

Evaluación ecotoxicológica de pesticidas organofosforados sobre *Daphnia magna*

Karen Burga P.¹, Lizardo Visitación F.², Teofilo Chire M.³

Resumen

La evaluación ecotoxicológica de los pesticidas organofosforados en el filtrado de suelos, metamidofos, clorpirifos y mezcla de metamidofos-clorpirifos, fue realizada utilizando como organismo de respuesta la *Daphnia magna*, se midió la toxicidad aguda en función del CL₅₀ (Concentración letal media), así mismo se evaluó el efecto sinérgico de la presencia de estos pesticidas. Finalmente se determinó si existe riesgo ambiental en la actividad agrícola de la localidad de Carapongo donde se emplean estos pesticidas como protección de sus cultivos.

Palabras Clave: *Daphnia magna*, metamidofos, clorpirifos.

Abstract

The ecotoxicological evaluation of organophosphorus pesticides in the soil filtering, methamidophos, chlorpyrifos and mix methamidophos-chlorpyrifos was conducted using *Daphnia magna* as organisms of response, was measured in terms of acute toxicity LC₅₀ (median lethal concentration) and it assessed the synergistic affect of the presence of these pesticides. Finally it was determined the environmental risk in farming in the locality of Carapongo where these pesticides are used as a protection of their crops.

Key Words: *Daphnia magna*, metamidophos, chlorpyrifos.

1. Introducción

Los pesticidas generan diferentes impactos ecotoxicológicos, que afectan al agua, aire, suelo y organismos vivos. Los problemas derivan de la falta de selectividad, ya que al liberar estas sustancias al ambiente, su efecto tóxico se extiende a otras especies no objetivos. Menos del 0.1% de la cantidad de pesticidas aplicados anualmente, llegan a las pestes objetivos de control. Se considera que muchos de los invertebrados componentes de la biodiversidad animal, no destinatarios del control químico, son afectados adversamente por el 99% del pesticida restante (1). El 2001 se registró en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) 937 productos entre pesticidas y sustancias afines, siendo los de amplio espectro los más comercializados (2).

Tabla 1. Pesticidas de mayor importación en el Perú (US\$).

N°	Nombre Común	1999	2000	Total
1	Mancozeb	1433010	1819825	3252835
2	Metamidofos	1545553	1424058	2969611
3	Cipermetrina	1216783	1551655	2768438
4	Glifosato	1393853	1329812	2723665
5	Propined	1039863	883610	1923473
6	Imidacloprid	5877878	1065791	6943669
7	Clorpirifos	659070	982599	1641669
8	Aldicarb	860236	623766	1484002
9	Ciromazina	1094283	376880	1471163
10	Carburofán	311270	886135	1197405

Fuente: Programa APGEP-SENREM 2000 (2)

Los pesticidas organofosforados pueden ser clasificados como: No sistémicos de contacto, para que estos puedan ser efectivos deben ser estables en condiciones del medio ambiente y deben ser

absorbidos por los tejidos de los insectos que rodean la cutícula, recubren el canal alimenticio o el sistema traqueal adyacente y luego deben ser transportados intactos hacia el sitio de acción de los tejidos susceptibles (3), un ejemplo muy utilizado de este tipo de pesticidas es el Clorpirifos conocido comercialmente como Lorsban, Dursban, Paladín, Pryrifos 48 EC (4).

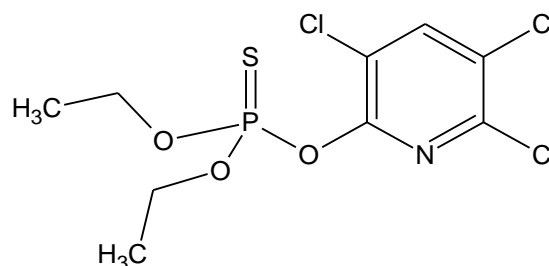


Figura 1. Molécula de Clorpirifos.

Los pesticidas organofosforados sistémicos son compuestos que frecuentemente son transformados en cantidades considerables dentro del organismo, ya sea en producto de descomposición menos tóxicos o productos metabólicos que también tienen propiedades insecticidas y acaricidas. Un ejemplo ampliamente utilizado es el Metamidofos conocido comercialmente como Tamaron 600 SL, Monitor 600, Stermin, Rondero (5).

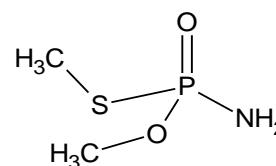


Figura 2. Molécula de Metamidofos.

