

# **ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL**

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE LOS  
PLAGUICIDAS ATRAZINA Y DIAZINÓN A TRAVÉS DE LOS  
BIOINDICADORES *Daphnia pulex* y *Artemia salina*”**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERA AMBIENTAL**

**YADIRA LISSETTE MIÑO MARCILLO**  
[yadiramino@gmail.com](mailto:yadiramino@gmail.com)

**EVELYN MICHELLE RODRÍGUEZ CÁRDENAS**  
[eve\\_rod33@outlook.com](mailto:eve_rod33@outlook.com)

**DIRECTOR: Ph.D ANA LUCÍA BALAREZO AGUILAR**  
[ana.balarezo@epn.edu.ec](mailto:ana.balarezo@epn.edu.ec)

**Quito, Diciembre 2018**

## **DECLARACIÓN**

Nosotras Yadira Lissette Miño Marcillo y Evelyn Michelle Rodríguez Cárdenas, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen 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 normatividad institucional vigente.

---

**YADIRA LISSETTE MIÑO  
MARCILLO**

---

**EVELYN MICHELLE  
RODRÍGUEZ CÁRDENAS**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Yadira Lissette Miño Marcillo y Evelyn Michelle Rodríguez Cárdenas, bajo mi supervisión

---

**Ph.D**  
**Ana Lucía Balarezo Aguilar**

## AGRADECIMIENTOS

El fin de esta etapa es un sueño hecho realidad. Por tanto, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos y dedicar esta tesis y mis esfuerzos a todas las personas que de una u otra forma fueron parte y motivación para la culminación de este proyecto. De esta manera agradezco:

A Dios por concederme fortaleza y sabiduría, por ser guía en mi camino y permitirme seguir perseverando hasta cumplir mis metas. Principalmente gracias por brindarme una familia extraordinaria.

A Elvia Marcillo, mi madre, mi luz de cada día, por ser una mujer llena de ternura, inteligencia, tolerancia, bondad infinita y además ser mi mejor amiga y apoyo incondicional en todo momento. Un ejemplo de mujer decidida y valiente, una maravillosa madre y mujer. La razón principal de cada una de mis victorias.

A Holger Miño, mi padre, por todas las virtudes que lo definen como un hombre respetable, íntegro y responsable, por brindarme un claro ejemplo de constancia y perseverancia. Gracias por todo su esfuerzo para sostener a nuestra familia y proporcionarnos siempre lo necesario para una vida sin necesidades.

A mis hermanos Willy y Taty, por ser un pilar fundamental en mi desarrollo personal, académico e intelectual. Gracias por su cariño y contribución en una de las principales metas de mi vida, han sido mi soporte en los momentos difíciles y mi motivación para ser una mejor persona. Con su ejemplo han inculcado valores imprescindibles para mi vida y me siento orgullosa de las personas en las que se han convertido. Como ramificaciones de un árbol crecemos en diferentes direcciones, pero nuestras raíces son las mismas, la vida de uno siempre será parte primordial de la vida del otro y siempre estaremos unidos por el corazón.

A los socios fundadores de la empresa COELECPRO y a todas aquellas personas que creen y generan trabajo a partir de la pequeña empresa. Que sus proyectos sean siempre prósperos.

A la familia Guamán Guanulema por su cariño y apoyo. Especialmente a Miguel Ángel por alegrar mis días y ser mi pequeño amigo. *“Eres más valiente de lo que crees, más fuerte de lo que pareces y más inteligente de lo que piensas”*. Siempre

cuenta conmigo para todo propósito que quieras alcanzar. Agradezco también a Geovanny por siempre cuidar de mí.

Al MSc. Vladimir Carvajal por su valiosa tutela y apoyo en el desarrollo de este proyecto. Además de convertirse en un gran amigo, de cualidades admirables y corazón generoso. Ha sido una pieza clave en mi vida, que me ha ayudado a consolidar esta etapa y ha contribuido a mi desarrollo personal y profesional. Estas palabras reflejan el aprecio, cariño y admiración que le tendré por siempre.

Al Ing. Luis Huaraca, por su amable y desinteresada colaboración en esta tesis. Te deseo una vida llena de felicidad y grandes éxitos y a la PhD. Ana Lucía Balarezo por compartir sus conocimientos y experiencias como docente y como directora de este proyecto.

Al Instituto de Ciencias Biológicas de la EPN por habernos acogido durante el periodo experimental de esta investigación, así como a las personas que forman parte del mismo por ser siempre amables y dispuestas a ayudarnos.

A Juan Enríquez, mi caballero de brillante armadura, mi amigo y compañero de vida. Gracias por ser parte de mis sueños, mi fuente intacta de alegría y por compartir el ideal de ser mejores cada día. Te mereces una vida maravillosa.

A Katy Naranjo, Rodro Albán y Lichita Yáñez por ser mis amigos incondicionales y ser parte de momentos únicos y extraordinarios en toda mi etapa universitaria. Les deseo éxitos y felicidad en su vida personal y profesional.

A Vane Cóndor, Jenny Tejedor y Eve Rodríguez con quienes, a pesar del corto tiempo, compartí momentos inolvidables. Mis mejores deseos para ustedes siempre y que nunca desaprovechemos las oportunidades para ir por algo sano. Especial agradecimiento a Eve por haber formado un gran equipo conmigo. Tú esfuerzo y dedicación en este proyecto nos permite compartir este logro.

A esos seres extraordinarios, quienes solo con su presencia me enseñan que *“Solo con el corazón se puede ver bien, lo esencial es invisible a los ojos”*, mis mascotas: Jack y Tobías y aquellos que lastimosamente ya no están conmigo: Dixi, Rufo, Roco, Sheyne y Sheng Long. No se olviden de mí, nunca me olvido de ustedes. Gracias, por tanto.

*Yadi*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, porque me demuestra que cada día existen los milagros, que no hay imposibles cuando tenemos fe y que nuestra existencia es un regalo divino.

A mi mamá, por creer en mis habilidades y darme su amor incondicional. Por mostrarme cuán grande es el poder de una mujer decidida, paciente y cariñosa. Su entrega, coraje y dedicación han forjado mi espíritu convirtiéndome en la persona que soy, este logro es por ti.

A mi papá, quien con sus acciones y forma de pensar me ha enseñado a ser justa y consciente. Su sacrificio y fortaleza me han permitido llegar hasta este momento, te agradezco por todo lo que me has brindado.

A mis ñaños, con los que he compartido alegrías, enojos y tristezas, porque estoy segura que puedo refugiarme en ustedes y que sin importar donde nos encontremos, estaremos dispuestos a ayudarnos y cuidarnos en todo el transcurso de nuestras vidas.

A Karen, por todas las veces que he sentido tu apoyo, sé que puedo contar contigo siempre. Agradezco tenerte como prima, pero sobre todo gracias por confiar en mí.

A toda mi familia en general, por sus palabras de ánimo en situaciones difíciles y por estar pendiente de mí recalando mis mejores cualidades.

Al MSc. Vladimir Carvajal, por guiarnos en cada parte de esta investigación, quien con su gentileza, arduo conocimiento y valiosas recomendaciones ha llegado a ser un modelo a seguir personal y profesionalmente. Agradezco profundamente su dirección, colaboración y completo apoyo en la elaboración de este proyecto.

A la PhD. Ana Lucía Balarezo, directora del proyecto, su respaldo en el presente trabajo de titulación ha hecho posible la culminación de esta etapa.

A las personas que laboran en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional, por asistirnos con la mejor disposición y amabilidad durante la realización de nuestro proyecto.

A mi amigo, cómplice y complemento Francisco, gracias por recorrer este camino conmigo, por compartir mis momentos de mayor euforia y ayudarme a volar cada

vez más alto. Espero ser parte de cada sueño, propósito y realización que logres alcanzar.

A mis ñañas del colegio Andy, Mabel, Michu y Karol; por estar siempre para mí, por ser parte de mi esencia, estoy segura que nuestra amistad será eterna. Solo me queda desear que disfrutemos muchos más años de alegrías juntas.

A mis chiquitas de la carrera universitaria Meli, Tatu, Gene, Tami y Pau por las divertidas experiencias y aventuras compartidas que perdurarán en mi memoria eternamente. Aspiro continuar construyendo grandes momentos junto a ustedes.

A Andrés, Vane y Jenny, personas maravillosas que con su amistad aportan a mi crecimiento personal y emocional.

A todas las personas que, con un gesto, una palabra o una sonrisa me dieron la fuerza necesaria para continuar y nunca detenerme, porque de esta manera han aportado a que alcance esta meta.

A mi compañera de tesis Yadira Miño, por hacerme parte de este proyecto y aportar activamente con ideas y gestiones para la realización de esta investigación. Te has convertido en una buena amiga, ¡qué gusto compartir este triunfo contigo!

*Evelyn*

## DEDICATORIA

*“No seré una mujer libre mientras siga habiendo mujeres  
sometidas. Aunque mis cadenas sean muy diferentes a  
las tuyas” (Audre Lorde)*

A las mujeres que más admiro:

Mi mami Elvia Marcillo y mi abuelita Clemencia Benavides. Todo lo que soy y tengo se los gratifico a ustedes. Este es el resultado de su infinito amor y sabiduría.

A todas aquellas niñas y mujeres rebeldes, vuelen alto, cumplan sus metas, anhelan a más, luchen con fuerza y ante la adversidad recuerden: nuestro poder es infinito.

A las personas que han aceptado nuestra responsabilidad en el deterioro de la naturaleza, aquellas que quieren nuestros ecosistemas vivos y aportan sabiamente soluciones para tantos daños de los que somos responsables.

*Yadi*

## DEDICATORIA

Para mis *nonni* maternos, por ser la fuente de sabiduría que sostiene a toda la familia y siempre creer en mí. Y a mis abuelitos paternos, a los cuales recuerdo con una sonrisa, donde se encuentren este logro va para ustedes también.

Para mis papás María Cárdenas y Marcelo Rodríguez, por darme su cariño ilimitado y ser mi mayor tesoro.

Para mis ñaños Bryan y Steven, sin ellos nada sería igual.

Para mi tía Alexandra por estar siempre presente en mi vida y demostrarme su afecto, y para mi tío Edwin que sonrío ante la adversidad y sabe ver el lado positivo de la vida.

Para mis tíos Miguel, Cristian, Inés y Mariana, que me enseñan el significado de la palabra familia.

Para Rosa y Mónica por enseñarme humildad y perseverancia.

Para la mejor prima del mundo Karen, porque eres mi hermana, mi mejor amiga y mi confidente.

Para mi querido primo Carlos, con quien compartí los mejores momentos de mi infancia, a pesar de la distancia te considero mi hermano.

Para Francisco y sus padres Jacqueline y Hugo, por ser una inspiración, brindarme su apoyo y hacerme parte de su familia.

Para esos seres humanos revolucionarios que anhelan un mundo mejor, en el que la igualdad y equidad gobiernen libremente, donde absolutamente nadie sea discriminado y hacen lo posible para que sea una realidad.

Para aquellas personas que luchan constantemente por alcanzar una meta y nunca se dan por vencidos.

*Evelyn*

## CONTENIDO

<b>DECLARACIÓN</b> .....	<b>II</b>
<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>VIII</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>IX</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XXI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XXII</b>
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. ANTECEDENTES .....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	4
1.3. ALCANCE .....	5
1.4. OBJETIVOS .....	6
1.4.1. OBJETIVO GENERAL .....	6
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
2.1. ATRAZINA, USO Y CARACTERÍSTICAS .....	7
2.1.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	7
2.1.2. MOVIMIENTO EN EL AGUA Y EL SUELO .....	8

2.1.3.	EFFECTOS SOBRE LA SALUD Y EL AMBIENTE .....	11
2.2.	DIAZINÓN, USO Y CARACTERÍSTICAS .....	13
2.2.1.	PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y AMBIENTALES .....	14
2.2.2.	Movimiento en suelo y agua .....	15
2.2.3.	Efectos sobre la salud y el ambiente .....	18
2.3.	ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN ECOSISTEMAS .....	19
2.3.1.	TOXICIDAD AGUDA.....	20
2.3.2.	TOXIDAD CRÓNICA.....	21
2.3.3.	RELACIÓN DOSIS- RESPUESTA.....	21
2.4.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS .....	23
2.4.1.	<i>Artemia salina</i> .....	23
2.4.2.	<i>Daphnia pulex</i> .....	28
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1.	AGROQUÍMICOS ESTUDIADOS.....	34
3.1.1.	ATRAZINA .....	34
3.1.2.	DIAZINÓN.....	35
3.2.	ENSAYOS DE TOXICIDAD .....	35
3.2.1.	<i>Artemia salina</i> .....	36
3.2.2.	<i>Daphnia pulex</i> .....	52
3.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
3.3.1.	TOXICIDAD AGUDA.....	62
3.3.2.	TOXICIDAD SUBLETAL .....	62
3.3.3.	INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN.....	63
<b>CAPITULO 4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
4.1.	EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LA EXPOSICIÓN DE ATRAZINA EN <i>A. salina</i> y <i>D. pulex</i> .....	64
4.1.1.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>A. salina</i> .....	64
4.1.2.	EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN de quistes de <i>A. salina</i> .....	66
4.1.3.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>D. PULEX</i> .....	68

4.1.4.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE <i>D. pulex</i> .....	71
4.2.	EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LA EXPOSICIÓN DE DIAZINÓN EN <i>A. salina</i> y <i>D. pulex</i> .....	78
4.2.1.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>A. salina</i> .....	78
4.2.2.	EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> .....	81
4.2.3.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE <i>D. pulex</i> .....	83
4.2.4.	EVALUACIÓN DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE <i>D. pulex</i> .....	85
4.3.	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD OBTENIDOS ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN .....	93
4.3.1.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE <i>A. salina</i> .....	93
4.3.2.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE <i>D. pulex</i> .....	93
4.3.3.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> AL APLICAR ATRAZINA Y DIAZINÓN.....	94
4.3.4.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD SUB-LETAL DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE <i>D. pulex</i> .....	95
	<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>96</b>
5.1.	Conclusiones .....	96
5.2.	RECOMENDACIONES.....	97
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>120</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA ATRAZINA .....	9
TABLA 2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL DIAZINÓN .....	15
TABLA 3. CONDICIONES PARA ECLOSIÓN DE QUISTES Y MANTENIMIENTO DE NAUPLIOS DE <i>A. salina</i> .....	27
TABLA 4. CONDICIONES PARA EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE <i>D. pulex</i> .....	33
TABLA 5. PARÁMETROS PARA ECLOSIÓN DE <i>A. salina</i> .....	36
TABLA 6. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA.....	40
TABLA 7. RESUMEN DE DATOS DE ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA.....	40
TABLA 8. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE DIAZINÓN .....	41
TABLA 9. RESUMEN DE DATOS DE ENSAYO PRELIMINAR .....	41
TABLA 10. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA ATRAZINA .....	43
TABLA 11. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA DIAZINÓN .....	43
TABLA 12. DATOS PRELIMINARES DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A ATRAZINA .....	48
TABLA 13. DATOS PRELIMINARES DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A DIAZINÓN.....	49
TABLA 14. DATOS DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A ATRAZINA.....	50
TABLA 15. DATOS DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A DIAZINÓN .....	51
TABLA 16. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA DE FILTRO.....	53
TABLA 17. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA DE CULTIVO C .....	56
TABLA 18. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA DE CULTIVO D .....	56

TABLA 19. DATOS PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA .....	58
TABLA 20. RESUMEN DATOS ENSAYOS PRELIMINARES DE ATRAZINA.....	58
TABLA 21. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE DIAZINÓN .....	59
TABLA 22. RESUMEN DATOS ENSAYOS PRELIMINARES DE DIAZINÓN .....	59
TABLA 23. CONDICIONES PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>D. pulex</i> .....	60
TABLA 24. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA ATRAZINA .....	60
TABLA 25. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA DIAZINÓN .....	61
TABLA 26. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL HERBICIDA ATRAZINA PARA <i>A. salina</i> .....	65
TABLA 27. RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN PARA <i>A. salina</i> .....	68
TABLA 28. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL HERBICIDA ATRAZINA PARA <i>D. pulex</i> .....	70
TABLA 29. ANOVA PARA CAMADAS POR HEMBRA .....	73
TABLA 30. TEST DE DUNNETS PARA CAMADAS POR HEMBRA .....	73
TABLA 31. ANOVA PARA TAMAÑO DE CAMADAS POR HEMBRA.....	74
TABLA 32. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS .....	75
TABLA 33. ANOVA PARA NEONATOS TOTALES POR HEMBRA .....	76
TABLA 34. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS .....	77
TABLA 35. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL INSECTICIDA DIAZINÓN PARA <i>A. salina</i> .....	80
TABLA 36. RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN PARA <i>A. salina</i> .....	82
TABLA 37. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL INSECTICIDA DIAZINÓN PARA <i>D. pulex</i> .....	84
TABLA 38. ANOVA PARA CAMADAS POR HEMBRA .....	87
TABLA 39. TEST DE DUNNETS PARA CAMADAS POR HEMBRA .....	88

TABLA 40. ANOVA PARA TAMAÑO DE CAMADAS POR HEMBRA.....	89
TABLA 41. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS .....	89
TABLA 42. ANOVA PARA NEONATOS TOTALES POR HEMBRA .....	91
TABLA 43. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS .....	91
TABLA 44. COMPARACIÓN DE CL <sub>50</sub> ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN PARA <i>A. salina</i> .....	93
TABLA 45. COMPARACIÓN DE CL <sub>50</sub> ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN PARA <i>D. pulex</i> .....	94
TABLA 46. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE QUISTES DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A ATRAZINA Y DIAZINÓN .....	95
TABLA 47. COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE <i>D. pulex</i> EXPUESTOS DE ATRAZINA Y DIAZINÓN .....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ATRAZINA (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> ) .....	8
FIGURA 2 ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE ATRAZINA Y SUS PRINCIPALES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN .....	10
FIGURA 3 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL INSECTICIDA DIAZINON.....	14
FIGURA 4 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DIAZINÓN Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.....	18
FIGURA 5 CURVA DOSIS-RESPUESTA.....	22
FIGURA 6 MORFOLOGÍA DE MACHO Y HEMBRA DE <i>A. salina</i> .....	25
FIGURA 7 CICLO REPRODUCTIVO DE <i>A. salina</i> .....	26
FIGURA 8 ANATOMÍA FUNCIONAL DE <i>D. pulex</i> .....	30
FIGURA 9 CICLO REPRODUCTIVO DE <i>D. pulex</i> .....	32
FIGURA 10 HERBICIDA GESAPRIM (INGREDIENTE ACTIVO ATRAZINA) .....	34
FIGURA 11 INSECTICIDA CONFIABLE (INGREDIENTE ACTIVO DIAZINÓN).....	35
FIGURA 12 FILTRO DE ÓSMOSIS INVERSA “ <i>Aqua Medic Easy line 150</i> ” .....	37
FIGURA 13. QUISTES DE <i>A. salina</i> Y SAL MARINA .....	37
FIGURA 14 CÁMARA DE INCUBACIÓN PARA ECLOSIÓN DE <i>A. salina</i> . .....	38
FIGURA 15 ETAPAS DE ECLOSIÓN DE <i>A. salina</i> .....	38
FIGURA 16 BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>A. salina</i> .....	42
FIGURA 17 QUISTES DE <i>A. salina</i> HIDRATADOS.....	44
FIGURA 18 CÁMARA DE INCUBACIÓN DE QUISTES A .....	45
FIGURA 19 SISTEMA DE AIREACIÓN PARA CÁMARA B .....	46
FIGURA 20 SISTEMA DE INCUBACIÓN DE QUISTES B.....	46
FIGURA 21 ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES .....	47
FIGURA 22 QUISTES EN ESTADO DE UMBRELLA Y COMPLETAMENTE ECLOSIONADOS. ....	52

