

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE AGUAS CONTAMINADAS
CON GLIFOSATO A PARTIR DE LOS BIOINDICADORES *Daphnia
magna* y *Artemia salina***

**PROYECTO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

LUIS FABIÁN HUARACAHUARACA
luis.huaraca@epn.edu.ec

DIRECTOR: Dra. CRISTINA ALEJANDRA VILLAMAR AYALA
cristina.villamar@epn.edu.ec

CO DIRECTOR: Msc. MARÍA BELÉN ALDÁS
maria.aldas@epn.edu.ec

Quito, Diciembre 2017

DECLARACIÓN

Yo, Luis Fabián Huaraca Huaraca, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluye en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Luis Fabián Huaraca Huaraca

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Luis Fabián Huaraca Huaraca, bajo nuestra supervisión.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes me han brindado apoyo incondicional a lo largo de la carrera y se han convertido en un ejemplo de vida.

A la Dra. Alejandra Villamar, Directora del Proyecto, quien ha depositado su confianza en mis capacidades para el desarrollo del presente trabajo, con sus consejos, dirección y apoyo se ha convertido en un referente y ejemplo a seguir.

A la Msc. María Belén Aldás, co directora del proyecto, quien con su colaboración y respaldo ha hecho posible la culminación del presente documento.

A los profesionales de la Universidad de Concepción: Dra. Soledad Chamorro, Dr. Victor Hernandez, químico analista Sergio Triviño y Jeannett Silva por todo su apoyo en la realización de la estancia de investigación en Chile, para mi significó un crecimiento personal y académico invaluable el haber trabajado con profesionales de primer nivel.

A las personas involucradas en el proyecto Dr. Patricio Espinoza, Msc. Verónica Carrera, Msc. Bernardo Castro, Grupo de Investigación Tecnología Ambiental (GITA) y al Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) por todo su apoyo y recomendaciones a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos, gracias por tantos momentos de locuras y diversiones.

DEDICATORIA

A mi familia, amigos y profesores

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN.....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
PRESENTACIÓN.....	XV
CAPÍTULO 1.....	16
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 ANTECEDENTES.....	16
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	18
1.3 ALCANCE.....	19
1.4 OBJETIVOS.....	20
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPÍTULO 2.....	21
MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Usos y características del glifosato.....	21
2.2 Mecanismos de acción sobre las plantas.....	22
2.3 Propiedades fisico-químicas y ambientales del glifosato.....	24
2.4 Propiedades químicas y ambientales de metabolitos procedentes del glifosato.....	26
2.4.1 Metabolitos del glifosato: ácido aminometilfosfónico (AMPA).....	26
2.4.2 Coadyuvantes en formulaciones comerciales.....	28
2.5 Destino ambiental del glifosato.....	31

2.6 Clasificación ecotoxicológica	33
2.6.1 Clasificación ecotoxicológica del glifosato	33
2.6.2 Características tóxicas del AMPA	34
2.7 Toxicidad en ecosistemas acuáticos	35
2.7.1 Toxicidad aguda	35
2.7.2 Toxicidad crónica	35
2.7.3 Distribución de contaminantes en ecosistemas acuáticos	35
2.7.4 Productores primarios	37
2.7.5 Consumidores primarios	38
2.7.6 Consumidores secundarios	38
2.7.7 Organismos detritívoros	39
2.8 Bioensayos ecotoxicológicos.....	39
2.8.1 Generalidades.....	39
2.8.2 Biodinadores utilizados en ensayos ecotoxicológicos.....	41
2.8.3 <i>Daphnia magna</i>	42
2.8.4 <i>Artemia salina</i>	46
CAPÍTULO 3	51
MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Herbicida objeto de estudio	51
3.2 Ensayos de ecotoxicidad.....	52
3.2.1 <i>Daphnia magna</i>	52
3.2.1 <i>Artemia salina</i>	55
3.3 Análisis analítico	58
3.3.1 Análisis cromatográfico del glifosato	58
3.3.2 Análisis cromatográfico del glifosato en ambiente dulce y salino	61
3.4 Análisis de los datos.....	61
3.4.1 Toxicidad Aguda	61

3.4.2 Toxicidad sub letal	61
CAPÍTULO 4	63
4.1 Análisis cromatográfico del herbicida comercial GLIFOPAC.....	63
4.1.1 Identificación de sustancias coadyuvantes.....	63
4.2 Estudios ecotoxicológicos del herbicida comercial GLIFOPAC sobre	75
<i>D. magna</i> y <i>A. salina</i>	75
4.2.1 Estudio de toxicidad aguda <i>D. magna</i>	75
4.2.2 Estudio de toxicidad sub letal del herbicida comercial GLIFOPAC sobre <i>D. magna</i>	77
4.2.3 Estudio de toxicidad aguda sobre <i>A. salina</i>	84
4.3 Correlación de metabolitos identificados y ensayo de toxicidad aguda sobre <i>D.</i> <i>magna</i> y <i>A.salina</i>	87
4.3.1 Análisis cromatográfico del glifosato en medios dulce y salino.....	87
CAPÍTULO 5	93
5.1 Conclusiones	93
5.2 Recomendaciones	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS.....	105
ANEXO 1	106
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>D. magna</i>	106
ANEXO 2.....	108
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE <i>D. magna</i> (SUPERVIVENCIA)	108
ANEXO 3.....	110
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE <i>D.magna</i> (REPRODUCCIÓN).....	110
ANEXO 4.....	112
PROMEDIOS DE LOS DATOS DE TOXICIDAD SUB LETAL	112
ANEXO 5.....	114
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>Artemia salina</i>	114

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 DOSIS RECOMENDADAS PARA LA UTILIZACIÓN DE GLIFOSATO	.22
TABLA 2 TASA MUNDIAL DE USO DEL GLIFOSATO22
TABLA 3 PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS DEL GLIFOSATO26
TABLA 4 PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS DEL AMPA27
TABLA 5 FORMULACIONES COMERCIALES DE GLIFOSATO EN EL ECUADOR29
TABLA 6 CLASIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES RECOMENDADA POR LA OMS33
TABLA 7 RELACIÓN DE Kow Y BIOACUMULACIÓN37
TABLA 8 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>D. magna</i>42
TABLA 9 PARÁMETROS IDEALES PARA <i>D. magna</i>45
TABLA 10 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Artemia</i>47
TABLA 11 CONDICIONES DEL BIOENSAYO CON <i>D. magna</i>54
TABLA 12 PARÁMETRO DE CULTIVO DE <i>A. salina</i>56
TABLA 13 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN ACETATO DE ETILO65
TABLA 14 SEÑALES IDENTIFICADOS EN ACETONITRILO72
TABLA 15 COADYUVANTES CUYA ESTRUCTURA ES SIMILAR A LAS DETECTADAS Y SON IDENTIFICADOS CON PATENTE74
TABLA 16 DATOS DE CONCENTRACIONES LETALES PARA <i>D. magna</i>76
TABLA 17 TABLA ANOVA (CAMADAS POR HEMBRA)79
TABLA 18 TEST DE DUNNETS (NÚMERO DE CAMADAS POR HEMBRA)80
TABLA 19 TABLA ANOVA (TAMAÑO DE CAMADA)81
TABLA 20 TEST DE DUNNETTS (TAMAÑO DE CAMADA)81
TABLA 21 TEST DE DUNNETTS (NEONATOS TOTALES POR <i>D. magna</i>)83
TABLA 22 TEST DE DUNNETTS (PRIMERA CAMADA)84
TABLA 23 DATOS DE CONCENTRACIONES LETALES PARA <i>A. salina</i>85
TABLA 24 TOXICIDAD (AGUDA Y SUB-LETAL) DEL HERBICIDA SOBRE LOS BIOINDICADORES ENSAYADOS86
TABLA 25 AFINIDAD DE LAS SUSTANCIAS EN FUNCIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS90

TABLA 26 RELACIÓN DE BCF Y AFINIDAD.....	90
TABLA 27 CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS DE LOS COADYUVANTES IDENTIFICADOS	91
TABLA 28 RELACIÓN CUALITATIVA DE LOS COADYUDANTES Y LA AFINIDAD EN EL AMBIENTE.....	92
TABLA 29 DATOS DE TOXICIDAD (CL ₅₀ - 48H) PARA COADYUVANTES BIODISPONIBLES EN AMBIENTES ACUÁTICOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 INHIBICIÓN EN LA SÍNTESIS DE LA EPSPS	23
FIGURA 2 N - FOSFONOMETIL GLICINA (GLIFOSATO)	24
FIGURA 3 METABOLITOS DEL GLIFOSATO	27
FIGURA 4 EFECTO DE LOS SURFACTANTES EN LAS HOJAS	29
FIGURA 5 DESTINO AMBIENTAL DEL GLIFOSATO.....	32
FIGURA 6 BIODISPONIBILIDAD DE CONTAMINANTES EN AMBIENTES ACUÁTICOS	36
FIGURA 7 RELEVANCIA ECOLÓGICA Y SENSIBILIDAD A LOS CONTAMINANTES EN ESCALA BIOLÓGICA.....	40
FIGURA 8 MORFOLOGÍA DE <i>D. magna</i>	43
FIGURA 9 CICLO REPRODUCTIVO DE <i>D. magna</i>	44
FIGURA 10 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Artemia</i>	48
FIGURA 11 CICLO REPRODUCTIVO DE <i>Artemia</i>	49
FIGURA 12 FORMULADO COMERCIAL GLIFOPAC	51
FIGURA 13 PREPARACIÓN DE AGUA RECONSTITUIDA	52
FIGURA 14 LIMPIEZA DE CULTIVOS DE <i>D. magna</i>	53
FIGURA 15 ALIMENTACIÓN DE <i>D. magna</i>	53
FIGURA 16 HIDRATACIÓN DE QUISTES DE <i>Artemia</i>	56
FIGURA 17 ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>Artemia</i>	57
FIGURA 18 EXTRACCIÓN DE GLIFOSATO Y EMULSIFICANTES	58
FIGURA 19 SECADO DE LA MUESTRA DE GLIFOSATO.....	59
FIGURA 20 REACCIONES QUÍMICAS DEL GLIFOSATO Y EL BSTFA.....	59
FIGURA 21 INYECCIÓN DEL GLIFOSATO EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES	60
FIGURA 22 CROMATOGRAMAS PARA LOS DOS MEDIOS DERIVATIZANTES	64
FIGURA 23 CURVA DOSIS-RESPUESTA <i>D. magna</i> EXPUESTA A GLIFOSATO	76
FIGURA 24 SUPERVIVENCIA DE <i>D. magna</i> A 21 DÍAS	78
FIGURA 25 NÚMERO DE CAMADAS POR <i>D. magna</i>	79

FIGURA 26 TAMAÑO DE CAMADA POR <i>D. magna</i>	80
FIGURA 27 NEONATOS TOTALES POR HEMBRA.....	82
FIGURA 28 PRIMERA CAMADA	83
FIGURA 29 CRUVA DOSIS - RESPUESTA PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>Artemia</i>	85
FIGURA 30 COMPARACIÓN GRÁFICA DEL GLIFOSATO Y EL MEDIO SALINO.....	88
FIGURA 31 COMPARACIÓN GRÁFICA DEL MEDIO DULCE MEDIO SALINO ..	88
FIGURA 32 GLIFOSATO EN MEDIO SALINO	89
FIGURA 33 GLIFOSATO EN MEDIO DULCE	89

RESUMEN

Herbicidas a base de glifosato se han utilizado desde 1974, siendo el principal herbicida utilizado a nivel mundial. En el Ecuador, se han registrado alrededor de 38 marcas comerciales de herbicidas a base de glifosato y existe relativamente poca información acerca de su formulación. Aunque el efecto directo de este contaminante se da a nivel vegetal, las nuevas formulaciones y metabolitos generados durante su degradación son potenciales contaminantes de ecosistemas acuáticos. Por lo tanto, la presente investigación contempla un estudio comparativo ecotoxicológico para el herbicida comercial GLIFOPAC (480 g.L⁻¹ de ingrediente activo o a.i) de mayor demanda en el Ecuador, en los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*.

La metodología se basó en ensayos agudos y crónicos en *D. magna* (LC₅₀-48 h, reproducción y crecimiento) y *A. salina* (LC₅₀ - 48h). Las concentraciones en las que se estudió el efecto ecotoxicológico de ambos organismos osciló entre 0,8 a 490 mg a.i.L⁻¹. La relación del efecto tóxico en organismos de agua dulce y marina respecto al componente del glifosato sospechoso de toxicidad, se determinó por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los resultados establecieron que la toxicidad aguda en *D. magna* y *A. salina* corresponden a concentraciones de 27,4 y 70,4 mg a.i.L⁻¹ respectivamente. Respecto a toxicidad sub-letal en *D. magna* se pudo establecer afectaciones a nivel reproductivo (frecuencia y número de neonatos) a concentraciones de NOEC y LOEC de 0,8 y 3,6 mg a.i.L⁻¹, respectivamente. El análisis cromatográfico determinó la presencia de alrededor de 45 sustancias como coadyuvantes, entre las cuales destacan cadenas alifáticas con grupos ésteres y éteres, además se identificó la presencia de ciclos glucofuranosa, glucopiranosida y galactopiranosida. De tal manera que en este trabajo se pudo establecer relación entre la posible formación de distintas sustancias ó metabolitos a concentraciones diferentes dependiendo de cada medio (salino ó dulce) en la toxicidad de organismos acuáticos.

ABSTRACT

Herbicides based on glyphosate have been used since 1974, which is the main herbicide used worldwide. In Ecuador, around 38 commercial herbicides glyphosate-based have been registered and there is relatively little information about the formulation. Although the direct effect of this pollutant is at the vegetal level, the new formulations and metabolites generated during the natural degradation are potential contaminants of aquatic ecosystems. Therefore, the present investigation contemplates a comparative ecotoxicological study for the commercial herbicide GLIFOPAC (480 g.L⁻¹ of active ingredient) which is the greatest demand in Ecuador on two bioindicators *Daphnia magna* and *Artemia salina*.

The methodology was based on acute and chronic tests on *D. magna* (LC₅₀-48 h, reproduction and growth) and *A. salina* (LC₅₀-48 h). The concentrations in which the ecotoxicological effect of both organisms was studied ranged from 0.8 to 490 mg a.i.L⁻¹ of the active ingredient. The relationship of the toxic effect in freshwater and marine organisms with respect to the glyphosate component suspected of toxicity was determined by gas chromatography and mass spectrometry. The results established that acute toxicity on *D. magna* and *A. salina* was reached at concentrations of 27.4 and 70.4 mg.L⁻¹ of active ingredient, respectively. Regarding to sub-lethal toxicity in *D. magna*, reproductive level affectations (frequency and number of neonates) could be established to concentrations of NOEC and LOEC of 0.8 and 3.6 mg a.i.L⁻¹, respectively. The chromatographic analysis determined the presence of about 45 substances such as coadjuvants, among which are aliphatic chains with esters and ethers groups. In addition, the presence of glucofuranose, glucopyranoside and galactopyranose cycles were identified. Therefore, in this work it was possible to establish a relationship between the possible formation of different substances or metabolites at different concentrations depending on each medium (marine or freshwater) in the toxicity of aquatic organisms.

PRESENTACIÓN

El presente documento constituye un estudio ecotoxicológico del herbicida comercial “GLIFOPAC” utilizando los bioindicadores *D.magna* y *A. salina*. Para lo cual se ha considerado 5 capítulos, como se detalla a continuación.

El Capítulo I de introducción contempla: los antecedentes, la justificación, el alcance y los objetivos planteados en el estudio

El Capítulo II de revisión bibliográfica (marco teórico) contempla: las características físico – químicas del glifosato, así como la influencia de sustancias coadyuvantes usados en formulaciones comerciales sobre el potencial ecotóxicológico enfocado en ambientes acuáticos, así mismo, se aborda la morfología e importancia de los bioindicadores (*D. magna* y *A. salina*) en los estudios de ecotoxicología moderna.

En el Capítulo III de desarrollo experimental, se detalla la metodología utilizada para el cultivo, mantenimiento y realización de los ensayos ecotoxicológicos del herbicida GLIFOPAC sobre los bioindicadores *D. magna* y *A. salina*. Por otro lado se describe la metodología utilizada para caracterizar químicamente el herbicida GLIFOPAC, mediante ensayos de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas.

El Capítulo IV de resultados y discusión, presenta y evalúa los resultados obtenidos de la evaluación ecotoxicológica del GLIFOPAC sobre *D. magna* y *A. salina*, así mismo se muestra las sustancias coadyuvantes identificadas.

Finalmente, en el Capítulo V de conclusiones y recomendaciones, se incluyen las conclusiones a fin de cumplir los objetivos planteados y las recomendaciones para trabajos futuros.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El glifosato es el séptimo ingrediente activo más usado a nivel mundial con el que se ha desarrollado más de 750 agroquímicos (Rodrigues et al., 2008). De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental (por sus siglas en inglés, EPA), las tasas de uso del glifosato han incrementado un 20% anual, debido al desarrollo de especies vegetales transgénicas (Salazar et al., 2011). Este compuesto es no selectivo, de amplio espectro y sistémico en tratamientos de post emergencia del follaje, malezas no deseables, hierba de hoja ancha y especies leñosas (Santos and Sánchez, 2006; Arregui et al., 2010). Los mecanismos de acción ecotóxicos sobre plantas invasivas, están vinculados con la inhibición enzimática de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), la cual bloquea la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, tirosina) en las plantas (Rodrigues et al., 2016).

El glifosato es una sal isopropilamínica de la N- fosfometil glicina ($C_3H_8NO_5P$) (Varona et al., 2009). Dentro de sus características físico-químicas (ambientales) que le confieren potencial ecotóxico, está la solubilidad media en agua ($15,7 \text{ g.L}^{-1}$ a 25°C) y su alta afinidad por el suelo (coeficiente de partición octanol-carbono orgánico o K_{oc} entre 2 a 4,7) (Mackay et al., 2006). No obstante, el glifosato tiene poca volatilidad ($0,0131 \text{ mPa}$ a 25°C) y baja afinidad con el tejido adiposo (coeficiente de partición octanol-agua o $\log K_{ow}$ entre -2,9 a -3,4) (Mackay et al., 2016). Por lo tanto, en el ambiente y una vez esparcido en áreas agrícolas, éste es adsorbido por el suelo donde sufre degradación microbológica y la formación de ácido aminometilfosfónico (AMPA), glicina y sarcosina (Dick and Quinn, 1995). El AMPA (aprox. 70%), es el principal metabolito formado de esta degradación y se han registrado efectos tóxicos mayores por ingesta en humanos adultos (intoxicación por 125 mg.kg^{-1} día de glifosato y 5 mg.kg^{-1} día de AMPA) (Bai and Ogboone, 2016). Algunos estudios,

han detectado la presencia de glifosato y AMPA en suelos arcillosos con tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de 154 y 98 días, respectivamente (Degenhardt, 2012). Esta condición favorece el arrastre por escorrentía de estos compuestos, a cuerpos de agua superficiales (Varona et al., 2009). En zonas tropicales (Colombia) se ha reportado la presencia de glifosato y AMPA en ríos cercanos a plantaciones ilícitas, con concentraciones del orden de 3,6 y 4,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (Rodríguez et al., 2002).

Los estudios ecotoxicológicos, son necesarios para evaluar los efectos tóxicos totales sobre la biota acuática, especialmente los que se llevan a cabo a nivel de organismo que permiten obtener una respuesta adecuada (minutos a días) y relevancia ecológica (extrapolación trófica) (Romero and Cantú, 2008). Este tipo de análisis, permite evidenciar efectos en el ambiente de contaminantes a corto plazo (agudo-mortalidad) y mediano-largo plazo (crónico-enfermedad). *Daphnia magna*, es el micro crustáceo dulceacuícola más utilizado en sistemas acuáticos, debido a la importancia ecológica que cumple en la comunidad zoo planctónica, facilidad de cultivo en laboratorio, ciclo de vida corto (menor 1 año) y sensibilidad a numerosos compuestos químicos (Martins et al., 2007). Estudios de glifosato grado técnico, reportan valores preliminares de toxicidad aguda y crónica en especies de *Daphnia spp.*, cuyos valores comprenden concentraciones de 146 mg.L^{-1} (Lethal Concentration o LC_{50}) y entre 120 mg.L^{-1} (No Observed Effect Concentration - NOEC) a 140 mg.L^{-1} (Lowest Observed Effect Concentration - LOEC), respectivamente (Dominguez, 2008). Por otro lado *Artemia salina*, son camarones pequeños de cuerpo blando y transparentes a la luz que habitan en ambientes de amplios rangos de salinidad desde aguas dulces (salinidades por debajo de 5g.L^{-1}) hasta aguas hipersalinas (200 g.L^{-1}) (Cisneros, 2009; Sanchez and Neira 2005). En bioensayos ecotoxicológicos su empleo es reciente y se ha popularizado debido a que no se necesita mantener un cultivo permanente en laboratorio, los ensayos se realizan con metanauplios (homogeneidad fisiológica) y se dispone comercialmente quistes de *Artemia* en cualquier época del año (Cisneros, 2009). La utilización de *Artemia salina* incluye evaluaciones ecotoxicológicas sobre mezclas de químicos, productos alimenticios y farmacéuticos (Pérez and

Gilling 2001, Sanchez and Neira 2005). Específicamente, estudios de glifosato grado técnico sobre *Artemia salina* no se han registrado.

Es importante señalar que los herbicidas a base de glifosato, pueden contener sustancias surfactantes, solventes y emulsificantes que permiten la absorción del glifosato en la planta y también son tóxicas (Arregui et al., 2010). Estudios realizados en *Daphnia magna*, evidencian mayor toxicidad de herbicidas comerciales como Roundup ($LC_{50} = 5,39 \text{ mg.L}^{-1}$), respecto al glifosato puro ($LC_{50} = 147 \text{ mg.L}^{-1}$) (Martin et al., 2003). La toxicidad crónica de Roundup sobre *Daphnia magna*, ha reportado disminución alométrica (tamaño) de individuos juveniles (NOEC = 0,05, LOEC = 0,45 mg.L^{-1}), reducción de la fecundidad (NOEC = 0,45 LOEC = 1,35 mg.L^{-1}) mortalidad y aborto de huevos (LOEC = 4,05 mg.L^{-1}). Así mismo se han registrado estudios de toxicidad aguda de herbicidas a base de glifosato sobre *Artemia salina*, Roundup ($LC_{50} = 14,19 \text{ mg.L}^{-1}$) y Glifosato AKB (37,53 mg.L^{-1}) (Rodrigues et al., 2008).

Por lo que esta investigación busca evaluar ecotoxicológicamente, usando los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*, aguas contaminadas con glifosato con el fin de establecer la sensibilidad de dichos bioindicadores y determinar la afectación del glifosato en ambientes salinos y de agua dulce.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los potenciales efectos que se derivan del ingreso de sustancias tóxicas en sistemas acuáticos, han motivado el desarrollo de técnicas de evaluación ecotoxicológicas, en el presente estudio se utilizará los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina* para evaluar ecotoxicológicamente al herbicida comercial GLIFOPAC. Dichos bioindicadores, son organismos filtradores (consumidores primarios) que se alimentan de algas microscópicas (Day, 1991). Cuando dichos organismos se exponen a sustancias tóxicas, existe afectación al sistema nervioso central, aparato locomotor y filtrador; por lo tanto, son muy sensibles a micro-contaminantes (Parada, 2014). Los invertebrados acuáticos son la base de transferencia de energía desde productores primarios a consumidores. Las alteraciones causadas por el glifosato sobre este grupo de organismos pueden afectar o interferir en otros

grupos interdependientes de la cadena trófica, condición que permite evidenciar efectos sobre la biota total de ecosistemas acuáticos (Pérez et al., 2010).

