad de los padres durante los 21 días del bioensayo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las cinco concentraciones de lufenuron. En cuanto a la longitud de las hembras, se obtuvieron diferencias significativas para el control con las 2 primeras concentraciones evaluadas: 0,00005 mg i.a.·L⁻¹ y 0,0001 mg i.a.·L⁻¹ (Tabla 6). La figura 1 permite visualizar el ritmo de mortalidad de *D. magna* durante la duración total del ensayo.

Tabla 6. Efecto del lufenuron en el número de crías vivas, en la mortalidad de los padres y en la longitud de las hembras de *Daphnia magna* a 21 días de exposición.

Concentración mg i.a.·L ⁻¹	Nº crías vivas	% Mortalidad de los padres	Longitud de hembras (mm)
control	81,1 a	0 a	4,8 a
0,00005	83,5 a	75 b	4,5 b
0,0001	26,8 b	91,6 b	4,4 c
0,031	0 c	100 b	0 d
0,061	0 c	100 b	0 d
0,122	0 c	100 b	0 d
NOEC (mg i.a.·L⁻¹)	0,00005	0,00005	0,00005
LOEC (mg i.a.·L⁻¹)	0,0001	<0,00005	<0,00005

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables.

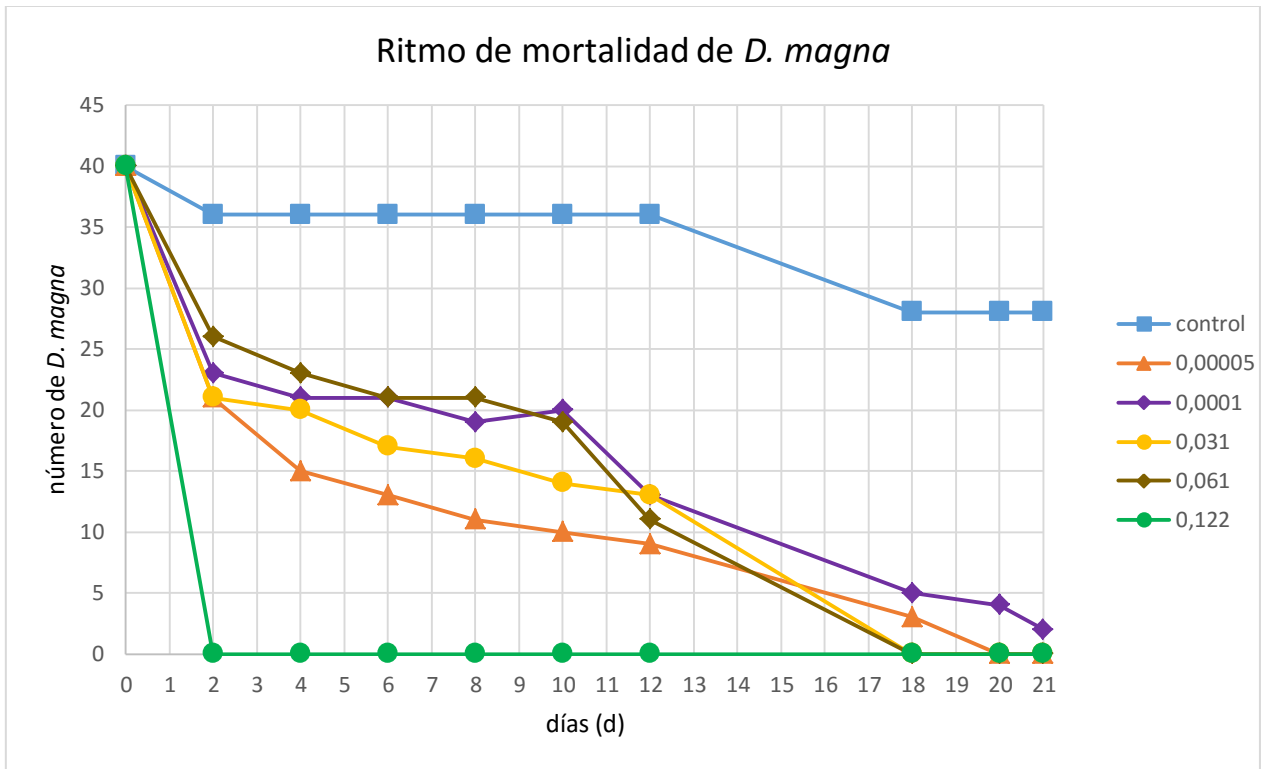


Figura 2. Ritmo de mortalidad de *D. magna* durante los 21 días de exposición con las cinco concentraciones de lufenuron y el control.

7.5. Determinación de la toxicidad crónica del lufenuron en *Carassius auratus*

Durante la evaluación del efecto crónico del lufenuron en el porcentaje de mortalidad acumulada de los embriones, larvas y juveniles de *C. auratus* durante los 26 d de exposición. Solo se observó diferencias estadísticamente significativas entre el control y la mayor concentración de lufenuron (0,122 mg i.a. L⁻¹). Los resultados en general indican que el lufenuron no produce efectos adversos en la eclosión de los huevos, longitud de los peces sobrevivientes, su peso de estos, larvas “fry” o alevines y en el comportamiento (Tabla 7)

Tabla 7. Efecto del Lufenurón en la mortalidad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *Carassius auratus* (Cyprinidae) “Goldfish” con comportamiento anormal a exposición.