FIGURA 23 CULTIVO DE <i>D. pulex</i> CON DIFERENTES TIPOS DE AGUA RECONSTITUIDA (CULTIVO A Y B).....	54
FIGURA 24 PRUEBAS DE SELECCIÓN DE ALIMENTO DE <i>D. pulex</i> CON DIFERENTES TIPOS DE AGUA RECONSTITUIDA.....	54
FIGURA 25 CULTIVO C DE <i>D. pulex</i> .....	55
FIGURA 26 CURVA DOSIS- RESPUESTA DE METANAUPLIOS DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A ATRAZINA.....	64
FIGURA 27 CURVA DOSIS-RESPUESTA % DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE MATANAUPLIOS DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A ATRAZINA .....	67
FIGURA 28 CURVA DOSIS- RESPUESTA DE NEONATOS DE <i>D. pulex</i> EXPUESTOS A ATRAZINA .....	69
FIGURA 29 SUPERVIVENCIA DE <i>D. pulex</i> A LOS 21 DÍAS DE EXPOSICIÓN A ATRAZINA.....	71
FIGURA 30 CAMADAS POR ORGANISMO DE <i>D. pulex</i> .....	72
FIGURA 31 TAMAÑO DE CAMADA POR <i>D. pulex</i> .....	74
FIGURA 32 NEONATOS TOTALES POR <i>D. pulex</i> .....	76
FIGURA 33 PRIMERA CAMADA DE <i>D. pulex</i> .....	77
FIGURA 34 CURVA DOSIS- RESPUESTA DE METANAUPLIOS DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A DIAZINÓN .....	79
FIGURA 35 CURVA DOSIS-RESPUESTA PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE METANAUPLIOS DE <i>A. salina</i> EXPUESTOS A DIAZINÓN .....	81
FIGURA 36 CURVA DOSIS-RESPUESTA DE NEONATOS DE <i>D. pulex</i> EXPUESTOS A DIAZINÓN.....	83
FIGURA 37 SUPERVIVENCIA DE <i>D. pulex</i> A LOS 21 DÍAS DE EXPOSICIÓN .....	86
FIGURA 38 CAMADAS POR ORGANISMO DE <i>D. pulex</i> .....	87
FIGURA 39 TAMAÑO DE CAMADA POR <i>D. pulex</i> .....	88
FIGURA 40 NEONATOS TOTALES POR <i>D. pulex</i> .....	90

FIGURA 41 PRIMERA CAMADA DE *D. pulex* .....92

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA EN EL BIOINDICADOR <i>A. salina</i> .....	121
ANEXO 2. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> AL APLICAR ATRAZINA.....	123
ANEXO 3. RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA EN EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> .....	126
ANEXO 4. TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (MORTALIDAD).....	128
ANEXO 5. TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (REPRODUCCIÓN).....	130
ANEXO 6. TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (PROMEDIOS) .....	132
ANEXO 7. TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (CAMADAS POR RECIPIENTE).....	134
ANEXO 8. RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE DIAZINÓN EN EL BIOINDICADOR <i>A. salina</i> .....	136
ANEXO 9. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE <i>A. salina</i> AL APLICAR DIAZINÓN .....	138
ANEXO 10. RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE DIAZINÓN EN EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> .....	141
ANEXO 11. TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (MORTALIDAD).....	143
ANEXO 12. TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (REPRODUCCIÓN).....	145
ANEXO 13. TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (PROMEDIOS) .....	147

ANEXO 14. TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE EL BIOINDICADOR <i>D. pulex</i> (CAMADAS POR RECIPIENTE).....	149
---	-----

## RESUMEN

La presente investigación analiza los efectos toxicológicos de dos agroquímicos de amplio uso en el Ecuador, atrazina y diazinón, sobre *Daphnia pulex* y *Artemia salina*.

La metodología se basó en ensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (LC<sub>50</sub>-24h) y *A. salina* (LC<sub>50</sub>-48h), ensayos subletales con *D. pulex* y evaluaciones de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina*. Los ensayos de toxicidad aguda en *D. pulex* iniciaron con el cultivo de estos organismos, se utilizaron neonatos (<24 h de edad) que se expusieron a diferentes concentraciones de atrazina y diazinón durante 24 h. Los ensayos de toxicidad subletal iniciaron con la exposición de los agroquímicos en neonatos de *D. pulex* durante 21 días, evaluando su supervivencia y capacidad reproductiva. La evaluación de toxicidad aguda sobre *A. salina* comenzó con la incubación de quistes en agua de mar sintética, durante 48 h. Los metanauplios se expusieron durante 48 h. Para determinar el porcentaje de inhibición de eclosión, se evaluaron 150 quistes a diferentes concentraciones de los pesticidas durante 72 h.

Los resultados evidenciaron que la toxicidad aguda en *A. salina* y *D. pulex* corresponde a 0,971g/L y 12,011 mg/L, respectivamente, para Atrazina y 29,534 mg/L y 0,053 µg/L, respectivamente, para diazinón. La Atrazina inhibió la eclosión del 50% de los quistes de *A. salina* desde 0,45 g/L y llegó al 100% cuando la concentración fue 1,8 g/L. El diazinón inhibió la eclosión del 45% de quistes cuando la concentración evaluada fue 15,3 mg/L, llegando al 100% a la concentración de 102 mg/L. Respecto a la toxicidad subletal en *D. pulex*, a nivel reproductivo, el NOEC y LOEC resultó ser 0,375 mg/L y 0,75 mg/L, respectivamente para Atrazina y 0,53 ng/L y <0,53 ng/L para diazinón.

Las evaluaciones de toxicidad de los agroquímicos analizados sobre *D. pulex* y *A. salina* evidenciaron que *D. pulex* es el organismo más sensible a estos plaguicidas. Además, los resultados revelan que diazinón es el agroquímico más tóxico al ser el pesticida que más afecta a la supervivencia y desarrollo de los organismos expuestos.

## ABSTRACT

The present investigation analyzes the toxicological effects of two agrochemicals, which are widely used in Ecuador, atrazine and diazinon, on *Daphnia pulex* and brine shrimp *Artemia salina*.

The methodology was based on acute toxicity assays with *D. pulex* (LC<sub>50</sub>-24h) and *A. salina* (LC<sub>50</sub>-48h), sublethals assays with *D. pulex* and evaluations of inhibition of *A. salina* cysts. The acute toxicity tests in *D. pulex* began with the cultivation of these organisms, neonates (<24 hours old) were exposed to different concentrations of Atrazine and Diazinon during 24 h. Sublethal toxicity assays began with the exposure of these agrochemicals on *D. pulex* neonates during 21 days, evaluating their survival and reproductive capacity. The evaluation of acute toxicity on *A. salina* started with the incubation of cysts in synthetic seawater, during 48 h. The metanauplii were exposed during 48 h. To determine the percentage of hatching inhibition, 150 cysts were evaluated at different concentrations of the pesticides during 72 h.

The results showed that acute toxicity in *A. salina* and *D. pulex* corresponds to 0.971 g/L and 12.011 mg/L, respectively, for atrazine and 29.534 mg/L and 0.053 µg/L, respectively, for diazinon. atrazine inhibited the hatching of 50% of *A. salina* cysts from 0.45 g/L and reached 100% when the concentration was 1.8 g/L. Diazinon inhibited the hatching of 45% of cysts when the tested concentration was 15.3 mg/L, reaching 100% at the concentration of 102 mg/L. About sublethal toxicity in *D. pulex*, at the reproductive level, NOEC and LOEC were 0.375 mg/L and 0.75 mg/L, respectively for atrazine and 0.53 ng/L and <0.53 ng/L for diazinon.

Toxicity evaluations of the agrochemicals analyzed on *D. pulex* and *A. salina* showed *D. pulex* is the most sensitive organism. In addition, the results reveal that diazinon is the most toxic agrochemical because it the pesticide that most affects the survival and development of these organisms.

## PRESENTACIÓN

El presente proyecto de titulación evaluó los efectos toxicológicos del insecticida comercial “Confiable” (Drexel Company, Estados Unidos), cuyo ingrediente activo es diazinón, y el herbicida “Gesaprim” (Sygenta, Suiza), cuyo ingrediente activo es atrazina, sobre dos especies bioindicadoras, *A. salina* y *D. pulex*.

El documento consta de 5 capítulos, brevemente descritos a continuación:

El capítulo I correspondiente a la introducción, los antecedentes, la justificación, el alcance y los objetivos generales y específicos planteados al inicio de la investigación.

El capítulo II presenta el marco teórico, donde se describen las características físico-químicas del diazinón y de la atrazina, así como las características morfológicas e importancia de los de *A. salina* y *D. pulex*, utilizados como organismo de prueba en los ensayos.

El capítulo III describe la metodología experimental aplicada para el desarrollo, cultivo y sostén de los organismos, además de los protocolos requeridos para la realización de los ensayos de toxicidad aguda y sub-crónica.

En el capítulo IV se muestran los resultados obtenidos en los ensayos toxicológicos, su discusión y su análisis estadístico mediante el método Probit.

Finalmente, en el capítulo V, se exponen las conclusiones consecuentes a los objetivos planteados y se proponen recomendaciones que sirvan de fundamento para futuros trabajos referentes a esta área de investigación.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

La agricultura es una actividad fundamental tanto en el ámbito económico como en la seguridad alimentaria del Ecuador (Monteros et al., 2015). Según cifras del Banco Central para el año 2016 el sector agrícola representó el 7,6% del PIB nacional, y los cultivos de mayor contribución monetaria son los que se encuentran relacionados al mercado internacional entre ellos el cacao, banano, café, flores y frutas con 2,6% del PIB agropecuario (Zapata, 2015). Los cultivos que permiten la soberanía alimentaria como maíz, arroz, papa, hortalizas y verduras aportan con un 3,3% del PIB; de los cultivos mencionados el arroz es el cultivo más extenso (Verdesoto, 2016) y la producción de maíz es la actividad económica primordial para varias provincias de la sierra y de la costa ecuatoriana (Chávez, 2014). La aplicación de diversos plaguicidas ha mejorado la producción y la calidad de los cultivos (Aveiga, 2012), del área total sembrada con cultivos permanentes y transitorios, el 50,03% y el 78,24%, respectivamente se encuentran vinculados a la aplicación de algún tipo de insumo con constituyentes químicos (INEC, 2016).

Los plaguicidas son productos químicos capaces de controlar, evitar o eliminar plagas que propagan enfermedades y obstaculizan la producción de alimentos (FAO, 2010). Son considerados agentes primordiales en la producción agrícola, protección de cultivos y calidad de las cosechas (Ceccon, 2008); no obstante, su uso no está libre de efectos adversos al ambiente. El empleo inadecuado de agroquímicos, así como las deficiencias en las prácticas operativas de las actividades agrícolas, ha generado que sólo una pequeña porción del plaguicida llegue al organismo de interés, y el resto circule libremente al ambiente (Orta, 2002). Estos contaminantes y sus productos de transformación pueden transportarse por la acción del viento, la escorrentía e infiltración del agua durante periodos de lluvia o riego (Badii y Varela, 2008), contribuyendo de esa manera al

detrimento de la calidad de aguas superficiales y subterráneas que alcanzan finalmente océanos en forma de sedimentos y cargas químicas (Orta, 2002). Estas sustancias resultan tóxicas para la fauna acuática, promoviendo bioacumulación y biomagnificación a diferentes niveles tróficos (Hernández y Hansen, 2011).

El diazinón y la atrazina, son ingredientes activos de plaguicidas utilizados ampliamente en el Ecuador, principalmente para el control de la mosca minadora (*Hydrellia sp*) que afecta la producción de arroz, y bledo (*Amaranthus hybridus*) que perjudica la producción de maíz. Estos productos se comercializan a nivel nacional bajo la aprobación de Agrocalidad, pese a ello, no existen planes de monitoreo respecto a su nivel de contaminación en fuentes hídricas del Ecuador, de tal manera que se desconoce sus efectos adversos en seres humanos y su toxicidad sobre organismos acuáticos.

El diazinón es un insecticida organofosforado, no sistémico, generalmente empleado en la agronomía para controlar insectos, ácaros y plagas en el follaje de plantaciones de arroz, banano, café, cebolla y plantas ornamentales (IARC, 2015). Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) su nombre químico es O,O-dietilO-2-isopropil-6- metilpirimidin-4-il-fosforotioato, y su fórmula molecular es  $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ . Las características físico-químicas que le confieren potencial tóxico en el ambiente son su alto coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) que se encuentra entre 3,11 a 3,81 (NCBI, 2015), y su alto coeficiente de partición octanol-carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) de 40 a 840 L/kg (NPIC, 2011). Además, posee rápida capacidad para hidrolizarse y fotodegradarse, por lo que sus productos de transformación resultan ser más solubles en agua y poseer un mayor potencial de lixiviación del suelo (Sarmah et al., 2009). Investigaciones realizadas por Osuna et al. (2000) en camarones del género *Penaeus sp* con diazinón resultaron a 24h  $CL_{50}=0,0741$  mg/L. Asimismo, análisis subletales realizados por Sánchez (2006) sobre *D. magna* con diazinón evidencian una reducción de nacimiento del número medio de neonatos por hembra, con  $CL_{50}=1,41$  ng/L, Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) de 0,1 ng/L y No Observed Effect Concentration (NOEC) de 0,05 ng/L.

La Atrazina, es un herbicida utilizado ampliamente a nivel mundial, se aplica en plantaciones para regular las malezas en cultivos de maíz, trigo, caña de azúcar, pastos y malezas acuáticas en lagos y estanques (Galíndez, 2010). Su nombre químico según la IUPAC es 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-1,3,5-triazina. Es considerada como un potencial contaminante gracias a sus propiedades físico-químicas como solubilidad en el agua que es a 25°C igual a 35 mg/L, su log Kow corresponde a 2,7, y su log Koc que es 2 L/kg, de esta manera su vida media (por biodegradación) va de 5.824 días a 10<sup>5</sup> días. La baja absorción de Atrazina en el suelo y su alta persistencia y solubilidad en agua es la causa principal para encontrar Atrazina en sistemas hídricos (Hansen et al., 2013). Es considerado como un producto de categoría IV (Agrocalidad, 2017), es decir, que no presenta riesgos en condiciones normales de uso (INEN, 1996). Según Adama (2015) la CL<sub>50</sub> aguda en ratas es igual a 5000 mg/kg. Es considerada moderadamente tóxica para: peces CL<sub>50</sub> (96 h)=103,14 mg/L (*Danio rerio*); Crustáceos CE<sub>50</sub> (48h) = 394,6 mg/L, Algas CE<sub>50</sub> (72h) = 0,12 mg/L (*Selenastrum capricornutum*), Aves: DL<sub>50</sub> = 940 mg/kg y no tóxico para abejas (Candela, 2016).

Los ensayos toxicológicos son herramientas de análisis convenientes para establecer efectos tóxicos de agentes físicos y químicos en organismos determinados (Hansen et al., 2013). Estos ensayos permiten evaluar consecuencias de contaminantes en un tiempo relativamente corto (agudo-mortalidad), y a mediano-largo plazo (crónico-enfermedad) para obtener una respuesta de relevancia ecológica a través de extrapolación trófica (Ramírez y Mendoza, 2008). *D. pulex*, es un organismo del orden cladócero ampliamente utilizado en ensayos toxicológicos debido a su facilidad de cultivo en laboratorio, ciclo de vida relativamente corto y sensibilidad a numerosos compuestos químicos (Miller, 2000). Por otra parte, *A. salina* es un camarón minúsculo de cuerpo blando que se desarrolla en aguas de alta salinidad (Mejía et al., 2009), además son organismos de fácil manutención y debido a que no es necesario conservar un cultivo de forma permanente en laboratorio y es posible obtener comercialmente sus quistes en todas las épocas del año; su empleo se ha popularizado para experimentación en ensayos biológicos (Pérez y Lazo, 2010). *D. pulex* y *A. salina*

son macroinvertebrados zooplanctónicos considerados como la base en la transferencia de energía de productores a consumidores (Pérez y Lazo, 2010). El uso indiscriminado de pesticidas puede afectar no solo a estos organismos sino a otros interdependientes, por lo que realizar este tipo de investigaciones permitirá evidenciar consecuencias ambientales en ecosistemas acuáticos, y a su vez sobre la biota total (Piguave y Gutiérrez, 2010).

Bajo estas premisas, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos toxicológicos del herbicida atrazina y el insecticida diazinón, empleando *D. pulex* y *A. salina*, para lo cual se realizará ensayos de toxicidad aguda y subletal, donde los organismos serán sometidos a diferentes concentraciones de los plaguicidas en análisis, contribuyendo de esta manera a generar conocimiento sobre la sensibilidad de los invertebrados acuáticos a este tipo de sustancias químicas.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Los efectos adversos producto del fácil acceso de sustancias potencialmente tóxicas en cuerpos de agua, han promovido el desarrollo de herramientas de diagnóstico o ensayos toxicológicos (Vargas y Perea, 2011), cuyo objetivo es determinar experimentalmente el impacto biológico de contaminantes en organismos de ensayo (modelo animal de toxicidad) (Silva et al., 2007). Estos modelos son sometidos por días u horas a varias concentraciones del compuesto de interés y los resultados obtenidos son comprobables, reproducibles y pueden ser extrapolables a niveles ecológicos superiores (Villarreal, 2004).

*Artemia salina* y *Daphnia pulex* son macroinvertebrados muy sensibles a ciertos compuestos químicos, permitiendo a través de pruebas de toxicidad estimar perturbaciones en su morfología, locomoción, tasa de filtración, reproducción y supervivencia (Parada, 2014). Son organismos fundamentales para las relaciones dentro de la cadena trófica (Núñez y Hurtado, 2005), posibles afectaciones por atrazina y diazinón en su población representa un peligro para la existencia de especies acuáticas superiores (Camacho y Sánchez, 2007).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD), Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la American Society for Testing and Materials (ASTM) han publicado recomendaciones para realizar estos ensayos, logrando de esta manera que los resultados obtenidos puedan ser estandarizados y comparables (Camean y Repetto, 2012).