Cabe señalar que los bioensayos con invertebrados acuáticos, están estandarizados y son reconocidos por organizaciones internacionales tales como la EPA, Comunidad Económica Europea (por sus siglas en inglés, EEC) y la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (por sus siglas en inglés, OECD) (López, 1996). Finalmente la evaluación ecotoxicológica aplicada sobre aguas contaminadas con glifosato, permite establecer el grado de toxicidad del glifosato en ambientes acuáticos, condición que evidenciará mejoras en la legislación respecto al uso/aplicación de pesticidas en el Ecuador.

1.3 ALCANCE

La presente investigación es de carácter experimental, debido a que los resultados del potencial ecotóxico (agudo y sub-letal) del herbicida comercial GLIFOPAC sobre los bioindicadores *D. magna* y *A. salina* fue a escala laboratorio. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los ensayos realizados, deben considerarse como ideales en ambientes controlados y como aproximaciones en ambientes naturales.

Por otro lado, los ensayos cromatográficos para la identificación de sustancias potencialmente tóxicas procedentes de la formulación de glifosato utilizada, es preliminar por ser de carácter cualitativa. La identificación no incluye la cuantificación, condición que fortalecería la hipótesis de su responsabilidad en la toxicidad. El trabajo busca encontrar una relación cualitativa de la toxicidad del herbicida y las sustancias identificadas en los ensayos cromatográficos. Cabe señalar, que dicha relación se trabajó solo con sustancias identificadas en patentes; por otro lado, el análisis químico de las sustancias identificadas debe constituirse en la idea de investigación posterior que complementarían a lo realizado en este trabajo.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar ecotoxicológicamente aguas contaminadas con glifosato mediante bioensayos de toxicidad sobre los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina* para establecer la afectación del glifosato sobre ambientes acuáticos.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las características ecotoxicológicas inmediatas de aguas contaminadas con glifosato mediante bioensayos de toxicidad aguda (48 horas) sobre los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*, para establecer comparativamente la sensibilidad de dichos bioindicadores.
- Evaluar las características ecotoxicológicas sub letales de aguas contaminadas con glifosato, mediante bioensayos de toxicidad sobre *Daphnia magna* y *Artemia salina* para evaluar efectos a mediano plazo (21 días) sobre dichos bioindicadores.
- Evaluar comparativamente los efectos del glifosato sobre ambientes acuáticos mediante bioensayos de toxicidad aguda y subletal sobre *Daphnia magna* y *Artemia salina*, para evidenciar efectos potenciales tóxicos en ambientes de agua dulce respecto ambientes de agua salobre.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Usos y características del glifosato

El glifosato es un herbicida no selectivo, de amplio espectro y de acción sistémica en tratamientos de post emergencia de follaje, usado para eliminar malezas no deseables, especies leñosas y hierbas de hojas anchas (Santos and Sánchez, 2006; Cárcamo, 2010). Las ventas mundiales durante los últimos 5 años superan las 40000 toneladas de ingrediente activo, representando aproximadamente el 40% del mercado de agroquímicos (Nivia, 2000). Las formulaciones de glifosato se han registrado en alrededor de 100 países y son utilizadas en actividades relacionadas con: cultivos agrícolas, mantenimiento de canales o vías, actividades de jardinería (públicas/privadas), fumigación en plantaciones ilícitas ubicadas en la frontera norte de Ecuador y manejo de bosques sometidos a intervención (Rojas and Fierro, 2008).

A partir de 1974 y durante dos décadas, el glifosato se ha utilizado para eliminar todo tipo de vegetación, pero a partir del desarrollo de cultivos transgénicos en el año de 1996 tales como: soja, maíz y algodón se hizo posible la aplicación en sistemas post emergencia de follaje para control de cultivos (Benbrook et al., 2016). En la actualidad, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) ha autorizado la utilización del glifosato en acciones urbanas, de jardinería y agrícola (Arregui et al., 2010).

Los cultivos agrícolas transgénicos poseen una ruta de la enzima shikimato – sintetasa que no es inhibida por el glifosato (Benbrook et al., 2016). Este herbicida es empleado para limpiar el cultivo, usándose en cualquier etapa del crecimiento, pero generalmente durante la etapa de establecimiento del periodo vegetativo, donde la planta ya tiene hojas para producir la fotosíntesis (Arregui et al., 2010). La Tabla 1 muestra las dosis recomendadas para la aplicación de glifosato en cultivos.

TABLA 1 DOSIS RECOMENDADAS PARA LA UTILIZACIÓN DEL GLIFOSATO

Cultivo	Dosis (L.ha⁻¹)
Cítricos	2,5 – 4
Frutales	1,5 – 4,5
Soja (transgénica)	1,5 – 2,5
Maíz (transgénico)	1,8 – 3,5
Algodón (transgénico)	1,1 – 2,5

Fuente: Arregui (2010)

La aplicación previa a la siembra, se realiza para mejorar las condiciones de emergencia de la planta, donde la dosis recomendada es de 2 a 4 L.ha⁻¹ hasta tres días antes de la siembra (Shawn et al., 2012). La Tabla 2 muestra la tasa de utilización del ingrediente activo del glifosato para aplicaciones agrícolas y no agrícolas durante el periodo 1995 – 2014.

TABLA 2 TASA MUNDIAL DE USO DEL GLIFOSATO

	1995	2000	2005	2010	2012	2014
Uso Glifosato (1000 kg)	67.078	193.485	402.350	652.486	718.600	825.804
Aplicaciones agrícolas	51.078	155.367	339.790	578.124	648.638	746.580
Aplicaciones no agrícolas	16.000	38.118	62.560	74.362	69.962	79.224
Porcentaje agrícolas	76	80	84	89	90	90
Porcentaje no agrícolas	24	20	16	11	10	10

Fuente: Benbrook (2016)

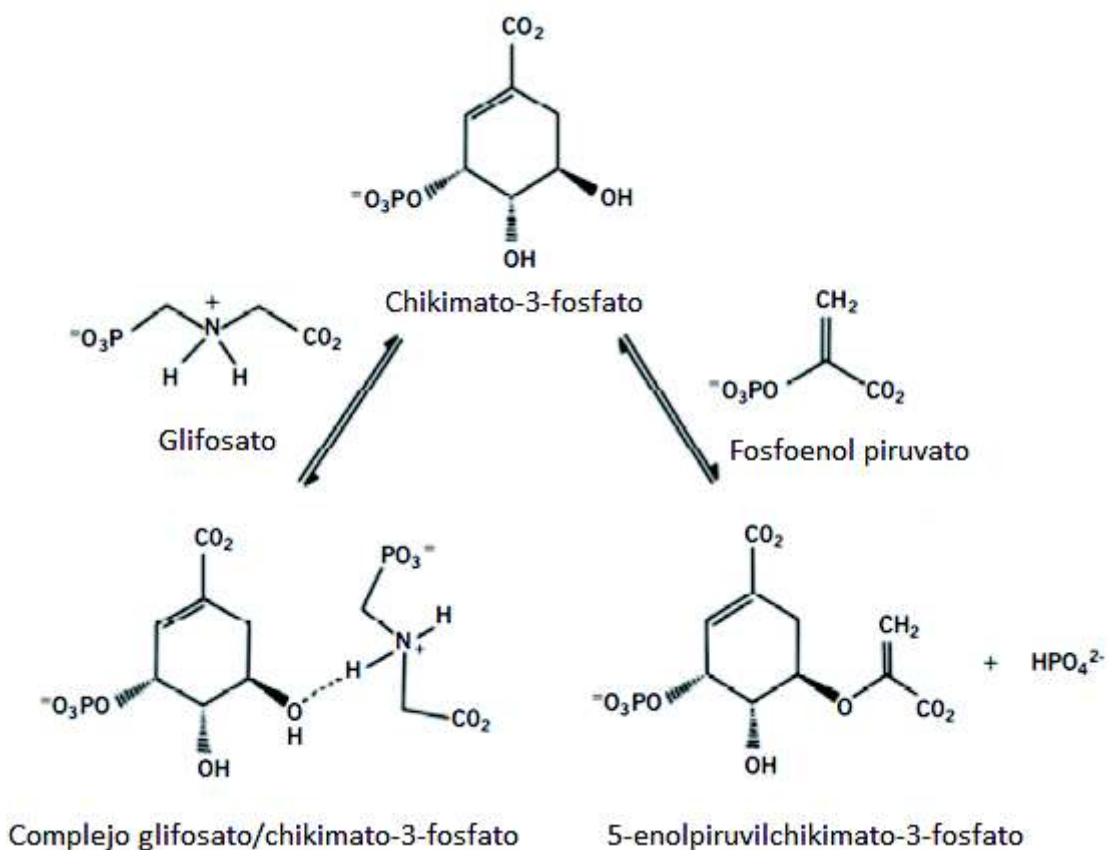
2.2 Mecanismos de acción sobre las plantas

El glifosato es un herbicida de acción foliar, es decir ingresa por las hojas y se mueve a través de la cutícula por difusión. Este herbicida migra en la planta, por medio del floema para concentrarse en zonas de crecimiento como: meristemos (responsables del crecimiento de tejido vegetal nuevo), hojas en desarrollo raíces y frutos (Duarte, 2003). El efecto generado por este herbicida,

indirectamente se relaciona con la inhibición de la división celular y el crecimiento de la planta, proceso que dura una semana o dos, y en donde el follaje se torna clorótico (amarillento) y finalmente entra en necrosis (Shawn et al., 2012).

El mecanismo ecotóxico sobre las plantas, está vinculado a la afectación de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, tirosina, triptófano), mediante la inhibición enzimática de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (Rodrigues et al., 2016). La Figura 1 describe la inhibición enzimática de la EPSPS, debido a que el glifosato forma complejos con la molécula de shikimato – 3 fosfato, evitando la unión con el fosfoenolpiruvato. La ruta de acción del shikimato solo se encuentra presente en las plantas, por lo cual el glifosato no representa directamente un peligro ecotóxico sobre mamíferos, peces, aves o reptiles (Arregui et al., 2010).

FIGURA 1 INHIBICIÓN EN LA SÍNTESIS DE LA EPSPS

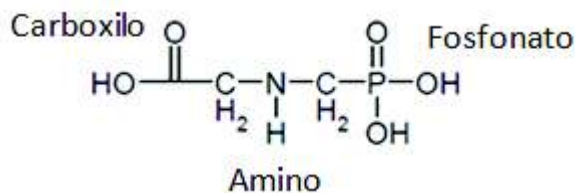


Fuente: Duarte (2003)

2.3 Propiedades físico-químicas y ambientales del glifosato

El glifosato, es un ácido usado en la forma de sal isopropilamínica de la N-fosfonometil glicina, cuya fórmula empírica es C₃H₈NO₅P. Este herbicida tiene tres grupos funcionales polares: carboxilo, amino y fosfonato (Varona et al., 2009). La Figura 2 muestra los grupos funcionales del glifosato.

FIGURA 2 N - FOSFONOMETIL GLICINA (GLIFOSATO)



Fuente: Varona et al. (2009)

La adsorción del glifosato en el suelo, es resultado de su capacidad de disociación, los valores de pKa son: 0,78 (grupo fosfonato), 2,29 (grupo carboxilo), 5,96 (grupo fosfonato) y 10,98 (grupo amino). Esta condición hace que se formen aniones (carga negativa) en los grupos funcionales que se unen a componentes del suelo como: arcillas, óxidos de hierro, ácidos húmicos, iones (Al⁺³, Fe⁺², Mn⁺², Zn⁺², Ca⁺², Mg⁺², Na⁺¹) (Menendez, 2013). Por lo tanto, el coeficiente de partición octanol-carbono orgánico o Koc es de 2 a 4,7, condición que establece que tiene alta afinidad por el suelo. Herrera (2011) señala que la adsorción del glifosato en la materia orgánica, es debido a la formación de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, la movilidad en el suelo depende de la composición de éste, registrándose promedios de vida media de 1 a 174 días, esto evidencia alta movilidad en suelos con bajo contenido de materia orgánica (Arregui et al., 2010, Herrera, 2011).

El glifosato es soluble en agua (15,7 g.L⁻¹ a 25 °C) y su persistencia va desde los 12 a 60 días (Rojas and Fierro, 2008). Por otro lado, en cuerpos de agua el glifosato sufre translocación hacia los sedimentos debido al alto valor de Koc, donde se reportan promedios de vida aproximados de 120 días (Nivia, 2000).

En el agua, suelo y sedimentos acuáticos el glifosato sufre degradación por la acción de microorganismos. La acción microbiológica produce degradación del glifosato y la formación de ácido aminometilfosfónico (AMPA), glicina y sarcosina (Dick and Quinn, 1995). La condición descrita favorece el arrastre por escorrentía de estos compuestos (glifosato y metabolitos) a cuerpos de agua (Varona et al., 2009). Cabe señalar, que al AMPA se le han adscrito propiedades toxicológicas diferentes al glifosato (Duarte, 2003). La formación del AMPA y sus características ecotóxicas se describen a mayor detalle en el apartado 2.4.

En el aire, el glifosato no ha mostrado persistencia. Una de las razones es una presión de vapor cercana a $1,84 \times 10^{-7}$ mm Hg a 25 °C, que lo hace poco volátil (Arregui et al., 2010). Chang et al., (2011) detectaron presencia de glifosato y AMPA en el aire de EEUU (Mississippi, Iowa e Indiana) a concentraciones entre 0,01 y 9,1 ng.m⁻³ y 0,1 y 2,5 µg.L⁻¹, respectivamente y concluyen que condiciones de lluvia y suspensión de partículas en la atmósfera podrían darle mayor permanencia o movilidad desde aire hacia suelo, agua y biota.

Finalmente, el glifosato en contacto con organismos no objetivo (animales) ha evidenciado no tener directa afectación. La razón está dada por la baja afinidad del glifosato con el tejido adiposo (coeficiente de partición octanol-agua o log Kow entre -2,9 a -3,4 condición que hace que la bioacumulación en tejido adiposo sea mínima (Mackay et al., 2016). La Tabla 3 describe las propiedades físico- químicas del glifosato.

TABLA 3 PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS DEL GLIFOSATO

Compartimiento ambiental	Característica	Valor/Condición
Características físico – químicas	Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
	Peso molecular	169,1 g.mol ⁻¹
	Estado físico	Sólido Blanco
	Olor	Inodoro
	Densidad	0,5 g.mL ⁻¹
	Punto de fusión	184,5 °C
	Explosividad	No explosivo
	Corrosividad	No corrosivo
Aire	Presión de vapor	1,84 x 10 ⁻⁷ mm Hg (25 °C)
Agua	pH en solución (1%)	2,5
	Solubilidad en agua	15,7 g.L ⁻¹ (25 °C)
Suelo	Log Koc	2 – 4,7
		0,78 (Primer protón grupo fosfonato)
		2,29 (Protón del grupo carboxilo)
		5,96 (Segundo protón fosfonato)
	pKa	10,98 (Protón del grupo amino)
Biota	Coefficiente de partición octanol/agua	Log Kow = -2,9 / -3,4

Fuente: Rojas and Fierro (2008); Arregui et al., 2010

Elaborado por: Huaraca Luis

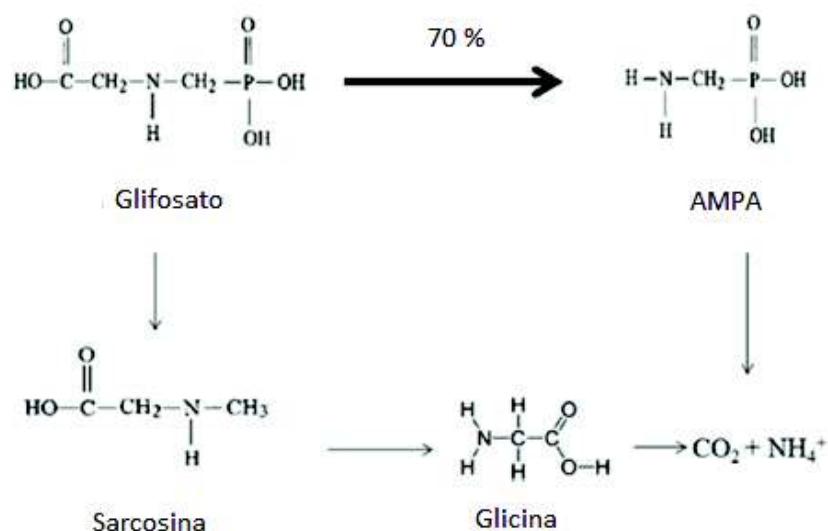
2.4 Propiedades químicas y ambientales de metabolitos procedentes del glifosato

2.4.1 Metabolitos del glifosato: ácido aminometilfosfónico (AMPA)

El ácido aminometilfosfónico o AMPA (CH₆NO₃P), es el principal metabolito de la degradación microbiana (bacterias y hongos) del glifosato tanto en ambientes acuáticos como edáficos. Durante la primera etapa de la degradación aeróbica el 70% es transformado a AMPA (ruptura del enlace C-N) y el 30% restante a sarcosina (C₃H₇NO₂) (ruptura del enlace C-P) y glicina

(C₂H₅NO₂). En una segunda etapa, estos últimos son transformados a dióxido de carbono (CO₂) y amonio (NH₄⁺) (Bai and Ogboune, 2016). La degradación del glifosato depende de las propiedades bioquímicas del suelo/agua como: pH, contenido de fosfatos, hierro y cobre. Además de la actividad microbiológica, la cual se incrementa en presencia de una fuente de carbono orgánico disponible. La Figura 3 resume el proceso de degradación microbiológica en agua y suelo del glifosato

FIGURA 3 METABOLITOS DEL GLIFOSATO



Fuente: Bai and Ogboune (2016)

El AMPA, cuya fórmula es CH₆NO₃P es de carácter polar con alta solubilidad en agua (10,5 g.L⁻¹). Los valores de pKa son iguales a 0,9 (primer fosfónico), 5,6 (segundo fosfónico) y 10,2 (amina) (Herrera, 2011). Las propiedades físico – químicas del AMPA se describen en la Tabla 4.

TABLA 4 PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS DEL AMPA

Parámetro	Condición
Masa molecular	111 g.mol ⁻¹
Solubilidad	10,5 g.L ⁻¹ (20 °C)
Log Koc	3,98
Tiempo de vida media en agua	83,7 días

Fuente: Levine (2015)

Debido a las propiedades químicas del glifosato (Koc), se supondría una baja tasa de lixiviación hacia cuerpos de agua, pero la degradación microbiológica facilitaría la movilidad del glifosato y AMPA hacia cuerpos de aguas subterráneas y superficiales (Donadía et al., 2009). Degenhardt (2012) ha detectado la presencia de glifosato y AMPA en suelos arcillosos con tiempos de vida media de 154 y 98 días, respectivamente. De forma similar, investigaciones realizadas por Rodríguez et al., (2002) en Colombia, han reportado la presencia de glifosato y AMPA en ríos cercanos a plantaciones ilícitas, con concentraciones del orden de 3,6 y 4,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

2.4.2 Coadyuvantes en formulaciones comerciales

Las presentaciones comerciales de herbicidas a base de glifosato son concentrados con el ingrediente activo más un agente surfactante. Según la Guía Fitosanitaria CASAFE (2011), el ingrediente activo puede ser:

- Sal isopropilamínica de la N - fosfometil glicina (48 – 64,8)%
- Sal amónica de la N – fosfometil glicina (40,5 – 39,6)%
- Sal dimetilamínica de la N – fosfometil glicina 60,8 %
- Sal monopotásica de la N- fosfometil glicina 43,8 %

Mientras el ingrediente surfactante a base de seboaminasetoxiladas es llamado ingrediente inerte (Florida et al., 2012). La adición de surfactantes, tiene relación con la naturaleza iónica de la solución herbicida, la cual retarda la penetración del ingrediente activo en la planta (Rojas y Fierro 2008). Por lo tanto, la adición de surfactantes disminuye la tensión superficial de las gotas de pulverización, haciendo que el herbicida sea absorbido a través de las hojas. La Figura 4 muestra el efecto de los surfactantes en las hojas de la planta. Wyrill and Burnside (1977) demostraron que la adición de surfactantes tiene un efecto directo en el rendimiento del herbicida y determinaron que los compuestos idóneos de mayor eficiencia e identificados son tensoactivos de alquilamina terciaria etoxilada. Por ejemplo, dentro de surfactantes comúnmente usados está una seboaminaetoxilada que tiene un promedio de aproximadamente 15 moles de óxido de etileno por mol de seboamina.

FIGURA 4 EFECTO DE LOS SURFACTANTES EN LAS HOJAS

Fuente: Wyrill and Burnside (1997)

Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (2015), en el Ecuador se encuentran registrados alrededor de 38 herbicidas de los cuales el ingrediente activo es el glifosato, como se puede visualizar en la Tabla 5. Cabe señalar, que la formulación de cada uno de los herbicidas no se encuentra en las etiquetas y no se ha encontrado registros de la identidad de las sustancias coadyuvantes.

TABLA 5 FORMULACIONES COMERCIALES DE GLIFOSATO EN EL ECUADOR

Nombre	Concentración ingrediente activo	Categoría tóxica	Fabricante
Glifolaq	360 g.L ⁻¹	IV	Agripac SA
Flame plus 360	324 g.L ⁻¹	IV	Importadora Industrial Agrícola
Flame plus 480	480 g.L ⁻¹	IV	Importadora Industrial Agrícola
Glialka	480 g.L ⁻¹	IV	Arilec SA
Kalac	480 g.L ⁻¹	IV	ArystaLifescience
Glifomat 500	480 g.L ⁻¹	IV	BBR
Azote	120 g.L ⁻¹	IV	BBR
Mon-0139	0.62 g.L ⁻¹	IV	BBR
Ranger	28.6 g.L ⁻¹	IV	Ecuaquimica

Nombre	Concentración ingrediente activo	Categoría tóxica	Fabricante
Rocket (Roundup)	74.7 %	IV	BBR
Rodeo	480 g.L ⁻¹	IV	BBR
Batalla/Fuete	480 g.L ⁻¹	IV	BBR
Round Up Spectra	480 g.L ⁻¹	IV	BBR
Ventarron/Rond y	480 g.L ⁻¹	IV	BiesterfeldEcuador
Glifogan	480 g.L ⁻¹	IV	C.A Industrial
Glifosato	48 %	IV	C.A Industrial
Estelar/Gliforey	0.48	IV	ConsultImz CIA
Glufuron (Glifosato+Diuron)	Glifosato 250 g.L ⁻¹ Diuron 250 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Arbex 180	180 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Crystal Glifosato	360 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Glifopac	480 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Glifonox bio	480 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Rondo/Ninja/Huracan/Jet	480 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Supex	240 g.L ⁻¹	IV	DupocsaProtectores
Matasato	750 g.Kg ⁻¹	IV	Ecuaquimica
Glifocor	480 g.L ⁻¹	IV	
Rango	480 g.L ⁻¹	IV	HortifloraAndina
Tirano	620 g.L ⁻¹	IV	Importadora del Monte
Arrasador	757 g.Kg ⁻¹	IV	Interoc SA
Nufarm/Atila	480 g.L ⁻¹	IV	Nufarm del Ecuador
Cortador	480 g.L ⁻¹	IV	Agropoint SA
Phase	480 g.L ⁻¹	IV	Quifal

Nombre	Concentración ingrediente activo	Categoría tóxica	Fabricante
Atake	480 g.L ⁻¹	IV	Quatroagro
Pin up	324 g.L ⁻¹	IV	AdamaAndina
Glifoagro	480 g.L ⁻¹	IV	Renagro Inc. SA
Shyfo	480 g.L ⁻¹	IV	Sharda del Ecuador
Ausato	480 g.L ⁻¹	IV	Salagro
Touchdown	500 g.L ⁻¹	IV	Syngentocrop.