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
E-mail: lvisitacionf@hotmail.com.

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
E-mail: tcchire@lamolina.edu.pe.

Para evaluar el efecto ecotoxicológico que generan los pesticidas organofosforados sobre especies no objetivo utilizamos en este trabajo ensayos con *Daphnia magna*. Estos son organismos comúnmente utilizados en los bioensayos de ecotoxicidad, son crustáceos pequeños que constituyen la mitad de la Clase Branchiopoda, la mayoría de estos organismos son pálidos y transparentes y viven casi exclusivamente en agua dulce (6). En condiciones favorables se reproducen partenogenéticamente (asexualmente) cada tres o cuatro días, siendo la población constituida solamente por hembras (7). Debido a su amplia distribución, su importancia ecológica y su sensibilidad en ambientes intervenidos, se les considera especies indicadoras de condiciones ambientales adversas. Además, por ser organismos de fácil mantenimiento bajo condiciones de laboratorio, normalmente se utilizan en pruebas de toxicidad acuáticas. Son fáciles de cultivar en el laboratorio, posee alta fecundidad y su ciclo de vida es de 60 días a 20 °C (6).

La evaluación del efecto tóxico de los pesticidas sobre las *Daphnias* se determinó a través del valor de la concentración letal media CL_{50} que determina la concentración que causa la muerte en el 50% de los individuos de una población bajo estudio. La determinación de la CL_{50} fue realizada utilizando el programa Probit (Probit análisis program) de la USEPA (U.S.A Environmental Protection Agency), el programa arroja los valores de CL_{50} , los límites de confianza y realiza el test de bondad de ajuste mediante el estadístico Ji - cuadrado (X^2), en este caso la hipótesis nula es que la línea Ldp (Línea dosis-Probit) es un modelo adecuado de los datos (8).



Figura 3. *Daphnia magna*.

La Evaluación del Riesgo Ambiental, de los pesticidas metamidfos y clorpirifos sobre las *Daphnias*, permite establecer los límites de aceptabilidad mediante procedimientos científicos basados en la información disponible. Los datos ecotoxicológicos a utilizar en este trabajo corresponden a ensayos de toxicidad agudos CL_{50} , realizados en 48 horas. En contraste, las pruebas crónicas estiman la concentración - efecto media (CE_{50}) de la sustancia de prueba que causa un efecto

al 50 % de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado (9). Se determina los coeficientes de riesgo (RQ), dividiendo la Concentración Ambiental Esperada por la Toxicidad. Luego del cociente calculado, se compara con el Nivel Crítico (LOC), valores establecidos por la USEPA y son usados para analizar riesgos potenciales en organismos, estos valores se encuentran clasificados en la siguiente categoría (10):

- Aguda: Potencial para riesgo agudo para organismos los cuales pueden garantizar acciones regulatorias en adición para clasificación de uso restringido (agudo $RQ > 0.5$ para animales acuáticos, mamíferos, aves).
- Uso agudo restringido: Riesgo agudo potencial para organismos no-target, pero pueden ser mitigado a través de la clasificación de uso restringido (agudo $RQ > 0.1$ para animales acuáticos o 0.2 para mamíferos y aves).
- Agudo, especies amenazadas: Especies amenazadas pueden ser potencialmente afectados por su uso (agudo $RQ > 0.05$ para animales acuáticos o 0.1 mamíferos y aves).
- Riesgo crónico: Riesgo crónico potencial puede garantizar acción regulatoria, especies amenazadas pueden potencialmente ser afectadas a través de exposiciones crónicas (Crónico $RQ > 1$ para todos los animales).
- Riesgo en plantas no amenazadas: $RQ > 1$
- Riesgo en plantas amenazadas - Efecto potencial en plantas amenazadas ($RQ > 1$).

Para la evaluación de ecotoxicológica de los pesticidas organofosforados se seleccionó el valle de Carapongo en Lima para la toma de las muestras de suelo contaminado, por ser una zona donde se aplica estos pesticidas y por haberse encontrado influencia de estos en la inhibición de la acetilcolinesterasa en la población (11, 12).