En este contexto, este trabajo permitirá establecer los efectos toxicológicos en *D. pulex* y *A. salina*, a corto y mediano plazo que producen las sustancias activas diazinón y atrazina. Estos productos se comercializan a nivel nacional bajo la aprobación de Agrocalidad. Sin embargo, no se han elaborado monitoreos de control ambiental en relación a estas sustancias. Existe desconocimiento e información limitada sobre sus posibles efectos en la salud humana y su toxicidad en el medio acuático. De esta manera, este trabajo contribuirá en el conocimiento de la toxicidad de estas sustancias activas en macroinvertebrados acuáticos y evidenciará progresos en cuanto al uso adecuado de estos agroquímicos en el Ecuador.

### **1.3. ALCANCE**

El presente trabajo tiene carácter experimental. Los ensayos de toxicidad aguda de los agroquímicos atrazina y diazinón, así como los ensayos subletales realizados sobre *D. pulex*, y de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina* se realizaron a escala de laboratorio, razón por la cual los resultados de las evaluaciones de toxicidad deben ser considerados como aproximaciones para ambientes naturales e ideales para ambientes controlados.

Este trabajo describe la relación entre la mortalidad de estos modelos y la concentración de agroquímico a la que fueron expuestos.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el grado de toxicidad de plaguicidas compuestos por atrazina y diazinón a través de ensayos de toxicidad sobre los organismos *A. salina* y *D. pulex* para establecer efectos adversos de estos compuestos en laboratorio.

### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el potencial toxicológico de atrazina y diazinón mediante ensayos de toxicidad aguda (48 horas), que permitan el cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) utilizando *A. salina* y *D. pulex* para evaluar y comparar el grado de toxicidad de las sustancias tanto en ambientes salobres como de agua dulce.
- Estimar las propiedades toxicológicas subletales (21 días) de las sustancias atrazina y diazinón, a través de ensayos de toxicidad utilizando *D. pulex* para determinar efectos a mediano plazo sobre este organismo.
- Determinar la sensibilidad embrionaria de *A. salina* frente a atrazina y diazinón mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de eclosión de quistes para obtener características toxicológicas de estos agroquímicos.

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ATRAZINA, USO Y CARACTERÍSTICAS**

La atrazina, es un herbicida sumamente utilizado a nivel mundial. Contribuye al control del desarrollo de malezas alrededor de carreteras y en plantaciones como caña de azúcar, maíz, pastos y malezas acuosas (Galíndez, 2010). Sus características físico-químicas, contribuyen a la polución de fuentes hídricas por la probabilidad de que el herbicida, así como sus metabolitos o productos de degradación se trasladen a cuerpos hídricos (Candela, 2016).

En el año de 1958 inició la comercialización de Atrazina a nivel mundial, incrementándose su uso durante los últimos 50 años (Golla et al. 2011). Sin embargo, su capacidad recalcitrante de acumularse en aguas superficiales y subterráneas, así como su elevada toxicidad, han provocado que el empleo de atrazina sea controlado en EE. UU (Hansen et al., 2013), y en países europeos como Alemania e Italia, donde se prohibió desde 1991 (Nödler et al., 2013).

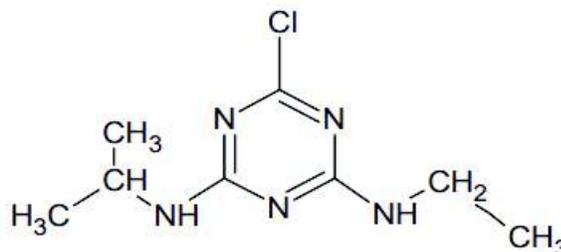
En Ecuador, la atrazina es usada principalmente en plantaciones de caña de azúcar y maíz (Agrocalidad, 2015 y 2016). Las importaciones de atrazina en el año 2013 fueron de 519 750 kg. Se comercializa como una sustancia cristalina blanca (Mudhoo y Garg, 2010), por empresas como Ecuaquímica, Syngenta, Crystal Chemical, Bayer S.A y Agripac, bajo el nombre de Gesaprim. La dosis recomendada para los cultivos va de cuatro a cinco litros por hectárea (Bravo, 2017).

##### **2.1.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Atrazina, es un herbicida sólido cristalino perteneciente a la familia de las triazinas cuyo nombre químico según la IUPAC es 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-

1.3.5- triazina (Cervantes, 2014) ó 6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina (Candela, 2016). La estructura química se muestra en la Figura 1.

**FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ATRAZINA (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>)**



FUENTE: Bravo, 2017

La presión de vapor de la atrazina es  $3,8 \times 10^{-5}$  Pa (muy baja), su solubilidad en agua es 35 mg/L (a 25°C) y el punto de fusión va desde 173 a 177°C. La baja adsorción de atrazina en el suelo y su relativamente alta persistencia en el medio es la causa principal para encontrar atrazina en sistemas hídricos (Hansen et al., 2013).

Los valores detallados en la Tabla 1 referentes a la presión de vapor y ley de Henry, mostraron la baja volatilidad del compuesto (Hansen et al., 2013). El Log K<sub>oc</sub> que representa la disposición de las sustancias orgánicas para ser adsorbidas por las moléculas del suelo, evidenció que la atrazina tiene un movimiento moderado y, por lo tanto, existe la posibilidad de que se lixivie hacia el agua (Bravo, 2017).

### 2.1.2. MOVIMIENTO EN EL AGUA Y EL SUELO

La atrazina en el ambiente permanece químicamente intacta, o puede degradarse para dar más de 15 metabolitos, siendo los cuatro principales la desetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA), didealquilatrazina (DDA), y hidroxiatrazina (HYA) (Figura 2). La hidrólisis de atrazina por un mecanismo de degradación químico primario (abiótico) da HYA; y la N-dealquilación de las cadenas laterales de atrazina produce DEA y DIA (Mudhoo y Garg, 2010). HYA es el metabolito más importante

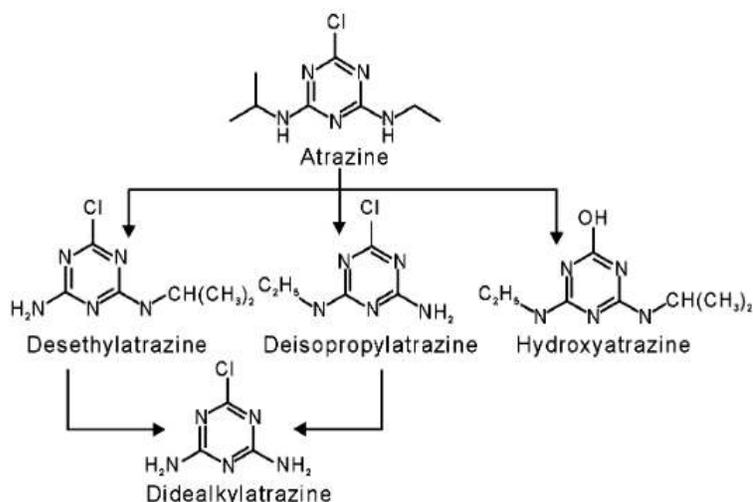
de la atrazina y muestra una mayor retención en los suelos que los otros metabolitos (Prata et al., 2003), además es el producto de degradación menos móvil de atrazina. Aunque la presencia de metabolitos es indicativa de una cierta degradación del herbicida, algunos de ellos, especialmente DEA y DIA, tienen toxicidad similar, menor solubilidad en agua e interacción más débil con los componentes del suelo que el herbicida aparente (Abate y Masini, 2005).

**TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA ATRAZINA**

<b>Parámetro</b>	<b>Característica</b>
Puntos de fusión (mp)	173-177 °C
Peso molecular (fw)	215,68 g/mol
Solubilidad (Sw)	35 mg/L en agua a 25 °C
Presión de vapor (vp)	$3,8 \times 10^{-5}$ Pa
Vida media (por biodegradación)	10 <sup>5</sup> a 5 824 días
Constante de la ley de Henry (K <sub>H</sub> )	$3,04 \times 10^{-9}$ atm m <sup>3</sup> /mol
Logaritmo del coeficiente de partición Octanol / Agua (Log K <sub>ow</sub> )	2,7
Logaritmo del coeficiente de partición en carbono orgánico(log K <sub>oc</sub> )	2 L/kg
Logaritmo negativo de la constante de disociación (pka)	1,62 a 20°C, 1,70 a 21°C

FUENTE: Hansen et al., 2013

**FIGURA 2. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE ATRAZINA Y SUS PRINCIPALES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN**



FUENTE: Mudhoo y Garg, 2010

La atrazina pertenece a una clase de herbicidas conocidos como s-triazinas y según Schwab (2005), es clasificado como moderadamente móvil. Una vez que el herbicida ha llegado al suelo se distribuye en 3 fases sólida, líquida y gaseosa. La parte que se mantiene en solución, es la que estará disponible para la absorción, degradación, lixiviación y arrastre por la superficie (Hang y Nassetta, 2003).

Sin embargo, este herbicida posee baja solubilidad en solución acuosa, y por tanto puede penetrar limitadamente en la parte profunda del suelo, y atacar a cultivos o plantas que poseen raíces profundas (árboles). El aro químico de la atrazina es resistente a la degradación (Mohammad et al., 2005).

Varios autores han reportado la presencia de atrazina y sus metabolitos en aguas superficiales y subterráneas, así como otras s-triazinas como simazina, ametrina y propazina (Abate y Masini, 2005). La infiltración lenta en el suelo promueve el movimiento de atrazina, así como sus metabolitos en el mismo, el transporte rápido es promovido por macroporos y grietas, por consiguiente, se forman flujos preferenciales que fomentan desplazamientos de agua rápidos e irregulares, además de solutos que penetran el suelo (Bravo, 2017). El movimiento de atrazina

en el suelo es autónomo de sus características adsorbentes, debido a que los flujos preferenciales, reducen el tiempo de interacción entre los componentes del suelo y la atrazina (Hang et al., 2010).

En el ambiente, la presencia de herbicidas obedece a varios factores como la dosis utilizada, el tipo de suelo y la temperatura e intensidad de las precipitaciones (Helling, 2005). El desplazamiento de atrazina en el suelo depende de la cantidad de agua suministrada, textura y drenaje del suelo, así como del contenido de materia orgánica. La atrazina tiende a infiltrarse en suelos arenosos y a moverse con el agua drenada; en cambio en suelos arcillosos con grandes contenidos de materia orgánica tienden a detener al herbicida limitando su aparición en el agua drenada. (Hang et al., 2010). En consecuencia, la presencia de materia orgánica aumenta la capacidad de adsorción del suelo y disminuye e inhibe la migración y movilidad de la atrazina. El exceso de lluvias y de riego fomentan, la posibilidad de migración de herbicida hacia los cuerpos de agua por procesos como lixiviación, infiltración y escorrentía (Bravo, 2017). Mahía y Díaz (2007) sostienen que Bacteriodes, Firmicutes, Proteobacterias, Actinobacterias entre otros microorganismos del suelo donde se ha aplicado atrazina, pueden adaptarse al herbicida y utilizarlo como fuente de nutrientes o de nitrógeno o carbono. En contraparte, la actividad microbiana reducida, fomenta la persistencia del herbicida en el medio y por tanto aumenta el riesgo de que el compuesto se traslade a cuerpos de agua.

### **2.1.3. EFECTOS SOBRE LA SALUD Y EL AMBIENTE**

Los efectos que esta sustancia produce en animales y seres humanos están principalmente sobre el sistema endocrino, debido a que puede generar un desequilibrio hormonal, por ser un agente que interviene con la síntesis, secreción, metabolismo, transporte y eliminación de hormonas en el cuerpo que permiten la homeostasis y reproducción de un organismo (Pocar et al., 2003). Savitz et al. (1997) elaboró un estudio en humanos en el cual determinó que la ocurrencia de nacimientos prematuros resultó el doble en familias en las que el padre había

empleado atrazina, a diferencia de familias en las que el padre no tuvo acercamiento con el herbicida (Bravo, 2017).

Para la Agencia de Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos (ATSDR) (2003), la atrazina también puede causar daños en el corazón, el riñón y el hígado en animales de laboratorio, es decir, esta sustancia provoca alteraciones cardíacas, renales, hepáticas y un incremento en el desarrollo de leucemias y linfomas en mamíferos (Ibarra, 2006). Un estudio realizado por la Organización de Estudios de Salud Agrícola de Estados Unidos (2017) determinó que el trabajo en granjas de campo se encuentra relacionado con un mayor riesgo a padecer Artritis Reumatoide (AR), una enfermedad donde el sistema inmunológico ataca y daña el tejido sano. En la investigación se estudiaron 220 hombres agricultores con AR, los agricultores varones que alguna vez usaron los pesticidas toxafeno y atrazina fueron más propensos a desarrollar AR. (NHI, 2005).

Estudios realizados por Hayes et al. (2011), en ranas *Xenopus laevis* demuestran que los machos adultos expuestos a atrazina sufrieron desmasculinizaciones en su totalidad. El 10% de los machos expuestos copularon con otros machos y produjeron huevos fecundos, debido a que llegaron a desarrollarse como hembras funcionales (Ibarra, 2006). El Programa Internacional de Seguridad Química determinó que la atrazina es tóxica para aves, y estableció mortalidad con una ingesta de 10 000 mg/kg (Pocar et al., 2003). Adicionalmente, se encuentra clasificada por esta misma entidad como moderadamente tóxica para organismos acuáticos, con una Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) comprendida entre 0,5 a 15 mg/L. La OMS estableció la DL<sub>50</sub> oral aguda para ratas entre 1900 a 2300 mg/kg y para ratones es de 670 a 740 mg/kg (Bravo, 2017).

Takizawa et al. (2005) encontraron que la atrazina aumentó la incidencia de tumores mamarios en una cepa transgénica de rata hembra (Sprague-Dawley) (OMS, 2003). Sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer clasificó a esta sustancia dentro del Grupo 3, es decir, describe a la atrazina como no clasificable con respecto a carcinogenicidad en seres humanos, debido a que según estudios adicionales realizados en animales de laboratorio la

información encontrada no logra establecer una conexión definitiva entre atrazina y cáncer. (IARC, 2015)

## **2.2. DIAZINÓN, USO Y CARACTERÍSTICAS**

El diazinón es un plaguicida no sistémico ampliamente utilizado en la agricultura para controlar insectos, ácaros y plagas en el follaje de plantaciones de arroz, banano, café, cebolla, maíz, mango, plantas ornamentales de jardines, ganado y mascotas (NPIC, 2011). Una vez en el entorno, el diazinón es lo suficientemente persistente como para afectar significativamente los recursos hídricos (Kouloumbos, 2003). Debido a su capacidad para hidrolizarse y fotodegradarse, el diazinón sufre procesos de transformación y llega a formar productos que resultan ser más solubles en agua, más móviles y poseen un mayor potencial de lixiviación en el suelo (Sarmah et al., 2009).

El diazinón fue desarrollado a principios de la década de 1950, el lanzamiento de este producto fue relevante para la época en la cual se realizaban esfuerzos para encontrar un sustituto del DDT (Dicloro difenil tricloroetano) (Gómez, 2015). Sin embargo, en 1986 la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) prohibió la utilización de este compuesto en áreas abiertas a causa del peligro potencial para aves migratorias, además de generar contaminación en el suelo y cuerpos de agua colindantes (EPA, 2006). Para el año 2004, su uso a escala doméstica empezó a ser ilegal en Estados Unidos y en 2006 la Unión Europea, debido a los efectos perjudiciales a corto y mediano plazo en la salud de personas expuestas a este plaguicida (Roldán, 2004).

La OMS no ha establecido el límite permisible de diazinón en agua potable, debido a que no es probable su presencia en agua de consumo humano (Troya, 2016). No obstante, para el 2011 en España, el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo en estableció un valor límite ambiental de exposición diaria de 0,01 mg/m<sup>3</sup>. Esta sustancia es considerada uno de los plaguicidas organofosforados más persistentes, ya que su vida media en el ambiente es de 90 días, en contraste con malatión o paratión de los cuales su vida media es de unas pocas semanas

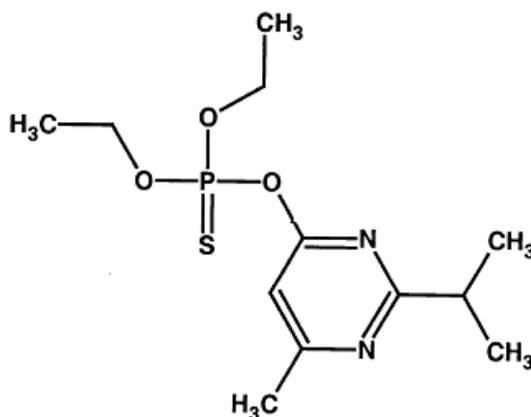
(Badii y Varela, 2008). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo clasifica dentro del grupo 2A, probablemente cancerígeno para los humanos y la OMS lo clasifica como un producto de categoría II, es decir, moderadamente peligroso (NCBI, 2015).

En Ecuador, de acuerdo a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad, 2015), el diazinón es utilizado generalmente en plantaciones de arroz, piña, rosas, papa y follaje; según su toxicidad se encuentra catalogado como un producto de categoría III, ligeramente peligroso (INEN, 1996). Adicionalmente, este compuesto es comercializado en su presentación de formulación concentrado emulsionable, por la empresa Drexel Chemical Company de Estados Unidos, bajo el nombre comercial Confiable y es importado a nivel nacional por la empresa AFECOR (Agrocalidad, 2017).

### 2.2.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y AMBIENTALES

El diazinón es un compuesto organofosforado cuyo nombre químico según la IUPAC es O,O-dietilO-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il-fosforotioato y; su fórmula molecular es  $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ . Su estructura molecular se muestra en la Figura 3

**FIGURA 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL INSECTICIDA DIAZINON.**



FUENTE: National Institutes of Health USA (NIH), 2005

En su forma pura, el diazinón es un líquido aceitoso incoloro, mientras que en formulaciones comerciales es de color ámbar claro a marrón oscuro, con olor similar a éster (IARC, 2015). Es miscible con disolventes orgánicos comunes como éteres, alcoholes, benceno, tolueno, hexano, ciclohexano, diclorometano, acetona y aceites de petróleo (NCBI, 2015). Es susceptible a oxidación por encima de 100 °C (Badii y Varela, 2008).

El diazinón posee alta afinidad con el tejido adiposo, log Kow entre 3,11 a 3,81 (IARC, 2015), y alta afinidad por el suelo log Koc 2,81 g/ml (NPIC, 2011). Los valores de la Tabla 2 muestran la poca volatilización de este compuesto en el suelo (NCBI, 2015), y su baja solubilidad en agua (Kouloumbos, 2003).