Fuente: INIAP (2010)

Elaboración: Huaraca Luis

Cabe señalar, que dichos ingredientes “inertes” pueden ser sustancias activas que confieren mayor ecotoxicidad a las formulaciones comerciales y que sobre las cuales no se ofrece información (Nivia, 2000). De acuerdo a investigaciones conducidas por aplicadores de agrotóxicos en plantaciones de FOSA – Uruguay, los herbicidas comerciales a base de glifosato pueden contener las siguientes sustancias como emulsificantes y coadyuvantes (Cárcamo, 2010):

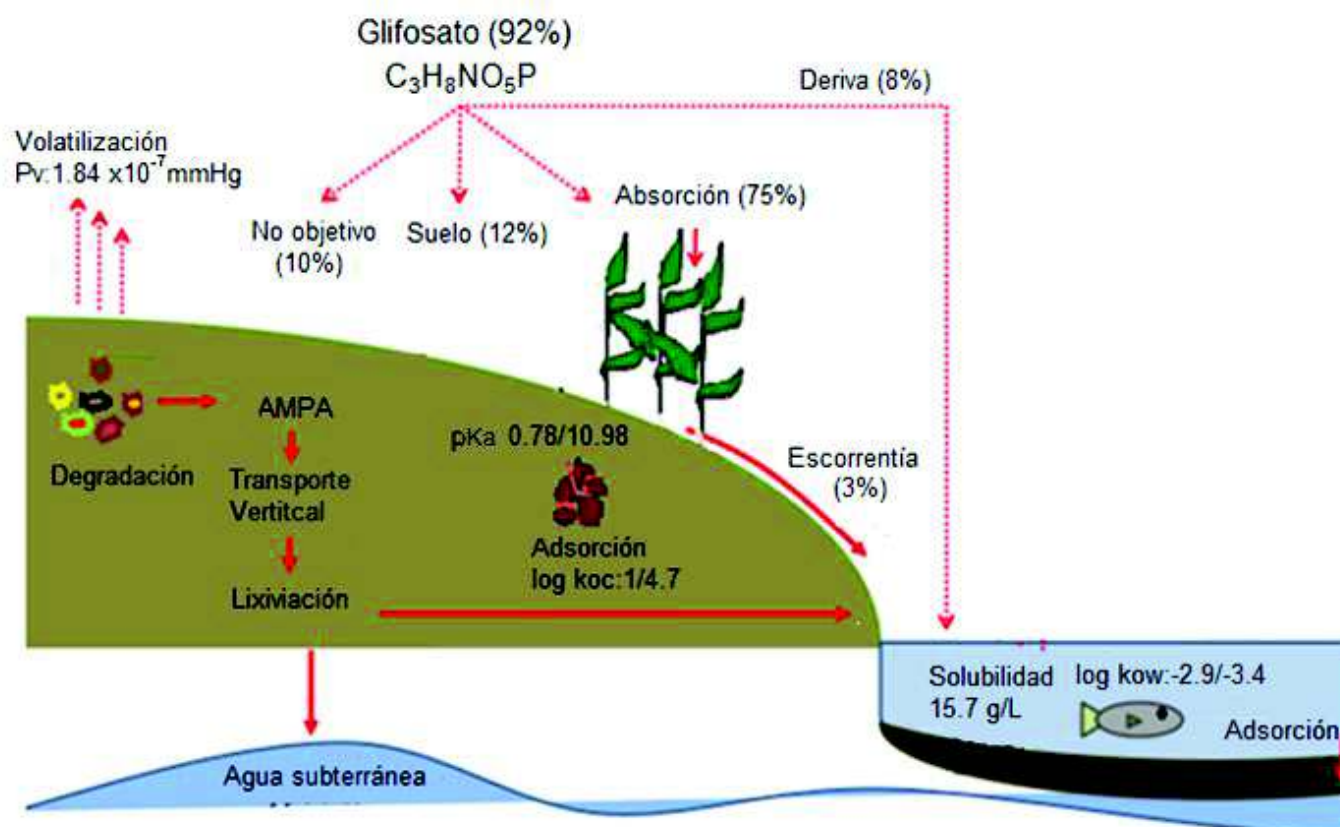
- Sulfato de amonio
- Benzisotiazolona
- 3- yodo-2 propinilbutilcarbamato
- Isobutano
- Metilpirrolidinona
- Ácido pelargónico
- Polioxietileno amina
- Hidróxido de potasio
- Sulfito sódico
- Ácido sórbico
- Isopropilamina

2.5 Destino ambiental del glifosato

La forma de aplicación del glifosato es por aspersion sobre el follaje, por lo tanto fenómenos como la deriva afectan la deposición del herbicida. Santos

(2006) establece que el 92% del herbicida aplicado permanece en el campo y el 8% está sujeto a la deriva (pérdida) atmosférica. El 12% del herbicida que permanece en el campo, llega al suelo debido al contacto directo, lavado de las hojas, exudación de las raíces y plantas tratadas. El 10% del herbicida que alcanza los campos puede llegar a plantas no objetivo (Civeira, 2012). Por lo tanto, sólo alrededor del 75% del glifosato que se aplica llega a la vegetación objetivo (Santos, 2006). Estudios conducidos por Alberdi (1996), señalan que aproximadamente el 3% del glifosato aplicado llega a ambientes acuáticos. En la Figura 5 se observa un esquema de la movilidad ambiental del glifosato.

FIGURA 5 DESTINO AMBIENTAL DEL GLIFOSATO



Fuente: Arregui et al., (2010)

Elaboración: Huaraca Luis

2.6 Clasificación ecotoxicológica

2.6.1 Clasificación ecotoxicológica del glifosato

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda la clasificación de plaguicidas en función de la Concentración Letal $_{50}$ (por sus siglas en inglés, LC_{50}) por vía oral o dérmica en ratas. Cabe señalar que el LC_{50} es la cantidad necesaria del plaguicida para producir la muerte del 50% de las individuos ensayados, expresado en mg de plaguicida/kg de peso del animal (Arregui et al., 2010). En la Tabla 6 se observa la clasificación ecotoxicológica recomendada por la OMS.

TABLA 6 CLASIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES RECOMENDADA POR LA OMS

Clase toxicológica	Formulaciones líquidas LC_{50} (mg.kg ⁻¹)		Formulaciones sólidas LC_{50} (mg.kg ⁻¹)	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
Clase Ia (Sumamente peligroso)	<20	<40	<5	<10
Clase Ib (Muy peligroso)	20 – 200	40 – 400	5 – 50	10 – 100
Clase II (Moderadamente peligroso)	20 - 2000	400 – 4000	50 – 500	100 – 1000
Clase III (Poco peligroso)	2000-3000	>4000	500 – 2000	>1000
Clase IV (Normalmente no peligroso)	>3000	---	>2000	---

Fuente: Arregui (2010)

La EPA clasifica a los herbicidas, en los cuales el ingrediente activo es el glifosato como de clase II (Moderadamente peligroso). Es decir, este tipo de herbicidas comerciales tienen toxicidad aguda oral y dérmica relativamente baja (Salazar et al., 2011). La OMS basándose en estudios realizados en

conejos, los califica en la categoría I (Muy peligroso) (Santos, 2006). Sin embargo, el 15 de Marzo del 2015 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (por sus siglas en inglés, IARC) calificó al glifosato como un agente probable carcinogénico (Szekacs et al., 2012). En caso de formulaciones comerciales, se han registrado valores de toxicidad aguda en ratas hasta 3 veces mayores que las correspondientes al ingrediente activo (Herrera, 2011).

De acuerdo a la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de México, el glifosato representa un ligero peligro para aves, debido a la presencia de residuos en cultivos de fresas, arándanos, cereales, lechugas y zanahorias posterior a su aplicación (Salazar et al., 2011).

2.6.2 Características tóxicas del AMPA

En humanos la intoxicación por ingesta de alimentos contaminados con glifosato y AMPA se registran a concentraciones de 125 mg/kg-día y 5 mg/kg-día respectivamente (Bai and Ogboune, 2016). Además, Reddy et al., (2004) y Druart et al., (2011) han encontrado rastros de glifosato y AMPA en diferentes fuentes alimentarias humanas (plantas y animales). Es importante señalar, que la degradación del AMPA puede incluir metilamina y formaldehídos, compuestos clasificados cancerígenos por la OMS. Al respecto la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) concluye que el AMPA podría ser un precursor para el cáncer rinofaríngeo en el hombre (Santos, 2006).

Específicamente en ambientes acuáticos, Leviné (2015) evaluó la toxicidad crónica del AMPA para el pez *Pimephales promelas* y el crustáceo *D. magna*, evaluando criterios como supervivencia, crecimiento y reproducción. El estudio concluye que los valores de NOEC corresponden a 12 mg.L⁻¹ para *Pimephales promelas* y 15 mg.L⁻¹ para *D. magna*.

2.7 Toxicidad en ecosistemas acuáticos

2.7.1 Toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda evalúan efectos inmediatos (mortalidad o inmovilidad). Los periodos de exposición a ciertas concentraciones (dosis) letales, varían entre 24 a 96 horas dependiendo la especie. El tiempo de exposición para peces, crustáceos y plantas acuáticas va de 96,48 y 76 horas, respectivamente. El indicador calculado se denomina concentración letal media (CL_{50}), el cuál es la concentración de inhibición media (Rojas and Fiero, 2008). Por lo tanto, se define como la concentración del contaminante que afecta al 50% de los organismos ensayados, sus límites de confianza son considerados en un 95% derivados de un análisis estadístico (Sánchez et al., 2004).

2.7.2 Toxicidad crónica

Los ensayos de toxicidad crónica evalúan efectos a mediano plazo (subletales). Los periodos de exposición a concentraciones (dosis) menores a las letales (agudas) son aproximadamente 1/3 de la vida de los organismos (Rojas and Fierro, 2008). Los indicadores que evidencian el efecto crónico son:

- La concentración más baja a la cual se observan efectos (por sus siglas en inglés, LOEC)
- La concentración más alta a la cual no se observa efectos (por sus siglas en inglés, NOEC).

Dichos efectos incluyen: inhibición en el desarrollo alométrico (tamaño) o alteraciones reproductivas (frecuencia y número de crías) (Cubra et al., 2013).

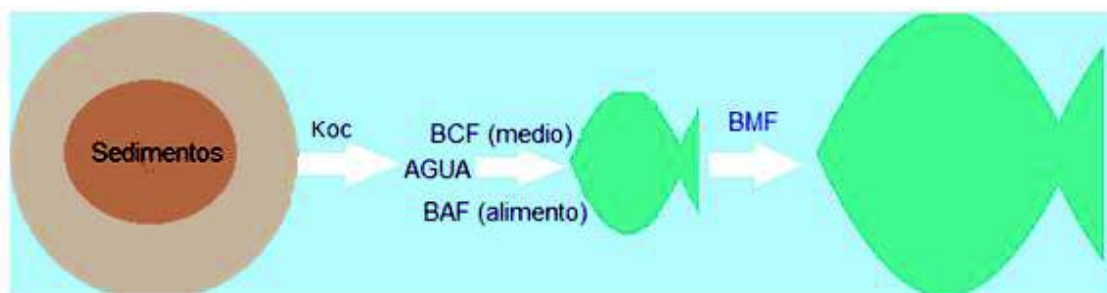
2.7.3 Distribución de contaminantes en ecosistemas acuáticos

Cuando una sustancia está disponible en ambientes acuáticos y su ingreso a organismos se da por la piel se habla que es bioconcentrable. La bioconcentración es el resultado de absorción (piel), transformación y eliminación de una sustancia debida a la exposición a través de medios acuáticos (UNECE, 2010). Por otro lado, si el ingreso es por el tracto digestivo (agua o alimentos) es bioacumulable. A medida que se asciende en la cadena

trófica, la concentración del contaminante se multiplica y por lo tanto se biomagnifica, causando efectos adversos sobre organismos depredadores (aves o ser humano) (Diamanti – Kandarakis et al., 2009).

Los procesos antes descritos, se caracterizan por coeficientes que determinan la capacidad de acumulación de una sustancia química en un organismo (Albert, 2010). Rodriguez et al., (2015) definen tres coeficientes: el factor de bioconcentración (BCF) representando la concentración de equilibrio entre el medio y el organismo y el factor de bioacumulación (BAF) relacionada con la concentración en equilibrio del organismo y su comida. Finalmente, el factor de biomagnificación (BMF) que tiene relación con la concentración en el organismo y de su antecesor en la cadena trófica. La Figura 6 describe la relación de dichos coeficientes en ambientes acuáticos.

FIGURA 6 BIODISPONIBILIDAD DE CONTAMINANTES EN AMBIENTES ACUÁTICOS



Fuente: Rodriguez et al., 2015

Elaborado por: Huaraca Luis

La absorción de contaminantes sobre organismos, es importante cuando se trata de sustancias hidrófobas o lipofílicas. Por lo tanto, el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) permite referir bioacumulación de contaminantes (OCCE, 2015). El potencial de bioacumulación, en función del K_{ow} se observa en la Tabla 7.

TABLA 7 RELACIÓN DE Kow Y BIOACUMULACIÓN

Bioacumulación	Log Kow
Alta	>5
Media alta	5 – 3,5
Media	3,5 – 3
Media baja	3 – 1
Baja	<1

Fuente: CEPIS (2017)

La introducción de herbicidas comerciales a medios acuáticos, afecta la calidad del agua y a organismos considerados no objetivos, modificando con esto la estructura y funcionalidad de ecosistemas acuáticos (Salazar et al., 2011). En específico el glifosato, es soluble en agua y puede ser adsorbido en sedimentos y partículas suspendidas. Szekacs et al., 20012 señala que el material suspendido en cuerpos acuáticos modifica la biodisponibilidad del glifosato y provoca aumentos de toxicidad.

2.7.4 Productores primarios

Los productores primarios son responsables de la captura de la energía solar y nutrientes. Además, este nivel es clave dentro de la síntesis de moléculas como: carbohidratos (glucosa, almidón, celulosa), lípidos (aceites), proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son disponibles para el zooplancton y peces que son consumidores (Arregui et al., 2010).

Vera et al., (2010) investigaron los efectos ecotóxicos en fitoplancton del glifosato comercial denominado Roundup. Dicho estudio se desarrolló a concentraciones de 8 mg.L⁻¹ (a.i. ingrediente activo) evaluando efectos como aumento del nivel de eutrofización del medio acuático (naturaleza organofosforada del glifosato), mortalidad de diatomeas y consecuentemente proliferación de cianobacterias. De acuerdo a Pérez et al., (2007), los cambios estructurales directos en el fitoplancton se deben a la naturaleza tóxica del glifosato y no al enriquecimiento de fósforo sobre ecosistemas acuáticos. Por

lo tanto, la presencia de cianobacterias puede producir muerte de la fauna acuática, olores desagradables y alteración en la tipología del ambiente acuático. La ocurrencia de efectos adversos en productores primarios de medios acuáticos, tiene relación a similitudes fisiológicas con las plantas ya que poseen la ruta del shikimato para la síntesis de tejido vegetativo (Arregui et al., 2010).

2.7.5 Consumidores primarios

La comunidad zooplanctónica constituye la población de consumidores primarios acuáticos (Begon et al., 1999). Este grupo se alimenta de los productores primarios y materia orgánica, y sirve de alimento a pequeños invertebrados y larvas juveniles de peces. Esta comunidad, está representada por tres grupos: cladóceros, copépodos (micro crustáceos) y rotíferos (Barrionuevo and Marcial., 2006)

La presencia de glifosato en el agua afecta a la fecundidad de micro crustáceos. Investigaciones realizadas por Reno et al., (2014) determinaron que concentraciones entre 5,3 a 31,8 mg a.i.L⁻¹ afectan la reproducción entre 3 y 4 veces de *Ceriodaphnia reticulata*. (Arregui et al., 2010) reporta valores del CL₅₀ sobre *A.salina* del orden de 14 – 37.53 mg herbicida.L⁻¹ dependiendo la formulación del herbicida, así mismo Servizi et al., (1987) determino la influencia del surfactante MON0818 en la toxicidad (LC₅₀, 96 h) sobre *D. magna* y reportan valores de Roundup (12.24 mg a.i.L⁻¹) y MON0818 (3,8 mg surfactante/L).

2.7.6 Consumidores secundarios

Los consumidores secundarios se alimentan de los consumidores primarios y pueden incluir: invertebrados, macrocrustáceos, moluscos e insectos (Soriano et al., 2001)

En macrocrustáceos como camarones, se ha observado que el glifosato modifica patrones de crecimiento (muda) a concentraciones menores de 8 mg a.i.L⁻¹ de formulados comerciales (Montanga et al., 2014). Por otro lado, Souza da Silva et al., (2003) registraron alteraciones en la enzima colinesterasa en

moluscos como *Phyllocaulis soleiformis*. Algunas afectaciones registradas por Salazar et al., (2011) sobre este nivel trófico se relacionan con: inhibición en la eclosión de erizos, distorsiones metabólicas bioquímicas y hematológicas en tejidos, lípidos y glucosa en peces. Dichas afectaciones, dependen de la concentración de glifosato y el tiempo de exposición.

2.7.7 Organismos detritívoros

Los organismos descomponedores o también llamados detritívoros, tales como: bacterias y hongos, son organismos que se alimentan de células muertas o desechos (detritos) procedentes de productores y consumidores (Gillén, 2012). Dicho proceso constituye el ciclo energético del que depende el buen funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Galante and García, 1997). Estudios ecotóxicos de glifosato sobre bacterioplanctónicos (*Vibrio fischeri*) fueron realizados por Spósito et al., (2016) donde se determinó que el valor de la CL_{50} a 48 horas fue de 37.28 mg.L^{-1} .

2.8 Bioensayos ecotoxicológicos

2.8.1 Generalidades

La ecotoxicidad es un concepto que hace referencia al estudio de los efectos tóxicos producidos por xenobióticos (sustancias) sobre el ambiente. Por lo tanto, la ecotoxicología busca la protección de sistemas ecológicos, mediante herramientas (bioensayos) de diagnóstico. Dichos ensayos, estudian los efectos adversos como resultado de la exposición a contaminantes físicos, químicos o biológicos sobre organismos sensibles (bioindicadores) (Sánchez, 2005). Los bioensayos se realizan bajo condiciones experimentales controladas y evalúan respuestas como: mortalidad, proliferación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (tejidos orgánicos) de los organismos (Sánchez et al., 2004). Los bioensayos, permiten obtener respuestas en tiempos de experimentación cortos (minutos a días), debido a que se llevan a nivel de organismos y la información se puede extrapolar desde niveles celulares o sistemas de enzimas hasta organismos completos, poblaciones y comunidades

(Toro, 2011). La Figura 7 describe la relevancia ecológica de los niveles de organización biológica y su respuesta ante la exposición a contaminantes. La importancia de trabajar a nivel de organismos radica en la complejidad biológica, debido a que se relaciona con la posibilidad de valorar en forma sencilla (conteo de supervivencia, mediciones alométricas, etc.) la sensibilidad que éstos puedan expresar a diferentes contaminantes (metales pesados, herbicidas, detergentes, hidrocarburos, etc.) (Sánchez, 2005).

FIGURA 7 RELEVANCIA ECOLÓGICA Y SENSIBILIDAD A LOS CONTAMINANTES EN ESCALA BIOLÓGICA



Fuente: Orrego (2010)

Cabe señalar, que la respuesta de los bioindicadores es el resultado de las interacciones de la sustancia y los sistemas biológicos. El efecto de los contaminantes sobre los organismos incluyen: reacciones metabólicas de detoxificación, biotransformación y excreción. Por lo tanto, el efecto nocivo depende de las propiedades físico-químicas del compuesto, concentración, tiempo y frecuencia de exposición (Sánchez et al., 2004). Este tipo de análisis, permite evidenciar efecto de los contaminantes a corto plazo (agudo-mortalidad) y mediano-largo plazo (crónico-enfermedad) sobre el ambiente (Romero and Cantú, 2008).

2.8.2 Biodinadores utilizados en ensayos ecotoxicológicos

La importancia de los bioensayos ecotoxicológicos acuáticos, radica en que permiten determinar efectos de compuestos tóxicos sobre organismos que tienen relevancia ecológica significativa (Sagastume, 2001). Por lo tanto, dentro de los organismos utilizados para ensayos de ecotoxicidad están:

Los rotíferos (organismos microscópicos) que forman parte del zooplancton y se encuentran en aguas marinas, estuarinas y dulces (Barnes, 1984). En especial, el género *Brachionus* es útil para ensayos de toxicología, debido a que se puede obtener datos de toxicidad aguda en 15 minutos (Snell et al., 2005).

Los crustáceos, los cuales son organismos que generalmente habitan en aguas dulces, su tamaño varía desde 0,25 mm hasta 10 cm, están compuestos por varios órdenes: Anostraca, Notostraca y Diplostraca. La única excepción es el camarón del género *Artemia*, que habita en agua salobre (Sagastume, 2001). Estos bioindicadores se usan en ensayos de toxicidad, debido a que son organismos filtradores (plancton, bacterias y detritus), la reproducción es por huevos en forma partenogénica (sin fecundación), exceptuando algunas especies de *Artemia* y presentan sensibilidad a compuestos tóxicos (Thanmotoxkit, 1995). Los dos crustáceos de mayor utilización para ensayos de ecotoxicología son los géneros: *Artemia spp* y *Daphnia spp*.

La utilización de la especie *Artemia salina* en ecotoxicología se ha iniciado desde 1975, siendo por tanto estandarizado en laboratorios americanos y europeos (Persoone y Vanhaecke, 1981). El género *Daphnia spp*. comúnmente conocido como “pulga de agua” es el crustáceo de agua dulce más utilizado en ensayos de toxicología. La relevancia de usarlo radica en su función ecológica dentro de la comunidad zoo planctónica, facilidad de cultivo en laboratorio, ciclo de vida corto y sensibilidad a numerosos compuestos químicos (Silva et al., 2003; Martins et al., 2007). Cabe señalar que los bioensayos con *Daphnia*

magna están estandarizados y son reconocidos por organizaciones internacionales tales como: la Agencia de Protección Ambiental norteamericana, EPA, Comunidad Económica Europea y la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (López, 1996).