2. Materiales y métodos

2.1. Caracterización del suelo

Se tomaron muestras de suelo agrícola provenientes de una parcela de cultivo de apio y lechuga, de la localidad de Carapongo Ate-vitarte, en el mes de Junio del 2004. Las muestras fueron tomadas 1 día después de la fumigación antes de la cosecha, en la etapa de crecimiento o desarrollo del cultivo. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Suelos, agua y planta de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, donde se realizaron los análisis de caracterización del suelo, los parámetros a determinar fueron: Clase Textural, pH, Materia Orgánica (M.O), Conductividad Eléctrica (C.E), Carbonato de Calcio, Capacidad de intercambio catiónico CIC. Se determinó en forma cualitativa por cromatografía de capa fina la presencia de pesticidas organofosforados (11).

2.2. Evaluación Ecotoxicológica en suelos agrícolas contaminados

Preparación de la especie test.

Se colectaron las hembras de *Daphnia magna* del laboratorio de Ecotoxicología de la UNALM.

Secraron en un medio para dáfnidos (13), los cultivos masivos fueron alimentados una vez por semana con 0.1 gramos de levadura deshidratada y estuvieron sometidas a condiciones óptimas de temperatura y aireación (18-25 °C y 2.5 mg/L de O₂ - 6,0 mg/L de O₂).

Extracción del material contaminante

Se tomaron 300 g de muestra de suelo contaminado y se saturó con agua destilada. Se procedió a filtrar al vacío. Ese filtrado se mantuvo en refrigeración a 2-5° C hasta el momento en que se realizaron los ensayos ecotoxicológicos. Esto se realiza de manera similar a la extracción del agua intersticial de sedimentos o la obtención del agua de saturación del suelo (14,15).

Ensayo Ecotoxicológico.

Los experimentos se realizaron con individuos juveniles de menos de 48 horas de edad, obtenidas de las hembras partenogénicas de los cultivos de *daphnias*, los individuos no se alimentaron durante la prueba. Las concentraciones que se probaron provienen de las de los filtrados: 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, el resto fue completado con agua de dilución o medio para dáfnidos. La determinación del

CL₅₀ se realizó empleando el Probit como programa estadístico. Se distribuyeron 25 individuos para cada concentración. Se condujeron ensayos de toxicidad aguda estático en oscuridad, la mortalidad fue evaluada en 6, 12, 24 y 48 horas de exposición.

2.3. Evaluación Ecotoxicológica en condiciones de laboratorio

Se evaluaron cinco concentraciones más el control, con cuatro repeticiones, para cada pesticida en estudio y la mezcla de ambos (metamidofos, clorpirifos, metamidofos + clorpirifos). Con los resultados de los test preliminares, se definieron las concentraciones a evaluar de los insecticidas, estos son los siguientes:

Los experimentos se realizaron con individuos juveniles de menos de 48 horas de edad, obtenidas de las hembras partenogénicas de los cultivos masivos, los individuos no se alimentaron durante la prueba. Se distribuyeron 25 individuos para cada concentración. Se condujeron ensayos de toxicidad aguda estático en oscuridad, la mortalidad fue evaluada en 6, 12, 24 y 48 horas de exposición.

Tabla 2. Concentraciones de los pesticidas en *Daphnia magna*.

Insecticidas	Tratamientos					
	Control	C1 (ug/L)	C2 (ug/L)	C3 (ug/L)	C4 (ug/L)	C5 (ug/L)
Metamidofos	Agua de dilución	0.1	1	5	10	15
Clorpirifos	Agua de dilución	0.1	1	5	10	15
Metamidofos + Clorpirifos	Agua de dilución	0.1	1	5	10	15

2.4. Determinación de la Concentración Ambiental Esperada CEE

Para determinar la CEE en medio acuático se empleará el programa GENECC versión 1.3 de la USEPA. El modelo es usado para calcular la concentración ambiental esperada para un ambiente acuático genérico que se encuentra adyacente a un campo agrícola (16). El programa determinó la máxima concentración ambiental esperada del pesticida para un ambiente acuático para 4 días, 21 días y 56 días.

2.5. Evaluación del Riesgo Ambiental

Con los resultados de toxicidad aguda (CL₅₀) a 48 horas de exposición y con los niveles de exposición o concentraciones ambientales esperadas (CEEs), se determinó los coeficientes de riesgo (RQ), dividiendo la Concentración Ambiental Esperada por la Toxicidad a 48 horas de exposición, este valor se

compara con el Nivel Crítico (LOC), siendo este valor 0.5 propuesto por la EPA para ensayos agudos con invertebrados. Si RQ > LOC existe riesgo ambiental.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del suelo

El suelo agrícola de la localidad de Carapongo como se observa en la tabla 3, presenta una clase textural del tipo Franco y tiene mayor proporción de arena y menor proporción de arcilla. El pH tiende a ser neutro y según el resultado de Conductividad eléctrica (C.E), este suelo es ligeramente salino. Así mismo otro dato importante es el contenido de Materia Orgánica el cual es media a bajo. El valor de CIC fue de 13.92, siendo este bajo y se puede deber a la predominancia de arena en el suelo.