Concentración mg i.a. L ⁻¹	% Mortalidad acumulada	Días en que inicia la eclosión	Longitud de peces sobrevivientes (mm)	Peso de peces sobrevivientes (g)	N° de larvas “fry” deformadas	% de juveniles con comportamiento anormal
control	0 a	3,6 a	7,2 a	0,20 a	0 a	0 a
0,00005	0 a	3,6 a	7,1 a	0,19 a	0 a	0 a
0,0001	0 a	3,7 a	7,0 a	0,20 a	0 a	0 a
0,031	2,85 a	3,9 a	7,0 a	0,17 a	0 a	2,63 a
0,061	5,71 a	3,9 a	7,1 a	0,18 a	2,5 a	0 a
0,122	25,71 b	3,9 a	6,9 a	0,17 a	5 a	2,63 a
LOEC (mg i.a. L⁻¹)	0,122	>0,122	>0,122	>0,122	>0,122	>0,122
NOEC (mg i.a. L⁻¹)	0,061	0,122	0,122	0,122	0,122	0,122

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables. La mortalidad acumulada incluyó la mortalidad embrionaria, de larvas y de juveniles. El Comportamiento anormal incluyó en conjunto el nado anormal y la hiperventilación. Además incluye a los peces (larvas y juveniles) muertos. Los valores del control se ajustaron a cero con la fórmula de Abbot.

7.6. Toxicidad del lufenuron por formación de nitratos en los microorganismos del suelo

En el bioensayo con los microorganismos del suelo no se observó inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a ninguna de las cinco concentraciones evaluadas, por ende no se puede determinar una concentración efectiva media del lufenuron a 120 h de exposición (Tabla 8). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a las 120h de exposición.

La Tabla 8 nos indica la concentración de nitratos obtenido por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenuron empleadas a 120 h de exposición a las comunidades microbianas del suelo.

Tabla 8. Efecto del lufenuron sobre las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición.

[c] de lufenuron mg i.a.·g ⁻¹ suelo	[c] de nitratos a 120 h en el suelo (ug·g ⁻¹ de suelo)
0	1,10a
110	1,05a
220	0,88a
450	1,18a
910	0,94a
1820	1,04a
LOEC	>1820
NOEC	1820

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables

7.7. Toxicidad del lufenuron sobre *E.foetida*

La Tabla 9 nos indica los porcentajes de mortalidad de *E. foetida* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenuron empleadas a 7 días y 14 días de exposición. Se determinó la dosis letal media del lufenuron sobre *Eisenia foetida* a 7 d y 14 d de exposición (Tabla 9). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC al 7d y 14d de exposición.

Tabla 9. Efecto del Lufenuron sobre la mortandad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* a 7 días y 14 días de exposición.

Concentración mg·kg ⁻¹	% Mortalidad	
	7 d	14 d
0	0 a	0 a
21,2	30 bc	36,6 b
50,3	43,3 bc	43,3 b
100,5	23,3 b	30 b
201	26,6 b	40 b
402	50 c	43,3 b
NOEC	<21,2	<21,2
LOEC	21,2	21,2
DL ₅₀	448,01	206,31
F	13,73	16,44
Sig	0,00	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($p < 0,05$). DL₅₀= Dosis letal media. LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más baja de efectos no observables. F= Prueba de Fisher. Sig= Nivel de significancia.

Tabla 10. Resumen de los parámetros ecotoxicológicos obtenidos en los bioensayos con lufenuron a los seis organismos bioindicadores de calidad ambiental. A= Acuático, T= Terrestre, Ag= Ensayo agudo, Cro= Ensayo crónico.
Las casillas marcadas con “X” indican que tipo de ensayo se realizó para cada modelo biológico

Modelo Biológico	CL ₅₀ /DL ₅₀	CI ₅₀	NOEC	LOEC	Unidades	Período	Ag	Cro	Tipo de organismo
<i>Chlorella vulgaris</i>		<2,46	2,46	2,46	mg i.a.·L ⁻¹	96 h		X	A
<i>Artemia franciscana</i>	11,41		<1,56	1,56	µg i.a.·L ⁻¹	48 h	X		A
<i>Daphnia magna</i>	0,05		<0,57	0,57	µg i.a.·L ⁻¹	48 h	X		A
<i>Daphnia magna</i>	-	-	0,00005	0,0001					
			0,00005	<0,00005	mg i.a.·L ⁻¹	21 d		X	A
			0,00005	<0,00005					
			0,061	0,122					
			0,122	>0,122					
<i>Carassius auratus</i>	-	-	0,122	>0,122	mg i.a.·L ⁻¹	26 d		X	A
			0,122	>0,122					
			0,122	>0,122					
			0,122	>0,122					
Microorganismos de suelo	-	-	1820	>1820	mg i.a.·g ⁻¹	120 h		X	T
<i>Eisenia foetida</i>	206,31		<21,2	21,2	mg i.a.·Kg ⁻¹	14 d		X	T