2.8.3 *Daphnia magna*

Daphnia magna es un crustáceo de 6 mm de longitud, su coloración va de anaranjado a pardo, debido al déficit de oxígeno disuelto del agua (Alonso, 1996). La Tabla 8 describe la clasificación taxonómica de *D. magna*

TABLA 8 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *D. magna*

Clase	Crustacea
Subclase	Brachipoda
Orden	Cladóceras
Suborden	Anomópoda
Familia	Daphnidae
Género	Daphnia
Especie	Magna

Fuente: Rojas and Fierro (2008)

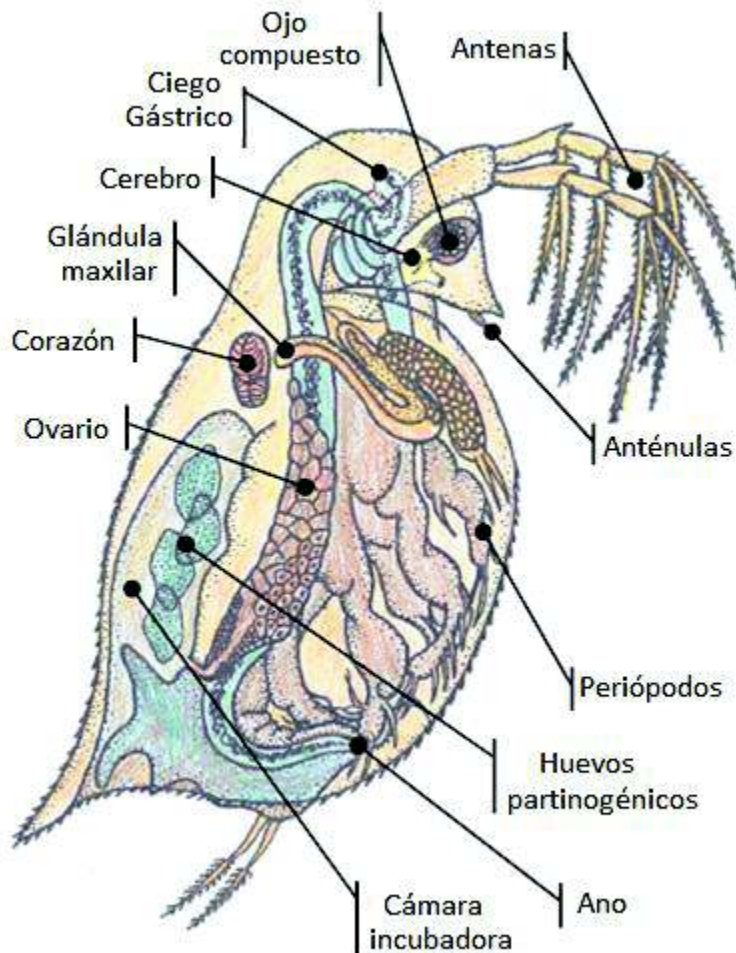
2.8.3.1 Morfología

Este crustáceo de cuerpo ovalado, está comprimido lateralmente sin divisiones. El tronco está encerrado dentro de un caparazón bivalvo de quitina transparente y cuenta con apéndices (antenas) y una cavidad embrionaria en la parte dorsal (Ruppert and Barnes, 1996). La Figura 8 muestra la morfología y las partes de *D. magna*.

Usualmente, en condiciones ambientales óptimas esto es, disponibilidad de alimento, oxígeno disuelto y baja densidad poblacional son transparentes, pero en condiciones de déficit de oxígeno ($3 - 4 \text{ mg.L}^{-1}$) toman coloración rojiza, debido a la presencia de hemoglobina en el cuerpo (Sagastume, 2001). Para el movimiento, utiliza apéndices que provocan corrientes de agua, que impulsan a

los daphnídeos en sentido vertical, luego se hunden lentamente utilizando los apéndices como flotadores (Villaroel, 2004).

FIGURA 8 MORFOLOGÍA DE *D. magna*



Fuente: Villaroel (2004)

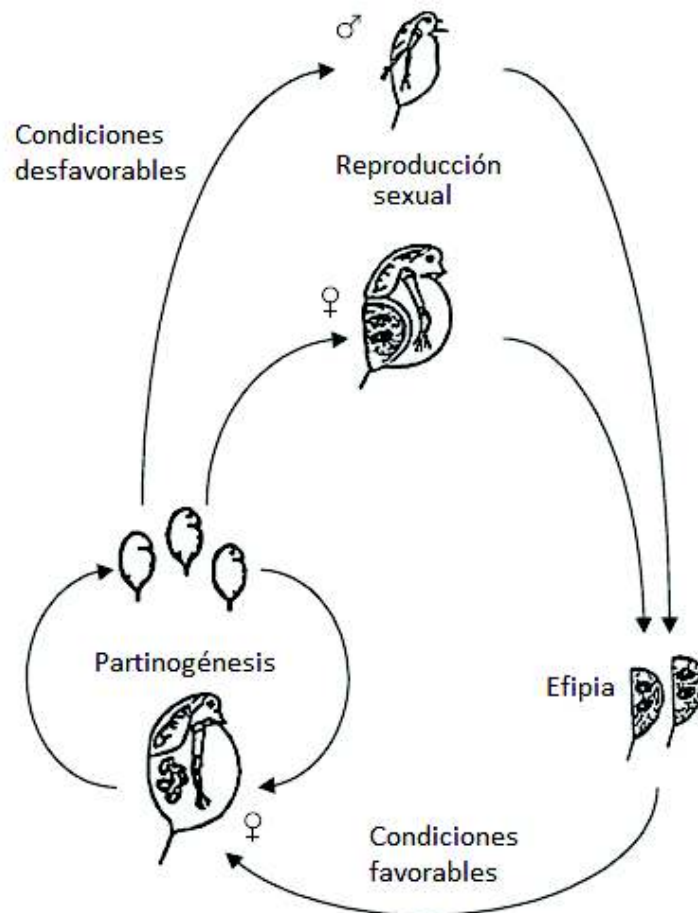
2.8.3.2 Alimentación

Los daphnídeos son organismos filtradores que utilizan los periópodos del tórax (cerdas finas) para captar alimento constituido por nanoplancton (< 30 micras) por medio de una corriente filtradora, que lleva el alimento al interior del cuerpo. Las partículas de alimento son recogidas en un canal ventral, desde donde son impulsadas hacia la boca y se mezclan con secreciones bucales (Riveros, 2008). Estos crustáceos basan su alimentación en algas, detritus, levaduras y zooplancton (Rojas and Fierro, 2008).

2.8.3.3 Reproducción

Los daphnídeos son hembras partenogénicas, con lo cual desarrollan células reproductoras que forman individuos sin fecundación. En definitiva, estos organismos producen huevos diploides los cuales eclosionan dando hembras, evitando así las diferencias genéticas (Villaroel, 2004). Las condiciones reproductivas, se basan en factores ambientales como: temperatura y disponibilidad de alimento (FAO, 2010). De tal forma, que cuando uno de los factores no es el idóneo aparecen machos y la reproducción es por medio de huevos (efipia) fecundados. Dichas efipias pueden soportar condiciones extremas (sequias, congelación, paso del tiempo) y eclosionan cuando las condiciones ambientales son las óptimas, dando lugar a hembras que inician un nuevo ciclo asexual (Sánchez, 2006). Este ciclo reproductivo se presenta en la Figura 9.

FIGURA 9 CICLO REPRODUCTIVO DE *D. magna*



Fuente: Villaroel (2014)

2.8.3.4 Parámetros ambientales para el desarrollo de *D. magna*

Los parámetros idóneos para el desarrollo de *D. magna* se visualizan en la Tabla 9.

TABLA 9 PARÁMETROS IDEALES PARA *D. magna*

Parámetro	Característica
Hábitat	Habitando en cuerpos de agua dulce (lagos, reservorios, charcos) y pueden coexistir con <i>Moina</i> , <i>Copépodos</i> y <i>Brachiópodos</i> .
Temperatura	Temperatura óptima varía de 18 a 22 °C, pero eventualmente pueden sobrevivir cambios de temperatura de 0 a 22 °C.
Oxígeno	Pueden soportar variaciones de oxígeno disuelto (OD), desde la saturación hasta concentraciones muy bajas (3-4 mg.L ⁻¹). La supervivencia en concentraciones bajas de OD depende de la capacidad de sintetizar hemoglobina.
pH	EL pH óptimo oscila de 7,5 a 8,0.
Otros requerimientos	En concentraciones de fosfatos y nitratos de 0,5 mg.L ⁻¹ se estimula la reproducción y madurez sexual. La madurez sexual depende de la temperatura.

Fuente: Villaroel (2014), Herrera (2011)

Elaborador por: Huaraca Luis

2.8.3.5 Importancia de *D. magna* como bioindicador

Como se ha mencionado, *D. magna* es una pieza clave en los estudios de toxicología acuática. La utilización de *Daphnia* se debe a los siguientes factores:

- Corto ciclo de vida (< 1 año), que permite la realización de ensayos de toxicidad agudos (horas) y crónicos (días) en un espacio breve de tiempo y es fácilmente cultivable en laboratorio (Villaroel, 2014).

- Cuando un organismo zooplanctónico, es expuesto a compuestos organofosforados en concentraciones sub letales, la tasa de filtración es inhibida, específicamente en *D. magna* el proceso de filtración e ingestión del alimento influye en su fisiología en términos de crecimiento, metabolismo y reproducción (Martínez et al., 1999).
- Los resultados son extrapolables a niveles ecológicos superiores, por lo tanto indican de manera indirecta los efectos totales sobre ecosistemas acuáticos (Villarroel, 2004).
- Bajo costo de implementación, debido a la estandarización del método, que representan los efectos reales del estrés ambiental (Mendoza et al., 2013).

2.8.4 *Artemia salina*

Artemia salina, es un crustáceo blanco filtrador transparente a la luz, de aproximadamente de 1 cm de longitud, éste se distribuye en hábitats acuáticos de salinidad variable ($5 - 200 \text{ g.L}^{-1}$) (Sanchez and Neira, 2005). Este organismo se adapta y supervive en ambientes hipersalinos, debido a la baja diversidad de depredadores, alta disponibilidad de alimento y capacidad de regulación osmótica (Browne, 2000).

En la actualidad, taxonómicamente el nombre de *A. salina* se ha invalidado, debido a las condiciones ambientales (salinidad y aislamiento geográfico) han inducido varios fenotipos de *Artemia* con diferencias físicas, químicas y biológicas (Cisneros, 2009:). Ruíz (2008) diferencia seis especies bisexuales: *A. salina*, *A. urmiana*, *A. sínica*, *A. tibetana*, *A. franciscana* (América) y *A. persimilis*. Mientras, que las poblaciones partenogénicas se agrupan taxonómicamente bajo el nombre de *A. partinogénica*. La Tabla 10 muestra la clasificación taxonómica de *Artemia*.

TABLA 10 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Artemia*

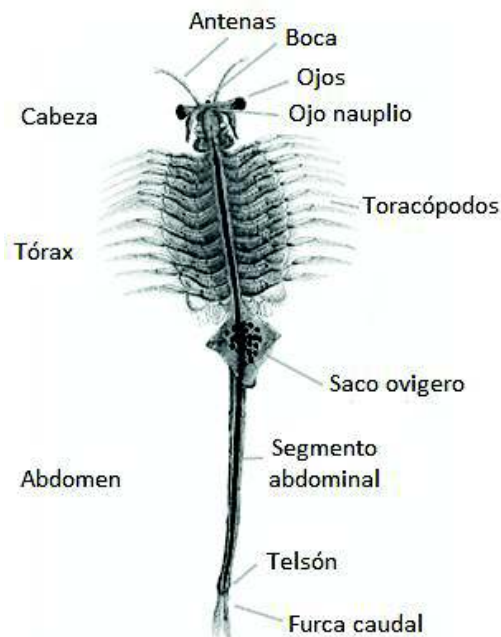
Clase	Crustacea
Subclase	Brachipoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemidae
Género	<i>Artemia</i>

Fuente: Cisneros (2009)

2.8.4.1 Morfología

La cabeza de este organismo está constituida por 5 segmentos, de los cuales sobresalen dos tipos de antenas: quimiosensoriales y anténulas, éstas últimas sirven para fines reproductivos (Reyes, 2013). En el centro de la cabeza, se observa un ocelo (ojo naupliar) y a los lados, se encuentra un par de ojos compuestos. Las mandíbulas se encuentran en el 3 tercer segmento (Ruiz, 2008).

El cuerpo de estos organismos, está dividido en segmentos uniformes que conforman un tórax y un abdomen. El tórax (11 segmentos) no contiene cefalotórax (caparacho). Cada segmento, lleva dos apéndices de tipo filopidal (aplanados) llamados filópodos o toracópodos, que se utilizan para actividades como: natación, alimentación y respiración. El abdomen (6 segmentos), es casi de forma cilíndrica y de ninguno de estos segmentos sobresalen apéndices. Finalmente, el cuerpo termina en una furca caudal (cola) (Ruiz, 2008; Pino et al., 2010; Reyes, 2013). La morfología de *Artemia*, se puede observar en la Figura 10.

FIGURA 10 MORFOLOGÍA DE *Artemia*

Fuente: Bioaretmia (2017)

2.8.4.2. Alimentación

Artemia es un organismo filtrador no selectivo, es decir su base alimenticia se conforma de bacterias, algas unicelulares, protozoos y detritos. Este alimento es ingerido, debido al movimiento de los apéndices (teracópodos) que generan corrientes en sentido oral. Por lo tanto, su alimentación es constante durante las 24 horas del día (Martinez, 2013).

2.8.4.3 Reproducción

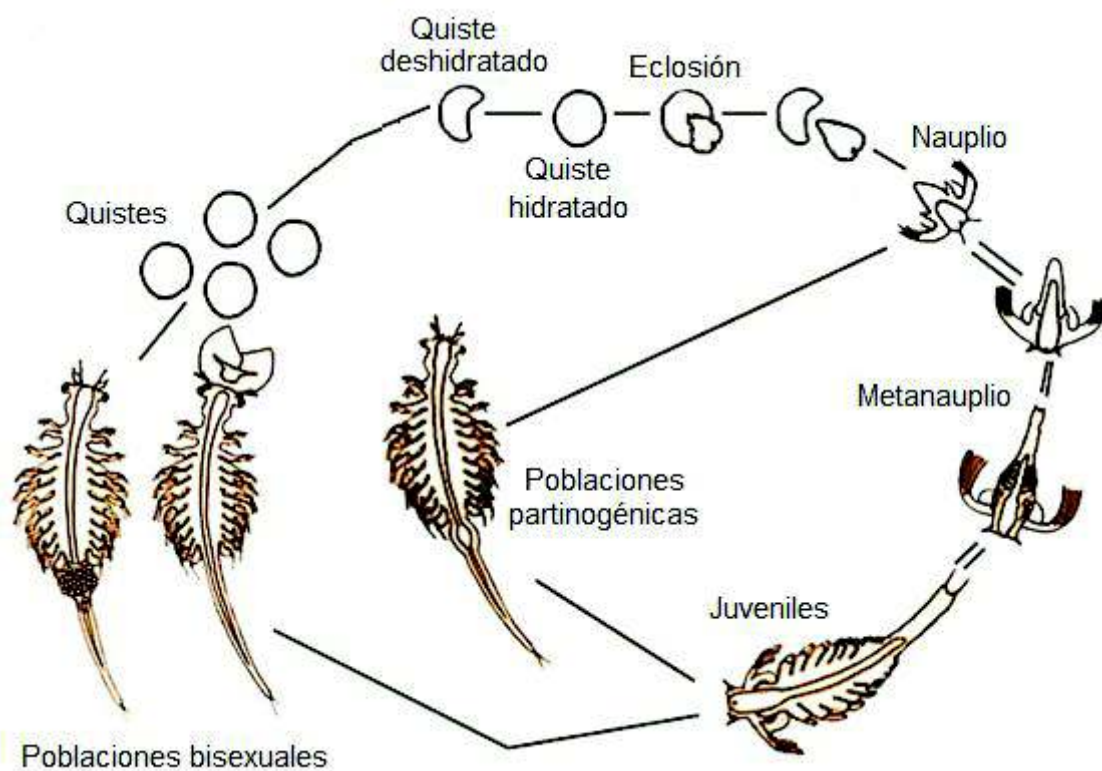
Artemia presenta dos tipos de reproducción: bisexual y partenogénica. Cabe señalar, que no se ha encontrado variedades que alternen dichas formas de reproducción (Ruiz 2008). Cuando las hembras alcanzan la edad reproductiva producen dos tipos de huevos:

- Los huevos que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, y como resultado se obtiene un nauplio completamente formado.
- Los huevos que detienen su desarrollo embrionario en el útero, quedando en forma de huevo o quiste, los cuales pueden eclosionar

inmediatamente o posteriormente dependiendo de las condiciones del medio.

Los quistes de *Artemia* (embrión encapsulado), son emitidos en condiciones desfavorables de supervivencia como: elevada salinidad, concentraciones bajas de oxígeno, baja disponibilidad de alimento (Browne 1980; Ruiz, 2008; Reyes, 2013; Pino et al., 2010). El ciclo reproductivo de *Artemia* se puede observar en la Figura 11.

FIGURA 11 CICLO REPRODUCTIVO DE *Artemia*



Fuente: Martins (2015)

2.8.4.5 Importancia de *Artemia* como bioindicador

La utilización de *Artemia* en bioensayos ecotoxicológicos se ha popularizado, debido a que no se necesita mantener cultivos permanentes en laboratorio. Los quistes de *Artemia* se disponen comercialmente como fuente de alimento vivo para actividades acuícolas (peces y crustáceos) y son de fácil adquisición (Pérez et al., 2010). La facilidad de estandarizar la metodología de los

bioensayos con *Artemia*, se relaciona con la disponibilidad de suficientes organismos de la misma edad y condición física en cualquier época del año. Los ensayos se realizan con metanauplios, lo que significa una homogeneidad fisiológica en los individuos evaluados. (Browne, 2000; Sanchez and Neira, 2005; Eljalek, 2011). La utilización de *Artemia salina* incluye evaluaciones ecotoxicológicas sobre mezclas de químicos, productos alimenticios y farmacéuticos (Pérez and Gilling 2001).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Herbicida objeto de estudio

El herbicida estudiado fue el formulado comercial GLIFOPAC, el cual es elaborado por la empresa ecuatoriana AGRIPAC y tiene una concentración de ingrediente activo (a.i.) de 480 g.L^{-1} . El número de registro unificado: 039 – H 32-SESA-U y está caracterizado como de categoría IV (No peligroso) en peligrosidad ecotoxicológica. En la Figura 12 se muestra el insumo químico utilizado en esta investigación. El almacenamiento de este herbicida se realizó en condiciones ambientales normales, bajo sombra para evitar fotorreacciones. Cabe señalar que es el herbicida de mayor demanda en el Ecuador.

FIGURA 12 FORMULADO COMERCIAL GLIFOPAC



Elaboración: Huaraca Luis

3.2 Ensayos de ecotoxicidad

Los ensayos de ecotoxicidad se realizaron con los bioindicadores *D. magna* y *A. salina*, los cuales se cultivaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM).

3.2.1 *Daphnia magna*

3.2.1.1 Cultivo

Los cultivos de *D. magna* se realizaron siguiendo los criterios propuestos por la EPA y la OECD (2000), de tal manera que para la preparación de agua reconstituida (AR) se disolvió en agua destilada sales de $MgSO_4$, $NaHCO_3$, KCl y $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, como se observa en la Figura 13.

FIGURA 13 PREPARACIÓN DE AGUA RECONSTITUIDA

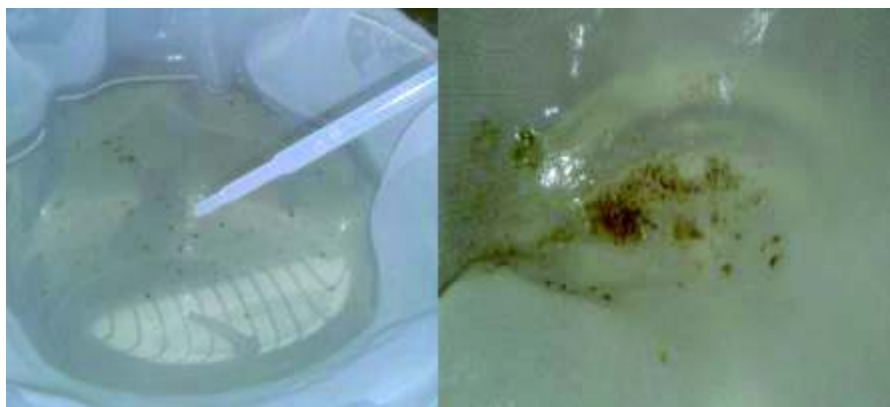


Elaboración: Huaraca Luis

Los cultivos se realizaron en vasos de precipitación de 2000 mL, con densidad poblacional aproximada de 30 individuos/L. La dureza del AR se mantuvo entre 160 y 180 mg $CaCO_3$ /L. La concentración de oxígeno disuelto fue superior a 6 mg.L⁻¹, temperatura de 21 +/- 2 °C y el fotoperiodo establecido de 16 h de luz y 8 h de oscuridad con intensidad lumínica de 800 luxes (Romero and Cantú, 2008).

La limpieza de exubias (cutícula de los daphnídeos) y restos de alimento depositados en el fondo, se realizó con la ayuda de una pipeta de 1 mL. Además, se utilizó mallas con diferente tamaño de poro, para separar los cultivos en edades de 1 a 4 semanas, tal como se observa en la Figura 14.

FIGURA 14 LIMPIEZA DE CULTIVOS DE *D. magna*



Elaboración: Huaraca Luis

La alimentación de los cultivos se realizó tres veces por semana con microalgas *Selenestrum capricornutum* (0,1 mg algas/daphnídeo/día) (OCDE, 2000) y suplemento constituido de harina de pescado, alfalfa y levadura (YTC), con recambio de agua reconstituida cada 48 h (Villamar et al., 2014). Como se observa en la Figura 15.

FIGURA 15 ALIMENTACIÓN DE *D. magna*



Elaboración: Huaraca Luis

Para realizar ensayos de toxicidad, un día previo al ensayo se extraen los neonatos, de esta forma se garantiza que dichos organismos tengan menos de 24 horas de edad.

3.2.1.2 Ensayos de toxicidad agudos sobre *D. magna*

Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron siguiendo los criterios de la EPA, (1995). De tal forma, se prepararon soluciones de glifosato con un factor de dilución de 0,5 (50%), es decir 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0%. Para tales fines, se prepararon 100 mL por cada concentración y colocaron 20 mL en recipientes de cristal (posillos), usando 3 réplicas por concentración. En cada réplica se expusieron al contaminante 5 neonatos de *D. magna* de menos de 24 h de nacidos, con un total de 15 individuos expuestos por concentración. En la Tabla 11 se describen las condiciones del bioensayo.

TABLA 11 CONDICIONES DEL BIOENSAYO CON *D. magna*

Especificaciones	Variable
Tipo de Bioensayo	Estático sin recambio
Tiempo de exposición	48 h
Temperatura	20 ± 0,2 °C
Fotoperíodo	16 h luz, 8 h oscuridad
Tamaño recipientes	50 mL
Volumen solución	20 mL
Edad organismos	neonatos < 24 h
Nº replicas por concentración	3
Nº organismos por concentración	15
Alimentación	hasta una hora antes del ensayo
Aireación	80% saturación O ₂ (≈ 8 mg.L ⁻¹)
Agua dilución	Reconstituida
Respuesta	mortalidad, movilidad

Fuente: Romero and Cantú (2008), Villamar et al., (2014)

Elaboración: Huaraca Luis

3.2.1.3 Ensayos de toxicidad subletales sobre *D. magna*

La exposición de *D. magna* a concentraciones subletales partió del valor de CL_{50} , del cual se realizó 5 disoluciones con un factor de 0.5, similar al procedimiento de toxicidad aguda. Cinco repeticiones por concentración más un blanco se realizaron en esta evaluación toxicológica. El ensayo consistió en exponer a tres organismos en cada recipiente utilizando 30 mL de solución, de tal forma que para cada concentración se obtuvo datos procedentes de 15 individuos. Diariamente, se separaron y contaron los neonatos de cada recipiente, la renovación de la solución se realizó cada 48 horas, con el fin de mantener la concentración del glifosato constante. La alimentación de los daphnídeos constituyó una mezcla de algas *Selenestrum capricornutum* (0,1 mg algas/*Daphnia*.día) (Villaroel, 2014).

La duración del ensayo fue de 21 días, dentro de los cuales se evaluó parámetros como: crecimiento, supervivencia y capacidad reproductiva.

La capacidad reproductiva, se evaluó siguiendo los criterios propuestos por Villaroel (2014) los cuales fueron:

- Tiempo medio de la primera camada
- Número medio de camadas por hembra
- Tamaño medio de camadas (número de neonatos por camada)
- Numero medio de neonatos totales por hembra a los 21 días de ensayo.

3.2.1 *Artemia salina*

3.2.1.1 Cultivo

La preparación de agua de mar artificial (AMA), se basó en la formulación de Dietrich&Kalle, la cual consiste en disolver sales de NaCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Na_2SO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y KCl en agua destilada (Pérez and Gilling, 2001).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO (2016), propone en su manual “Cultivo y uso de *Artemia* en la Acuicultura”

parámetros importantes en el mantenimiento de dicho organismo, que se pueden visualizar en la Tabla 12.