**TABLA 2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL DIAZINÓN**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor de la propiedad</b>
Punto de ebullición (tb)	Se descompone a T > a 120°C
Peso molecular (fw)	304,345 g/mol
Solubilidad (Sw)	60 mg/L en agua (20 °C)
Presión de vapor (vp)	9,01×10 <sup>-5</sup> mmHg (25°C)
Vida media (por biodegradación)	90 días
Constante de la Ley de Henry (K <sub>H</sub> )	6,09×10 <sup>-2</sup> (Pa m <sup>3</sup> /mol) (25°C)
Logaritmo del coeficiente de partición Octanol/Agua (Log Kow)	3,11 a 3,81
Logaritmo del coeficiente de partición en carbono orgánico (Log Koc)	2,81 g/ml
Logaritmo negativo de la constante de disociación (pka)	2,60 (25°C)

FUENTE: NIH, 2005, Pesticides Properties DataBase (PPBD), 2018

### 2.2.2. MOVIMIENTO EN SUELO Y AGUA

Gran parte de la polución ambiental generada por el diazinón proviene del uso agrícola y doméstico (ATSDR, 2015). Una vez en el ambiente, las partículas remanentes de esta sustancia pueden ser trasladadas por el aire (Souza et al.,

2010), además de liberarse a aguas superficiales y al ser un compuesto moderadamente móvil en algunos tipos de suelo (dependiendo de la cantidad de materia orgánica y carbonato de calcio) puede filtrarse a aguas subterráneas (Fenlon et al., 2011). Se conoce que el diazinón puede estar presente en aguas subterráneas, arroyos principales y estanques en regiones rurales cercanas a áreas de cultivo (ATSDR, 2015). En la biota el diazinón es degradado rápidamente en la mayoría de los animales que lo ingieren en sus alimentos. Sin embargo, por su alto valor de log Kow y log Koc posee un importante potencial de acumulación en el suelo y en la biota. (Narváez et al., 2012).

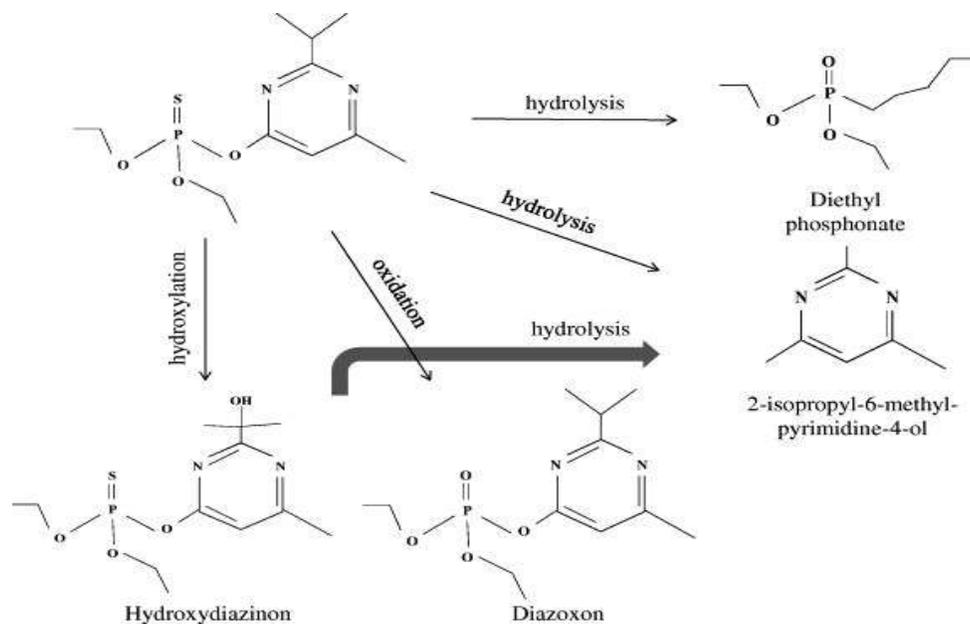
La degradación y estabilidad química del diazinón en ambientes naturales, depende de reacciones fotolíticas, hidrólisis y de degradación biológica, dichos procesos permiten la reacomodación y ruptura de enlaces químicos, que producen la transformación parcial del compuesto (Badii y Varela, 2008). La degradación microbiológica y química tanto en el suelo y el agua es la principal manera por la cual el diazinón se disipa en el ambiente (Bondarenko et al., 2004). En suelos microbianos activos se degrada rápidamente y; se ha encontrado que la semidesintegración de este compuesto ocurre de 1,2 a 5 semanas para suelos no estériles y de 6,5 a 12,5 semanas para suelos estériles. (FAO, 2000).

El diazinón es estable en aguas pH alcalino, mientras que en agua con pH ácido se hidroliza rápidamente. Se estima que la semidesintegración por hidrólisis (a 20°C) a pH igual a 5 es de 32 días, con pH igual a 7,4 es de 185 días y con pH igual a 9 es de 136 días (FAO, 2000). Los principales productos de hidrólisis se han identificado como 2-isopropil-6-metil- pirimidin-4-ol (IMP) y Dietil tiofosfato (Kuolombus et al., 2003). Estudios de fotólisis de diazinón en suspensiones acuosas del suelo bajo luz ultravioleta han demostrado que los principales productos de transformación son su análogo de oxígeno dietil 2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosfato (Diazoxón), su isómero O,O-dietilo-S-(2-isopropil-6-metilpirimidina-4-il) Tiofosfato (Isodiazinón), y O,O-dietilo-O-[2-(1-hidroxi-1-metiletil)-6 -metilpirimidina -4-il] tiofosfato (Hidroxidiazinón) (Mansour et al., 1999).

Wu et al. (2009) investigaron la degradación del diazinón mediante un Proceso de Oxidación Avanzada (PAO), cuyos resultados experimentales indicaron que se observaron cuatro subproductos principales durante la degradación del diazinón, los cuales fueron: el fosfonato de dietilo, el 2-isopropil-6-metil-4-pirimidinol (IMP), el Diazoxón y el Hidroxidiazinón (Wang y Shih, 2015). Las posibles vías de degradación de diazinón se muestran en la Figura 4. El primero es la oxidación de diazinón a Diazoxón, mediante ozonización permitió determinar que el Diazoxón era el mayor subproducto para luego degradarse fácilmente (Wu et al., 2009). Asimismo, el IMP se produjo por la hidrólisis de Diazoxón a medida que se degradaba el diazinón. Se concluyó que otra vía era la hidrólisis para dividir el diazinón en dos subproductos, el fosfonato de dietilo y el IMP. La tercera vía se definió como hidroxilación, donde el OH se unió al grupo funcional isopropilo del diazinón y produjo Hidroxidiazinón. (Basfar, 2007).

Es importante recalcar que los productos de transformación de diazinón son más polares que el compuesto parental (Narváez et al., 2012), pueden ser más solubles en agua, más móviles y tienen un mayor potencial de lixiviación del suelo (Vittozzi et al., 2001). Consecuentemente, estos compuestos probablemente serían encontrados en aguas superficiales y subterráneas en concentraciones más altas que el compuesto original (diazinón) (Souza et al., 2010).

**FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DIAZINÓN Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN**



FUENTE: Wang y Shih, 2015

### 2.2.3. EFECTOS SOBRE LA SALUD Y EL AMBIENTE

Según la OMS, el diazinón es un pesticida catalogado como moderadamente peligroso para el ambiente, ya que una vez expuesto al medio tiende a degradarse por hidrólisis, fotólisis y metabolismo microbiano impidiendo de esta manera persistencia en el medio (Díaz, 2004).

El uso inadecuado de los pesticidas organofosforados como el diazinón ya sea en la agricultura, por exposición accidental, entre otros, ha ocasionado muchos casos de envenenamiento. La exposición puede ser por la piel, gastrointestinal, por inhalación e intravenosa (Sungur y Güven, 2001). La ATSDR (2006) sostiene que pequeñas cantidades de diazinón han sido detectadas en alimentos, sin embargo, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos manifiesta que si bien es cierto algunos alimentos presentan diazinón, si su presencia en los mismos es muy baja, no causan efectos adversos en la población.

El diazinón es un inhibidor irreversible en el tejido nervioso de la enzima acetilcolinesterasa, ocasionando el incremento y acumulación en las uniones neuronales de acetilcolina y por consiguiente el bloqueo de la transmisión neuromuscular del impulso nervioso, provocando deficiencias respiratorias y posteriormente la muerte (Poet et al., 2004).

Investigaciones realizadas por Osuna et al. (2000), en camarones del género *Penaeus* sp. sometidos a 24h de diazinón, revelaron una  $CL_{50}=0,0741$  mg/L. Asimismo, análisis subletales realizados por Sánchez (2006), sobre *D. magna* sometida a diazinón evidenciaron una disminución del número medio de neonatos por hembra,  $CL_{50}=1,41$  ng/L, No Observed Effect Concentration (NOEC) de 0,05 ng/L y Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) de 0,1 ng/L.

Las principales acciones tóxicas del diazinón en ratas, están asociados a los efectos reproductivos masculinos, incluidas las alteraciones de la cromatina espermática, reducción del peso de las gónadas y anomalías en la morfología de los espermatozoides. Estos efectos están relacionados con la fosforilación de proteínas, es decir que generan alteraciones químicas en las proteínas nucleares de los espermatozoides (protaminas), las cuales empaquetan el ADN durante los últimos pasos del espermatogénesis, contribuyendo a la toxicidad reproductiva masculina y comprometiendo la fertilidad y el desarrollo de la descendencia (Piña-Guzmán et al., 2005). De acuerdo a Díaz (2004), no se han reportado informes acerca de los efectos adversos del diazinón en los gametos femeninos o gónadas, ni en el desarrollo del embrión de mamíferos. Sin embargo, otros pesticidas organofosforados, alteran los niveles de algunas hormonas, el ciclo menstrual y disminuyen la duración de embarazos en humanos.

### **2.3. ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN ECOSISTEMAS**

La toxicidad estudia los efectos tóxicos causados por los xenobióticos sobre los ecosistemas (Vargas y Perea, 2011). Por lo tanto, busca evaluar el estado de los sistemas ecológicos y contribuir a la restauración de los trastornos producidos en

el ambiente por agentes tóxicos mediante ensayos de diagnóstico (Mejía et al., 2009), los cuales deben ser realizados bajo condiciones experimentales definidas y controladas (Huovinen y Gómez, 2017).

A través de dichos ensayos, se determinan los efectos desfavorables resultantes de cierta exposición de un contaminante sobre organismos sensibles a variaciones (Peña et al., 2001). Los ensayos permiten estimar respuestas tales como: mortalidad y cambios tanto morfológicos como fisiológicos en los organismos de estudio (Mejía et al., 2009). Las consecuencias nocivas sobre el individuo o población en evaluación dependen de las características físicas y químicas del xenobiótico, así como de la concentración (dosis), tiempo, ruta y frecuencia de exposición (Silva et al., 2007).

### **2.3.1. TOXICIDAD AGUDA**

Las evaluaciones de toxicidad aguda, analizan los efectos desfavorables de un compuesto determinado sobre organismos específicos, en un periodo de exposición corto que varía entre 24 y 96 horas. El lapso de exposición para crustáceos, plantas y peces corresponde a 48, 76 y 96 horas respectivamente (Espíndola, 2004). Los organismos son sometidos a diferentes concentraciones de un producto, obteniéndose finalmente la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

La CL<sub>50</sub> representa la capacidad tóxica de una sustancia en una concentración determinada, que provoca la muerte de la mitad de la población (Castillo, 2004); dicho parámetro varía de acuerdo a diversos factores como la vía de entrada (respiratoria, oral o dérmica), la presentación (sólida, líquida, gel, polvo o gas) del producto, temperatura, la edad de los organismos, así como la dieta y el sexo (Ramírez y Lacasaña, 2001).

### **2.3.2. TOXIDAD CRÓNICA**

Los estudios de toxicidad crónica evalúan los efectos adversos de la exposición continua de un contaminante (Huovinen y Gómez, 2017). Los efectos a largo plazo están vinculados con modificaciones en crecimiento, metabolismo, reproducción, o capacidad de supervivencia (Castillo, 2004). La exposición para *Daphnias* según OECD (2012) corresponde a 21 días, tiempo suficiente para obtener resultados confiables. Los indicadores para manifestar el efecto crónico son: No observed effect concentration (NOEC) y Lowest observed adverse effect level (LOEC).

El NOEC es la concentración sin efecto observado, indica la mayor concentración de una sustancia que no altera la capacidad funcional, morfología, crecimiento, o tiempo de vida de los organismos expuestos. Es la concentración más alta donde los efectos adversos no son observados (Repetto, 2009).

El LOEC es el nivel más bajo de efecto adverso observado, indica la concentración más baja a la cual se observa efectos adversos en la morfología, capacidad de crecimiento o desarrollo vital de organismos expuestos (Repetto, 2009).

### **2.3.3. RELACIÓN DOSIS- RESPUESTA**

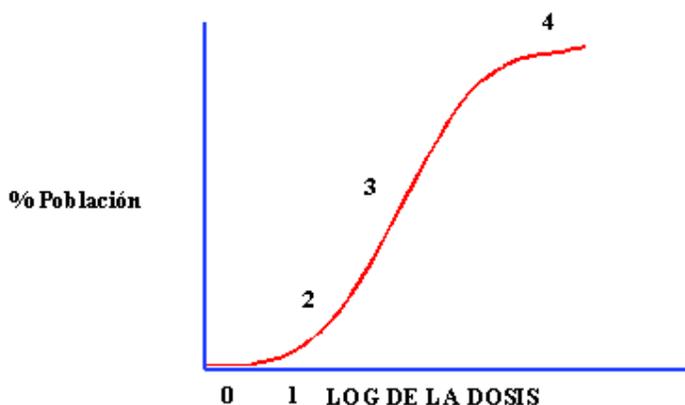
La relación dosis-respuesta describe la correspondencia entre la cantidad de tóxico (dosis) y el número de individuos que muestran un efecto establecido (respuesta) (Silbergeld, 2001). Normalmente cuando se aumenta la dosis, el número de organismos afectados también se incrementa en la población en estudio (Hernández et al., 2011). El efecto tóxico es una transformación permanente en la morfología del organismo evaluado que puede ser medida, alcanzando un valor de cero cuando la concentración de contaminante administrado es cero (Silbergeld, 2001). En cambio, la dosis es la cantidad de contaminante que ingresa en un individuo (Maier y Lantz, 2016). La dosis recibida es el resultado de cierto periodo de exposición, es así que una exposición aguda sucede por lo general de 24 a 72 horas, un intervalo de tiempo muy corto, mientras que las exposiciones crónicas

tienen lugar durante períodos prolongados de tiempo desde semanas o meses hasta años. (ATSDR, 2009)

La curva dosis-respuesta es la representación gráfica de la respuesta observada frente a las dosis administradas, en las ordenadas se establece los valores asociados a los efectos y en las abscisas los valores de la dosis (ATSDR, 2009). Generalmente, la curva de dosis-respuesta es sigmoidea y existe un lapso de dosis menores en el que no se detecta respuesta alguna, mientras si se aumenta la dosis, el efecto prolonga una curva con pendiente positiva que termina cuando la respuesta es del 100% (efecto máximo) (Maier y Lantz, 2016)

En la Figura 5 cuando la curva pasa por el origen la dosis es cero, mientras que cuando los valores de la dosis son muy bajos la curva se vuelve horizontal porque los valores de efecto son iguales a cero (Repetto, 2009). La respuesta empieza a obtener un valor ascendente cuando la dosis se encuentra en el nivel límite (Hernández et al., 2011). La curva mantiene su pendiente (línea recta) cuando la respuesta aumenta de forma directamente proporcional a la dosis (Silva et al., 2007). A dosis mayores la curva llega a ser asintótica cuando tiene un valor máximo (Maier y Lantz, 2016).

**FIGURA 5. CURVA DOSIS-RESPUESTA.**



0 A 1.-REGIÓN NOAEL; 2.-LOAEL; 3.-REGIÓN LINEAL; Y 4.-RESPUESTA MÁXIMA.

FUENTE: Silbergeld, 2001

## **2.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

Los ensayos de toxicidad acuática determinan experimentalmente el impacto biológico de contaminantes en organismos de ensayo (bacterias, algas, crustáceos, peces) (Silva et al., 2007). Estos organismos son sometidos por días u horas a varias concentraciones del compuesto de interés y los resultados obtenidos son comprobables, reproducibles y pueden ser extrapolables a niveles ecológicos superiores (Villaruel, 2004).

Trabajar con organismos es relevante, debido a las distintas manifestaciones de sensibilidad que estos pueden evidenciar (Repetto y Repetto, 2009), y en consecuencia, permiten conocer el estado o nivel de preservación de un hábitat (Morales, 2011). La OECD, EPA y ASTM han publicado recomendaciones para realizar estos ensayos, logrando que los resultados obtenidos puedan ser estandarizados y comparables (Camean y Repetto, 2012).

### **2.4.1. *Artemia salina***

Las características de *A. salina* (Branchiopoda, Anostraca, Artemiidae) se detallan a continuación:

#### **2.4.1.1. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

La distribución geográfica de la *Artemia* es muy amplia, esparciéndose por prácticamente todos los continentes (menos la Antártida). Su distribución, es producto del transporte accidental del viento o las aves, por causas naturales o por acción humana (Sarabia, 2002). Este pequeño crustáceo del orden Anostraca (carece de caparazón), naturalmente habita en pozos y lagos de agua salada con concentraciones salinas entre 3,5 a 70 ‰ (Gava et al., 2007). Estos organismos están asociados a zonas de alta salinidad debido a la baja incidencia de predadores, capacidad de regulación osmótica y disponibilidad de recursos alimenticios (Bustos y Vargas, 2010).

#### 2.4.1.2. ALIMENTACIÓN

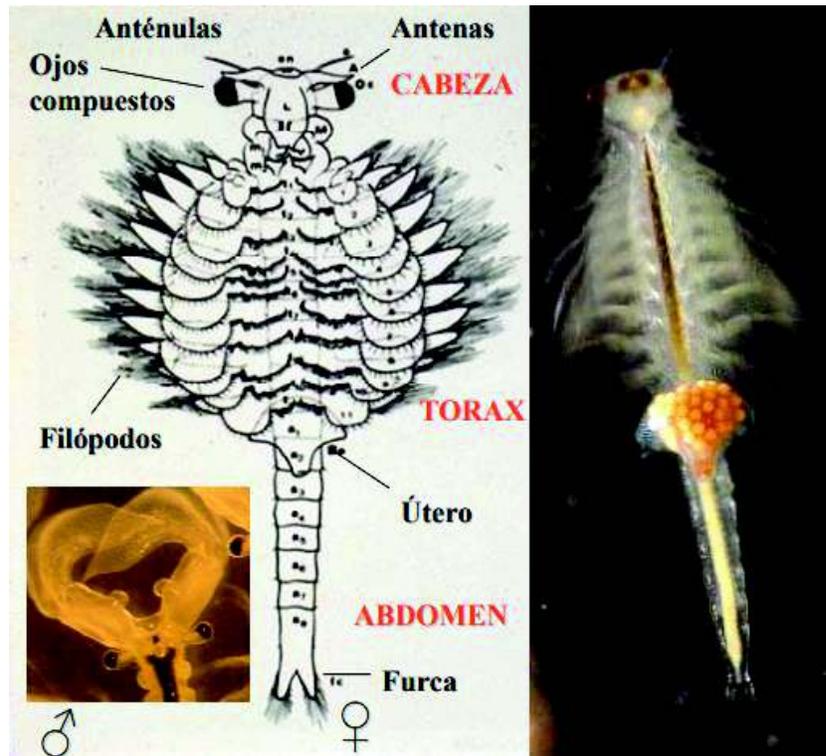
*Artemia salina* es un micro crustáceo con capacidad de filtrar diferentes tipos de material particulado en suspensión del medio acuático en el que se desarrolla (Villamar, 2000), esta función la realiza debido al movimiento de sus antenas y toracópodos, que generan pequeñas corrientes en sentido oral (Mejía et al., 2009). Su alimentación se conforma de fitoplancton, algas como *Dunaliella*, *Tetrahedron*, *Chaetoceros*, bacterias, protozoos y rotíferos (Esteve y Elmasri, 2007). En este sentido, al ser un organismo no selectivo, puede retener partículas (detritos) de diámetro inferior a 50  $\mu\text{m}$  (FAO, 2000). Asimismo, un individuo de esta especie ingiere y digiere continuamente partículas durante las 24 horas del día (Martínez et al., 2013).