VIII. DISCUSIÓN

La toxicidad del lufenuron depende de la duración, intensidad de exposición, formulación y susceptibilidad del organismo evaluado, lo cual el presente estudio evaluó el efecto tóxico del plaguicida lufenuron sobre seis especies bioindicadores de calidad ambiental. Hay que tener en cuenta que las rutas de exposición para cada especie difieren, y además sus procesos metabólicos y bioquímicos también son distintos cuando se les somete a un plaguicida. Se advierte que el lufenuron es altamente contaminante de ambientes acuáticos en comparación con los terrestres. Esto se explica por la alta toxicidad en organismos acuáticos como los descritos por Mayer *et al.* (2013), donde resalta la efectividad del lufenurón para tratar peces de un estanque infestados con el ectoparásito *Argulus* sp., pero advierten que se debe tener precaución con respecto a la contaminación ambiental del agua con lufenuron, ya que podría causar efectos perjudiciales por las aguas residuales en los crustáceos de agua dulce que viven en el medio ambiente circundante. Además Brock *et al.* (2016) mencionan que los sedimentos actúan como sumideros para los plaguicidas lipófilos que pueden persistir allí, lo que puede conducir a efectos tóxicos en los organismos bentónicos, siendo uno de estos plaguicidas lipofílicos el lufenuron.

Daphnia magna fue la especie más sensible al lufenuron con un valor de $CL_{50} = 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 48 h de exposición, lo cual se debe a que este plaguicida inhibe la síntesis de quitina en los artrópodos como señala Viñuela *et al.* (1991), actuando específicamente sobre la cutícula, evitando la incorporación de las unidades de N-acetilglucosamina, en el polímero de quitina. Un estudio similar de Dantzger *et al.* (2015) reportan que la *Daphnia similis* fue el organismo más sensible a los efectos del diflubenzuron con un valor de CL_{50} de $0,97 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h de exposición, así también Ikemoto *et al.* (1992) determinan que hay un exceso de toxicidad del diflubenzuron en *D. magna*. Por otra parte Valderrama *et al.* (2015) muestra la sensibilidad de *Daphnia pulex* frente a la degradación hidrolítica del clorpirifos (CPF) en ensayos de toxicidad a 24 h de exposición, donde se demostró la inmovilidad de la totalidad de los neonatos de *D. pulex*.

Duchet *et al.* (2011) reportan que para ambas especies de *Daphnia* (*Daphnia pulex* y *Daphnia magna*), la exposición a las tres concentraciones de diflubenzurón (0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) resultó en una disminución en el número de individuos supervivientes, y también afectó negativamente a la producción de neonatos. Además, en *D. magna*, se observó un efecto negativo significativo en la longitud del cuerpo. Todos estos diversos estudios toxicológicos sobre el género *Daphnia* prueba que es muy sensible al ser expuesto a un insecticida como el lufenuron.

La concentración de inhibición media (CI_{50}) en la microalga *Isochrysis galvana* a las 96h de exposición fue de 0,97 $\text{mg}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ con el bioplaguicida catahua (Iannacone *et al.* 2014), sin embargo en nuestro bioensayo con la microalga *Chlorella vulgaris* se puede observar que la CI_{50} es $<2,46\text{ mg}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo más sensible a la inhibición del crecimiento que la microalga *I. galvana*. Sin embargo, Ikemoto *et al.* (1992) determinan que los compuestos buprofezin y diflubenzuron, los cuales son compuestos muy similares en la forma de acción que el lufenuron (inhibidores de la síntesis de quitina), no son excesivamente tóxicos para *C. vulgaris*. Para otro modelo de bioindicador de calidad ambiental Dantzger *et al.* (2015) reportan que la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov, 1953) frente al diflubenzuron presento que el valor de CI_{50} fue de 58,90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 168 h de exposición. En otros pesticidas, Ma *et al.* (2006) hallan que el CI_{50} para *C. vulgaris* a 96 h de exposición frente al carbofurano es de 7,86 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Rioboo *et al.* (2002) después de 96 h de exposición a los herbicidas frente *C. vulgaris*, la terbutrina fue el inhibidor más fuerte del crecimiento, dando un valor de CI_{50} para el crecimiento dos veces menor que el de los cultivos de isoproturon (CI_{50} terbutrina = 0,057 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; CI_{50} isoproturón = 0,116 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Estos estudios nos aclaran que el lufenuron frente a *C.vulgaris* tiene un efecto inhibidor considerable comparado a otros pesticidas.