TABLA 12 PARÁMETRO DE CULTIVO DE *A. salina*

Parámetro	Criterio
Temperatura	25 – 30 °C
Salinidad	Salinidad aproximada al 5%
Oxígeno disuelto	Niveles por encima de 2 mg.L ⁻¹
Densidad de quistes	No sobrepasar 5 g quistes.L ⁻¹
Iluminación	2000 lux

Fuente: FAO (2016)

Elaboración: Huaraca Luis

Los quistes de *Artemia* adquiridos comercialmente, se hidrataron en cajas Petri por inmersión total en agua destilada a 4°C durante 12 horas en la oscuridad. Posteriormente, se transfirieron hidratados a una probeta con AMA a 25 °C, pH de 8,6 con una fuente de luz de 2000 lux y aireación continua como se observa en las figuras 16 y 17.

FIGURA 16 HIDRATACIÓN DE QUISTES DE *Artemia*

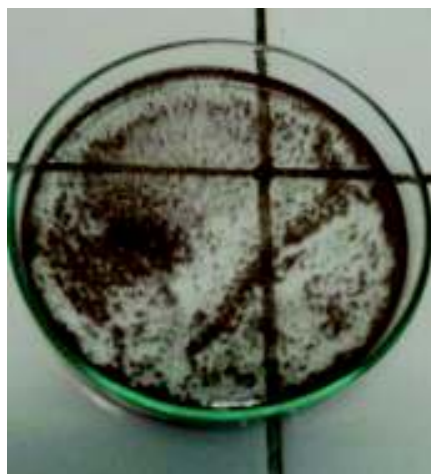


FIGURA 17 ECLOSIÓN DE QUISTES DE *Artemia*

Elaboración: Huaraca Luis

Transcurridas 16 a 18 horas del inicio de la eclosión, se obtuvo una población de nauplios suficiente para ser utilizados en los ensayos de toxicidad. Dichos organismos, se transfirieron a cajas Petri con AMA a 25°C y se mantuvieron bajo condiciones similares a los quistes durante 24 horas. Dichos nauplios, alcanzaron el estado de metanauplios, los cuales fueron usados para las evaluaciones ecotoxicológicas (Pérez and Gilling 2001).

3.2.1.2 Ensayos de toxicidad agudos sobre *A. salina*

El bioensayo consistió en realizar 5 diluciones, similar al proceso de toxicidad aguda en *D. magna*. Cabe señalar que las diluciones se realizaron con agua marina artificial (AMA). Posteriormente, el AMA fue utilizada para las diluciones utilizándose de estas mezclas 10 mL en recipientes de cristal. Con la ayuda de pipetas Pasteur, se introdujeron 10 metanauplios de *A. salina* con 3 repeticiones por cada concentración. Los viales se incubaron a 25 °C y bajo la ausencia de luz por 48 horas. (Sanchez and Neira, 2005).

3.3 Análisis analítico

3.3.1 Análisis cromatográfico del glifosato

El análisis cromatográfico del formulado comercial GLIFOPAC, se realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas y Oceanográficas de la Universidad de Concepción (UDEC), Chile.

La identificación de metabolitos y surfactantes de la formulación comercial, se llevó a cabo por la técnica de cromatografía gaseosa – espectrometría de masas (GC-MS), mediante el cromatógrafo Agilent 5975 C VL MSD y derivatización con Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). El procedimiento se basó en la metodología propuesta por Arkan et al., 2016 y Sun et al., 2017. Para tales fines, se extrajo el ingrediente activo (glifosato) y los emulsificantes del formulado comercial con acetato de etilo, como se muestra en la Figura 18.

FIGURA 18 EXTRACCIÓN DE GLIFOSATO Y EMULSIFICANTES



Elaboración: Huaraca Luis

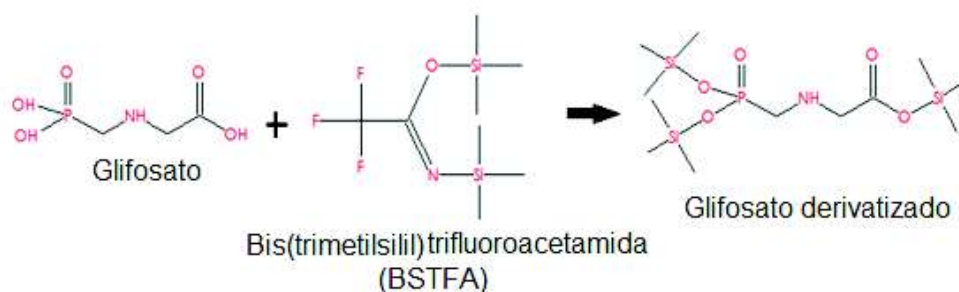
A continuación, se concentró (secado) la muestra en un rotavapor a temperatura de 50°C y 90 revoluciones por minuto (rpm), como se puede observar en la Figura 19.

FIGURA 19 SECADO DE LA MUESTRA DE GLIFOSATO

Elaboración: Huaraca Luis

La derivatización del glifosato se realizó con BSTFA en dos medios ácidos (acetato de etilo y acetonitrilo), donde los grupos trimetilsilil del BSTFA reaccionan con los grupos funcionales del glifosato (amino, carboxilo y fosfonato) en medio ácido, como se observa en la Figura 20.

Para dicha reacción, se tomaron dos alícuotas del residuo del proceso de secado y se agregó 1 mL de acetato de etilo o acetonitrilo, respectivamente más 1 mL de BSTFA. Dichas muestras se calentaron 200 °C por una hora en una estufa.

FIGURA 20 REACCIONES QUÍMICAS DEL GLIFOSATO Y EL BSTFA

Elaboración: Huaraca Luis

Una vez derivatizado el glifosato se resuspende en los medios ácidos correspondientes (acetato de etilo o acetonitrilo), según corresponda. Finalmente, se filtró en membranas de teflón PTFE con tamaño de poro de 20 μm inyectándose al cromatógrafo de gases, como se observa en la Figura 21.

FIGURA 21 INYECCIÓN DEL GLIFOSATO EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES



Elaboración: Huaraca Luis

La temperatura del equipo se programó siguiendo los criterios propuestos por Arkan et al., 2017, para que la inyección de la muestra sea a 100 °C durante 1 minuto y alcanzar los 300 °C a una tasa de 20 °C/min, manteniéndose por 4 minutos y finalmente enfriándose a 100°C a una tasa de 100 °C/min. El total del tiempo de elución fue de 16 minutos y como gas de arrastre se utilizó helio a una pureza de 99,9 %.

Para la identificación de los compuestos se utilizó la técnica de espectrometría de masas, la cual se basó en la obtención de iones (fragmentación) a partir de moléculas en fase gaseosa, estos iones son separados en función de la relación masa/carga (m/z) pasando por un detector y finalmente siendo comparados en una base de datos. Por lo tanto, un espectro de masas es un gráfico bidimensional que en el eje “y” representa la abundancia de los iones en

función de la relación m/z y en el eje "x" el tiempo a la cual eluyen los distintos tipos de iones (Arkan et al., 2016; Arkan et al., 2017; Sun et al., 2017).

3.3.2 Análisis cromatográfico del glifosato en ambiente dulce y salino

Para lograr la identificación de el/los causantes de toxicidad sobre los bioindicadores *D. magna* y *A. salina*, se realizó un análisis cromatográfico, de soluciones de GLIFOPAC de agua dulce y marina. La concentración utilizada fue de 20 mL GLIFOPAC/L, para el caso de del medio dulce se utilizó agua dura reconstituida y para el medio salino se utilizó agua de mar filtrada.

El proceso de extracción, preparación y tratamiento de las muestras fue similar al análisis cromatográfico del glifosato, exceptuando que se trabajó únicamente con acetato de etilo. Cabe señalar que el pH inicial de las soluciones fue de alrededor de 4,2 para el medio salino y 5,7 para el medio dulce.

3.4 Análisis de los datos

3.4.1 Toxicidad Aguda

La determinación de la CL_{50} se realizó con los datos de toxicidad aguda, es decir a las 48 horas. Con los resultados obtenidos, se grafican curvas dosis-respuesta y los datos son ingresados a los programas estadísticos EPA-*software* Probit en su versión 1.5 o Spearman Karber en su versión 1.5 dependiendo de la distribución normal o no normal de los datos (Castillo et al., 2004). Este programa emplea la función probit y estiman el CL_{50} a un intervalo de confianza del 95% (modificación del método tradicional) (EPA, 1993) ajustando los datos tomando en cuenta la mortalidad de los controles. Además, la distribución \log_{10} de la tolerancia al tóxico (Castillo et al., 2004; Canuta 2009).

3.4.2 Toxicidad sub letal

Para el análisis estadístico de la toxicidad sub letal, se utilizó el programa Toxstat en su versión 3.4, el cual realiza análisis de varianza (ANOVA) paramétricos y no paramétricos que permiten comparar grupos de datos. Para

este estudio, los datos previamente fueron evaluados respecto a los dos supuestos, la normalidad y homogeneidad mediante el test de Shapiro – Wilks y el test de Levene, respectivamente. En el caso de datos no paramétricos, se empleó el test de Kruskal Wallis y para datos paramétricos Dunnett, estableciéndose un nivel de significancia de 0,05. Los indicadores LOEC y NOEC se obtuvieron de los límites de diferencias establecidas por el *software* (EPA 1993). Según Fernandez (2017), el programa compara el control (sin contaminación) con cada valor experimental (con contaminación) y acepta la significación estadística (diferencias significativas) cuando la probabilidad de que el resultado asumiera la hipótesis nula, es decir los valores se aceptan cuando $p < 0,05$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis cromatográfico del herbicida comercial GLIFOPAC

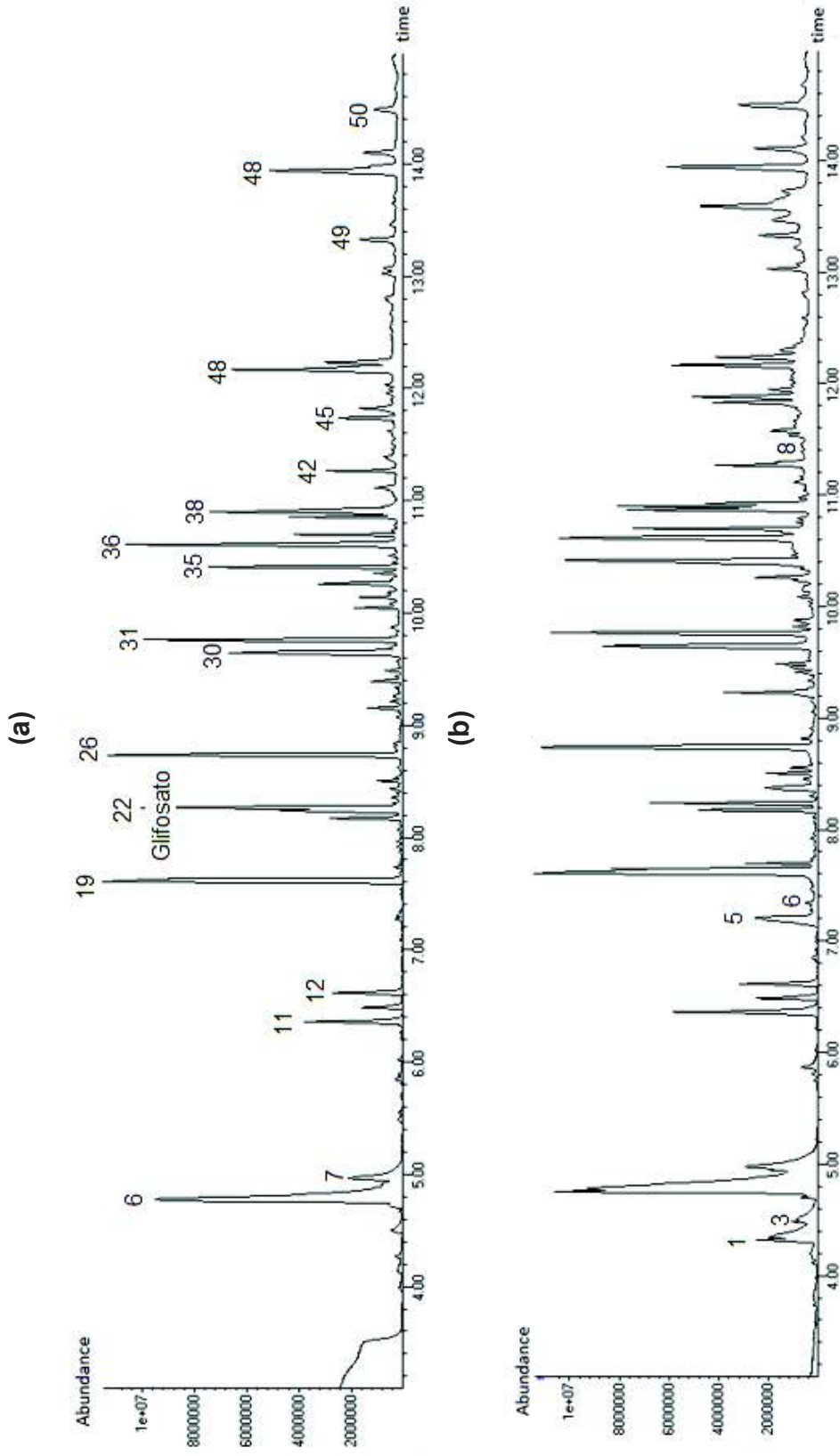
4.1.1 Identificación de sustancias coadyuvantes

El análisis cromatográfico (GC-MS) se llevó a cabo con la finalidad de obtener información cualitativa acerca de identidad de las sustancias emulsificantes y surfactantes presentes en la formulación comercial GLIFOPAC, por lo que se trabajó en dos medios: acetato de etilo y acetonitrilo. La Figura 22 describe los cromatogramas obtenidos mediante la derivatización con a) acetato de etilo y b) acetonitrilo.

Como se observa en la Figura 22, se encontraron diferencias en las señales o picos en los minutos 4,32 - 4,35 – 4,48 – 4,70 – 7,21 – 7,35 – 8,38 – 11,58 lo que implica que se identificaron distintas sustancias en cada medio (acetato de etilo y acetonitrilo). En la Tabla 13 se puede observar la identidad de las sustancias identificadas del herbicida comercial GLIFOPAC en acetato de etilo; mientras que en la Tabla 14, se observa las diferentes señales identificadas en acetonitrilo.

La molécula del glifosato se identificó en el minuto 8,27 en forma de glifosato de un ácido fosfónico. Cabe señalar que en acetonitrilo no se identificó la molécula de glifosato, por lo cual para futuros ensayos se utilizó acetato de etilo.

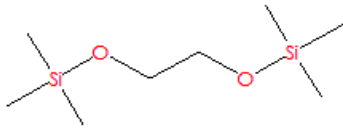
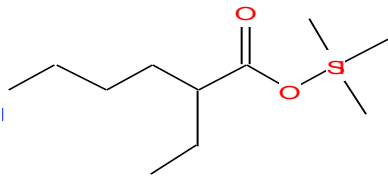
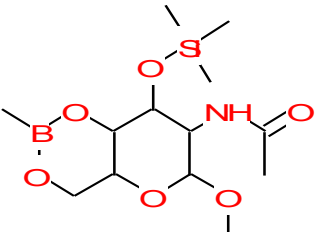
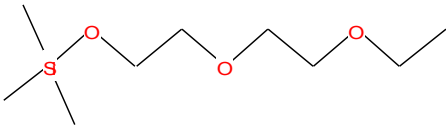
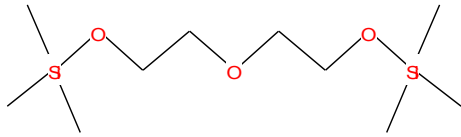
FIGURA 22 CROMATOGRAMAS PARA LOS DOS MEDIOS DERIVATIZANTES



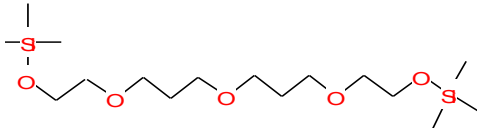
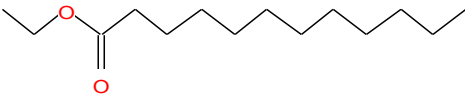
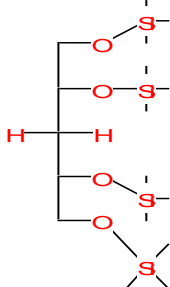
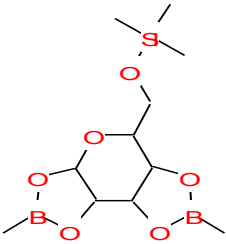
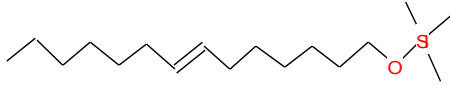
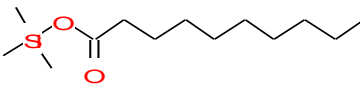
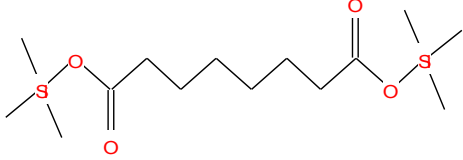
Elaborado por: Luis Huaraca

Las tablas 13 y 14 detallan las estructuras químicas identificadas mediante la derivatización de acetato de etilo y acetonitrilo, respectivamente. El análisis cromatográfico reveló la presencia de alrededor de 50 sustancias como coadyuvantes, entre las cuales destaca la presencia de cadenas alifáticas con grupos ésteres, éteres, amino y boronatos. Además, en las sustancias identificadas se ha detectado ciclos glucofuranosa, glucopiranosida y galactopiranosida.

TABLA 13 COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN ACETATO DE ETILO

N	tiempo	Nombre	Estructura
1	3,99	1,2-Bistrimetilsiloxietano	
2	4,125	2-ácido Etilhexanoico, trimetilsilil ester	
3	4,27	a-D-Glucopiranoside, metil 2-(acetilamino)-2-deoxi-3-O-(trimetilsilil)-, cyclicmetilboronato	
4	4,50	3,6,9-Trioxa-2-silaundecano, 2,2-dimetil	
5	4,72	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil-	

N	tiempo	Nombre	Estructura
6	4,78	Trimetilsilileter de glicerol	
7	4,96	Ácido Octanoico	
8	5,70	Ácido fosfónico	
9	5,85	1- Trimetilsililoxiheptadecano	
10	6,26	3,6,9,13,16-Pentaoxa- 2,17-disilaoctadecano, 2,2,17,17-tetrametil-	
11	6,36	Ácido decanoico	
12	6,61	3,6,9,12-Tetraoxa-2,13- disilatetradecano, 2,2,13,13-tetrametil-	
13	7,23	Ácido Nonadecanoico- glicerina-(1)-monoester, bis-O-trimethylsilyl-	

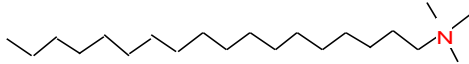
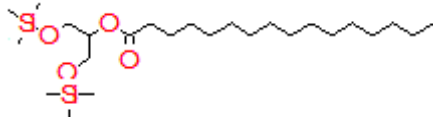
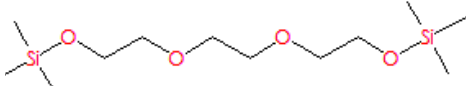
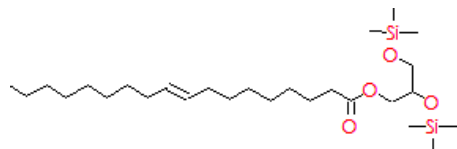
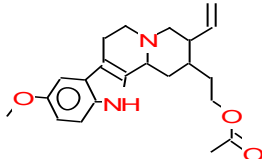
N	tiempo	Nombre	Estructura
14	7,30	3,6,10,14,17-Pentaoxa- 2,18-disilanonadecano, 2,2,18,18-tetrametil-	
15	7,34	Ácido Dodecanoico, etiléster	
16	7,45	Pentitol, 3-desoxy-tetrakis- O-(trimetilsilil)-	
17	7,48	α-D-Galactopiranoose, 6-O- (trimetilsilil)-, 1,2:3,4- bis(methylboronato)	
18	7,53	E-7- Tetradecenol,trimetilsilil éter	
19	7,60	Ácido Decanoico, trimetilsililester	
20	7,87	Ácido Octanedioico, bis(trimetilsilil) éster	

N	tiempo	Nombre	Estructura
21	8,07	1-Trimetilsililoxy-2-undecano	
22	8,27	Glifosato	
23	8,36	9- Ácido Octadecenoico, 2-[(trimetilsilil)oxy]-1-[[trimetilsilil]oxy]metil]etil éster	
24	8,43	Ácido Azelaico	
25	8,50	Monocaprilin	
26	8,88	9-Ácido Tetradecenoico, trimetilsililéster	
27	9,12	9,12,15-Ácido Octadecatrienoico, 2-[(trimetilsilil)oxy]-1-[[trimetilsilil]oxy]metil]etil éster,	

N	tiempo	Nombre	Estructura
28	9,32	Ácido Decanoico, 2- [[trimetilsilil]oxy]-1- [[[trimetilsilil]oxy]metil] etiléster	
29	9,57	D-Glucofuranose, 6-O- (trimetilsilil)- 1,2:3,5- bis(butilboronato)	
30	9,61	3,6,9,12-Tetraoxa-2,13- disilatetradecano, 2,2,13,13-tetrametil	
31	9,79	Etanol, 2-(9- octadeceniloxi)-, (Z)	
32	9,69	Z-(13,14-Epoxy)tetradec- 11-en-1-ol acetato	
33	9,86	Dasycarpidan-1-metanol, acetato (éster)	

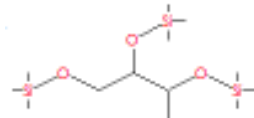
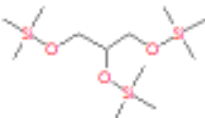
N	tiempo	Nombre	Estructura
34	10,05	15-Isopropenil-3-(trimetilsilil)oxaciclopentadecan-2-one	
35	10,41	Ácido Láurico, 2,3-bis(trimetilsiloxi)propil éster	
36	10,61	11-cis-Ácido Octadecenoico, trimetilsilil éster	
37	10,78	Vitamina D	
38	10,85	3,6,9,12-Tetraoxa-2,13-disilatetradecane, 2,2,13,13-tetrametil	
39	10,86	1-Decanamina, N,N-dimetil	





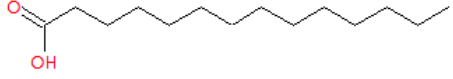
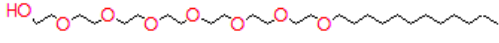
N	tiempo	Nombre	Estructura
40	10,95	Ácido Hexadecanoico , 1-(hidroximetil)-1,2-ethanedil éster	
41	11,40	Glicina, N-[(3à,5á,7à,12à)-24-oxo-3,7,12-tris[(trimetilsilil)oxy]cholan-24-yl]-, metil éster	
42	11,11	Ácido Mirístico , 2-(trimetilsiloxi)-1-[(trimetilsiloxi)metil]etil éster	
43	11,62	Ácido Dehidroabiético, trimetilsilil éster	
44	11,70	1-Monolinoleoilglicerol trimetilsilil éter	
45	11,74	1-Ácido Aminociclopropanocarbox olic, 2,6-di-t-butil-4-metoxifenil éster	

N	tiempo	Nombre	Estructura
46	11,82	Stearyltrimetilammonium chloride	
47	12,08	2-Monopalmitin trimetilsilil éter	
48	12,20	3,6,9,12-Tetraoxa-2,13-disilatetradecano, 2,2,13,13-tetrametil	
49	13,38	Monooleoilgliceroltrimetil sililéter	
50	14,45	Corinan-17-ol, 18,19-didehidro-10-metoxi-, acetate éster	

Elaborado por: Huaraca Luis

TABLA 14 SEÑALES IDENTIFICADOS EN ACETONITRILLO

N	tiempo	Nombre	Estructura
1	4,32	Butano, 1,2,3-tris(trimetilsiloxi)	
2	4,35	Trimetilsilileter de glicerol	

N	tiempo	Nombre	Estructura
3	4,48	3,6,9-Trioxa-2-silaundecano, 2,2-dimetil	
4	4,70	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil	
5	7,21	Ácido Dodecanoico	
6	7,35	Ácido Dodecanoico, etiléster	
7	8,38	Ácido Tetradecanoico	
8	11,58	Heptaetilenglicolmonododeciloéter	

Elaborado por: Huaraca Luis

En la Tabla 15 se resume los coadyuvantes cuya estructura es similar a las detectadas y son identificados con patente. En la formulación GLIFOPAC, se ha identificado que la sal de glifosato es la isopropilamina de la N - fosfometil glicina, debido a presencia del grupo amino en la fórmula (tiempo de elución 8.27 min), comparándose las sustancias emulsificantes y surfactantes identificadas con patentes de formulaciones comerciales de glifosato. Cabe señalar, que no todos los elementos identificados en el análisis cromatográfico se encontraron en patentes, por lo cual se requiere realizar un estudio específico de la formulación del herbicida GLIFOPAC, que no se incluye en el presente trabajo.