#### 2.4.1.3. MORFOLOGÍA

Los organismos pertenecientes al orden anostraca presentan un destacado dimorfismo sexual, las hembras poseen antenas de corto tamaño y un ovisaco donde se almacenan los quistes hasta su liberación, los machos por su parte son distinguidos por poseer un par de penes retráctiles y antenas desarrolladas usadas para sostener a la hembra durante el apareamiento (Lomas et al., 2015).

La cabeza de estos organismos está compuesta por cinco segmentos fusionados, donde se observa un ojo compuesto a cada lado y ojo naupliano u ocelo central (Correa y Murici, 2011). El tórax está constituido por once segmentos contenedores de un par de apéndices aplanados llamados toracópodos o filópodos que sirven para nadar, comer y respirar. El abdomen está formando por 8 segmentos carentes de apéndices, los dos primeros son genitales y el último es el telson dotado de una furca caudal (Ruíz, 2008). La Figura 6 muestra la morfología y partes de una hembra y macho de *A. salina*.

FIGURA 6. MORFOLOGÍA DE MACHO Y HEMBRA DE *A. salina*



FUENTE: Ruíz, 2008

#### 2.4.1.4. REPRODUCCIÓN

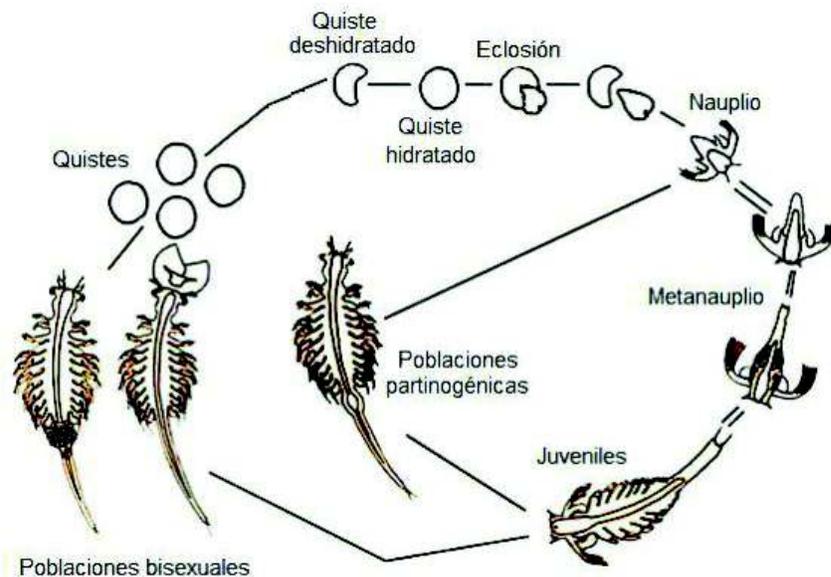
La reproducción entre los individuos macho y hembra del género *Artemia*, sucede cuando, habiendo alcanzado la madurez sexual en la etapa de adultez, el macho engancha a la hembra con sus antenas curvadas y encaja uno de sus penes en la anchura del útero permitiendo la fertilización de los quistes (Pastorino, 2003). Cuando los quistes han rebasado el útero, el cigoto se desarrolla hasta la etapa de gástrula dentro del ovisaco, formándose hasta 4000 células. (Villamar, 2000).

En la reproducción asexual por partenogénesis la fertilización no tiene lugar, debido a que ésta ocurre cuando no existen machos dentro de la población que fecunden a las hembras (Lomas et al., 2015).

En condiciones favorables, se produce la reproducción ovovivípara, y se observa que la gástrula aumenta su tamaño dentro del ovisaco hasta llegar al estadio de nauplia, para luego ser desprendido al exterior (Villamar, 2000). En cambio, si las

condiciones son extremas, se desarrolla reproducción ovípara, las gástrulas serán rodeadas de envolturas quitinosas (formación de quistes), generándose un estado de diapausa o latencia (Mejía et al., 2009). En el exterior los embriones enquistados sufren procesos de desecación de modo que todas sus funciones metabólicas se suspenden, pero mantienen su viabilidad durante varios años (Fernández, 2017). Al encontrarse los quistes, nuevamente en condiciones favorables de humedad, temperatura, salinidad, oxígeno, alimento natural, pueden reiniciar su desarrollo y dar origen a una larva nauplia (FAO, 2000). En la Figura 7 se muestra el ciclo reproductivo de esta especie.

**FIGURA 7. CICLO REPRODUCTIVO DE *A. salina***



FUENTE: Mejía et al., 2009

#### 2.4.1.5. CONDICIONES PARA LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina*

Las recomendaciones para mantener un cultivo de *A. salina* se detallan en la Tabla 3.

**TABLA 3. CONDICIONES PARA ECLOSIÓN DE QUISTES Y MANTENIMIENTO DE NAUPLIOS DE *A. salina***

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Temperatura	25 a 30 °C
Iluminación	Iluminación artificial constante provista por un foco LED colocado a 30 cm de distancia por 48 h
Recipiente de mantenimiento	Recipiente alargado de plástico transparentes que debe permanecer tapado
Densidad poblacional	Incubación de 0,5 g de quistes de <i>A. salina</i> en 0,5 L de agua de mar artificial
pH	8,6 ± 2
Salinidad	5 a 30 ppm
Oxígeno Disuelto	De 1,0 mg/L hasta saturación de O <sub>2</sub>
Alimentación	Algas y detritus

FUENTE: FAO, 2000; Martínez et al, 2006; Sánchez, 2006

ELABORACIÓN: Miño y Rodríguez

#### 2.4.1.6. IMPORTANCIA AMBIENTAL

Los organismos pertenecientes al género *Artemia* son considerados un elemento determinante del zooplancton, sobre todo en ambientes estuarinos, y por tanto son un elemento significativo dentro de la cadena trófica, la reducción de sus poblaciones implica riesgo para otras especies superiores en el medio acuático (Camacho y Sánchez, 2007). En ambientes acuáticos de alta salinidad estos organismos actúan como biosensores de contaminación llegando a convertirse en individuos importantes para análisis de toxicidad (Pérez y Lazo, 2010).

El corto ciclo de desarrollo de la *A. salina*, su importancia en el medio acuático, así como su facilidad de crianza en laboratorio, favorece su uso en ensayos de toxicidad, presentándose como un método rápido, de bajo costo, eficiente y que requiere pequeñas cantidades de la sustancia a analizar (Gava et al., 2007).

## 2.4.2. *Daphnia pulex*

Las características de *D. pulex* (Branchiopoda, Cladocera, Daphniidae) se detallan a continuación:

### 2.4.2.1. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Daphnia pulex* se encuentra distribuida en América del Norte, Europa y Australia, en Sudamérica se encuentra presente en un gran número de lagos de montaña y estanques del sur de Perú y de Chile (Villalobos, 2017). Es un organismo que se desarrolla en pequeños estanques, aunque poblaciones con menor pigmentación pueden encontrarse en lagos profundos y transparentes (ultra oligotróficos) (Miller, 2000), también pueden existir poblaciones en pequeños estanques y lagos eutróficos, donde pueden ser de color rojo brillante debido a la alta producción de hemoglobina. (Aliberti et al., 2013)

Viven en aguas abiertas de lagos, apegados a la vegetación principalmente cerca de la superficie de la columna de agua (Miller, 2000), dependiendo de las estaciones o los depredadores tienden a desplazarse arriba o abajo de la columna de agua en un proceso denominado migración vertical diel (Ramos et al., 2004). Generalmente, gastan una gran cantidad de energía moviéndose hacia una profundidad más baja durante el día para evitar a los depredadores y se acercan a la superficie para comer durante la noche (Ebert, 2005).

### 2.4.2.2. ALIMENTACIÓN

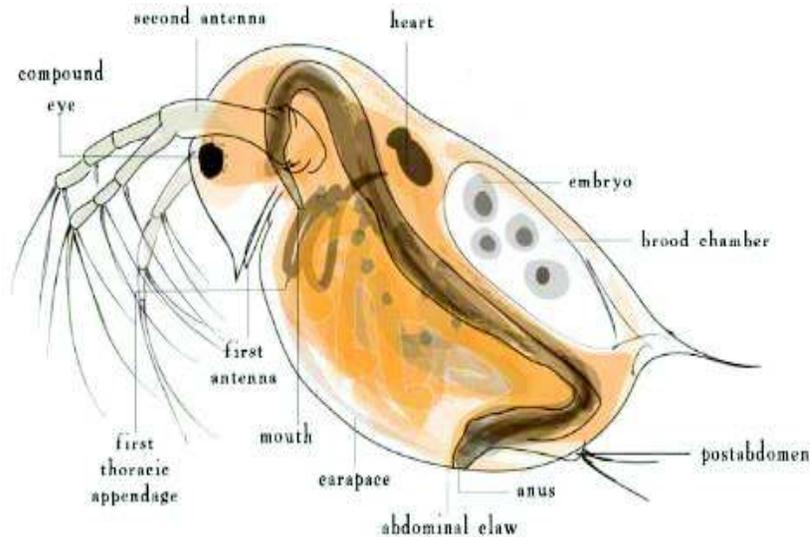
Las *Daphnias* son crustáceos filtradores (Ocampo et al., 2010). El alimento es colectado por sedas situadas en los apéndices del tórax que producen una corriente de agua (Ebert, 2005). Mientras la corriente fluye, el alimento es filtrado y recogido por un canal ventral e impulsado hacia la boca donde se mezcla con secreciones bucales y es triturado entre las mandíbulas para luego ser transportado por el intestino donde se completa la digestión (Piñeros y Quintero, 2008). La asimilación de nutrientes puede tomar de entre 30 minutos a 3 horas (Velandia y Montañez, 2010).

Aunque el sistema de alimentación es tan eficiente que incluso puede recoger bacterias, la comida generalmente está compuesta por algas planctónicas de 0,5  $\mu\text{m}$  hasta 50  $\mu\text{m}$  (Alarcón y Ardila, 2008), también se puede encontrar partículas de hasta 70  $\mu\text{m}$  de diámetro en el contenido intestinal de individuos grandes (Ebert, 2005). Las algas verdes se encuentran entre los mejores alimentos para las *Daphnias*, aunque también pueden alimentarse de levaduras, detritus y zooplancton (Garcés, 2003), así como hongos, protozoarios, bacterias y desechos orgánicos (Velandia y Montañez, 2010).

### 2.4.2.3. MORFOLOGÍA

*Daphnia pulex*, es la especie más conocida del género *Daphnia*, es un micro crustáceo que mide alrededor de 0,2 y 3,0 mm de largo (Miller, 2000). Su cuerpo es ovalado, lateralmente comprimido y no se encuentra claramente segmentado (Aliberti et al., 2013). Posee una estructura no calcificada transparente compuesta de quitina denominada caparazón, que cubre completamente al organismo (Alarcón y Ardila, 2008). La cabeza contiene un ojo compuesto de color oscuro y 5 pares de apéndices planos que sirven para filtrar el alimento y funciones sensoriales, además de varias antenas secundarias comprendidas por numerosas setas que sirven para locomoción (Ebert, 2005). Posee un pequeño ojo u ocelo especializado para percibir luz (Espíndola, 2004). Tiene mandíbulas que se encuentran en constante movimiento y le permiten al organismo comprimir y disgregar sus alimentos (Ocampo et al., 2010). En la Figura 8 se aprecia la anatomía funcional de esta especie.

Estos organismos pueden realizar su locomoción a través de segundas antenas, debido a su movimiento vertical y espasmódico, la agitación hacia abajo de las antenas proyecta al individuo hacia la superficie, luego lentamente se va cayendo, usando sus antenas a modo de paracaídas (Villaroel, 2004). La porción central del cuerpo es el tórax y contiene hasta seis pares de piernas aplastadas cubiertas de setas (Ebert, 2005). El intestino posee forma tubular, mientras que el corazón está ubicado dorsalmente en la parte superior del tronco y en la parte anterior de la cámara de cría (Ocampo et al., 2010).

**FIGURA 8. ANATOMÍA FUNCIONAL DE *D. pulex***

FUENTE: McMahon, 2016

Esta especie presenta un marcado dimorfismo sexual, es decir, las hembras *Daphnia* son generalmente más grandes que los machos. Sin embargo, éstos presentan largas antenas y poseen un par de patas con garfios que son empleadas en la copulación (Miller, 2000). Las hembras poseen una cámara de cría, espacio entre el tórax y la superficie dorsal del caparazón, que sirve para el desarrollo de los huevos (Jiménez y González, 2009).

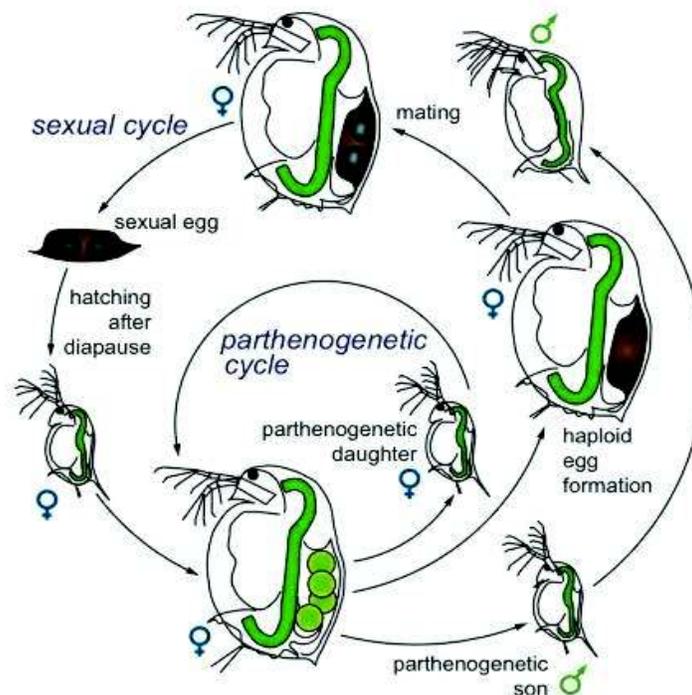
#### 2.4.2.4. REPRODUCCIÓN

Dependiendo de las condiciones del medio, *D. pulex* puede reproducirse de manera asexual y sexual (Velandia y Montañez, 2009). La reproducción asexual se produce por partenogénesis, presentándose cuando las condiciones son favorables en cuanto a alimento, factores ambientales de calidad química del agua y baja densidad poblacional, de esta manera se producen poblaciones únicamente de hembras que al alcanzar la fase reproductiva pueden producir cientos de huevos diploides partenogenéticos que generan más hembras y continúan reproduciéndose de manera asexual mientras perduren estas condiciones (Garcés, 2013). Durante los primeros 21 días, el promedio normal de neonatos por hembra

varía entre 112 y 212 (Castillo, 2014). Los huevos y embriones se desarrollan en una cavidad embrionica en la parte dorsal de las hembras, entre el dorso del cuerpo y el caparazón (Parada, 2014). Esta forma de reproducción representa una importante característica en la implementación de cultivos controlados de laboratorio (Ramírez y Mendoza, 2008).

Cuando las condiciones del medio se tornan desfavorables (anoxia, temperaturas bajas, sequías, falta de alimento, entre otros), entonces se desarrollará una generación constituida no sólo por hembras sino también por machos, que al crecer promueven la reproducción sexual, generando el apareamiento de un saco resistente conocido como efipio (Jiménez y González, 2009). El efipio es una estructura de paredes gruesas y con reservas suficientes para tolerar condiciones adversas como sequías y falta de alimento (Ramírez y Mendoza, 2008); los embriones se desarrollan cuando las condiciones mejoran dando lugar a nuevas hembras que promueven un nuevo ciclo (Espíndola, 2004). El ciclo reproductivo esta especie se presenta en la Figura 9.

**FIGURA 9. CICLO REPRODUCTIVO DE *D. pulex***



FUENTE: Pérez (2008)

#### 2.4.2.5. CONDICIONES PARA EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE *D. pulex*

Las recomendaciones para mantener un cultivo de *D. pulex* se detallan en la Tabla 4.

#### 2.4.2.6. IMPORTANCIA AMBIENTAL

La pulga de agua o *D. pulex*, resulta ser fundamental para la transmisión de la energía dentro de los sistemas acuáticos (Ramírez et al., 2010), debido a que al ser parte del zooplancton participa en el movimiento de sustancias, productividad y estabilidad en un ecosistema acuático (Villaroel, 2004). Este organismo cladócerosirve de alimento para diferentes especies de animales acuáticos como los peces, por tanto, permite la transferencia de materia orgánica entre un productor y un consumidor en la cadena trófica (Gómez et al., 2013). El uso de este microcrustáceo

como organismo en ensayos de toxicidad permite establecer el efecto a corto y mediano plazo de determinadas sustancias xenobióticas para prever potenciales cambios dentro de un sistema de agua dulce (Ebert, 2005).

**TABLA 4. CONDICIONES PARA EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE *D. pulex***

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Temperatura	21 ± 2 °C
Fotoperiodo	8 horas de oscuridad/16 horas luz
Recipientes de mantenimiento	Recipientes de vidrio transparentes que deben permanecer tapados
Densidad poblacional	Menor o igual a 12 individuos por litro
pH	7,9 ± 2
Dureza total	160 - 180 mg/L de CaCO <sub>3</sub>
Oxígeno Disuelto	5-7 mg/L de O <sub>2</sub>
Alimentación	Algas verdes

FUENTE: Castillo, 2004., Zambrano y Beltrán, 2008., Ramírez y Mendoza, 2008., Villaroel, 2004

ELABORACIÓN: Miño y Rodríguez

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. AGROQUÍMICOS ESTUDIADOS

Los agroquímicos evaluados fueron atrazina y diazinón cuyos nombres comerciales en Ecuador corresponden a Gesaprim y Confiable respectivamente.

##### 3.1.1. ATRAZINA

Este herbicida es producido por la empresa Syngenta y comercializado en el país por Ecuaquímica bajo el nombre de Gesaprim, el ingrediente activo es atrazina (90%). Según Agrocalidad el número de registro es 2-H1 y toxicológicamente está clasificado dentro de la categoría IV, es decir, que no presenta riesgos en condiciones normales de uso.

La Figura 10 muestra la presentación comercial de atrazina utilizada en esta investigación, fue almacenado en su envase original, bajo un ambiente seco, evitando el contacto con la luz solar o fuentes de calor.