La concentración letal media (CL_{50}) de *Artemia franciscana* fue de 11,41 $\mu\text{g}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h de exposición al lufenuron, según Dantzger *et al.* (2015) reportan que la especie *Artemia salina* frente al diflubenzuron presento que el valor de CL_{50} fue de 0,08 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 168 h o 7 d de exposición. Iannacone *et al.* (2016) evaluaron la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana*, en donde tres sustancias químicas calificadas como muy tóxicas y que presentaron los niveles guía más bajos para la

protección de la vida acuática, siendo sus CL_{50} a 48 h de exposición las siguientes: Triclosan ($0,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Cipermetrina ($0,84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y Clotrimazol ($0,97 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). En comparación a los tres compuestos anteriores, el lufenuron frente a *A. franciscana* no parece ser tan toxico, además es menos susceptible frente al bioensayo con *D. magna*.

Soares *et al.* (2016) en el ensayo de toxicidad aguda con lufenuron a 96 h con *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) “Tambaqui”, muestran la presencia de hemorragias en los ojos, las aletas y el opérculo de peces expuestos a $0,7$ y $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de lufenurón. Nuestro resultados de toxicidad crónica con *C. auratus* a 26 d de exposición muestra que no hay efectos significativos en la eclosión de los huevos, longitud de los peces sobrevivientes, el peso de estos, larvas “fry” o alevines y en el comportamiento. Sin embargo, Sabra & Mehana (2015) señalaron que los peces son particularmente sensibles a la contaminación del medio ambiente acuático, ya que son susceptibles a contaminantes como los insecticidas. Contribuyendo a la investigación anterior, Marimuthu *et al.* (2013) investigaron que la tasa de mortalidad de las larvas de *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) “bagre africano” aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el aumento de las concentraciones de buprofezina ($0; 0,05; 0,5; 5; 25; 50$ y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) expuestas a 24 h y 48 h. Los valores de CL_{50} de 24 y 48 h de buprofezina para las larvas se estimaron en 5.70 y $4.64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Se observaron malformaciones cuando los embriones y larvas expusieron a más de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En el bioensayo con los microorganismos del suelo no se observó inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a ninguna de las cinco concentraciones evaluadas del lufenuron. En el trabajo de Bending & Lincoln, (2000) demostraron que cuando se mezclan concentraciones de 2-propenil-ITC y dimetil-sulfuro, que no tuvieron efecto sobre la nitrificación cuando se aplicaron al suelo individualmente, se inhibió fuertemente la nitrificación. De Boer & Kowalchuk (2001) nos mencionan que la oxidación autotrófica de amonio es un proceso de dos etapas, consistente en la conversión de amonio en nitrito y su posterior conversión en nitrato. Estas dos etapas son llevadas a cabo por bacterias oxidantes de amoniaco (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB), respectivamente. Todos los AOB terrestres conocidos pertenecen a un grupo monofilético dentro de la subclase β de Proteobacteria, y la clasificación actualmente aceptada reconoce sólo dos

géneros dentro de este grupo, *Nitrosospira* y *Nitrosomonas*. Además, una amplia gama filogenética de bacterias y hongos posee el potencial de nitrificación heterotrófica, y el rango de transformaciones incluye la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno, como por ejemplo *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Penicillium nigricans* (Bainier, 1930), *Clitocybe* sp. , *Arthrobacter* sp. , *Thiosphaera pantotropha* (Robertson and Kuenen, 1984), *Paracoccus denitrificans* (Davis, 1969) y *Pseudomonas putida* (Trevida, 1889). Se podría inferir que las posibles poblaciones de microorganismos de suelo nitrificadoras presentes en las muestras de suelo utilizadas en los bioensayos frente al lufenuron son las mencionadas anteriormente; además que son resistentes al lufenuron (NOEC= 1820 mg i.a.·g⁻¹; LOEC> 1820 mg i.a.·g⁻¹).

Con respecto al bioensayo realizado con *Eisenia foetida*, se obtuvieron las dosis letales media (DL₅₀) frente al lufenuron a 7 d (DL₅₀= 448,01 mg i.a.·Kg⁻¹) y 14 d (DL₅₀= 206,31 mg i.a.·Kg⁻¹) de exposición. En otro trabajo de investigación Badawy *et al.* (2013) delimitaron la toxicidad de tres reguladores de crecimiento de insectos (IGR) buprofezin, lufenurón, y triflumurón, en diferentes proporciones de aplicación y tiempos de exposición en lombrices maduras de la especie *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), indicando que el lufenurón fue el plaguicida más dañino para la maduración de lombrices de tierra, seguido en orden decreciente por buprofezina y triflumurón. Los estudios de toxicidad de Nasr *et al.* (2015) indicaron que el piriproxifeno fue más perjudicial para las lombrices maduras de la especie *A. caliginosa* que el flufenoxurón con CL₅₀ = 42,63 y 60,66 mg·kg⁻¹ después de cuatro semanas (28 d), respectivamente. Así relacionaron la tasa de crecimiento y las actividades enzimáticas de AChE (acetilcolinesterasa), PPO (polifenol oxidasa) y GST (glutación-S-transferasa), proporcionando una fuerte evidencia de la participación de la contaminación plaguicida en los cambios bioquímicos de las lombrices de tierra, que pueden ser utilizados como bioindicadores de la contaminación del suelo por pesticidas, por lo cual el oligoqueto *E. foetida* también puede llegar a ser un buen bioindicador de contaminación de suelos. Con compuestos organofosforados Espinoza & Bustos (2015) concluyeron que malation y metamidofos alteran la morfología externa provocando una baja significativa en el peso corporal y expresando contracción muscular en forma de cola enrollada en *E. foetida*.