TABLA 15 COADYUVANTES CUYA ESTRUCTURA ES SIMILAR A LAS DETECTADAS Y SON IDENTIFICADOS CON PATENTE

Tiempo (min)	Compuesto identificado	Compuesto comparado	Fuente	Función
4,1	2-Ácido Etilhexanoico trimethylsilyl ester	Ácido etil hexanoico	US2012021467 1 A1	Agente secante
4,2	Glucopiranosida, metil 2-(acetilamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, ciclicomethylboronato	D-glucopiranoside	CA2558648 A1	Sistema surfactante
4,7	Trimethylsilyléter de glicerol	Éter de glicerol	US2012021467 1 A1	Agente que activa los efectos biológicos del ingrediente activo
7,2	Ácido Nonanoico - glicerina-(1)-monoester, bis-O-trimethylsilyl	Ácido Nonanoico	WO200912702 0 A1	Herbicida para prevenir el crecimiento de malas hierbas
7,3	Ácido Dodecanoico etil éster	Ácido Láurico	WO200912702 0 A1	Tensoactivo
7,5	Tetradecenol, trimethylsilyl éter	Tetradecenol	EP0268574A1	Surfactante
8,3	Ácido Octadecenoico, 2-[(trimethylsilyloxy)methyl]ethyl éster	9-Ácido Octadecenoico	WO200905563 2 A2	Surfactante Aniónico

Tiempo (min)	Compuesto identificado	Compuesto comparado	Fuente	Función
8,4	Ácido Azelaico bis(trimethylsilyl) éster	Ácido azelaico	US8461081 B2	Emulsificante Aniónico
9,1	9,12,15-Ácido Octadecatrienoico, 2 trimethylsilyloxy]methyl]ethyl éster	Metilo linolenato	US 8,211,832 B2	Surfactante
9,3	Ácido Decanoico, 2- [(trimethylsilyloxy)-1- [[(trimethylsilyloxy)methyl]ethyl éster	Ácido cáprico	US 2004/0014603 A1	Solvente no polar
10,7	Vitamina D	Vitamina D	-----	Evita oxidación de ácidos grasos (preservante)
11,6	Ácido Dehidroabietico, trimethylsilyl éster	Ácido Dehidroabietico	-----	Propiedades de secado de soluciones acuosas
11,70	Monolinoleglicol trimethylsilyl éter	Aceite de Linole	EP1001680 A1	Sistema surfactante

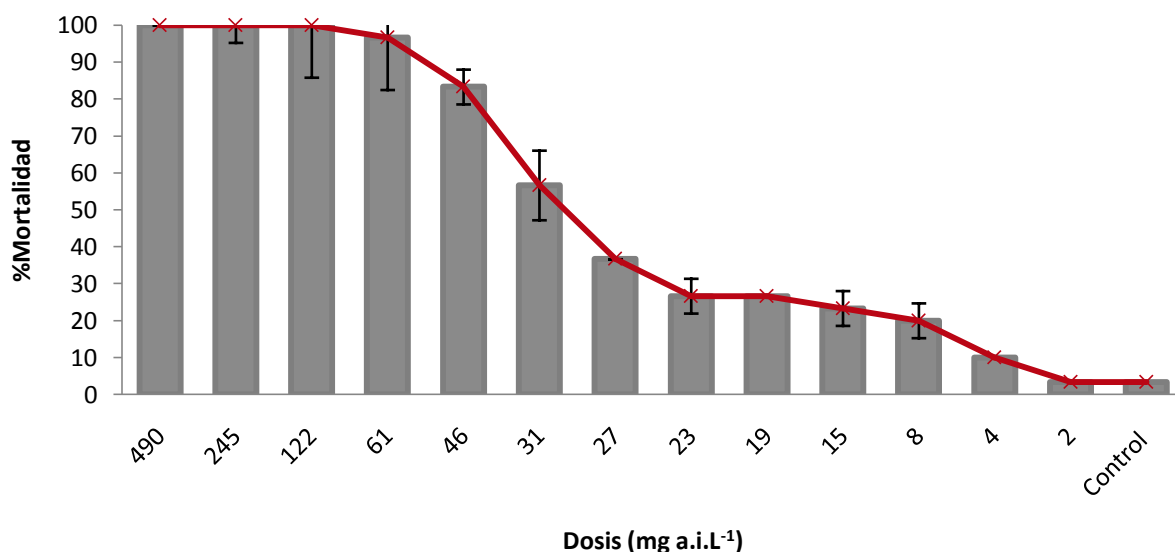
Elaborado por: Huaraca Luis

4.2 Estudios ecotoxicológicos del herbicida comercial GLIFOPAC sobre *D. magna* y *A. salina*

4.2.1 Estudio de toxicidad aguda *D. magna*

Los datos del estudio de toxicidad aguda sobre *D. magna* se pueden observar en el ANEXO 1. Con los datos se trazaron gráficas en las que se representó el porcentaje de mortalidad (eje y) con respecto a la concentración de herbicida (eje x) utilizada como se puede observar en la Figura 23.

FIGURA 23 CURVA DOSIS-RESPUESTA *D. magna* EXPUESTA A GLIFOSATO



Elaborado por: Huaraca Luis

Al observar la Figura 23 se puede visualizar que el herbicida GLIFOPAC provocó una mayor mortalidad de los individuos de *D.magna* al aumentar la concentración de tal manera que para concentraciones mayores a 122 mg a.i.L⁻¹ la mortalidad fue del 100%.

El programa EPA – Probit, empleó el valor del parámetro Chi – cuadrado de heterogeneidad de 6,662, siendo el tabulado de 16,919. Por lo tanto, los datos de mortalidad fueron paramétricos. En la Tabla 16 se reporta los valores de concentraciones letales (por sus siglas en inglés, LC) obtenidos para los ensayos de toxicidad aguda de *D. magna* expuesta a glifosato.

TABLA 16 DATOS DE CONCENTRACIONES LETALES PARA *D. magna*

Punto	Concentración mg a.i.L ⁻¹	Intervalos de confianza al 95 %	
		Inferior	Superior
LC ₁	11,39	6,08	15,10
LC ₅	14,72	9,25	18,29
LC ₁₀	16,89	11,54	20,33
LC ₁₅	18,52	13,37	21,87
LC₅₀	27,38	23,60	31,44
LC ₈₅	40,51	34,70	54,23
LC ₉₀	44,43	37,40	62,72
LC ₉₅	50,96	41,61	78,12
LC ₉₉	65,90	50,49	118,74

Elaborado por: Huaraca Luis

El valor CL_{50} para el herbicida comercial GLIFOPAC sobre *D. magna* fue de 27,38 mg a.i.L⁻¹ con intervalos de confianza al 95 % entre 23,60 y 31,44 mg a.i.L⁻¹.

En el ANEXO 1 se muestran los porcentajes de mortalidad (inmovilidad) observados en *D. magna* para cada una de las concentraciones ensayadas del herbicida comercial GLIFOPAC. Adicionalmente, se muestra el número de individuos vivos por recipiente (vivos/unidad) con los cuales se calculó el número de individuos muertos y el porcentaje de mortalidad. Cabe señalar que el ensayo se realizó por duplicado. Los valores obtenidos por Alberdi et al., 1996 para CL_{50} a 48 h del glifosato Rondo (48%) en *D. pulex* fueron de 29,62 mg a.i.L⁻¹. Por otro lado Dominguez et al., 2009, reportan datos de la CL_{50} del herbicida comercial Faena (36% pureza) y el ingrediente activo sal isopropilamina de glifosato (IPA) sobre *D. magna* a 48 h, en concentraciones de 7,9 mg faena/L y 146 mg a.i.L⁻¹, respectivamente. Investigaciones conducidas por Cubra et al., (2013) determinaron menor toxicidad aguda (LC_{50} , 48 h) sobre clones de *D. magna* del herbicida Roundup de 3,7 a 10,6 mg.L⁻¹, que la sal isopropilamina (IPA) de glifosato con valores entre 1,4 a 7,2 mg a.i.L⁻¹. Servizi et al., (1987) reporta efectos agudos (LC_{50} , 96 h) de Roundup y su surfactante MON0818, obteniendo valores de 12,24 mg a.i.L⁻¹ y 3,8 mg surfactante/L, demostrando que existe mayor toxicidad del surfactante.

Al analizar comparativamente los resultados (CL_{50}) obtenidos con los datos bibliográficos se puede evidenciar menor toxicidad aguda del compuesto ensayado GLIFOPAC (27,38 mg a.i.L⁻¹) en relación a la marca Roundup (3,7 – 12,24 mg a.i.L⁻¹) evidenciando la influencia de las sustancias coadyuvantes en las formulaciones comerciales. La toxicidad del herbicida GLIFOPAC es similar a la marca comercial Rondo (29,62 mg a.i.L⁻¹).

4.2.2 Estudio de toxicidad sub letal del herbicida comercial GLIFOPAC sobre *D. magna*

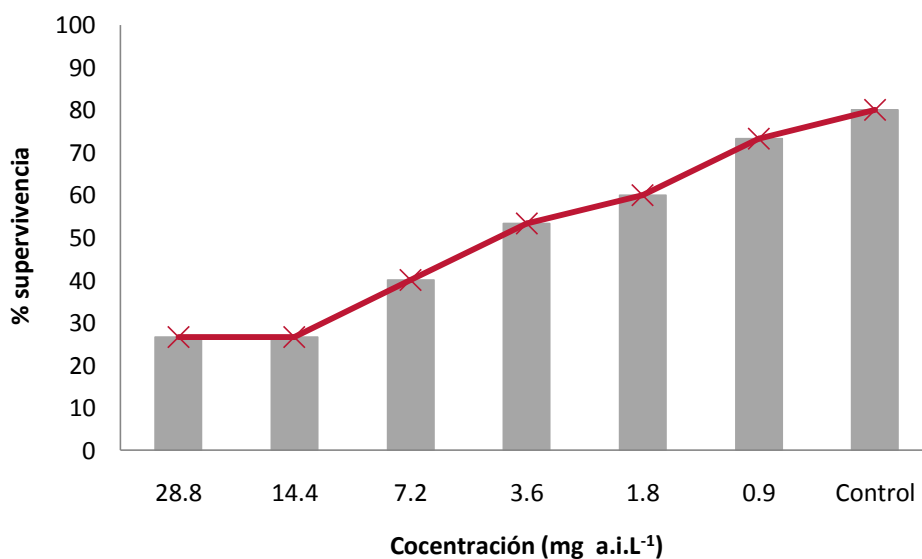
En los ANEXOS 2 (Supervivencia) y ANEXOS 3 (Datos de reproducción) se observan en detalle los datos obtenidos en el ensayo durante los 21 días. Además, en el ANEXO 4 se observa los promedios obtenidos para cada una de

las concentraciones ensayadas, para lo cual se ha realizado un tratamiento matemático de la longevidad, supervivencia y parámetros reproductivos.

4.2.2.1 Longevidad

Los datos correspondientes a la longevidad reflejan la supervivencia de al menos 3 individuos en la concentración ensayada; es decir, a las concentraciones de 28,8 y 14,40 mg a.i.L⁻¹ a los 8 y 15 días, respectivamente sobrevivieron 3 (26,6%) individuos (ANEXO 2). La Figura 24 detalla el comportamiento de este parámetro evaluado.

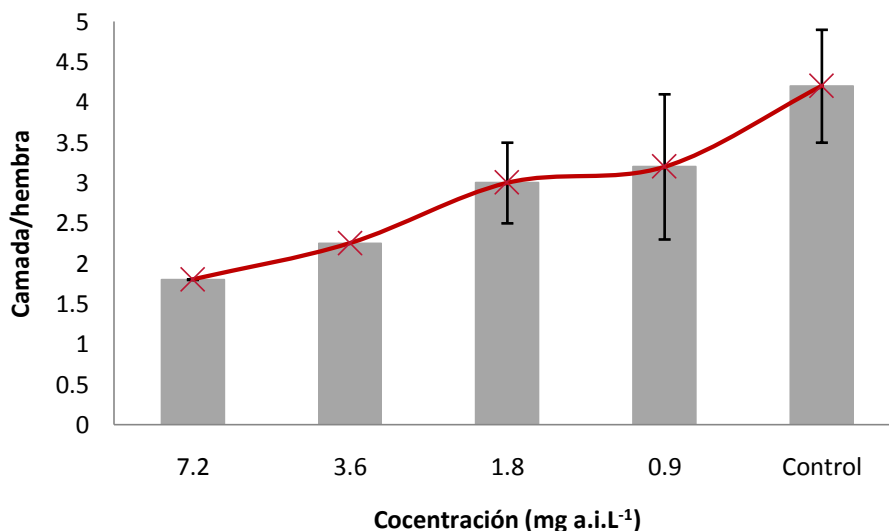
FIGURA 24 SUPERVIVENCIA DE *D. magna* A 21 DÍAS



Elaborado por: Huaraca Luis

4.2.2.2 Camada por hembra

Los datos de camada por hembra reflejan el número de partos (camadas) que tuvo cada *Daphnia* a los 21 días. Estos datos se obtuvieron realizando una inspección visual del útero de los organismos cada vez que existían neonatos en los recipientes. La Figura 25 describe el número de camadas por hembra en las concentraciones ensayadas.

FIGURA 25 NÚMERO DE CAMADAS POR *D. magna*

Al analizar los parámetros reproductivos se observa una disminución en el número de camadas por hembra desde 4,1 (Control) hasta 1,8 (7.2 mg a.i.L⁻¹) como se detalla en ANEXO 4. El análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de normalidad de Shapiro – Wilks y el test de homogeneidad de Levene, determinó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el control y las concentraciones ensayadas como se puede observar en la Tabla 17.

TABLA 17 TABLA ANOVA (CAMADAS POR HEMBRA)

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre grupos	4	0,640	0,160	0.333
Intra grupos	20	9.600	0,480	

F crítico = 2,87

Elaborado por: Huaraca Luis

El posterior test de Dunnetts mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y las concentraciones 0,8, 3,6 y 7,2 mg a.i.L⁻¹, como se puede observar en la Tabla 18. En consecuencia, el LOEC para la disminución en el número de camadas por hembra correspondió a 0,8 mg a.i.L⁻¹. Cabe señalar, que el NOEC correspondió a una concentración menor a 1,8 mg a.i.L⁻¹ que no se ha considerado en el presente estudio.

TABLA 18 TEST DE DUNNETS (NÚMERO DE CAMADAS POR HEMBRA)

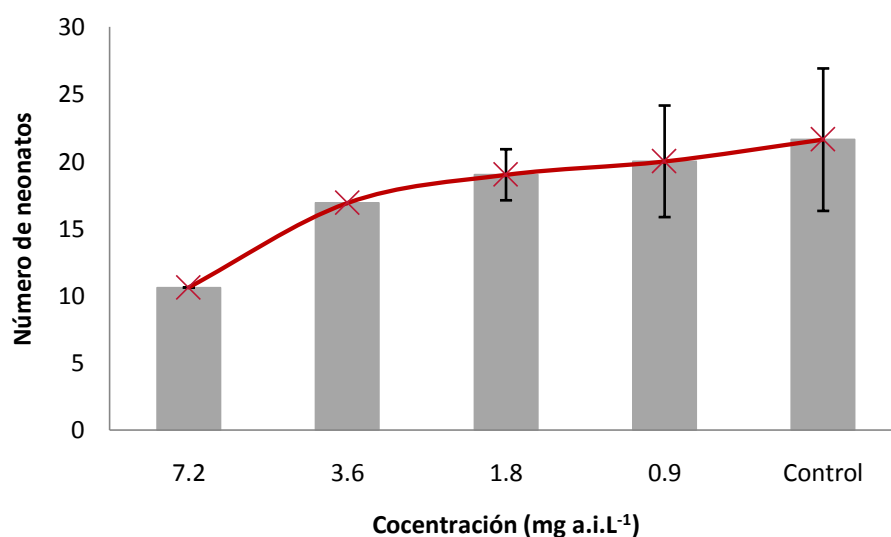
Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Valor trasformado	Valor calculado	T- stat	Significancia
Control	4,2	4,2		
0,,8	2,8	2,8	2,767	✖
1,8	3,2	3,2	1,976	
3,6	2,4	2,4	3,558	✖
7,2	1,4	1,4	5,534	✖

Dunnett tabulado = 2,30 ($p = 0,05/df = 20-4$)

Elaborado por: Huaraca Luis

4.2.2.3 Tamaño de camada

Los datos de tamaño de camada reflejan la media de los números de neonatos por cada camada en cada una de las concentraciones ensayadas. Dichos datos se obtuvieron por el cociente del número totales de neonatos por recipiente y el número de camadas en ese día. En la Figura 26 se puede observar lo anteriormente descrito.

FIGURA 26 TAMAÑO DE CAMADA POR *D. magna*

Elaborado por: Huaraca Luis

Al analizar el tamaño de camada, se observa que el glifosato tiene incidencia en el número de neonatos por camada, desde 21,6 (Control) hasta 10,6 (7,2 mg a.i.L⁻¹) neonatos/camada como se observa en el ANEXO 4. El análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de normalidad de Shapiro – Wilks y el test de homogeneidad de Levene, determinó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el control y las concentraciones ensayadas como se puede observar en la Tabla 19.

TABLA 19 TABLA ANOVA (TAMAÑO DE CAMADA)

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre grupos	4	19,20	4,80	0,380
Intra grupos	20	252,80	12,64	

F crítico = 2,87

Elaborado por: Huaraca Luis

El posterior test de Dunnetts, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y las concentraciones 3,6 y 7,2 mg a.i.L⁻¹, como se puede observar en la Tabla 20. En consecuencia, el LOEC para la disminución en el tamaño de camada por hembra fue de 3,6 mg a.i.L⁻¹ y el NOEC correspondería a una concentración de 1,8 mg a.i.L⁻¹.

TABLA 20 TEST DE DUNNETTS (TAMAÑO DE CAMADA)

Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Valor transformado	Valor calculado	T- stat	Significancia
Control	24,40	24,40		
0,8	20,00	20,00	1,724	
1,8	19,00	19,00	2,116	
3,6	16,40	16,40	3,135	✖
7,2	8,40	8,40	6,270	✖

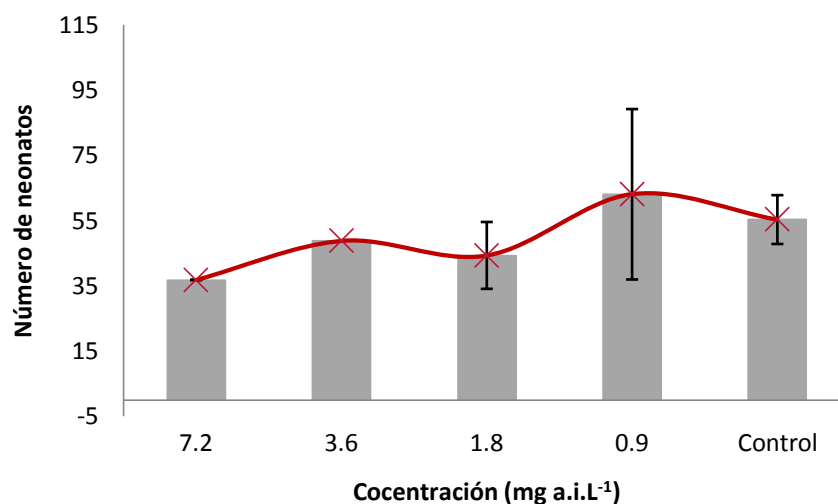
Dunnett tabulado=2,30 ($p=0,05/df=20-4$)

Elaborado por: Huaraca Luis

4.2.2.4 Neonatos totales por hembra

Los neonatos totales por hembra representan el valor medio de la sumatoria de los neonatos por hembra a los 21 días, lo cual es el resultado del cociente entre los neonatos totales en cada recipiente y el número de camadas por hembra, tal como se observa en la Figura 27.

FIGURA 27 NEONATOS TOTALES POR HEMBRA



Elaborado por: Huaraca Luis

El cálculo de neonatos totales por hembra se realizó con los datos a los 21 días, y se como se observa en la ANEXO 4 a mayor concentración de GLIFOPAC, la producción de neonatos disminuye desde 55,3 neonatos (control) a 36,8 (7,2 mg a.i.L⁻¹). El análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de normalidad de Shapiro – Wilks y el test de homogeneidad de Levene, determinó la no existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$), entre el control y las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, no se puede establecer los valores del NOEC y LOEC como se puede observar en la Tabla 21.

TABLA 21 TEST DE DUNNETTS (NEONATOS TOTALES POR *D. magna*)

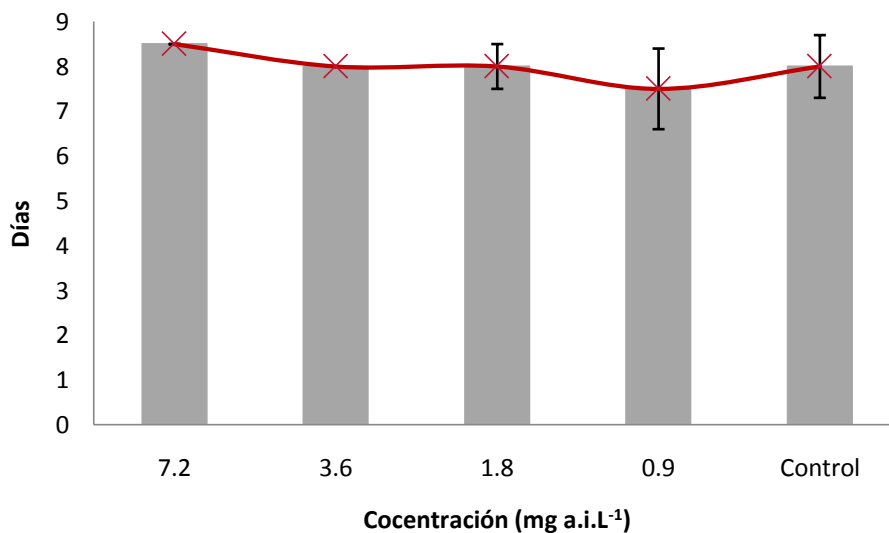
Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Valor transformado	Valor calculado	T- stat	Significancia
Control	55,40	55,40		
0,8	63,20	63,20	-0,60	
1,8	44,40	44,40	0,88	
3,6	48,80	48,80	0,53	
7,2	29,60	29,60	2,08	

Dunnett tabulado = 2,30 ($p = 0,05/df = 20-4$)

Elaborado por: Huaraca Luis

4.2.2.5 Primera camada

La primera camada representa el valor medio del tiempo al cual se produjo la primera camada en cada concentración ensayada, tal como se observa en la Figura 28.