**FIGURA 10. HERBICIDA GESAPRIM (INGREDIENTE ACTIVO ATRAZINA)**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez.

### 3.1.2. DIAZINÓN

El insecticida se comercializa bajo la denominación de Confiable, es producido por la empresa Drexel Chemical Company de Estados Unidos. En el Ecuador es importado y comercializado por la empresa AFECOR, como concentrado emulsionable de 600 g/L de diazinón (ingrediente activo). El número de registro unificado para este producto es 22-19/NA y su clasificación toxicológica es categoría III (ligeramente peligroso). La Figura 11 muestra la presentación comercial del diazinón empleado en esta investigación, fue almacenado en un ambiente seco, bajo sombra y en su recipiente original.

**FIGURA 11. INSECTICIDA CONFIABLE (INGREDIENTE ACTIVO DIAZINÓN)**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

### 3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD

Los cultivos y evaluaciones de toxicidad fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Escuela Politécnica Nacional. Los análisis realizados evaluaron la toxicidad de atrazina y diazinón mediante ensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (LC<sub>50</sub>-24h) y *A. salina* (LC<sub>50</sub>-48h), ensayos subletales con *D. pulex* y evaluaciones de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina*.

### 3.2.1. *Artemia salina*

#### 3.2.1.1. Eclosión

La instauración de la población experimental fue basada en el manual de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) “*Manual para el cultivo y uso de Artemia en acuicultura*” (Lavens et al., 1986). Los parámetros conservados para la eclosión y mantenimiento del crustáceo para esta investigación se detallan en la Tabla 5.

**TABLA 5. PARÁMETROS PARA ECLOSIÓN DE *A. salina***

PARÁMETRO	CRITERIO
Densidad de Quistes	0,5 g/0,5 L
Iluminación	Iluminación aproximada de 2000 lux en la superficie del agua
Oxígeno Disuelto	Superior a 6 mg/L
Temperatura	21°C y 23 °C
Salinidad	27 g/L
pH	8± 0.5

FUENTE: FAO, 1986.

Para la eclosión de los quistes se preparó agua de mar sintética, utilizando agua tratada por ósmosis inversa y una sal anhidra que provee al agua las concentraciones adecuadas de Sr, Ca, K y Mg. La concentración de sal en el agua fue de 27 g/L. La Figura 12 muestra el filtro de ósmosis inversa “*Aqua Medic Easy Line 150*” y la Figura 13 muestra la sal anhidra “*Vibrant Sea*”.

Los quistes de *A. salina* (Figura 13) fueron obtenidos del local Mascota Moda (Quito, Ecuador), para su eclosión, se colocaron en una cámara de incubación (tubo plástico adaptado) 0,5 g de quistes en 500 mL de agua de mar sintética, se airearon constantemente a través de un difusor de pecera instalado en la parte inferior del

dispositivo que garantizó la oxigenación y con iluminación artificial suministrada por una lámpara LED, colocada a 40 cm de distancia de la cámara de incubación. La Figura 14 muestra la cámara de incubación ensamblada en el laboratorio del DCB.

Transcurridas 24 horas, se observó la eclosión de nauplios, los cuales se dejaron madurar 48 horas, para obtener la primera población de larvas (metanauplios) (Figura 15), a ser empleadas en los ensayos de toxicidad, de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por Sánchez (2006) (Tabla 3).

**FIGURA 12. FILTRO DE ÓSMOSIS INVERSA “Aqua Medic Easy line 150”**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 13. QUISTES DE *A. salina* Y SAL MARINA**



A: QUISTES DE *Artemia salina*; B: SAL MARINA “Vibrant sea”

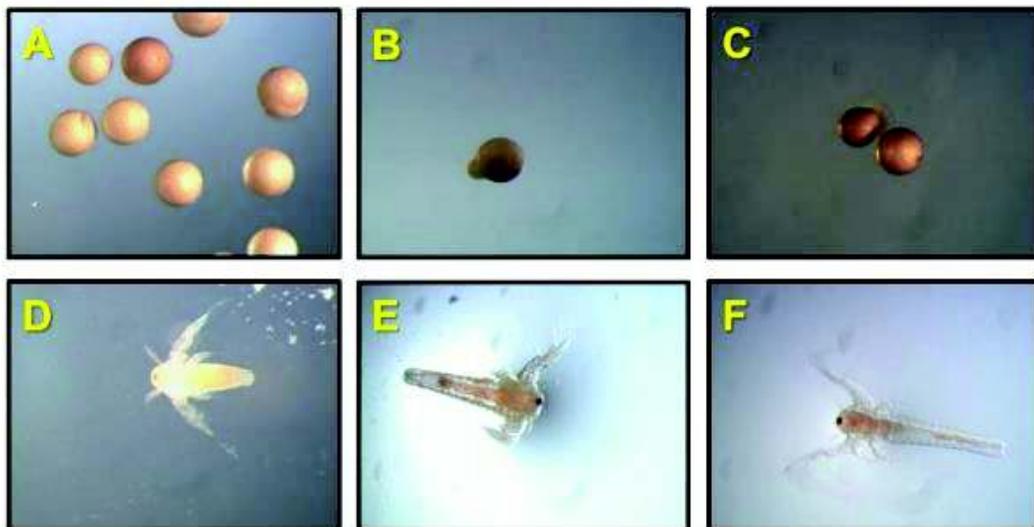
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 14. CÁMARA DE INCUBACIÓN PARA ECLOSIÓN DE *A. salina***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 15. ETAPAS DE ECLOSIÓN DE *A. salina***



A: QUISTES, B: FRACTURA DE LA MEMBRANA, C: ESTADO DE UMBRELLA, D:  
NAUPLIO EMERGENTE, E: NAUPLIO 24 h, F: METANAUPLIO 48 h

FUENTE: Pacheco, 2011

### **3.2.1.2. Ensayos de toxicidad aguda sobre A. salina**

#### **3.2.1.2.1. Ensayos preliminares**

A fin de encontrar el rango de  $CL_{50}$ , se realizaron varios ensayos preliminares con una réplica, exponiendo 10 organismos por cada concentración. En el primer ensayo se prepararon soluciones acuosas de atrazina a concentraciones logarítmicas de 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L y 0 mg/L (control), rangos en los que no se encontró mortalidad asociada a este agroquímico como se observa en la Tabla 6, por lo cual se determinaron intervalos más altos de concentraciones para que exista la respuesta deseada, realizándose en total 7 ensayos preliminares resumidos en la Tabla 7.

Para el insecticida diazinón se prepararon soluciones de 10 mL/L, 1 mL/L, 0,1 mL/L, 0,01 mL/L, 0,001 mL/L y 0 mg/L (control), valores que fueron transformados mediante la densidad del compuesto (1,02 g/mL) a concentración másica como se muestra en la Tabla 8. Las concentraciones de 10200 mg/L; 1020 mg/L y 102 mg/L reflejaron alto índice de mortalidad, por tanto, las concentraciones a evaluarse fueron menores a 102 mg/L. Se realizaron en total 3 ensayos preliminares resumidos en la Tabla 9.

Para los ensayos se colocaron 50 mL de cada solución en acuarios de vidrio de 100 mL de capacidad, previamente etiquetados; con ayuda de pipetas Pasteur se transfirieron a cada acuario 10 nauplios del cultivo de eclosión. A las 48 h se registraron el número de neonatos muertos. Con esta información se estableció el intervalo de concentración a investigar (0 y 100% de mortalidad), utilizado para las pruebas definitivas.

**TABLA 6. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA**

CONCENTRACIÓN (mg/L)	NÚMERO DE MUERTOS (48h)		TOTAL MUERTOS	ORGANISMOS EXPUESTOS
	ENSAYO	RÉPLICA 1		
100	1	2	3	20
10	1	1	2	20
1	1	0	1	20
0,1	1	0	1	20
0,01	0	0	0	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 7. RESUMEN DE DATOS DE ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA**

CONCENTRACIÓN (mg/L)	NÚMERO DE MUERTOS (48h)		TOTAL MUERTOS	ORGANISMOS EXPUESTOS
	ENSAYO	RÉPLICA 1		
1500	10	10	20	20
1200	7	8	15	20
1100	6	5	11	20
1000	5	5	10	20
900	4	2	6	20
800	2	3	5	20
700	2	2	4	20
600	1	2	3	20
500	2	0	2	20
450	0	1	1	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 8. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE DIAZINÓN**

C (mL/L)	C (mg/L)	NÚMERO DE MUERTOS (48h)			
		E	R 1	T M	O E
10	10200	10	10	20	20
1	1020	10	10	20	20
0,1	102	10	9	19	20
0,01	10,2	0	1	1	20
0,001	1,02	0	0	0	20
Blanco	Blanco	0	0	0	20

C= Concentración; E= Ensayo; R = Réplica; TM= Número Total de Organismos Muertos; OE= Organismos Expuestos  
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 9. RESUMEN DE DATOS DE ENSAYO PRELIMINAR DE DIAZINÓN**

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ENSAYO	RÉPLICA 1	NÚMERO DE MUERTOS (48h)	
			TOTAL MUERTOS	ORGANISMOS EXPUESTOS
102	10	10	20	20
51	10	10	20	20
25	3	4	7	20
15,3	1	2	3	20
10,2	0	1	1	20
3	0	0	0	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

### 3.2.1.2.2. Ensayos definitivos

Los ensayos definitivos se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos preliminares, pero por duplicado y con dos réplicas por concentración (Figura 16). Las concentraciones ensayadas para atrazina fueron: 0,45 g/L; 0,75 g/L; 0,9 g/L; 1,05 g/L, 1,35 g/l y 1,5 g/L y para diazinón: 15,3 mg/L, 20,4 mg/L, 25,5 mg/L, 30,6 mg/L, 40,8 mg/L y 51 mg/L.

**FIGURA 16. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON *A. salina***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Las Tablas 10 y 11 presentan los datos registrados durante los ensayos de toxicidad aguda definitivos con *A. salina*, expuestos a atrazina y diazinón, respectivamente.

TABLA 10. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA ATRAZINA

C	ENSAYO 1				ENSAYO 2			
	NÚMERO DE MUERTOS				NÚMERO DE MUERTOS			
	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS
(g/L)								
1,5	10	10	10	30	10	9	10	29
1,35	9	9	10	28	9	8	9	26
1,05	6	5	7	18	6	5	6	17
0,9	4	4	3	11	5	4	4	13
0,75	4	3	3	10	4	3	3	10
0,45	3	1	1	5	2	1	2	5
Blanco	0	1	1	2	0	0	0	0

C= Concentración; E= Ensayo; R = Réplica  
 ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

TABLA 11. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA DIAZINÓN

C	ENSAYO 1				ENSAYO 2			
	NÚMERO DE MUERTOS				NÚMERO DE MUERTOS			
	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS
(mg/L)								
51	9	10	10	29	10	10	10	30
40,8	8	8	9	25	9	8	8	25
30,6	5	6	5	16	5	7	6	18
25,5	3	4	4	11	3	3	4	10
20,4	2	2	2	6	2	3	3	8
15,3	2	1	1	4	1	2	1	4
Blanco	1	0	0	1	1	1	0	2

C= Concentración; E= Ensayo; R = Réplica  
 ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

### 3.2.1.3. Ensayos de Inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina*

#### Parámetros de selección de organismos para el ensayo

Para este ensayo, se colocó 1 g de quistes de *A. salina* en 150 mL de agua salina sintética, para su hidratación. Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiraron los quistes que quedaron sobre la superficie (no fecundos) y los quistes que se depositaron al fondo del recipiente fueron utilizados para el bioensayo. La Figura 17 muestra la hidratación de los quistes de *A. salina* y los quistes desechados.

**FIGURA 17. QUISTES DE *A. salina* HIDRATADOS.**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 3.2.1.3.1. Cámara de Incubación

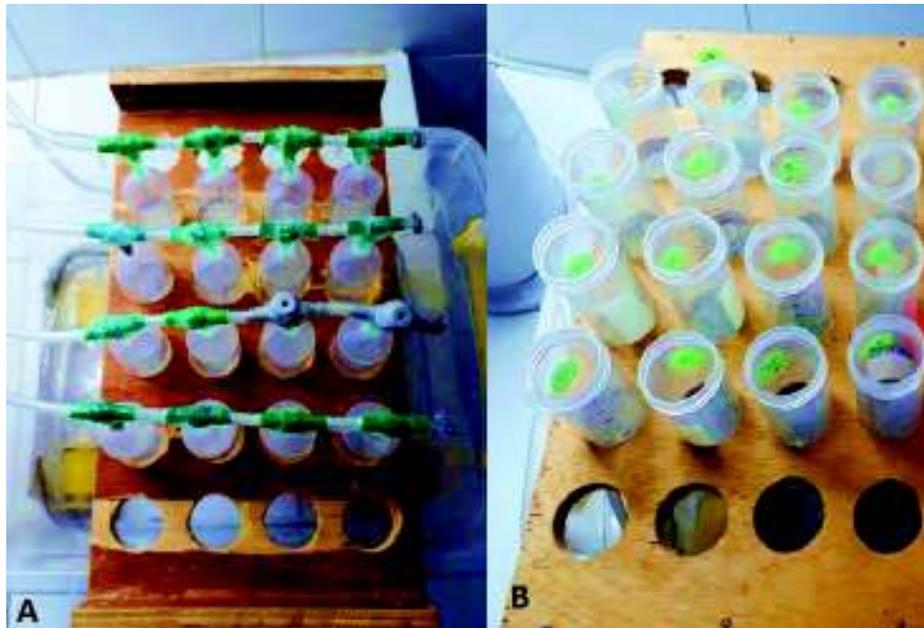
##### CÁMARA A

El sistema de incubación para quistes consistió en 2 cámaras conformadas por 16 tubos de ensayo cónicos graduados a 50 mL, ordenados en grupos de 4x4 y colocados en un contenedor de madera como se observa en la Figura 18. Cada recipiente contenía en su parte inferior (cónica) una aguja de 1,1 mm de diámetro

conectada a una válvula T, que permitió su unión en serie con 3 tubos a través de mangueras para acuario.

La oxigenación de cada recipiente fue provista mediante la conexión de cada manguera a una bomba de 4 W.

**FIGURA 18. CÁMARA DE INCUBACIÓN DE QUISTES A**



A. Vista inferior: Base cónica de cada tubo conectado a una válvula T; B. Vista superior: Tubos en soporte de madera.  
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

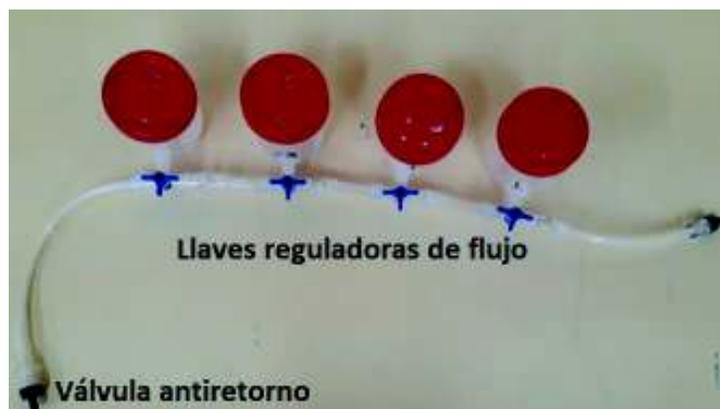
El sistema de incubación A evidenció fallas al no poder contener las soluciones en cada tubo, razón por la cual se elaboró otro sistema descrito a continuación.

### **CÁMARA B**

El sistema de incubación para quistes consistió en 2 cámaras con 8 recipientes esterilizados de plástico transparente de 100 mL de capacidad, ordenados en grupos de 4x2 y conectados en serie mediante tubos y llaves reguladoras de flujo (Figura 19), acoplados a una bomba de aire de 4 W mediante válvulas antiretorno,

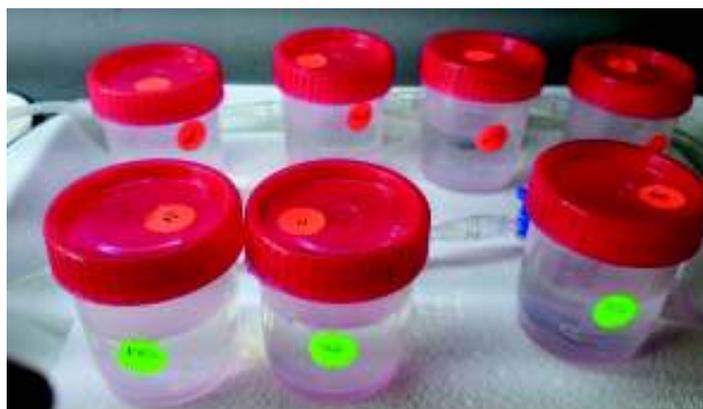
permitiendo la aireación constante de cada acuario durante las 72 horas de experimentación (Figura 20).

**FIGURA 19. SISTEMA DE AIREACIÓN PARA CÁMARA B**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 20. SISTEMA DE INCUBACIÓN DE QUISTES B**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El sistema de incubación B presentó las condiciones óptimas para la eclosión de quistes y por tanto fue elegido para la ejecución de los ensayos de inhibición de eclosión.

#### **3.2.1.3.2. Ensayos preliminares**

Los ensayos preliminares de inhibición de la eclosión de quiste de *A. salina*, se ejecutaron con las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos definitivos de

toxicidad aguda, estableciéndose de esta manera los rangos del 0 al 100% de inhibición de la eclosión.

El número de quistes (seleccionados con ayuda de un estereoscopio), por grupo de prueba fueron 50, y el volumen de solución acuosa en cada acuario fue de 60 mL. Se proveyó iluminación continua a través de una lámpara LED colocada a 30 cm de distancia de las cámaras de incubación por 72 h, la Figura 21 muestra este sistema en funcionamiento. Los datos preliminares para inhibición de la eclosión para atrazina y diazinón se detallan en las Tablas 12 y 13, respectivamente.

**FIGURA 21. ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### **3.2.1.3.3. Ensayos definitivos**

Con la información obtenida de los ensayos preliminares (0 y 100% de mortalidad), se prepararon las soluciones acuosas de concentraciones definitivas de atrazina: 0,45 g/L; 0,75 g/L; 1,05 g/L; 1,35 g/L; 1,5 g/L y 1,8 g/L; y diazinón: 15,3 mg/L; 25,5 mg/L; 30,6 mg/L; 40,8 mg/L; 51 mg/L; 76,5 mg/L y 102 mg/L, a ser ensayadas.

Para los ensayos definitivos se mantuvieron las mismas condiciones que en los ensayos preliminares, esto es 72 horas de iluminación y aireación continua, con 2 réplicas por grupo. La Tabla 14 y la Tabla 15, muestran los datos obtenidos de los ensayos definitivos para atrazina y diazinón, respectivamente.

Transcurridas las 72 h de experimentación, se registraron los nauplios eclosionados para cada concentración ensayada, considerando también aquellos que se encontraban en estado de umbrella, es decir aquellos nauplios que aún tienen pegado en ellos la cáscara del quiste (Figura 22).