Tabla 3. Caracterización del suelo agrícola de la localidad de Carapongo.

Clase Textural	pH	C. E	CaCO ₃ (%)	M.O (%)	P (ppm)	K (ppm)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	CIC (cmol+/KgSuelo)
Franco	6.7	1.79	0.60	2.5	42.0	111	48	36	16	13.92

De la prueba cualitativa por cromatografía de capa fina se observa la presencia de pesticidas

organofosforados al ser revelados utilizando azul de bromofenol como se observa en la Figura 4.

Figura 4. Identificación cualitativa de pesticidas organofosforados

3.2. Evaluación Ecotoxicológica en suelos agrícolas contaminados

El porcentaje de muertos de *Daphnia magna*, al ser expuestos a porcentajes de filtrado proveniente de suelo agrícola contaminado por el pesticida Metamidofos. A 24 y 48 horas de exposición se registraron mortalidades debido al efecto del pesticida en todos los niveles. La mortalidad aumentó conforme aumentaron las

concentraciones, se presentó mortalidad mayor a 50% a partir del tercer nivel y se registraron mortalidades al 100% en los dos últimos niveles. El control presentó 4% y 10% de individuos muertos para las exposiciones a 24 y 48 horas respectivamente, esto se puede deber a que los individuos no se encontraron bien adaptados al medio. La CL_{50} fue de 8.19 % y de 7.02% para las exposiciones de 24 y 48 horas del filtrado, tal como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de muertos de *Daphnia magna*, expuestos al filtrado producido por suelo agrícola contaminado por el pesticida Metamidofos.

Concentración (%)	24 horas					48 horas				
	R1	R2	R3	Promedio	Desv. Est	R1	R2	R3	Promedio	Desv. Est
0	4	0	0	1.3	2.3	8	0	0	2.7	4.6
6.5	40	32	24	32.0	8.0	60	48	40	49.3	10.1
12.25	72	64	60	65.3	6.1	88	80	68	78.7	10.1
25	80	92	96	89.3	8.3	100	100	100	100.0	0.0
50	100	100	100	100.0	0.0	100	100	100	100.0	0.0
100	100	100	100	100.0	0.0	100	100	100	100.0	0.0
CL_{50}	8.63	9.24	6.71	8.19		6.05	6.93	8.09	7.02	

La figura 5 presenta la curva Dosis-Respuesta del filtrado proveniente del suelo contaminado por el pesticida metamidofos en *Daphnia*. Las curvas para este caso indican el mayor poder tóxico del filtrado a 48 horas de exposición.

3.3. Análisis de Parámetros Toxicológicos en condiciones de laboratorios

La toxicidad de los pesticidas metamidofos, clorpirifos y la mezcla de estos dos, fueron mayores al incrementar el tiempo de exposición como se observa en la tabla 5.

La figura 6, 7 y 8 nos presenta la curva dosis-respuesta de las *daphnias* expuestas a los pesticidas metamidofos, clorpirifos y mezcla de ambos respectivamente, se puede apreciar el aumento de la mortalidad de los individuos conforme aumenta la concentración de los pesticidas, así mismo a mayor tiempo de exposición del tóxico sobre la especie test el efecto tóxico se incrementa, por lo tanto la CL_{50} es menor a 48 horas con respecto a todos los intervalos de exposición, indicando de esta manera el efecto tóxico de los pesticidas.

Figura 5. Curva Dosis-Respuesta del filtrado proveniente de suelo contaminado con el pesticida metamidofos sobre *Daphnia magna*.