Sánchez-Bayo *et al.*, (2013) mencionan que las únicas benzoilureas sistémicas del mercado, hexaflumurón, novalurón y el teflubenzurón presentan un modo de acción está restringido a los artrópodos, y que no son muy tóxicas para otros taxa de animales como moluscos y vertebrados. No obstante, (Schaaf, 2015) dice que el lufenuron es un insecticida que presento una alta toxicidad, ya que se midió el impacto ambiental de este mismo teniendo en cuenta los siguientes factores: "ecotoxicología": categoría toxicológica, toxicidad en abejas, aves y peces; "Toxicidad humana": carcinogenicidad, neurotoxicidad, alteraciones endocrinas, genotoxicidad y capacidad irritativa; "Comportamiento ambiental": la persistencia en el agua / sedimento, persistencia en el suelo y bioconcentración. Farrag & Shalby, (2007) concluyeron que el IGR, el lufenuron y el insecticida, profenofos causaron cambios histopatológicos e histoquímicos en *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) que no se conservaron a la normalidad después de un mes de recuperación. Por último, Pinakin *et al.* (2011) estudiaron el efecto del lufenuron en la embriogénesis de los vertebrados utilizando como modelo *Gallus domesticus* (Linnaeus, 1758). Llegaron a la conclusión de que el regulador del crecimiento de insectos, lufenurón a una dosis muy baja (100 µl de 54ppm) fue embriotóxico y teratogénico a un organismo no diana, el pollo, lo que nos revela que la exposición a lufenurón en la cadena alimentaria puede llevar a consecuencias indeseables en los vertebrados. Por ello se recomienda que lufenurón debe utilizarse con precaución, ya que puede ser altamente toxico para los ambientes marinos especialmente, y también los terrestres, afectando las cadenas tróficas y poniendo en peligro en consecuencia los ecosistemas donde también se encuentra el ser humano.

IX. CONCLUSIONES

- La *Daphnia magna* es el organismo bioindicador de calidad ambiental más sensible con $CL_{50}=0.05 \text{ ug i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ y los microorganismos de suelo los más resistentes al lufenuron .
- En la inhibición de crecimiento de *Chlorella vulgaris* se determinó que el CI_{50} es menor a $2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 96 h de exposición al lufenuron.
- En *Artemia franciscana* se encontró la concentración letal media es igual a $11,41 \text{ ug i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h de exposición.
- En la toxicidad aguda de *Daphnia magna* se precisó la concentración letal media es igual a $0,05 \text{ ug i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h de exposición.
- La toxicidad crónica de *Daphnia magna* se halló que a partir de la concentración $0,0001 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ hay diferencias significativas en relación al número de crías vivas, porcentaje de mortalidad de los padres y longitud de las hembras.
- La toxicidad crónica de *C. auratus* solo se calculó diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad acumulada (embriones, larvas y juveniles) entre el control y la mayor concentración ($0,122 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$). No hay diferencias significativas en relación a la eclosión de huevos, longitud de los peces sobrevivientes, su peso, número de larvas “fry” deformadas y porcentaje de juveniles con comportamiento anormal.
- En las comunidades microbianas de suelo no se observó ni inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a partir de la concentración $110 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ a 120 h de exposición.
- En *Eisenia foetida* se delimitó la dosis letal media que es igual a $206,31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ a 14 d de exposición.

- Se concluyó que los seis organismos escogidos para evaluar los posibles daños ambientales del insecticida lufenuron, ayudaron a aclarar que este compuesto daña principalmente la cadena trófica acuática que la terrestre, siendo más sensibles los ecosistemas acuáticos que los terrestres que presentan riesgo bajo, por lo cual en general no se le considera muy tóxico, aunque las evidencias adversas reportadas nos hacen tomar las precauciones necesarias al administrar el insecticida para controlar plagas, ya que al estar expuesto al agua y superficie terrestre puede afectar a organismos no blanco, siendo uno de estos el ser humano.

X. RECOMENDACIONES

- Evaluar mayor cantidad de organismos terrestres para medir su sensibilidad al lufenuron.
- Modificar los protocolos existentes para optimizar los resultados en los bioensayos que se planteen para organismos acuáticos y terrestres con potencial bioindicador de la calidad ambiental.
- Determinar los efectos ecotoxicológicos a niveles histológicos para evaluar las patologías que causan en los órganos internos de los bioindicadores a seleccionar.
- Emplear otros insecticidas de la familia del lufenuron con potencial inhibidor de síntesis de quitina para hallar cuales son más tóxicos frente a organismos acuáticos y terrestres.