**TABLA 12. DATOS PRELIMINARES DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A ATRAZINA**

C(g/L)	OE	OU	Total Eclosionados	Total no Eclosionados	Número de quistes expuestos
1,5	3	4	7	43	50
	3	2	5	45	50
	2	2	4	46	50
<b>TOTAL</b>			16	<b>134</b>	<b>150</b>
1,35	8	7	15	35	50
	8	6	14	36	50
	10	7	17	33	50
<b>TOTAL</b>			46	<b>104</b>	<b>150</b>
1,05	10	8	18	32	50
	10	7	17	33	50
	13	9	22	28	50
<b>TOTAL</b>			57	<b>93</b>	<b>150</b>
0,75	18	6	24	26	50
	15	3	18	32	50
	13	7	20	30	50
<b>TOTAL</b>			62	<b>88</b>	<b>150</b>
0,45	23	6	29	21	50
	17	8	25	25	50
	17	6	23	27	50
<b>TOTAL</b>			77	<b>73</b>	<b>150</b>
BLANCO	30	7	37	13	50
	26	9	35	15	50
	28	10	38	12	50
<b>TOTAL</b>			110	<b>40</b>	<b>150</b>

C= Concentración; OE= Organismos Eclosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella.

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 13. DATOS PRELIMINARES DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A DIAZINÓN**

C(mg/L)	OE	OU	Total Eclosionados	Total no Eclosionados	Número de quistes expuestos
51	20	5	25	25	50
	22	3	25	25	50
	15	3	18	32	50
<b>TOTAL</b>			68	<b>82</b>	<b>150</b>
40,8	18	6	24	26	50
	20	2	22	28	50
	23	5	28	22	50
<b>TOTAL</b>			74	<b>76</b>	<b>150</b>
30,6	27	2	29	21	50
	26	1	27	23	50
	24	1	25	25	50
<b>TOTAL</b>			81	<b>69</b>	<b>150</b>
25,5	16	7	23	27	50
	17	5	22	28	50
	22	4	26	24	50
<b>TOTAL</b>			71	<b>79</b>	<b>150</b>
15,3	10	7	17	33	50
	12	9	21	29	50
	11	8	19	31	50
<b>TOTAL</b>			57	<b>93</b>	<b>150</b>
BLANCO	24	10	34	16	50
	29	14	43	7	50
	31	10	41	9	50
<b>TOTAL</b>			118	<b>32</b>	<b>150</b>

C= Concentración; OE= Organismos Eclosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella.

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 14. DATOS DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A ATRAZINA**

C (g/L)	ENSAYO 1					ENSAYO 2				
	OE	OU	TE	TNE	QE	OE	OU	TE	TNE	QE
1,8	0	1	1	49	50	0	1	1	49	50
	0	1	1	49	50	0	1	1	49	50
	0	0	0	50	50	0	0	0	50	50
TOTAL			2	148	150			2	148	150
1,5	3	5	8	42	50	3	5	8	42	50
	4	2	6	44	50	4	2	6	44	50
	2	3	5	45	50	5	3	8	42	50
TOTAL			19	131	150			22	128	150
1,35	8	9	17	33	50	8	9	17	33	50
	10	9	19	31	50	10	9	19	31	50
	13	7	20	30	50	11	7	18	32	50
TOTAL			56	94	150			54	96	150
1,05	14	3	17	33	50	14	3	17	33	50
	9	11	20	30	50	9	11	20	30	50
	13	10	23	27	50	11	10	21	29	50
TOTAL			60	90	150			58	92	150
0,75	16	5	21	29	50	16	5	21	29	50
	17	5	22	28	50	17	5	22	28	50
	16	4	20	30	50	14	4	18	32	50
TOTAL			63	87	150			61	89	150
0,45	18	5	23	27	50	18	5	23	27	50
	20	4	24	26	50	20	4	24	26	50
	18	7	25	25	50	20	7	27	23	50
TOTAL			72	78	150			74	76	150
BLANCO	27	10	37	13	50	27	10	37	13	50
	25	9	34	16	50	25	9	34	16	50
	21	11	32	18	50	19	11	30	20	50
TOTAL			103	47	150			101	49	150

C= Concentración; OE= Organismos Eclosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella; TE= Total Eclosionados; TNE= Total No Eclosionados; QE= Número de Quistes Expuestos

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

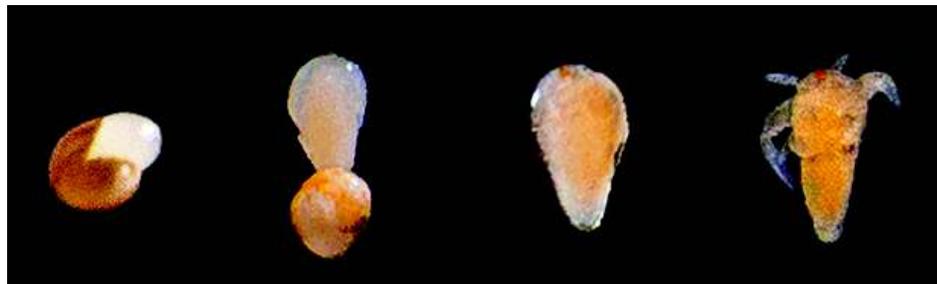
**TABLA 15. DATOS DE INHIBICIÓN DE ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A DIAZINÓN**

C (mg/L)	ENSAYO 1					ENSAYO 2				
	OE	OU	TE	TNE	QE	OE	OU	TE	TNE	QE
102	1	0	1	49	50	0	0	0	50	50
	0	0	0	50	50	0	1	1	49	50
	0	0	0	50	50	0	0	0	50	50
TOTAL			1	149	150			1	149	150
76,5	3	10	13	37	50	2	11	13	37	50
	4	8	12	38	50	3	9	12	38	50
	3	9	12	38	50	2	10	12	38	50
TOTAL			37	113	150			37	113	150
51	9	11	20	30	50	5	17	22	28	50
	6	14	20	30	50	6	16	22	28	50
	10	12	22	28	50	7	15	22	28	50
TOTAL			62	88	150			66	84	150
40,8	18	6	24	26	50	17	7	24	26	50
	15	8	23	27	50	15	9	24	26	50
	21	3	24	26	50	21	4	25	25	50
TOTAL			71	79	150			73	77	150
30,6	25	1	26	24	50	28	1	29	21	50
	24	1	25	25	50	23	1	24	26	50
	22	2	24	26	50	21	2	23	27	50
TOTAL			75	75	150			76	74	150
25,5	19	8	27	23	50	19	8	27	23	50
	21	3	24	26	50	21	3	24	26	50
	23	4	27	23	50	23	4	27	23	50
TOTAL			78	72	150			78	72	150
15,3	23	6	29	21	50	23	5	28	22	50
	22	4	26	24	50	22	4	26	24	50
	24	4	28	22	50	24	4	28	22	50
TOTAL			83	67	150			82	68	150
BLANCO	27	8	35	15	50	27	8	35	15	50
	30	11	41	9	50	30	16	46	4	50
	22	8	30	20	50	16	7	23	27	50
TOTAL			106	44	150			104	46	150

C= Concentración; OE= Organismos Eclosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella; TE= Total Eclosionados; TNE= Total No Eclosionados; QE= Número de Quistes Expuestos

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 22. QUISTES EN ESTADO DE UMBRELLA Y COMPLETAMENTE ECLOSIONADOS.**



FUENTE: Neli, 2015

Es necesario recalcar que no todos los quistes eclosionan, aunque se encuentren en buenas condiciones, razón por la cual se tomó el número de organismos que eclosionaron en el control, como el mayor porcentaje de eclosión para cada replica en todos los ensayos.

### 3.2.2. *Daphnia pulex*

#### 3.2.2.1. Cultivo

Para determinar el ambiente más adecuado para la supervivencia y desarrollo de *D. pulex* se probaron 4 medios de cultivo, especificados a continuación:

#### **CULTIVO A**

Para este cultivo se preparó agua dura reconstituida; de acuerdo a los criterios de la norma ISO 6341, se colocaron 76 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4,93 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  y 0,23 g de KCl, por litro de agua purificada a través de un filtro de ósmosis inversa. El agua reconstituida para el cultivo se preparó diluyendo 25 mL de cada solución por cada litro a preparar.

#### **CULTIVO B**

Las pruebas del Cultivo B fueron realizadas con agua dura reconstituida obtenida de acuerdo a los criterios de APHA (1998), para lo cual se preparó una solución de micronutrientes con 2,4 g de  $\text{MgSO}_4$ , 3,84 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,16 g de KCl, en 19 litros

de agua purificada, a esta solución se añadió en 1 L de solución acuosa de 2,4 g/L de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , obteniendo 20 L de agua reconstituida.

Las aguas reconstituidas fueron aireadas hasta saturación de oxígeno y se determinó su dureza y pH finales. La Tabla 16 muestra las características físico-químicas del agua purificada utilizada para preparar los cultivos y diluciones, durante los ensayos de toxicidad.

Los cultivos se realizaron en recipientes de vidrio de 3 L de capacidad como se muestra en la Figura 23, manteniendo una densidad poblacional no mayor a 12 individuos/litro y fotoperiodo: 12:12 (luz: oscuridad). La dureza del agua fue de 170 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , oxígeno disuelto de 6 mg/L y temperatura de  $21 \pm 2$  °C; la limpieza de los recipientes del cultivo se realizó 3 veces por semana con una pipeta de 1 mL.

**TABLA 16. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA DE FILTRO**

PARÁMETRO	VALOR
pH	7,33
OD	6,14 mg/L
Conductividad	7,33 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Dureza Total	36 mg $\text{CaCO}_3/\text{L}$
Alcalinidad	22 mg $\text{CaCO}_3/\text{L}$

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Los requerimientos de alimentación de los organismos de prueba fueron determinados experimentalmente con distintas biomasas y tipo de agua, siendo las siguientes:

Agua A + espirulina

Agua B + espirulina

Agua A + acelga

Agua B + acelga

Agua A + acelga + levadura

Agua A + levadura.

La Figura 24 muestra las combinaciones de alimento que se ensayaron.

**FIGURA 23. CULTIVO DE *D. pulex* CON DIFERENTES TIPOS DE AGUA RECONSTITUIDA (CULTIVO A Y B)**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**FIGURA 24. PRUEBAS DE SELECCIÓN DE ALIMENTO DE *D. pulex* CON DIFERENTES TIPOS DE AGUA RECONSTITUIDA**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Las diferentes pruebas de alimento para *D. pulex* reflejaron que la Acelga era el alimento ideal para su desarrollo. Sin embargo, transcurridas 2 semanas de pruebas se evidenció mortandad asociada al uso de esta planta, posiblemente por

el cambio de lugar de adquisición del producto y la carga de agroquímicos utilizada para su crecimiento.

### Cultivo C

Para el segundo cultivo (Cultivo C) de *D. pulex*, se establecieron condiciones más cercanas a un ambiente natural, es por ello que se utilizaron plantas acuáticas como *Lemna minor* (lenteja de agua) y *Elodea* como una fuente de alimento, además estas plantas suministraron características más viables al agua para el apropiado crecimiento de *D. pulex*, debido a que poseen alto contenido de proteína y permiten la correcta oxigenación del agua. El cultivo se realizó en un recipiente de plástico resistente, de 15 L de capacidad, conteniendo 6 L de agua purificada, y 6 L de agua mineral embotellada, completando el volumen total a 12 L, se dejó en reposo por 72 horas para aclimatación a las condiciones de laboratorio, antes de colocar los organismos *D. pulex*.

La Figura 25 muestra el cultivo de *D. pulex*, con las plantas acuáticas: *Elodea* y *Lemna minor*, con un fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad. La Tabla 17 presenta las características del agua de Cultivo C de *D. pulex*.

**FIGURA 25. CULTIVO C DE *D. pulex*.**



A. Vista frontal: Apreciación de *elodea*. B. Vista superior: Apreciación de *lemna minor*  
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 17. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA DE CULTIVO C**

PARÁMETRO	VALOR
pH	7,82
OD	6, 21 mg/L
Conductividad	143,6 $\mu$ S/cm
Dureza Total	144 mg CaCO <sub>3</sub> /L
Alcalinidad	56 mg CaCO <sub>3</sub> /L

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**Cultivo D**

Para su preparación se utilizó 6 L de agua de Cultivo A y 6 L de agua de Cultivo B mezclados con 8 L de agua lluvia reposada. Además, las condiciones de temperatura ambiente se mantuvieron aproximadamente a 15°C mientras que la temperatura del agua de cultivo fue de 17°C. La alimentación de los organismos se realizó con fitoplancton adquirido comercialmente y la cantidad administrada fue de 1 mL/ 20 L de agua de cultivo. En la tabla 18 presenta las características del agua de Cultivo D de *D. pulex*.

**TABLA 18. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA DE CULTIVO D**

PARÁMETRO	VALOR
pH	7,82
OD	6,09 mg/L
Conductividad	156,8 $\mu$ S/cm
Dureza Total	174 mg CaCO <sub>3</sub> /L
Alcalinidad	52 mg CaCO <sub>3</sub> /L

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

En los medios de Cultivo A, B y C existió aproximadamente el 80% de mortalidad de los organismos *D. pulex* durante las dos primeras semanas desde el inicio del

ensayo. Mientras que el Cultivo D mostró las condiciones favorables para el adecuado desarrollo de los organismos, logrando reproducirse hasta la tercera generación. Por lo tanto, los medios A, B y C fueron descartados y el medio D fue el utilizado durante la ejecución de esta investigación.

### **3.2.2.2. Ensayos de toxicidad aguda sobre *D. pulex***

La metodología aplicada para los ensayos de toxicidad aguda utilizando *D. pulex* se realizaron de acuerdo al procedimiento establecido por Castillo (2004).

#### **3.2.2.2.1. Ensayos preliminares**

Se realizó un ensayo preliminar con una réplica, exponiendo a 10 organismos por cada concentración, a fin de obtener el rango de concentraciones para las pruebas definitivas. Para el caso de la atrazina en el primer bioensayo se prepararon soluciones acuosas a concentraciones de 100 mg/L, 70 mg/L, 50 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L y 0 mg/L (control), como lo muestra la Tabla 19. Las concentraciones de 100 mg/L, 70 mg/L, 50 mg/L y 20 mg/L, reflejaron alto índice de mortalidad (100%), por tanto, las siguientes concentraciones a evaluarse fueron menores a 40 mg/L. Se realizaron en total 3 ensayos preliminares resumidos en la Tabla 20.

Para el insecticida diazinón se prepararon soluciones 1,5 mg/L, 0,15 mg/L, 0,015 mg/L, 0,0015 mg/L y 0,00015 mg/L y 0 mg/L (control), rangos en los que se encontró mortalidad asociada a este agroquímico como se observa en la Tabla 21, por lo cual se determinaron intervalos más bajos de concentraciones para que exista la respuesta deseada, realizándose en total 3 ensayos preliminares resumidos en la Tabla 22.

**TABLA 19. DATOS PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE ATRAZINA**

<b>NÚMERO DE MUERTOS (24 h)</b>				
<b>CONCENTRACIÓN (mg/L)</b>	<b>ENSAYO</b>	<b>RÉPLICA 1</b>	<b>TOTAL MUERTOS</b>	<b>ORGANISMOS EXPUESTOS</b>
100	10	10	20	20
70	10	10	20	20
50	10	10	20	20
20	10	9	19	20
10	4	3	7	20
1	1	0	1	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 20. RESUMEN DATOS ENSAYOS PRELIMINARES DE ATRAZINA**

<b>NÚMERO DE MUERTOS (48h)</b>				
<b>CONCENTRACIÓN (mg/L)</b>	<b>ENSAYO</b>	<b>RÉPLICA 1</b>	<b>TOTAL MUERTOS</b>	<b>ORGANISMOS EXPUESTOS</b>
40	10	10	20	20
30	10	10	20	20
20	10	9	19	20
10	4	4	8	20
1	1	0	1	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 21. PRIMER ENSAYO PRELIMINAR DE DIAZINÓN**

CONCENTRACIÓN (mg/L)	NÚMERO DE MUERTOS (48h)		TOTAL MUERTOS	ORGANISMOS EXPUESTOS
	ENSAYO	RÉPLICA 1		
1,5	10	10	20	20
0,15	10	10	20	20
0,015	10	10	20	20
0,0015	10	10	20	20
0,00015	10	10	20	20
Blanco	0	1	1	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 22. RESUMEN DATOS ENSAYOS PRELIMINARES DE DIAZINÓN**

CONCENTRACIÓN (µg/L)	NÚMERO DE MUERTOS (48h)		TOTAL MUERTOS	ORGANISMOS EXPUESTOS
	ENSAYO	RÉPLICA 1		
0,15	10	10	20	20
0,075	7	8	15	20
0,015	3	4	7	20
0,0015	1	1	2	20
0,00015	1	0	1	20
Blanco	0	0	0	20

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**3.2.2.2.2. Ensayos definitivos**

Se prepararon soluciones acuosas de los agroquímicos atrazina: 1 mg/L, 5mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L y 0 mg/L (control) y diazinón: 0,00765 µg/L, 0,0153 µg/L, 0,03825 µg/L, 0,0765 µg/L, 0,11475 µg/L y 0,153 µg/L y 0 µg/L (control). En

acuarios de vidrio de 500 mL de capacidad, se colocaron 250 mL de cada solución y 10 neonatos de *D. pulex*; la Tabla 23 muestra las condiciones del ensayo. Para cada grupo de prueba se preparó dos réplicas y sus respectivos grupos de control (blancos). A las 24 horas se registraron el número de organismos muertos para atrazina y diazinón como se presenta en la Tabla 24 y Tabla 25, respectivamente.

**TABLA 23. CONDICIONES PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON *D. pulex***

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Temperatura	20±2 °C
Alimentación	Hasta una hora antes del ensayo
Tipo de Agua	Agua de Cultivo D
Densidad poblacional	No mayor a 12 individuos por litro
Oxígeno Disuelto	6,34 mg/L
pH	7,82

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

FUENTE: Castillo, 2004

**TABLA 24. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA ATRAZINA**

C (mg/L)	ENSAYO 1				ENSAYO 2			
	NÚMERO DE MUERTOS			TOTAL MUERTOS	NÚMERO DE MUERTOS			TOTAL MUERTOS
	E	R 1	R 2		E	R 1	R 2	
30	10	10	10	30	10	9	10	29
20	10	10	9	29	10	8	10	28
15	7	6	7	20	8	8	6	22
10	4	3	4	11	3	4	5	12
5	2	2	3	7	2	3	1	6
1	1	1	1	3	0	1	1	2
Blanco	0	1	0	1	0	0	0	0

C= Concentración; E= Ensayo; R = Réplica

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 25. DATOS DE ENSAYO DEFINITIVO PARA DIAZINÓN**

	ENSAYO 1				ENSAYO 2			
	NÚMERO DE MUERTOS				NÚMERO DE MUERTOS			
C (µg/L)	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS	E	R 1	R 2	TOTAL MUERTOS
0,153	10	10	10	30	10	9	10	29
0,11475	8	8	7	23	8	7	7	22
0,0765	6	6	7	19	6	6	7	19
0,03825	4	3	4	11	3	4	3	10
0,0153	2	3	1	6	3	3	2	8
0,00765	1	0	1	2	1	1	1	3
Blanco	0	1	0	1	1	1	0	2

C= Concentración; E= Ensayo; R = Réplica

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

### 3.2.2.3. Ensayos de toxicidad subletal sobre *D. pulex*

Para evaluar la respuesta de *D. pulex* a concentraciones subletales de los agroquímicos, se seleccionaron 5 disoluciones inferiores al CL<sub>50</sub> obtenida en las evaluaciones de toxicidad aguda. Las concentraciones investigadas fueron para atrazina: 12mg/L, 6mg/L, 3mg/L, 1,5mg/L, 0,75mg/L, 0,375mg/L y 0 mg/L (control) y para diazinón: 0,053 µg/L, 0,0371 µg/L, 0,0212 µg/L, 0,0106 µg/L, 0, 00053 µg/L y 0 mg/L (control).