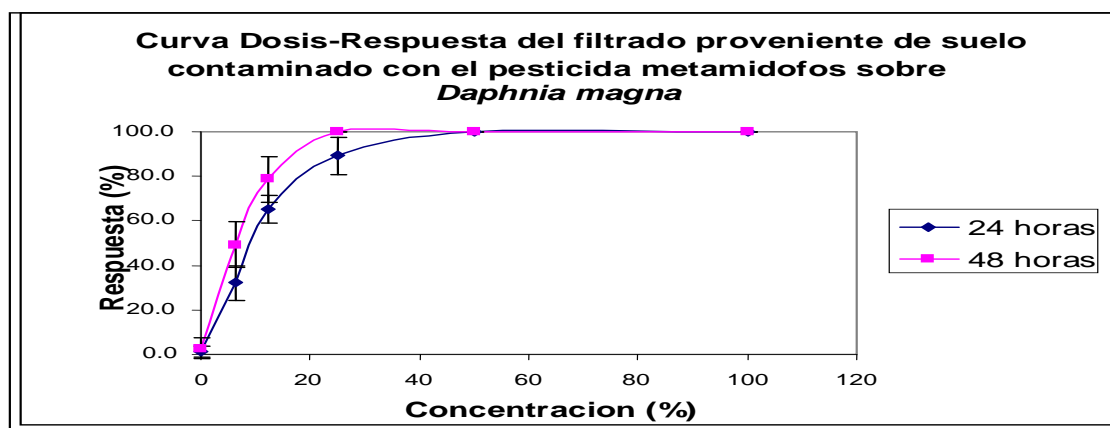


Tabla 5. Toxicidad aguda de los pesticidas metamidofos y clorpirifos a diferentes tiempos de exposición.

Toxicidad aguda CL ₅₀ (µg/L)	Tiempo de Exposición			
	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Metamidofos	8.00	2.90	0.10	0.05
Clorpirifos	7.03	1.15	0.15	0.06
Metamidofos + Clorpirifos	4.79	0.50	0.052	0.02

Figura 6. Curva Dosis-Respuesta Cuantales del Metamidofos en *Daphnia magna* a diferentes tiempos de exposición.

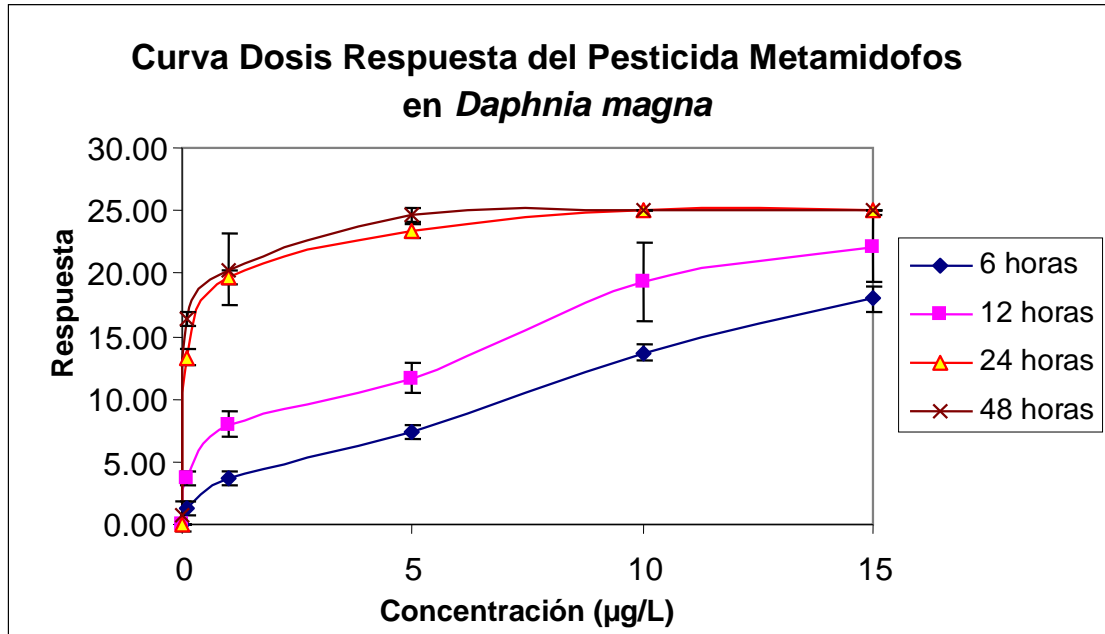


Figura 7. Curva Dosis-Respuesta Cuantales del Clorpirifos en *Daphnia magna* a diferentes tiempos de exposición.