XI. REFERENCIAS CITADAS

1. Badawy, M. E., Kenawy, A., & El-Aswad, A. F. (2013). Toxicity assessment of buprofezin, lufenuron, and triflumuron to the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International Journal of Zoology*, 2013.
2. Bending, G. D., & Lincoln, S. D. (2000). Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8), 1261-1269.
3. Braga da Silva, M.T; Correa Costa, E., & Boss, A. (2003). Controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. *Ciencia Rural*, Santa María. 33, 601-605.
4. Brock, T. C. M., Bas, D. A., Belgers, J. D. M., Bibbe, L., Boerwinkel, M. C., Crum, S. J. H., & Roessink, I. (2016). Effects of sediment-spiked lufenuron on benthic macroinvertebrates in outdoor microcosms and single-species toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 177, 464-475.
5. Both G. J., Gerards S. and Laanbroek H. J. 1990 (a). Enumeration of nitriteoxidizing bacteria in grassland soils using a Most Probable Number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 277-286.
6. Clare,J. (2002). *Daphnia: An aquarist's guide*. [Internet]. Citado 26/07/2016. Disponible en
7. Chung, B. (2008). Control de los contaminantes químicos en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25, 413-418.
8. Cruz, T. L., Eduardo, Díaz B. M., Consuelo, Reyes, C. (1996). *Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial*; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería.

9. Dantzger, D. D., Vallim, J. H., Marigo, A., & Aoyama, H. (2015). Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 10(4), 259-272.
10. Das, P., Pal, R., & Chowdhury, A. (2008). Influence of biotic-abiotic factors on the degradation of novaluron in tropical soil. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 5, 425-429.
11. De Boer, W., & Kowalchuk, G. A. (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7), 853-866.
12. Devine, G. J., Eza, D., Oigusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 25, 74-100.
13. Duchet, C., Inafuku, M. M., Caquet, T., Larroque, M., Franquet, E., Lagneau, C., & Lagadic, L. (2011). Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 800-810.
14. Escobar Malaver, P. M., & Londoño Pérez, R. D. (2010). Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia* (No. Doc. 23020) CO-BAC, Bogotá).
15. Espinoza-Navarro, O. & Bustos-Obregón, E. (2015). Toxicidad y Riesgo Ambiental por Efecto de Insecticidas Organofosforados sobre Reproductor Macho de Lombriz de Tierra (*Eisenia foetida*). *Int. J. Med. Surg. Sci*, 2, 723-729.
16. Evangelista, W. S., Silva-Torres, C. S., & Torres, J. B. (2002). Toxicity of lufenuron to *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 31, 319-325.

17. Farrag, A. R. H., & Shalby, S. E. (2007). Comparative histopathological and histochemical studies on IGR, lufenuron and profenofos insecticide albino rats. J. Appl. Sci. Res, 3(5), 377-386.
18. Hernández, J. A., Rincón, M., & Jiménez, R. (1997). Comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia fetida*) bajo condiciones de clima cálido. Revista de la Facultad de Agronomía de LUZ, 14, 387-392.
19. Iannacone, J., & Lamas, G. (2003). Efectos toxicológicos del nim, rotenona y cartap sobre tres micro-avispa parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 29, 124-142.
20. Iannacone, J., & Alvariño, L. (2005). Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. Ecología Aplicada, 4, 91-104.
21. Iannacone, J., Alvariño, L., & Mamani, N. (2011a). Toxicity estimation for mixtures of Furadán 4F® and Monofos® on *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Ecotoxicology and Environmental Contamination, 6, 23-29
22. Iannacone, J., Alvariño, L., Paredes, C., Alayo, M., Mamani, N., Bonifacio, J. & Miglio, M. C. (2011b). Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta toxicológica argentina, 19, 19-31.
23. Iannacone, J. A., Ayala, H., Alvariño, L., Paredes Espinal, C., Villegas, W., Alomia, J., & Santos SI, N. (2014). Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepítans* (Euphorbiaceae). Revista de Toxicología, 30, 50-62.
24. Iannacone, J. J., Alvariño, L., Riestra, V. V., Ymaña, B., Argota, G., Fimia, F. & Castañeda, L. (2016). Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). Revista de toxicología, 33, 31-38.

25. Ikemoto, Y., Motoba, K., Suzuki, T., & Uchida, M. (1992). Quantitative structure-activity relationships of nonspecific and specific toxicants in several organism species. *Environmental toxicology and chemistry*, 11(7), 931-939.
26. Jaksic, F., & Ojeda, F. P. (1993). Estándares secundarios de calidad ambiental. *Medio Ambiente en Desarrollo*. Ricardo Katz y Gabriel del Fávero (Editores). Centro de Estudios Públicos. Santiago de Chile.
27. Karam, M. Á., Ramírez, G., Montes, L. P. B., & Galván, J. M. (2015). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum*, 11, 246-254.
28. Ley N° 29157. *Diario El Peruano*, Lima, Perú. 31 de agosto de 2008.
29. Luengo, G. (1998). Elementos para la definición y evaluación de la calidad ambiental urbana. Una propuesta teórico-metodológica. ponencia presentada en el IV Seminario Latinoamericano de Calidad de Vida Urbana, 8-11.
30. Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., & Chen, X. (2006). Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 63(2), 268-274.
31. Marco Normativo General, Documento Preliminar. Compendio de la Legislación Ambiental Peruana. Ministerio del Ambiente. 31 de Mayo de 2010.
32. Marimuthu, K., Muthu, N., Xavier, R., Arockiaraj, J., Rahman, M. A., & Subramaniam, S. (2013). Toxicity of buprofezin on the survival of embryo and larvae of African catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). *PloS one*, 8(10), e75545.
33. Martí, M. A. C. (2007). Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Editorial Tebar.
34. Martínez Moreno, O. (2013). Determinación del efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento de goldfish (*Carassius auratus*) en sistemas cerrados de recirculación de agua. [Tesis]. Universidad Militar Nueva Granada.