FIGURA 28 PRIMERA CAMADA

Elaborado por: Huaraca Luis

Los datos determinaron que a mayor concentración de GLIFOPAC el tiempo para la primera camada aumenta desde 8,5 días (7,2 mg a.i.L⁻¹) a 8 (control). El análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de normalidad de Shapiro – Wilks y el test de homogeneidad de Levene, determinó la no existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$), entre el control y las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, no se puede establecer los valores del NOEC y LOEC como se puede observar en la Tabla 22.

TABLA 22 TEST DE DUNNETTS (PRIMERA CAMADA)

Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Valor transformado	Valor calculado	T- stat	Significancia
Control	8,0	8,0		
0,8	7,6	7,6	0,47	
1,8	8,0	8,0	0,00	
3,6	8,0	8,0	0,00	
7,2	8,3	8,3	-0,47	

Dunnett tabulado = 2,30 ($p = 0,05/df = 20-4$)

Elaborado por: Huaraca Luis

Valores reportados por Cubra et al., (2013) reportan valores de toxicidad subletal del herbicida Roundup sobre *D. magna* y concluyen que los valores del NOEC=0,45 y LOEC=1,35 mg a.i.L⁻¹ para reducción de fecundidad.

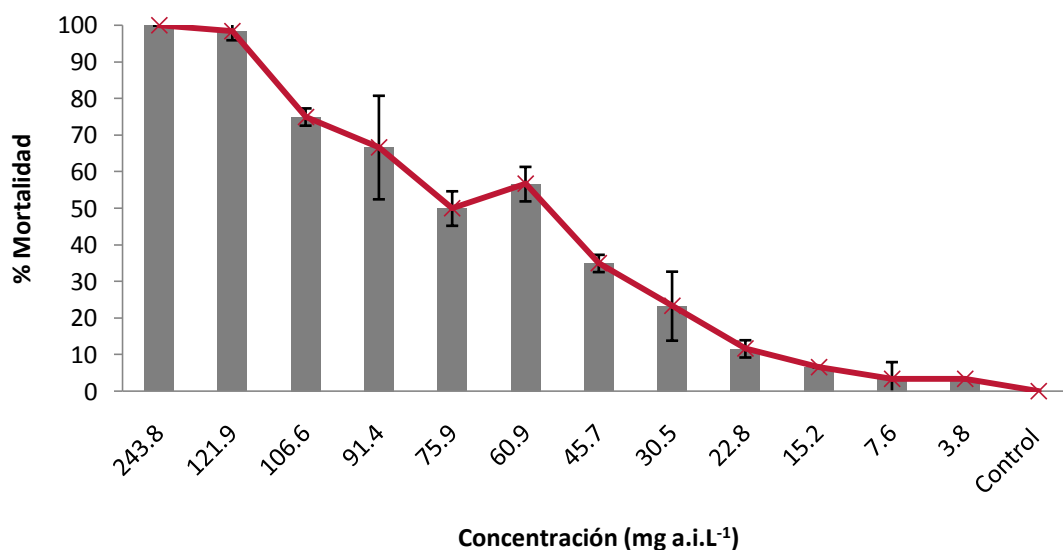
AL analizar comparativamente los datos obtenidos: NOEC < 0,8 y LOEC =3,6 mg a.i.L⁻¹ se evidencia que el herbicida comercial GLIFOPAC es ligeramente menos tóxico para el parámetro reproductivo sobre *D. magna* en comparación con el herbicida Roundup.

4.2.3 Estudio de toxicidad aguda sobre *A. salina*

El ANEXO 5 muestra los porcentajes de mortalidad (inmovilidad) observados en *A. salina* para cada una de las concentraciones ensayadas del herbicida comercial GLIFOPAC. Adicionalmente se muestra el número de individuos vivos por recipientes (vivos/ recipiente) con los cuales se calcula el número de individuos muertos y el porcentaje de mortalidad. Cabe señalar que el ensayo se realizó dos veces para calcular el valor medio y la desviación estándar.

Con los datos que se observan en el ANEXO 5 se trazaron gráficas en las que se representó el porcentaje de mortalidad (eje y) con respecto a la concentración (eje x) de herbicida utilizada como se puede observar en la Figura 29.

FIGURA 29 CRUVA DOSIS - RESPUESTA PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *Artemia*



Elaborado por: Huaraca Luis

Al observar la Figura 29 se puede determinar que el herbicida GLIFOPAC provocó una mayor mortalidad de los individuos al aumentar la concentración. Para realizar el tratamiento estadístico, se utilizó el programa EPA – Probit y el valor del parámetro Chi – cuadrado de heterogeneidad calculado fue de 10,47 y el tabulado de 18,30 lo cual indica que los datos de mortalidad son paramétricos y la utilización del programa EPA – PROBIT es justificada, de tal manera que los datos de concentraciones letales se observa en la Tabla 23.

TABLA 23 DATOS DE CONCENTRACIONES LETALES PARA *A.salina*

Punto	Concentración mg a.i.L ⁻¹	Intervalos de confianza al 95 %	
		Inferior	Superior
LC ₁	19,6	11,0	27,2
LC ₅	28,5	18,4	36,7
LC ₁₀	34,8	24,2	43,1
LC ₁₅	39,8	29,1	48,1
LC₅₀	70,4	61,1	79,2
LC ₈₅	124,6	108,2	154,5
LC ₉₀	142,7	121,3	184,7
LC ₉₅	174,3	143,1	241,9
LC ₉₉	253,6	193,6	404,1

Elaborado por: Huaraca Luis

La CL_{50} para el herbicida comercial GLIFOPAC sobre *A. salina* fue de 70,44 mg a.i.L⁻¹ con intervalos de confianza al 95% entre 61,1 y 79,2 mg a.i.L⁻¹. Cabe señalar que los ensayos de toxicidad sub-letal sobre *A. salina* no se realizaron debido a que la reproducción de la especie es sexual, condición que imposibilita obtener datos de inhibiciones reproductivas. Además, el dimorfismo sexual de *Artemia* hace imposible obtener datos alométricos, debido a que los machos morfológicamente son diferentes a las hembras, y en el estadio de metanauplios es imposible reconocer esta condición.

En la Tabla 24 se puede observar un resumen de los resultados de los ensayos de toxicidad (aguda y sub-letal) del herbicida sobre los bioindicadores ensayados.

TABLA 24 TOXICIDAD (AGUDA Y SUB-LETAL) DEL HERBICIDA SOBRE LOS BIOINDICADORES ENSAYADOS

Organismo	CL ₅₀ -48 h (mg a.i.L ⁻¹)	LOEC (mg a.i.L ⁻¹)		NOEC (mg a.i.L ⁻¹)	
		Camada/ Hembra	Tamaño de camada	Camada/ Hembra	Tamaño de camada
<i>D. magna</i>	27,38	---	---	---	---
<i>A. salina</i>	70,40	0,8	3,6	<0,8	1,8

Elaborado por: Huaraca Luis

Al comparar la toxicidad aguda de los bioindicadores ensayados se observa que la sensibilidad de *D. magna* es 2,5 veces mayor que *A. salina*. Por otro lado, los ensayos sub-letales sobre *D. magna* evidenciaron afectaciones reproductivas a concentraciones menores 0,8 a 3,6 mg a.i.L⁻¹. Así se registró reducciones de fertilidad hasta en un 57 % para el número de camadas/daphnídeo y la producción de neonatos por camada se vio afectada en un 33%, para el número de neonatos totales y el tiempo de la primera camada el estudio no es concluyente.

Los resultados obtenidos se compararon con las posibles concentraciones que se encontrarían en sistemas acuáticos, para lo cual se tomó en cuenta la dosis recomendada para cultivos que van de 0,25 a 4 kg a.i.ha⁻¹ (dependiendo del cultivo), y tomando en cuenta que aproximadamente el 3% puede llegar a

cuerpos acuáticos, es posible encontrar concentraciones del orden 0,7 a 0,8 mg a.i.L⁻¹.

Si bien en cierto las posibles concentraciones no alcanzan los valores del CL₅₀ establecidos para los bioindicadores, se podrían manifestar efectos sub-letales (reproducción) sobre poblaciones de *D. magna*, lo que afectaría la distribución trófica en sistemas acuáticos de agua dulce.

4.3 Correlación de metabolitos identificados y ensayo de toxicidad aguda sobre *D. magna* y *A.salina*

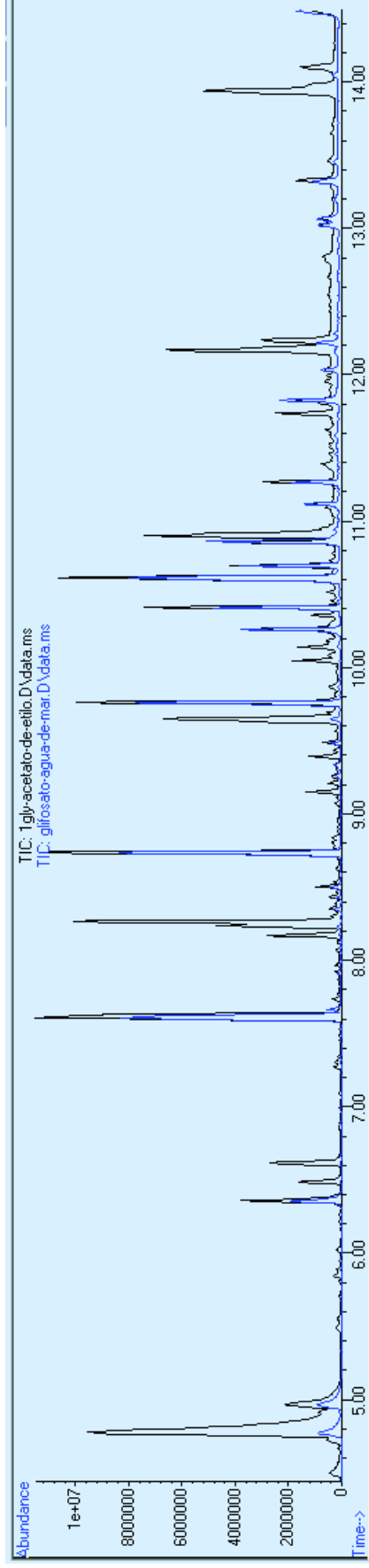
4.3.1 Análisis cromatográfico del glifosato en medios dulce y salino

En la Figura 30 se observa una comparación gráfica del glifosato (línea negra) y el medio salino (línea azul). La señal del minuto 8,27 que corresponde al glifosato, desaparece en el medio salino, lo que implica que se ha metabolizado y podría tener presencia del AMPA y otros metabolitos.

En la Figura 31, al analizar gráficamente los cromatogramas del medio dulce (línea azul) y ambiente salino (línea negra) se observa que ciertas señales son más intensas, lo que implica mayor abundancia de una sustancia en este medio, en específico en los minutos 4,76 – 4,96 – 6,35 – 11,6, donde se ha favorecido la presencia de éter de glicerol, ácido octanoico (metil linolenato), ácido decanoico, ácido mirístico.

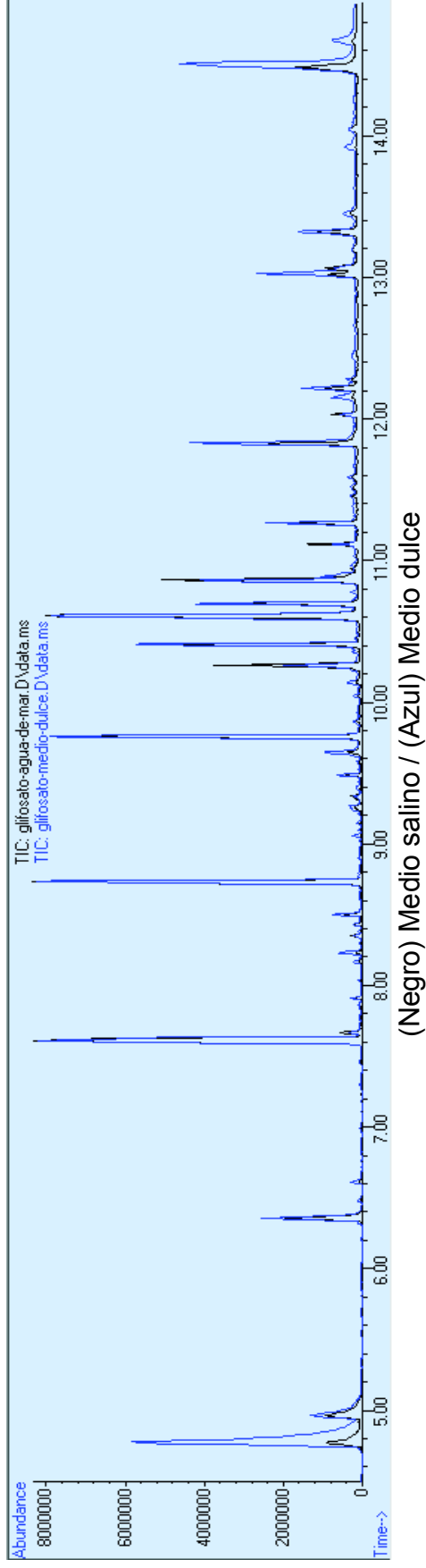
Como se evidenció que el glifosato se metaboliza en los medios (dulce y salino), se procedió a buscar la señal correspondiente a la forma ácida del glifosato (AMPA), encontrándose en el medio salino al tiempo de 4,9 minutos, como se observa en la Figura 32. Pero en el medio dulce, no se registró la presencia del AMPA (Figura 33) a pesar de registrar un pico al mismo tiempo de elución, correspondiente a otra señal. Cabe señalar, que la presencia de sarcosina y glicina no se registró en ninguno de los medios.

FIGURA 30 COMPARACIÓN GRÁFICA DEL GLIFOSATO Y EL MEDIO SALINO

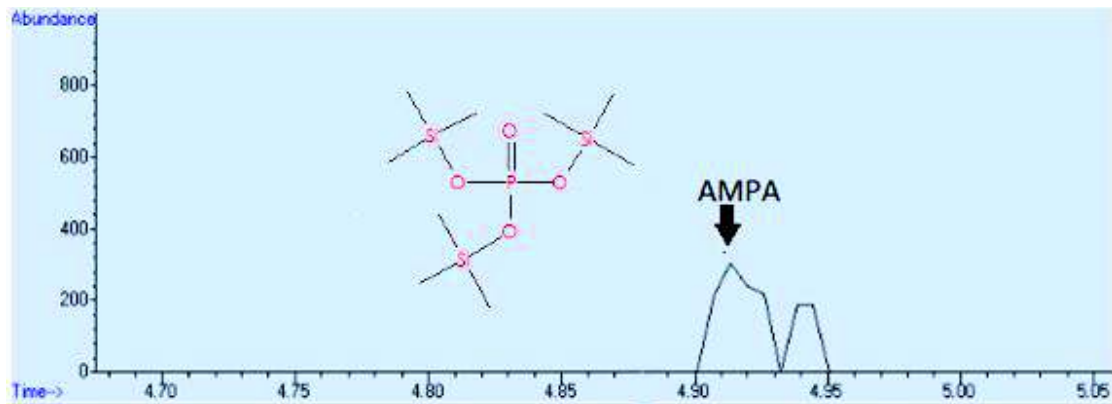
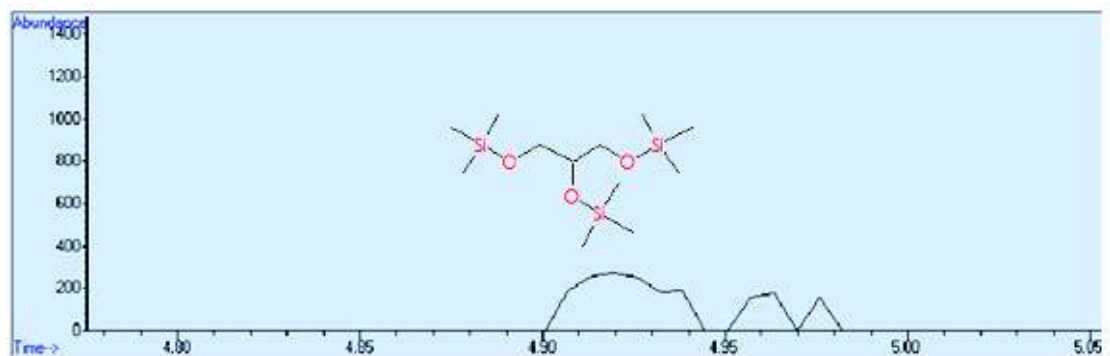


(Negro) Glifosato / (Azul) Medio salino

FIGURA 31 COMPARACIÓN GRÁFICA DEL MEDIO DULCE MEDIO SALINO



(Negro) Medio salino / (Azul) Medio dulce

FIGURA 32 GLIFOSATO EN MEDIO SALINO**FIGURA 33** GLIFOSATO EN MEDIO DULCE

Como se observa en las figuras 32 y 33 a pesar de que en el minuto 4,90 se tiene un “*peak*” en los dos medios, la naturaleza de los compuestos identificados no es la misma (comparación en la forma de la señal). En el medio salino, se identificó un compuesto fosforado de naturaleza ácida AMPA (metabolito) relacionando bibliográficamente a los tiempos de elución propuestos por Arkan et al., (2016). Mientras, que en el medio dulce la identidad de la sustancia corresponde a un éter de glicerol (coadyuvante).

Por lo tanto, de forma preliminar se evidencia que la presencia del AMPA en agua salada, es un factor determinante en la toxicidad del herbicida sobre *Artemia salina*, por otro lado en medio dulce al no tener la presencia del AMPA la presencia de los coadyuvantes cobra importancia en la toxicidad sobre *D. magna*.

La correlación de toxicidad específica de los coadyuvantes se realizó considerando los criterios de afinidad de dichos compuestos a los compartimentos ambientales. En la Tabla 25 se detalla la clasificación de afinidad ambiental de compuestos en función de propiedades físico – químicas, relacionadas con los compartimentos ambientales.

TABLA 25 AFINIDAD DE LAS SUSTANCIAS EN FUNCIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Afinidad	Agua	Aire	Suelo
	Solubilidad (g.L ⁻¹)	H (Pam ³ /mol)	log koc
Alta	>1	>10	>5
Media alta	1 – 10 ⁻²	10 – 10 ⁻¹	5 – 4
Media	10 ⁻² – 10 ⁻³	10 ⁻¹ – 10 ⁻²	4 – 2
Media baja	10 ⁻³ – 10 ⁻⁵	10 ⁻² – 10 ⁻⁴	2 -1
Baja	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁴	<1

H (constante de Henry): Presión de vapor/solubilidad en agua

Fuente: CEPIS (2017)

Por otro lado Camean (1995) relaciona la afinidad del Factor de Bioconcentración (FBC) en el medio acuático. Como se observa en la Tabla 26.

TABLA 26 RELACIÓN DE BCF Y AFINIDAD

FBC	Afinidad
<1	No bioconcentrable
<10	Baja
10 – 100	Medio
>100	Alto

Fuente: Camean (1995)

La Tabla 27 muestra los valores de solubilidad, Koc, Kow, H y BFC para las sustancias identificadas como coadyuvantes en el herbicida GLIFOPAC.

TABLA 27 CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS DE LOS COADYUVANTES IDENTIFICADOS

N	Compuesto	Fórmula	Solubilidad (25°C) (mg.L ⁻¹)	Log Koc	Log Kow	Pv (25°C) mm Hg	H (atmm ³ /mol)	BCF
1	Ácido etil hexanoico	C ₈ H ₁₆ O ₂	1400	1,38	2,64	0,03	3x0 ⁻⁶	3,16
2	D-glucopiranosida	C ₇ H ₁₄ O ₆	1x10 ⁶	1,00	-2,50	0,21	1,56x10 ⁻¹⁴	3,16
3	Eter de glicerol	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	0,93	4,76	4,77	0,15	1,38x10 ⁻³	937,00
4	Ácido Nonanoico	C ₉ H ₁₈ O ₂	207,80	1,67	3,52	0,02	3,98x10 ⁻⁶	3,16
5	Ácido Láurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	12,76	2,47	5,00	<0,01	9,31x10 ⁻⁶	3,12
6	Tetradecenol	C ₁₄ H ₃₀ O	0,84	3,05	5,75	<0,01	1,70x10 ⁻⁴	277,40
7	9-Ácido Octadecenoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0,01	4,07	7,73	5,13 x10 ⁻⁵	4,48x10 ⁻⁵	10,00
8	Ácido azelaico	C ₉ H ₁₆ O ₄	5684	2,13	1,70	2,29x10 ⁻⁵	2,23 x10 ⁻¹¹	3,16
9	Metil de Linolenato	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	0,06	4,80	7,59	3,1x10 ⁻⁵	1,11x10 ⁻²	439,80
10	Ácido cáprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	47,89	1,94	4,02	0,01	5,28x10 ⁻⁶	3,16
11	Vitamina D	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	0,39	4,05	4,29	2,5x10 ⁻¹⁴	2,19x10 ⁻¹⁰	404,40
12	Ácido Dehidroabietico	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	0,08	4,34	6,52	2,88x10 ⁻⁷	1,78x10 ⁻⁷	56,23
13	Linoleoil	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	0,03	2,76	6,19	1,51x10 ⁻⁹	2,97x10 ⁻⁸	365,90

Fuente: ChemSpider

Elaborado por: Huaraca Luis

Con los criterios de afinidad propuestos, se relacionó la afinidad en función de las propiedades físico – químicas de las sustancias coadyuvantes identificados en las patentes de herbicidas comerciales a base de glifosato (Tabla 27). Dicha relación cualitativa se puede observar en la Tabla 28.

TABLA 28 RELACIÓN CUALITATIVA DE LOS COADYUDANTES Y LA AFINIDAD EN EL AMBIENTE

N	Compuesto	Solubilidad	H	log Kow	log Koc	BCF
1	Ácido etil hexanoico	Alta	Media baja	Media baja	Media baja	Baja
2	D-glucopiranosida	Alta	Baja	Media baja	Media baja	Baja
3	Eter de glicerol	Media baja	Alta	Media alta	Media alta	Alta
4	Ácido Nonanoico	Media alta	Media alta	Media alta	Media baja	Baja
5	Ácido Láurico	Media alta	Media alta	Alta	Media	Baja
6	Tetradecenol	Media baja	Alta	Alta	Media	Alta
7	9-Ácido Octadecenoico	Media baja	Media alta	Alta	Media alta	Media
8	ácido azelaico	Media alta	Baja	Media baja	Media	Baja
9	Metil Linolenate	Media baja	Media alta	Alta	Media alta	Alta
10	Ácido cáprico	Media alta	Media alta	Media alta	Media baja	Baja
11	Vitamina D	Media baja	Baja	Media alta	Media alta	Alta
12	Ácido Dehidroabietico	Media baja	Media	Alta	Media alta	Media
13	Linoleoil	Media baja	Baja	Alta	Media	Alta

Elaborado por: Huaraca Luis

Una vez identificadas las sustancias con alta disponibilidad en medios acuáticos (ácidos nonanoico, laurico, cáprico y tetradecenol) se recopilaron datos bibliográficos de toxicidad (CL_{50} -48 h) sobre *D. magna* para evaluarlos en función de la toxicidad observada. Dicha información se observa en la Tabla 29.