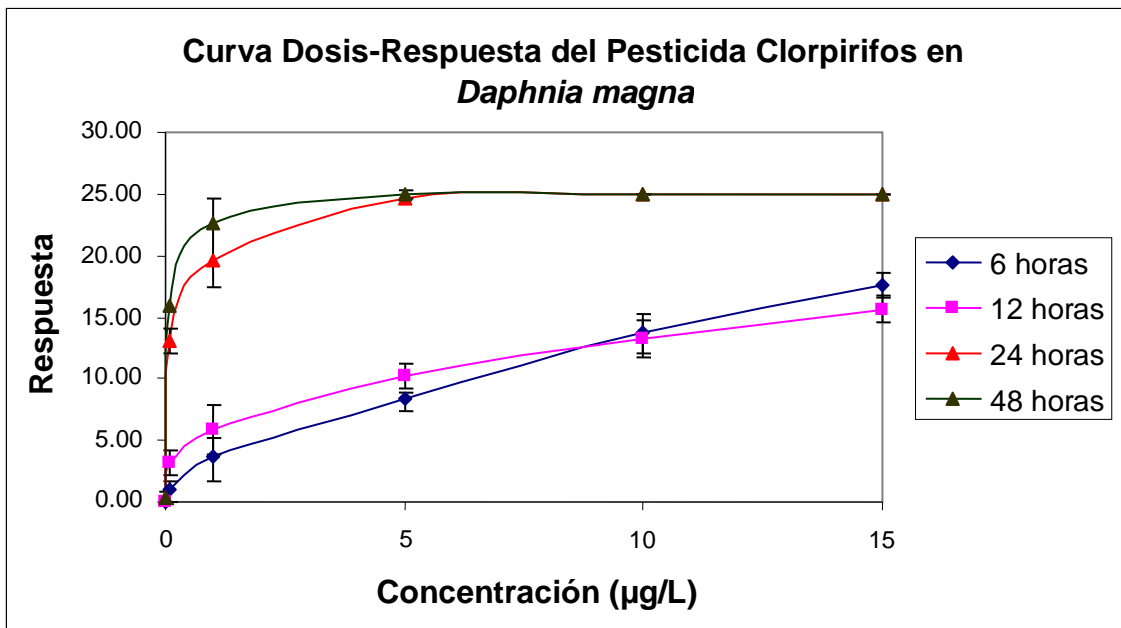
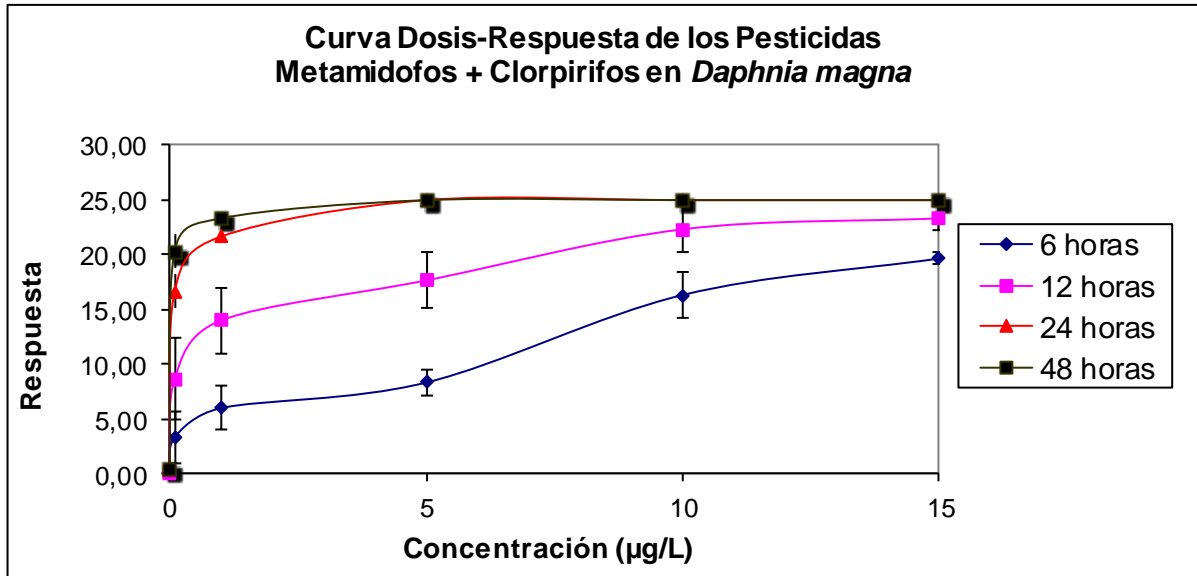