35. Matsumura, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97, 133-139.
36. Mayer, J., Hensel, P., Mejia-Fava, J., Brandão, J., & Divers, S. (2013). The use of Lufenuron to treat fish lice (*Argulus* sp.) in Koi (*Cyprinus carpio*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 22, 65-69.
37. Nasr, H. M., & Badawy, M. E. (2015). Biomarker Response and Biomass Toxicity of Earthworms *Aporrectodea caliginosa* Exposed to IGRs Pesticides. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 2015.
38. Norton J. 2008. Nitrification in Agricultural Soils. En: Nitrogen in Agricultural Systems, Agronomy Monographs 49. Schepers, J.S. and Raun, W.R. (eds.). ASA,CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin. pp. 173-199.
39. Pardo (2005). Ética de la experimentación animal: directrices legales y éticas contemporáneas. *Cuadernos de Bioética*, 16, 393-418.
40. Pica Granados, Y. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
41. Pinakin, W., Deshpande, S. G., & Salokhe, S. G. (2011). Studies on the effect of the insect growth regulator lufenuron on embryogenesis of chick *Gallus domesticus* (white leghorn strain). *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1, 82-88.
42. Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25, 34-43.

43. Pulgarín Urbina, E., & Martínez Valencia, J. A. (2012). Estado ecotoxicológico actual en la cuenca alta del río Bogotá mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*. [Tesis] Universidad de la Salle.
44. Pérez-moreno, I., Zalom, F. G., & Marco, V. (2006). Effects of lufenuron on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval, and adult stages. *Journal of Economic Entomology*, 99, 427-431.
45. Rioboo, C., González, O., Herrero, C., & Cid, A. (2002). Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicology*, 59(3), 225-235.
46. Ruiz Suarez, E. J. (2015). Estudio de microcrustáceos (*Daphnia pulex* y *Artemia salina*) como indicadores de toxicidad por causa del dicromato de potasio en la cuenca alta del río Bogotá. [Tesis]. Universidad Militar Nueva Granada.
47. Rubio Bellido, M. (2015). Estudios de biodegradación y mineralización a elevadas concentraciones del herbicida diuron empleando cepas bacterianas degradadoras específicas en condiciones de estrés. [Tesis]. Universidad Pablo de Olavide.
48. Rodríguez, S. M., Gálvez, J. B., Gasca, C. A. E., & Bandala, E. R. (2001). Degradación de plaguicidas. Miguel A. Blesa, Eliminación de contaminantes por catálisis heterogénea, Red CYTED VIII-G, 269-284.
49. Sabra, F. S., & Mehana, E. S. E. D. (2015). Pesticides Toxicity in Fish with Particular Reference to Insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences* (ISSN: 2321–1571).
50. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
51. Schaaf, A. A. (2015). Valoración de impacto ambiental por pesticidas agrícolas. *Observatorio Medioambiental*, 18, 87-96.

52. Sánchez-Bayo, F. (2012). Ecological Impacts of Insecticides. INTECH Open Access Publisher. Disponible en: http://cdn.intechopen.com/pdfs/25669/InTech-Ecological_impacts_of_insecticides.pdf Sarabia Alvarez, R. (2002). Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia. [Tesis]. Universidad de Valencia.
53. Soares, P. R. L., de Andrade, A. L. C., Santos, T. P., da Silva, S. C. B. L., da Silva, J. F., dos Santos, A. R. & de Sá, F. B. (2016). Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. Chemosphere, 161, 412-421.
54. Sun, R., Liu, C., Zhang, H., & Wang, Q. (2015). Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. Journal of agricultural and food chemistry, 63, 6847-6865.
55. Valderrama, J. F. N., Puerta, J. A. B., Zuluaga, S. C., Baena, J. A. P., & Pérez, F. J. M. (2015). Degradación hidrolítica de clorpirifos y evaluación de la toxicidad del extracto hidrolizado con *Daphnia pulex*. REVISTA POLITÉCNICA, 10, 9-15.
56. Vazquez, M. P., Vazquez, P. P., Galera, M. M., & Moreno, A. U. (2014). Comparison of two ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry: Evaluation of green parameters. Journal of Chromatography A, 1356, 1-9.
57. Viñuela, A. E., Marigil, F. B., & del Estal Padillo, P. (1991). Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 17, 391-400.
58. Wang, Y., Wu, S., Chen, L., Wu, C., Yu, R., Wang, Q., & Zhao, X. (2012). Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fétida*. Chemosphere, 88, 484-491.