TABLA 29 DATOS DE TOXICIDAD (CL_{50} - 48H) PARA COADYUVANTES BIODISPONIBLES EN AMBIENTES ACUÁTICOS

Sustancia	Toxicidad (CL_{50} – 48h)	Fuente
Ácido Nonanoico	96 mg.L ⁻¹	FS OXEA
Ácido Láurico	No tóxico	FS APLICHEM
Tetradecenol	0,1 – 1 mg.L ⁻¹	FS SASOL
Ácido cáprico (1 – decanol)	3 mg.L ⁻¹	FS ROTH

FS: Ficha de seguridad

Elaborado por: Huaraca Luis

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Mediante la identificación cualitativa de la composición química del herbicida GLIOFOPAC, se determinó la presencia de al menos 50 sustancias como coadyuvantes, dentro de las cuales los ácidos nonanoico, láurico, cáprico y tetradecenol son importantes debido a su bio disponibilidad en ambientes acuáticos.
- Los ensayos de toxicidad aguda sobre *D. magna* y *A. salina* determinaron que el herbicida GLIFOPAC tiene incidencia directa en la toxicidad sobre los bioindicadores ensayados, siendo *D. magna* más sensible en aproximadamente 2,5 veces ($CL_{50} - 48h = 27.38 \text{ mg a.i.L}^{-1}$) que *A. salina* ($CL_{50} - 48h = 70.40 \text{ mg a.i.L}^{-1}$). Mientras que, los ensayos sub-letales determinaron afectaciones reproductivas tales como camada por hembra y tamaño de camada, sobre *D. magna* a concentraciones superiores a $0,8 \text{ mg a.i.L}^{-1}$.
- El estudio comparativo del ambiente salino respecto al agua dulce determinó que en el medio salino la presencia del AMPA es un factor determinante en la toxicidad sobre *Artemia*; mientras que en el ambiente de agua dulce, la presencia del tetradecenol como coadyuvante aumenta la toxicidad sobre *D. magna*.
- Finalmente se concluye que la presencia del herbicida comercial GLIFOPAC en ambientes acuáticos es un factor con potencial tóxico a corto y mediano plazo para organismos como *Daphnia magna* y *Artemia salina*.

5.2 Recomendaciones

- Ensayos en bioindicadores terrestres deberían realizarse para determinar el efecto directo de Glifosato y AMPA en sedimentos de medios acuáticos en el Ecuador.
- Ensayos cromatográficos específicos debe realizarse para determinar sustancias de naturaleza nitrogenada, debido a que en los coadyuvantes identificados existen estructuras similares al POEA.
- Para determinar el parámetro de crecimiento en ensayo de toxicidad sub-letal sobre *D. magna*, se debería realizar a 7 días (primera camada), debido a que la mortalidad a los 21 días no se obtiene suficientes datos para realizar el análisis de varianza.
- Los ensayos de toxicidad sub-letal se deberían realizar sobre un bioindicador salino, en el que la reproducción sea por partinogénesis, para tales efecto se recomienda realizar ensayos de toxicidad crónica sobre el bioindicador *Tisbe longuicornis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., Nakano, Y. (2001). Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45, 487-495.
- Alberdi, J. L., Sáenz, M. E., Di Marzio, W. D., & Tortorelli, M. C. (1996). Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 57(2), 229-235.
- Albert, L. A. (1997). Contaminantes ambientales y criterios de evaluación. *Introducción a la toxicología ambiental. México DF: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud*, 101-12.
- Alonso, M. (1996). *Crustacea, branchiopoda* (Vol. 7). Editorial CSIC-CSIC Press.
- American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vigésima edición. American Public Health Association. Ap. 8010G, Washington D.C
- APPLICHEM (Ficha de seguridad). 2012. Ácido Láurico. Recuperado de https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A5423_es_ES.pdf
- Arkan, T., Csámpai, A., & Molnár-Perl, I. (2016). Alkylsilyl derivatization of glyphosate and aminomethylphosphonic acid followed by gas chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 125, 219-223.
- Arregui, M. C., Beldoménico, H. R., Cassano, A. E., Collins, P., Gagneten, A. M., Kleinsorge, E. C., Maitre, M. I. (2010). Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato, 48pp.
- Bai, S. H., Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18988-19001.
- Barrionuevo, R., & Marcial, R. (2006). *Ecología trófica de la fauna acuática en el manglar de San Pedro, Sechura*. Universidad Nacional de Piura.

- Becher, D., Agbaje, H., Travers, J., Brinker, R., Ottens., T (2006) *Herbicidal Compositions Containing N- Phosphonomethyl Glycine and an Auxin Herbicide N° EP1001680 A1* United States Patent
- Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (1999). *Ecología: individuos, poblaciones y comunidades* (No. 04; QH541, B43y 1999.). Barcelona
Barcelona: Omega
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 3.
- Brinker, J., Sandbrink, J., Wideman, A., Wright, D., 2000. *Formulaciones de glifosato que contienen tensoactivos de eteramina N° 2141055. España* Patent and Trademark Office
- Browne, R. A., & Wanigasekera, G. (2000). Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 244(1), 29-44.
- Browne, R. A., & Wanigasekera, G. (2000). Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 244(1), 29-44.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria, CASAFA. (2011). Guía de productos fitosanitarios para la Republica Argentina. In *Guía de productos fitosanitarios para la Republica Argentina*.
- Camean, A. (1995). *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos
- Cárcamo I. (2010). Investigación sobre aplicadores de agrotóxicos en plantaciones de FOSA, RAP – AL Uruguay, 34pp
- CEPIS. 2017 The Predictive Approach to Environmental Distribution and Fate of Chemical Substances", por Davide Calamari, Instituto de Entomología Agrícola, Universidad de Milán, Italia,
- Chang, F. C., Simcik, M. F., & Capel, P. D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 548-555.

- Cisneros, R., & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología aplicada*, 8(1-2), 9-14.
- Cisneros, R., & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología aplicada*, 8(1-2), 9-14
- Civeira, G. (2012). Recopilación sobre los efectos del Glifosato en agroecosistemas Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Julio, 2009. *Eds. Buenos Aires. Autor.*,
- Cubra, M., Traavik, T., Bøhn, T. (2013). Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2), 251-262.
- Day, K. E. (1991). Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 91-101.
- Degenhardt, D., Humphries, D., Cessna, A. J., Messing, P., Badiou, P. H., Raina, R., Pennock, D. J. (2012). Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment of two Canadian prairie wetlands. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 47, 631-639.
- Diamanti – Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC., Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT (2009). Endocrine disrupting chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Review* 30, 293 – 342
- Dick, R. E., & Quinn, J. P. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(3), 545-550.
- Dmitruk, U., & Dojlido, J. (2000). Application of Toxkit microbiotests for toxicity evaluation of river waters and waste waters in the region of Warsaw in Poland. In *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* (pp. 323-325). Springer US.
- Dominguez Cortinas G., Mejía Saavedra J., Santos Medrano G. E., Martinez R. R. (2008). Analysis of toxicity of glyphosate and Faenausin the freshwater

invertebrates *Daphnia magna* and *Lecanequadridentata*. *Toxicology and Environmental Chemical*, 90, 377 – 384.

Donadío de Gandolfi, M. C., García, S. I., Ghersa, C. M., Haas, A. I., Larripa, I., Marra, C. A., & Ricca, A. Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Consejo Nacional De Investigaciones Científicas Y Técnicas.. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Julio, 2009. *Eds. Buenos Aires. Autor.*

Druart, C., Delhomme, O., De Vaufleury, A., Ntcho, E., & Millet, M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(4), 1725-1732.

Duarte, W. R., Barragán, I. R., Mocha, P. E. (2003). Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (revisión de literatura). *Orinoquia*, 7, 70-100.

EPA. 1993. Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*). 131-147.

Forbes, J., Henriët, M., Hewitt, S., Belgium, R., Mitchell W. 1995. *Glyphosate formulations Comprising alkoxylated amine surfactants N° US8461081 B2*. United States Patent.

García, H., Nadolny, D. 2005. *Glyposate Composition N° CA2558648 A1*. United States Patent

García-Ulloa, M., Gallo-García, M. C., Ponce-Palafox, J. T., Rodríguez-González, H., & Góngora-Gómez, A. M. (2012). Crecimiento de crías de *Oreochromis niloticus* alimentadas con una inclusión dietética de quistes decapsulados de *Artemia*. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 16(1)

Gómez, J. F. (1995). Control de malezas. *CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Cali-CENICAÑA. P*, 143-152.

Henriët, M., Mitchell, R. 1988. *Compositions containing glyphosate, simazine and diuron. N° EP0268574A1*. European patent. Espacenet

- Herrera, M. A. (2011). Implementación de una metodología para la determinación de glifosato en muestras de agua. *Universidad Industrial de Santander (UIS)*.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 2015. Registro de productos plaguicidas.
- Levine, S. L., von Mérey, G., Minderhout, T., Manson, P., & Sutton, P. (2015). Aminomethylphosphonic acid has low chronic toxicity to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(6), 1382-1389.
- LLosas, J., Raya, J., Fabry, B., Abribat, B., (2013) *Herbicide Composition Containing Glyphosate N° US 8,211,832 B2* United States Patent
- López, C. E., Espinosa, A., Alape, J. (1996). Variación en las características del ciclo de vida en individuos de *Daphnia magna*, provenientes de diferentes camadas. *Acta Biológica Colombiana*, 3, 93-104.
- Mackay, N., Touchant, K., Seuntjens, P., Tang, T., Bronders, J. (2016). A hybrid monitoring and modelling approach to assess the contribution of sources of glyphosate and AMPA in large river catchments. *Science of The Total Environment*, 573, 1580-1588.
- Mackay, D., Kuo-Ching Ma, D.M., Sum Chi Lee, and Wan Ying Shiu. (2006), *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*, EEUU, New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 3572pp
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 36(2), 193-199.
- Martinez T. K., Tsui L., Chu M. (2013) Aquatic toxicity of glyphosate – based formulations: comparison between different organism and the effects of environmental factors, *Chemosphere*, 52, 1189 – 1197.
- Martínez-Tabche, L., Romero Solís, M., López López, E., Galar Martínez, M. (1999). Efecto tóxico del DDT, clordano y agua de la presa Ignacio Ramírez

- (México), sobre *Daphnia magna* (Crustacea: Daphnidae). *Revista de Biología Tropical*, 47, 681-690.
- Martins, J., Teles, L. O., Vasconcelos, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Daniorerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33, 414-425.
- Mejia, J. C., Barrera, T. C., Figueroa, J. L. A., Hernández, L. H. H., Mejia, G. C., Andrade, R. D. L., & Monroy, M. D. C. D. (2009). La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. *ContactoS*, 73, 5-15.
- Mendoza-Cantú, A., Ramírez-Romero, P., Pica-Granados, Y., Zarco, C., Jaisibi, I., Salazar Coria, L., Sobrino Figueroa, A. S. (2013). Intercalibración de las pruebas con *Daphnia magna* y *Pseudo kirchneriella subcapitata* en México: herramientas potenciales para el monitoreo ambiental. *Hidrobiológica*, 23, 97-110.
- Menéndez Helman, R. J. (2013). *Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental*. Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires (UBA). Buenos Aires, Argentina, 12pp.
- Montagna, M. C. (2009). *Toxicidad de agroquímicos sobre especies acuáticas autóctonas: Crustáceos Decápodos* (Doctoral dissertation), Instituto Nacional de Ecología, Universidad del Litoral Buenos Aires - Argentina 36pp
- Nivia, E. (2000). Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato. *Recuperado de* Weed Science Laboratory, USDA-ARS, BARC-W, 10300 Baltimore Ave, Beltsville, MD USA 1999
- Organization for Economic Co-operation and Development (OCDE)(2000). Section 2. Guideline 202. *Daphnia* sp. acute immobilisation test and reproduction test. Technical report, Guidelines for testing chemicals, Paris, 10pp.
- OXEA (Ficha de seguridad). 2016. *Ácido Nonanoico*. Oxea chemicals <http://www.oxeachemicals.com/download/wercs/MTA1NjAjbXMjcHMjYw14IzE0ODI0MDE1MjkwMDAjb3hIYSMxI0Q=/10560-ms-ps-mx.pdf>

- Parada-Valderrama, M. (2014). *Evaluación de la disrupción endocrina y efectos toxicológicos en Daphnia magna de un extracto estandarizado de Buddleja globosa Hope y de su componente mayoritario (verbascósido)*. Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile, 30pp.
- Pérez, Y. G., & Gilling, P. A. (2010). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de Artemia salina. *Anuario Toxicología*, 1(1), 104-8.
- Pérez, G., Torremorrell, A., Mugni, H., Rodríguez, P., Bustingorry, J., Ferrano, M., Pizarro, H. (2007) Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310-2322
- Persoone, G., Vanhaecke, P., Claus, C., & Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with Artemia nauplii. *Ecotoxicology and environmental safety*, 5(3), 382-387.
- 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(1), 34-43.
- Reno, U., Gutierrez, M. F., Regalado, L., & Gagneten, A. M. (2014). The impact of Eskoba®, a glyphosate formulation, on the freshwater plankton community. *Water Environment Research*, 86(12), 2294-2300
- Reyes, C., & Elizabeth, R. (2013). Producción semi-intensiva de biomasa de Artemia franciscana kellogg 1906 (cepa Virrilá, Perú) *Microchemical Journal*, 125, 219-223.
- Rodrigues, L., de Oliveira, R., Abe, F. R., Brito, L. B., Moura, D. S., Valadares, M., Grisolia, C., Oliveira, S. (2008). Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 64, 225 – 252
- Rodríguez, C. (2015). Análisis, biodisponibilidad y vigilancia de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el medio acuático.
- Rodríguez, H. A., Guerrero, J., Castro, R. (2002). Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico en aguas mediante

cromatografía líquida de alta eficiencia con derivación poscolumna y detección por fluorescencia. *Revista Colombiana de Química*, 31, 52 - 64

- Rojas, G. P., Fierro, J. A. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL50) del Glifosato Roundup R 747 SG ((NH₄) C₃H₇NO₅P), por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex*.
- Romero, P. R., Cantú, A. M. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México: 17pp
- ROTH (Ficha de seguridad). 2017. 1- Decanol (Ácido cáprico). Recuperado de https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/4/SDB_4151_ES_ES.pdf
- Ruppert, E. E. B., Fox, R. D., Ruppert, R. S. E. E., Fox, R. S., & Barnes, R. D. (2004). *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach* (No. 592 RUPi)
- Sagastume, J. M. M., & Robles, A. N. (2001). *U.S. Patent No. 6,210,578*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Salazar-López, N. J., Madrid, M. L. A. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Biotecnia*, 13, 23-28.
- Sánchez Martínez, M. (2005). *Alteraciones fisiológicas como consecuencia de la exposición a plaguicidas en sucesivas generaciones de Daphnia magna*. Doctoral dissertation, Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia, Valencia, España, 17pp.
- Sánchez, L., & Neira, A. (2006). Bioensayo General de Letalidad en *Artemia Salina*, a Las Fracciones del Extracto Etanólico De *Psidium Guajava*. L y *Psidium Guineense*. Sw. *Cultura Científica*, 3(3), 40-45.
- Sánchez, L., & Neira, A. (2011). Bioensayo General de Letalidad en *Artemia Salina*, a Las Fracciones del Extracto Etanólico De *Psidium Guajava*. L y *Psidium Guineense*. Sw. *Cultura Científica*, 3(3), 40-45
- Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G., & Ronco, A. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. CIID, Ottawa, ON, CA.
- Santos, Claudia. Sánchez, Andrés. (2006). Optimización del procedimiento de evaluación medioambiental de quejas instauradas contra el programa de

erradicación de cultivos ilícitos con glifosato. Tesis de Pregrado, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia, 36pp.

- Shawn, T., Stamps, R., Diaz, R. Uso apropiado y Manipulación de Glifosato y Viveros de plantas Pest Management Science 67 (9): 1037 – 1048
- Silva, J., Torrejón, G., Bay-Schmith, E., Larrain, A. (2003). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana*, 67, 87-96.
- Snell, T. W. (2005). Rotifer ingestion test for rapid assessment of toxicity. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, 323-335.
- Soriano-Peña, J. L., Reynel-Rodríguez, C., Zevallos-Pollito, P., Bulnes-Soriano, F., & Pérez-Ojeda del Arco, A. (2004). Diversidad, composición florística y endemismos en los bosques estacionalmente secos alterados del distrito de Jaén, Perú. *Ecología aplicada*, 6(1-2), 9-22.
- Souza da Silva, R., Cognato, G., Rezende, F., Dutra, D., (2003) Different sensitivity of Ca²⁺ – ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleifirms*. *Comp Bioch Phys Part C* 135:215 – 220
- Spósito, M., Espínola Moltedo, J. C., & Saona Olivera, G. F. (2016). Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representantes de diferentes hábitats y niveles tróficos. *Innotec*, (12pp).
- Stickler, C., Worthley, R., 2008. *Herbicide Glyphosate Composition N° WO2009127020 A1*. United States Patent
- Stockdale, A., Tipping, E., Fjellheim, A., Garmo, Ø. A., Hildrew, A. G., Lofts, S., ... & Shilland, E. M. (2014). Recovery of macroinvertebrate species richness in acidified upland waters assessed with a field toxicity model. *Ecological Indicators*, 37, 341-350
- Sun, L., Kong, D., Gu, W., Guo, X., Tao, W., Shan, Z., ... & Wang, N. (2017). Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1502, 8-13

- Szekacs, A., & Darvas, B. (2012). Forty years with glyphosate. In *Herbicides- Properties, Synthesis and Control of Weeds*. InTech P, 143-152.
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista. Luna. Azul*, 32, 121-127.
- Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*, 29, 456-475.
- Vera, M., Lagomarsino L., Sylvester M., Pérez, G., Zagarese, H., Ferrano, M. (2009) New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impacto on the periphyton community in the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19 (4):710 - 721
- Villamar, C. A., Cañuta, T., Belmonte, M., Vidal, G. (2012). Characterization of swine wastewater by toxicity identification evaluation methodology (TIE). *Water, Air, and Soil Pollution*, 223, 363-369.
- Villamar, C. A., Silva, J., Bay-Schmith, E., Vidal, G. (2014). Toxicity identification evaluation of anaerobically treated swine slurry: A comparison between *Daphnia magna* and *Raphanus sativus*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49, 880-888.
- Villarreal-Utrillas, M. (2004). *Alteraciones fisiológicas en el crustáceo Daphnia magna por exposición a plaguicidas*. Doctoral dissertation. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia. Valencia – España, 20pp.
- Wollenweber, H., Rathjens A., Mainx, H (2004). *Aqueous Agents Containing Pesticides N° WO2009055632 A2* United States Patent
- Wright, D., Forbes, J., Berger, P., Jimenez, M. 2000. *Highly Concentrated Glyphosate herbicidal Composition N° US20120214671 A1* United States Patent

ANEXOS

ANEXO 1
DATOS RECOPIRADOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *D.*
magna

		Resultados 48 horas (<i>D. magna</i>)											
Concentración (μL Glifopac/L)	Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Ensayo 1					Ensayo 2					Media	Desv
		Vivos/ Recipiente	Organismos muertos	% Mortalidad 1	Vivos/ Recipiente	Muertes	% Mortalidad 2	Vivos/ Recipiente	Muertes	% Mortalidad 2			
1020,8	489,9	0	0	0	15	100,0	0	0	0	15	100,0	100,0	0,0
510,4	244,9	0	0	0	15	100,0	0	0	0	15	100,0	100,0	0,0
255,2	122,4	0	0	0	15	100,0	0	0	0	15	100,0	100,0	0,0
127,6	61,2	0	0	1	14	93,3	0	0	0	15	100,0	96,7	4,7
95,7	45,9	2	1	1	11	73,3	0	0	1	14	93,3	83,3	14,1
63,8	30,6	3	1	4	7	46,7	2	1	2	10	66,7	56,7	14,1
55,8	26,7	2	4	4	5	33,3	2	3	4	6	40,0	36,7	4,7
47,8	22,9	2	5	5	3	20,0	2	5	3	5	33,3	26,7	9,4
39,8	19,1	1	5	5	4	26,7	1	5	5	4	26,7	26,7	0,0
31,9	15,3	3	4	4	4	26,7	3	4	5	3	20,0	23,3	4,7
15,9	7,6	3	4	5	3	20,0	5	4	3	3	20,0	20,0	0,0
7,9	3,8	3	5	5	2	13,3	5	4	5	1	6,7	10,0	4,7
3,9	1,9	4	5	5	1	6,7	5	5	5	0	0,0	3,3	4,7
Control	0	5	4	4	1	6,7	5	5	5	0	0,0	3,3	4,7

ANEXO 2
DATOS RECOPIRADOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE *D.*
***magna* (SUPERVIVENCIA)**

Mortalidad																					
Concentraciones (mg/L)																					
Días	60			15			7.5			3.75			1.8			Blanco					
1	Inicio del ensayo																				
2	2	1	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3	2	0	2	2	3	3	2	2	3	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3
4	0	0	2	2	3	3	2	2	3	2	3	2	2	3	2	2	3	3	3	3	3
5	Sábado																				
6	Domingo																				
7			1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	3	3
8			0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
9	Medida																				
10					1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11					1	0	1	1	2	0	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
12	Sábado																				
13	Domingo																				
14					0	0	1	1	2	0	1	2	2	2	0	3	2	2	2	2	2
15	Medida																				
16										0	1	2	2	2	0	3	2	2	2	2	2
17										0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
18										0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
19	Sábado																				
20	Domingo																				
21										0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2

ANEXO 3
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE
***D.magna* (REPRODUCCIÓN)**

ANEXO 4
PROMEDIOS DE LOS DATOS DE TOXICIDAD SUB LETAL

Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Longevidad (días)	Supervivencia (%)	Camadas por hembra		Tamaño de camada		Neonatos por hembra		Primera camada (días)	
			Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv
28,8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,4	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,2	21	40,0	1,8	0,5	10,6	1,9	36,8	10,25	8,5	0,7
3,6	21	53,3	2,25	0,9	16,9	4,15	48,8	26,11	8	1
1,8	21	60,0	3	0,7	19	5,3	44,32	7,48	8	1
0,8	21	73,3	3,2	0,8	20	4,6	63,05	21,43	7,5	0,71
Control	21	80,0	4,2	0,4	21,6	5,3	55,3	18,8	8	1

ANEXO 5
DATOS RECOPIADOS DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *Artemia*
salina

Concentración (mg a.i.L ⁻¹)	Resultados 48 horas (<i>D. magna</i>)										Media	Desv
	Ensayo 1					Ensayo 2						
	Vivos/ recipiente	Muertes	Mortalidad 1	Vivos/ Posilo	Muertes	Mortalidad 2						
243,8	0	0	0	30	100,0	0	0	0	30	100,0	100,0	0,0
121,9	0	0	0	30	100,0	1	0	0	29	96,7	98,3	2,4
106,6	3	4	1	22	73,3	4	2	1	23	76,7	75,0	2,4
91,4	5	2	0	23	76,7	6	3	4	17	56,7	66,7	14,1
75,9	4	7	3	16	53,3	5	6	5	14	46,7	50,0	4,7
60,9	6	3	3	18	60,0	4	6	4	16	53,3	56,7	4,7
45,7	5	8	6	11	36,7	6	8	6	10	33,3	35,0	2,4
30,5	8	7	6	9	30,0	7	9	9	5	16,7	23,3	9,4
22,8	7	10	9	4	13,3	9	8	10	3	10,0	11,7	2,4
15,2	9	9	10	2	6,7	9	9	10	2	6,7	6,7	0,0
7,6	10	10	10	0	0,0	10	10	8	2	6,7	3,3	4,7
3,8	10	10	9	1	3,3	10	9	10	1	3,3	3,3	0,0
Control	10	10	10	0	0,0	10	10	10	0	0,0	0,0	0,0