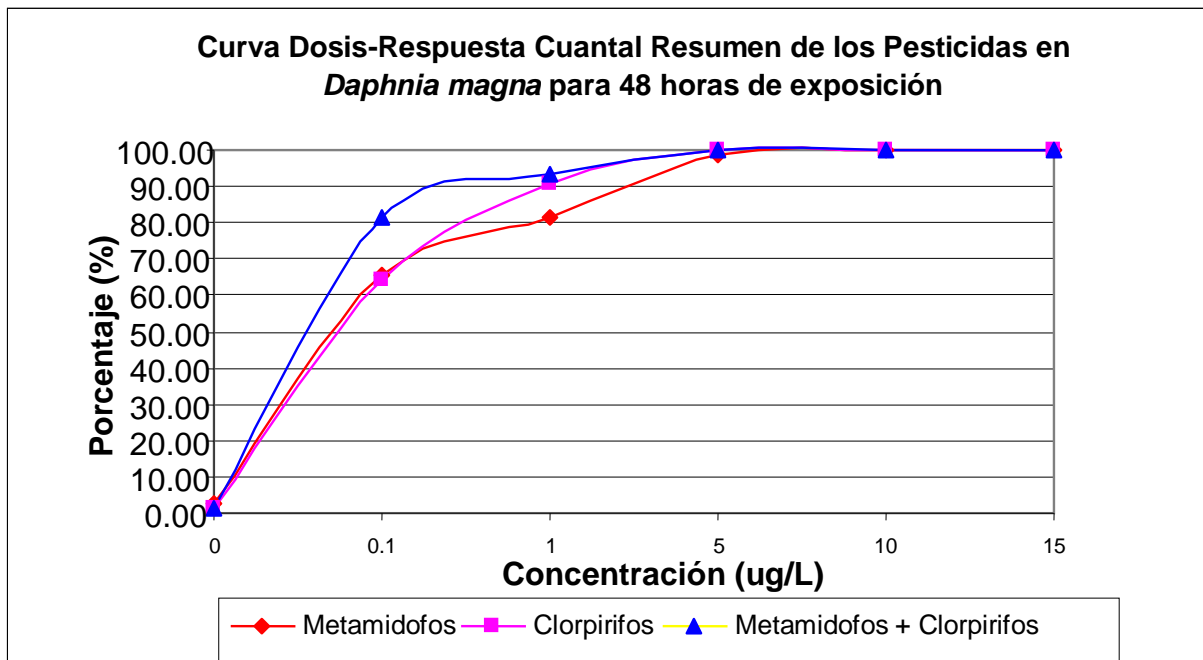
Figura 8. Curva Dosis-Respuesta Cuantal del Metamidofos + Clorpirifos en *Daphnia magna* a diferentes tiempos de exposición.



De los datos de la tabla 5 se observa al evaluar la mezcla de los pesticidas Metamidofos y Clorpirifos, existe un efecto sinérgico entre ellos, como se puede

observar en la figura 9, la toxicidad de la mezcla está a la derecha y su valor de CL50 es menor al de los pesticidas puros.

Figura 9. Curva Dosis-Respuesta Resumen de los Plaguicidas en estudio en *Daphnia magna* para 48 horas de exposición.



3.4. Concentración Ambiental Esperada CEE
 Conociendo la cantidad de pesticida liberado al ambiente, el tipo de cultivo regado, la solubilidad del pesticida, las constantes de distribución suelo y agua (Kd), las constantes de degradación por hidrólisis,

fotólisis y metabólicas, además aplicando el programa GEENEC, se estima la cantidad de pesticida presente en el agua, los resultados de esta aplicación se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores estimados en el agua ($\mu\text{g/L}$) por el GEENEC versión 1.3.

Pesticida	Cantidad liberada en el campo Kg/Ha	Valores estimados en el agua por el GEENEC ($\mu\text{g/L}$)			
		Pico máximo	Promedio 4 días	Promedio 21 días	Promedio 56 días
Metamidofos	1.27	7.88	7.24	4.59	2.49
Clorpirifos	1.07	14.26	9.88	2.98	1.15

Como se puede observar en la tabla 6, el clorpirifos alcanza una mayor concentración $7.88 \mu\text{g/L}$ en el agua a las 48 horas de ser aplicado al campo.

3.5. Determinación del riesgo ambiental

La evaluación del riesgo ambiental del metamidofos y clorpirifos presentaron un alto riesgo a nivel del ambiente acuático, pues los cocientes de riesgo (RQ) fueron muy altos en comparación al nivel crítico (LOC), como se observa en la tabla 10.