XII. ANEXOS

Tabla 1. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con *Chlorella vulgaris*

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición (h)	96
Temperatura (°C)	27±0,5
pH de solución	7±0,5
Fotoperiodo	Iluminación permanente
Tamaño de envase	Tubos de 12mL
Volumen de solución	10mL
Edad de organismos (densidad celular inicial)	40·10 ³ org.mL ⁻¹
Nº de réplicas por concentración	3
Nº de concentración más control	6
Nº de organismos por concentración	N.R
Nº de organismos por envase	N.R
Régimen de alimentación	No requiere, solo medio
Agua control y de dilución	Embotellada y declorinada
Respuesta subletal	Inhibición de crecimiento al cincuenta por ciento (CI ₅₀)
Criterio de aceptabilidad sugerida	Densidad optima en el control a 72h de iniciado el ensayo sobre 40·10 ³ org.mL ⁻¹

N.R: No requerido

Tabla 2. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con *Artemia franciscana*

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición (h)	24 y 48
Temperatura (°C)	21±2
pH de solución	7,6-8
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
Tamaño de envase	30mL
Volumen de solución	20mL
Edad de organismos	Nauplio II < 24 h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	ausencia
Agua control y de dilución	Agua de mar
Respuesta letal	Mortalidad
Criterio de aceptabilidad sugerida	Sobre 90% de supervivencia de los controles.

Tabla 3. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con *Dahpnia magna*

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición (h)	24 y 48
Temperatura (°C)	21±2
pH de solución	7,6-8,0
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
Tamaño de envase	30mL
Volumen de solución	20mL
Edad de organismos	Neonatos<24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	ausencia
Agua control y de dilución	Embotellada y declorinada
Respuesta letal	Mortalidad
Criterio de aceptabilidad sugerida	Sobre 90% de supervivencia de los controles

Tabla 4. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad crónica con *Daphnia magna*

Tipo de bioensayo	Semi-estático
Tiempo de exposición (d)	21
Temperatura (C°)	21±2
pH de solución	7,6-8
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
Tamaño de envase	300mL
Volumen de solución	200mL
Edad de organismos	Neonatos<24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	10
N° de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	Tetramin®
Agua control y de dilución	Embotellada y de clorinada
Respuesta subletal y letal	-Número de crías vivas producidas por hembra viva -Mortalidad de los padres al momento de producción de la primera camada -Longitud de las hembras a los 21 días de exposición.
Criterio de aceptabilidad sugerida	Sobre 80% de supervivencia de los controles a los 21 días.

Tabla 5. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad crónica con *Carassus auratus*

Tipo de bioensayo	Semi-estático
Tiempo de exposición (días)	26
Temperatura (°C)	21±2
pH de solución	7,6-8,0
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
Tamaño de envase	1000mL
Volumen de solución	800mL
Edad de organismos	embriones
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	Tetramin®
Agua control y de dilución	Embotellada y declorinada
Respuesta letal y subletal	-Mortalidad acumulada (embriones, larvas y juveniles) -N° de días de eclosionados los huevos -Peso y longitud de juveniles sobrevivientes -Número de larvas deformadas -comportamiento anormal (nado anormal e hiperventilación)
Criterio de aceptabilidad sugerida	Sobre 80% de supervivencia de los controles al finalizar los ensayos

Tabla 6. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad subletal con Microorganismos de suelo

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	120h (5d)
Temperatura	21±2°C
pH de solución	6±2
Humedad relativa	70-80%
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	250mL
Sustrato	Suelo artificial: 34 g de arena lavada, 10 g. aserrín, 5 g. musgo, 1 g. carbonato de calcio y 6mL agua conteniendo alfalfa filtrada
Edad de organismos	N.R
N° de réplicas por concentración	5
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	N.R
N° de organismos por envase	N.R
Régimen de alimentación	N.R
Agua control y de dilución	Embotellada y declorinada
Respuesta subletal	Nitrificación en las comunidades microbianas en base al NOEC Y LOEC
Criterio de aceptabilidad sugerida	Incremento en la nitrificación en el control en comparación con el inicial.

N.R= No requerido

Tabla 7. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad con *Eisenia foetida*

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición (días)	7 y 14d
Temperatura (°C)	21±2
Humedad relativa (%)	70-80
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase, área interna total en cm ²	79,53
Sustrato	Suelo artificial: 34 g de arena lavada, 10 g. aserrín, 5 g. musgo, 1 g. carbonato de calcio y 6mL agua conteniendo alfalfa filtrada
Edad de organismos	Tamaño de 9-11cm con clitelo
N° de réplicas por concentración	3
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	10
N° de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	N.R
Agua control y de dilución	Destilada y declorinada
Respuesta letal	Mortalidad (inmovilidad durante 10 seg al ser pinchados por alfileres entomológicos)
Criterio de aceptabilidad sugerida	Sobre 90% de supervivencia de los controles

N.R= No requerido