Tabla 10. Coeficientes para la determinación del Riesgo Ambiental.

Pesticidas	Efecto Agudo	Toxicidad 48 horas	Exposición	RQ	LOC	Riesgo
Metamidofos	CL_{50} ($\mu\text{g/L}$)	0.049	7.88	160.816	0.5	Si
Clorpirifos		0.057	14.26	250.175	0.5	Si

4. Conclusiones

La evaluación ecotoxicológica de los pesticidas en el filtrado de un suelo saturado presento un valor de CL_{50} de 7.02 % al ser evaluado sobre *daphnias*, esto nos indica que es muy tóxico para la vida acuática. La presencia de los pesticidas Metamidofos y Clorpirifos en el agua generan un efecto sinérgico, incrementando la ecotoxicidad sobre las especies acuáticas. Al realizar comparación entre la estimación de la concentración ambientalmente esperada en el agua con el GEENEC, la toxicidad de los pesticidas y el nivel crítico se concluye que el uso de los pesticidas metamidofos y clorpirifos en las cantidades actualmente utilizadas en la localidad de Carapongo presenta riesgo ambiental, sobre las especies acuáticas.

5. Referencias bibliográficas

- Iannacone O. José, Alvarino Lorena F. Julio 2002. Evaluación del Riesgo Ambiental del Insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. Perú. Agricultura Técnica 62. pp. 362-374.
- Programa APGEP-SENREM. 2002. Propuesta participativa para el fortalecimiento de políticas y Marco Normativas sobre plaguicidas químicos en el Perú. Documento de Sistematización. Perú. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos (RAAA). pp 65-85.
- Obiols J. Plaguicidas Organofosforados I: Aspectos generales y toxicocinética. Instituto Nacional de Seguridad e higiene en el trabajo. España.2002. Pag 5-7.
- Bayer CropScience, Productos Fitosanitarios, Hoja de datos de seguridad para transporte. Disponible en www.cropscience.com, Octubre 2002.
- Syslo S., Davy M. January 1998. Methamidophos: Revision of Efed Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Decision (RED) Document to Include Registrant's Comments. United States Environmental Protection Agency. Pp. 54-78.
- Hernández G., Espinoza O. E., Julio 1987. Manual de Bioensayos con Microorganismos Cladóceros. Dirección General de Prevención y control de la Contaminación Ambiental-Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Medio Ambiente. México. pp 44.
- Tortorelli, M. y Hernández, D. 1995. Calidad de Agua de un Ambiente Acuático Sometido a Efluentes Contaminantes. Ecosistemas de Aguas Continentales. Tomo I. Ediciones Sur. La Plata – Argentina. 217-230.
- Martinez Y. P., Osorio J. 1995. Análisis Probit. Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío Vol 4, N° 12. Universidad del Quidío, Armenia, Colombia.
- Rodríguez J., Esclapés M., 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. PDVSA. Venezuela Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/clado/clado.shtml>
- U.S. Environmental Protection Agency. Overview of the Ecological Risk Assessment Process in the Office of Pesticida Programs. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Office of Pesticida Programs Washington D.C. Enero 2004.
- Milla C. O. M., Palomino H. W. R., Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis Químico Farmacéutico, UNMSM, 2003.
- Burga P. K.F., Evaluación Toxicológica de los Insecticidas Metamidofos y Clorpirifos en Ensayos con *Daphnia magna* y *Porcellio laevis*. Tesis Ingeniero Ambiental, UNALM, 2006.
- Visitación L., Palma J. C., Reyes M., Ensayos de laboratorio de ecotoxicología. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2005.
- Greenberg, A.E.; Clesceri, L.S.; Eaton, A.D. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water 20th Edition 1998.

Hanks R.J., Ashcroft G.L., Applied soil physics. Springer Verlag, New York, USA 1980.
Parker, R.D., and P.D. Rieder. 1995. Geneec The Generic Expected Environmental Concentration Program. Users Manual. Environmental Fate and Effects, Division Office of Pesticide Programs. USEPA.

Iannacone. José, Alvariño Lorena. 2000. "Chironomus callygraphus goeldo y Moina Macrocopa (SARS) como herramienta ecotoxicológica para la evaluación del lindano y clorpirifos". Perú. Bol. Soc. Biol. Concepción. Chile. Tomo 71. pp 33-39.