En acuarios de vidrio de 500 mL, se colocaron 250 mL de cada una de las diluciones señaladas en el párrafo anterior y 3 organismos de prueba. Para cada concentración se trabajó con 4 réplicas y grupos de control respectivos, y la renovación del medio se realizó cada dos días, durante los 21 días de duración de la prueba subletal, y como alimento para los organismos se suministró fitoplancton 0,1 mL/L cada día.

Durante el periodo de prueba se estimó mortalidad (supervivencia) y capacidad reproductiva, para esto diariamente se contó y separó los neonatos de cada recipiente, a fin de adquirir los datos como número medio de camadas por hembra, tiempo medio de la primera camada, número medio de neonatos totales por hembra a los 21 días y tamaño de camadas (número de neonatos por camada) (Villaroel, 2014).

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.3.1. TOXICIDAD AGUDA**

La  $CL_{50}$  fue determinada con los datos de dosis y número de organismos muertos, registrados en el bioensayo definitivo de toxicidad aguda para cada agroquímico, es decir 48 horas para *A. salina* y 24 horas para *D. pulex*. Los datos fueron ingresados al software *Probit Analysis Program*, versión 1.5 dotado por la EPA, el cual, primero realiza la prueba de CHI cuadrado ( $X^2$ ), es decir, determina la relación entre la concentración del herbicida y el porcentaje de respuesta en unidades probit, que sirve para determinar si los valores son paramétricos o no. Los valores son ajustados considerando la mortalidad de los blancos o controles. El programa tiene un límite de confianza del 95% (Castillo, 2004). Con los resultados del análisis probit se graficaron curvas de dosis-respuesta tanto para atrazina como para diazinón, que permiten determinar por interpolación gráfica o analítica la  $CL_{50}$ .

#### **3.3.2. TOXICIDAD SUBLETAL**

La evaluación de la toxicidad subletal para *D. pulex* se realizó estadísticamente utilizando el software TOXSTAT versión 3.4, el cual permite comparar grupos de datos al realizar estudios de varianza (Anova) tanto paramétricos como no paramétricos (Huaraca, 2017).

Los resultados fueron evaluados considerando dos supuestos: homogeneidad a través del test de Levene y la normalidad mediante el test de Shapiro- Wilks. Para datos paramétricos se empleó el test de Dunnett y para no paramétricos el test de Kruskal Wallis, instaurándose un nivel de significancia de 0,05. NOEC y LOEC

fueron obtenidos con límites de diferencia fijados en el *Software EPA*, 1993. El software compara cada valor experimental de cada concentración con los valores del control, aceptando las diferencias significativas cuando la probabilidad de que el resultado acepte la hipótesis es nula, esto ocurre cuando  $p < 0,05$  (Fernández, 2017).

### 3.3.3. INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN

La evaluación de inhibición de la eclosión para cada agroquímico se realizó con la ayuda de la fórmula para calcular el rendimiento, es decir:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} * 100 \quad (1)$$

El rendimiento teórico se interpretó como el número total de quistes que debieron eclosionar, mientras que el rendimiento real como el número de quistes que realmente eclosionaron durante el bioensayo. Finalmente, para conseguir el porcentaje de inhibición de la eclosión se empleó:

$$\% \text{ inhibición} = 100\% - \% \text{ rendimiento} \quad (2)$$

## CAPITULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

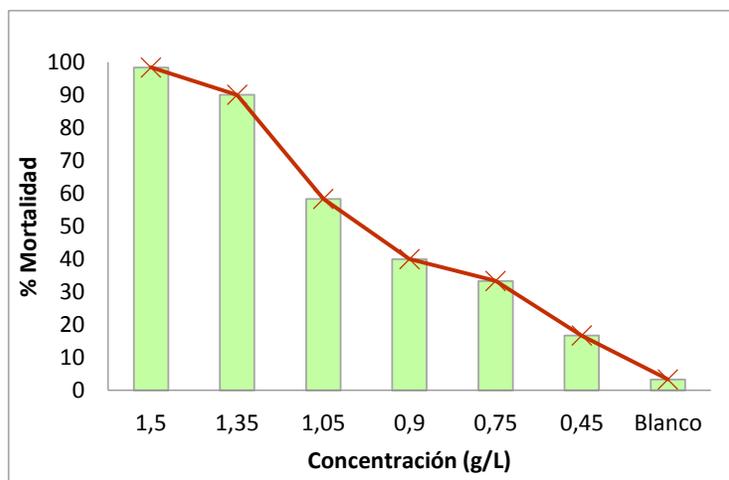
#### 4.1. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LA EXPOSICIÓN DE ATRAZINA EN *A. salina* Y *D. pulex*.

##### 4.1.1. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *A. Salina*

Los resultados del estudio de toxicidad aguda sobre *A. salina* donde se muestran las concentraciones evaluadas del herbicida, así como el número de organismos muertos, junto con el porcentaje de mortalidad se exponen en el Anexo 1. El ensayo fue realizado por duplicado y con tres réplicas por cada concentración, de esta manera se pudo obtener la desviación estándar y el valor medio.

Con los resultados del Anexo 1, se realizó la curva dosis – respuesta, es decir, el porcentaje de mortalidad respecto a la dosis administrada del herbicida como se observa en la Figura 26.

**FIGURA 26. CURVA DOSIS- RESPUESTA DE METANAUPLIOS DE *A. salina* EXPUESTOS A ATRAZINA**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

La concentración de atrazina y el porcentaje de mortalidad exhibieron una relación directamente proporcional; así, a medida que aumenta la concentración del herbicida también aumenta el número de organismos muertos.

Con ayuda del software *EPA- Probit*, se realizó el análisis estadístico de los resultados. El programa arrojó resultados para Chi cuadrado de heterogeneidad calculado y tabulado de 4,301 y 9,488, respectivamente, lo cual indica que, los valores de mortalidad son paramétricos y por tanto el uso del software es aceptado. Los resultados de concentraciones letales se exponen en la Tabla 26.

**TABLA 26. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL HERBICIDA ATRAZINA PARA *A. salina***

Punto	Concentración (g/L)	Intervalos de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC <sub>1</sub>	0,537	0,375	0,646
LC <sub>5</sub>	0,639	0,485	0,739
LC <sub>10</sub>	0,700	0,555	0,794
LC <sub>15</sub>	0,746	0,608	0,835
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>0,971</b>	<b>0,878</b>	<b>1,048</b>
LC <sub>85</sub>	1,264	1,165	1,431
LC <sub>90</sub>	1,346	1,231	1,559
LC <sub>95</sub>	1,476	1,329	1,779
LC <sub>99</sub>	1,756	1,525	2,292

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de atrazina sobre *A. salina* corresponde a 0,971 g/L con intervalos de confianza al 95% de 0,878 y 1,048 g/L.

Según Adama (2015) la CL<sub>50</sub> aguda en ratas es mayor a 5000 mg/kg, para peces la CL<sub>50</sub> (96 h) corresponde a 103,14 mg/L (*Danio rerio*), en crustáceos la CE<sub>50</sub> (48h)

es igual a 394,6 mg/L, en algas la  $CE_{50}$  (72h) es 0,12 mg/L (*Selenastrum capricornutum*) y en aves la  $DL_{50}$  corresponde a 940 mg/kg (Candela, 2016).

Los análisis de Mohammad et al. (2005) muestran que la atrazina posee baja solubilidad en agua, además según González y Hansen (2009) el aumento de la salinidad en el medio puede provocar que el herbicida se vuelva más persistente ya que el incremento de salinidad, así como alcalinidad o fertilización impide la mineralización de este herbicida al hacerlo menos disponible para microorganismos y provocando la aglomeración del mismo en el medio.

El ensayo de toxicidad aguda se realizó con agua marina artificial, de esta manera durante el ensayo, los gránulos del herbicida se dispersaron y al finalizar las 48 horas la parte de atrazina no disuelta en el agua se aglomeró al fondo del recipiente. La baja solubilidad del herbicida fue la causa principal para que la  $CL_{50}$  frente a *A. salina* sea alta respecto a otras investigaciones con diferentes indicadores.

Es importante recalcar que a partir de la concentración de 1,05 g/L los nauplios sobrevivientes tenían poca movilidad, así como poca reacción a la luz. Además, tendían a nadar al fondo del recipiente y aglomerados en un solo lugar.

#### **4.1.2. EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN de quistes de *A. salina***

Los datos y resultados de la inhibición en la eclosión de los quistes de *A. salina* cuando se aplicó atrazina se exponen en el Anexo 2, el cual muestra las concentraciones evaluadas del herbicida, el número de quistes eclosionados (que llegaron al estado naupliar), los que se encontraron en estadio umbrella y aquellos que no eclosionaron. En este mismo Anexo se presenta los porcentajes de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina* para cada dosis ensayada del herbicida en estudio.

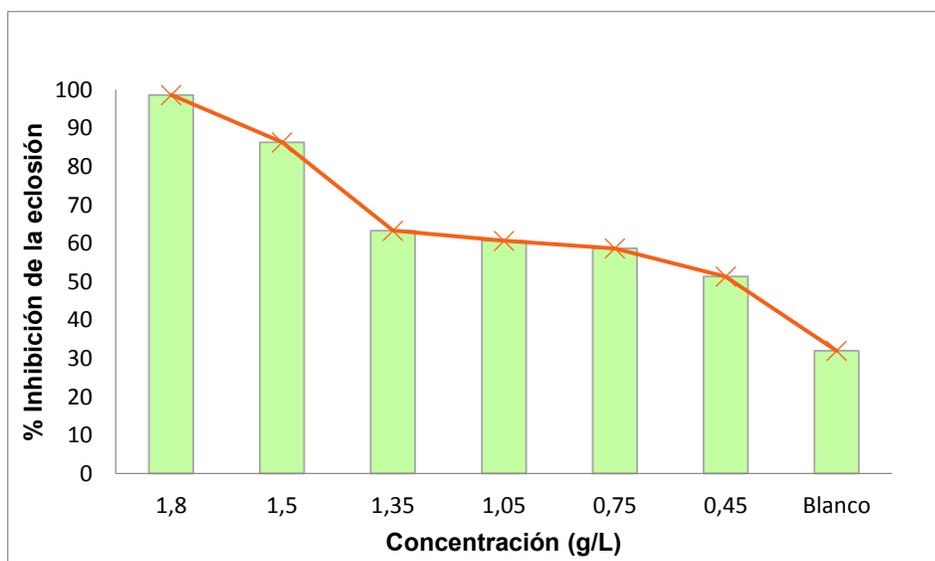
Para los cálculos, se tomó en consideración que el número total de quistes eclosionados sea igual a la suma de los quistes que llegaron a ser nauplios y los quistes que se encontraron en estado umbrella. Es necesario destacar que el ensayo fue realizado por duplicado y con 3 réplicas para cada concentración, de esta manera se pudo obtener la desviación estándar y el valor medio.

En la Figura 27 se puede observar que el herbicida atrazina a la concentración de 1,8 g/L provocó un porcentaje de inhibición de eclosión igual al 100% mientras que a la concentración de 0,45 g/L el porcentaje de inhibición de eclosión fue de 51%, de modo que se produce una relación positiva, pues al aumentar la concentración del plaguicida aumenta también el porcentaje de inhibición de la eclosión de los quistes.

La  $CL_{50}$  de este herbicida en *A. salina* corresponde a 0,971 g/L, concentración a la cual aproximadamente el 60% de los quistes expuestos no eclosionaron y aquellos que lo lograron murieron a las 24 horas de exposición.

Es importante reiterar que no todos los quistes eclosionan, aunque se encuentren en buenas condiciones, razón por la cual se tomó el número de organismos que eclosionaron en el control como el mayor porcentaje de eclosión para cada replica en todos los ensayos.

**FIGURA 27. CURVA DOSIS-RESPUESTA PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A ATRAZINA**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

En la Tabla 27 se exponen los resultados de los porcentajes de inhibición de la eclosión en quistes de *A. salina* obtenidos para diferentes concentraciones de atrazina.

**TABLA 27. RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN PARA *A. salina***

<b>CONCENTRACIÓN (g/L)</b>	<b>PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN (%)</b>
Blanco	32,00
0,45	51,34
0,75	58,67
1,05	60,67
1,35	63,34
1,5	86,33
1,8	99

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

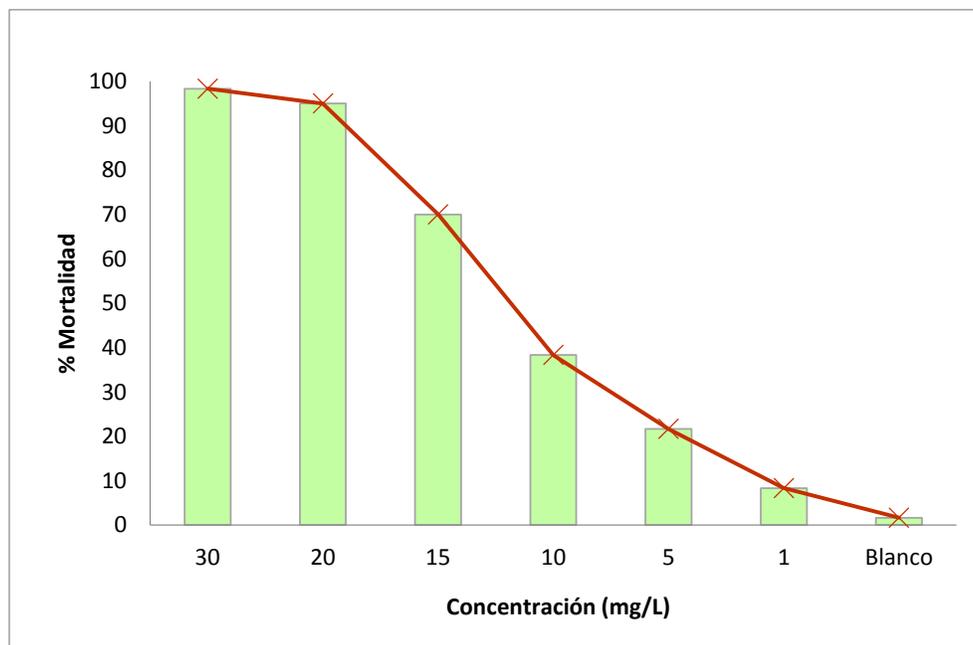
No existen estudios de grado técnico sobre ensayos de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina* con el herbicida analizado. Sin embargo, en esta investigación y bajo la metodología empleada, se determinó que la atrazina es capaz de afectar la supervivencia del embrión, es decir, que desde 0,45 g/L del formulado Gesaprim existe inhibición de la eclosión de quistes y además afectación de la viabilidad de un nauplio para continuar con su desarrollo normal.

#### **4.1.3. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *D. PULEX***

Los resultados del estudio de toxicidad aguda sobre *D. pulex* donde se muestran las concentraciones evaluadas del herbicida, así como la cantidad de organismos muertos, junto con el porcentaje de mortalidad se exponen en el Anexo 3. El bioensayo fue realizado por duplicado y con tres réplicas por cada concentración, de esta manera se pudo obtener la desviación estándar y el valor medio.

Con los resultados del Anexo 3 se realizó la curva dosis – respuesta, como se muestra en la Figura 28. El herbicida atrazina a mayor concentración en el medio ocasiona mayor mortalidad de organismos de *D. pulex*. En dosis iguales o superiores a 20 mg/L se obtiene prácticamente el 100% de mortalidad.

**FIGURA 28. CURVA DOSIS- RESPUESTA DE NEONATOS DE *D. pulex* EXPUESTOS A ATRAZINA**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El análisis estadístico de los resultados fue evaluado con ayuda del programa *EPA-Probit*, proporcionando resultados para Chi cuadrado de heterogeneidad calculado y tabulado de 4,822 y 9,488 respectivamente, indicando que los valores de respuesta son paramétricos. En la Tabla 28 se exponen los resultados de concentraciones letales para este ensayo.

La CL50 de atrazina sobre *D. pulex* fue de 12,011 mg/L cuyos intervalos de confianza al 95% corresponden a 9,889 mg/L y 13,594 mg/L.

En el Anexo 3 se presentan el número de organismos muertos, así como el porcentaje de mortalidad para cada concentración ensayada.

La concentración letal media para peces como trucha (96h) y bluegill (96h) corresponde a 4,4 mg/L y 59 mg/L, respectivamente (Sygenta, 2018), por otro lado, de acuerdo a Adama (2015) la CL50 aguda en los peces *Danio rerio* (96 h) corresponde a 103,14 mg/L y en crustáceos la CE50 (48h) es igual a 394,6 mg/L.

Las investigaciones de toxicidad cuyo bioindicador ha sido *D. pulex* han arrojado resultados que varían entre 10 mg/L (Anasac, 2018) y 27,1 mg/L a las 48 h (Syngenta, 2017).

**TABLA 28. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL HERBICIDA ATRAZINA PARA *D. pulex***

Punto	Concentración (mg/L)	Intervalos de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC <sub>1</sub>	5,325	2,660	7,220
LC <sub>5</sub>	6,758	3,949	8,601
LC <sub>10</sub>	7,673	4,867	9,456
LC <sub>15</sub>	8,360	5,599	10,091
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>12,011</b>	<b>9,889</b>	<b>13,594</b>
LC <sub>85</sub>	17,257	15,246	20,979
LC <sub>90</sub>	18,802	16,456	23,861
LC <sub>95</sub>	21,348	18,274	29.116
LC <sub>99</sub>	27,092	21,959	42,842

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Al comparar los resultados de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del presente estudio con las referencias bibliográficas se observa que la toxicidad aguda de Gesaprim con atrazina al 90% (12,011 mg/L) está dentro de los intervalos de toxicidad aguda reportados en otros estudios. Para *D. pulex* la atrazina es un potencial contaminante, su baja solubilidad en agua provoca su permanencia en el medio por varios meses, además es moderadamente móvil en el suelo (principalmente en suelos con bajo contenido de materia orgánica) llegando finalmente a cuerpos de agua (Nufarm, 2018)

#### 4.1.4. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE *D. pulex*

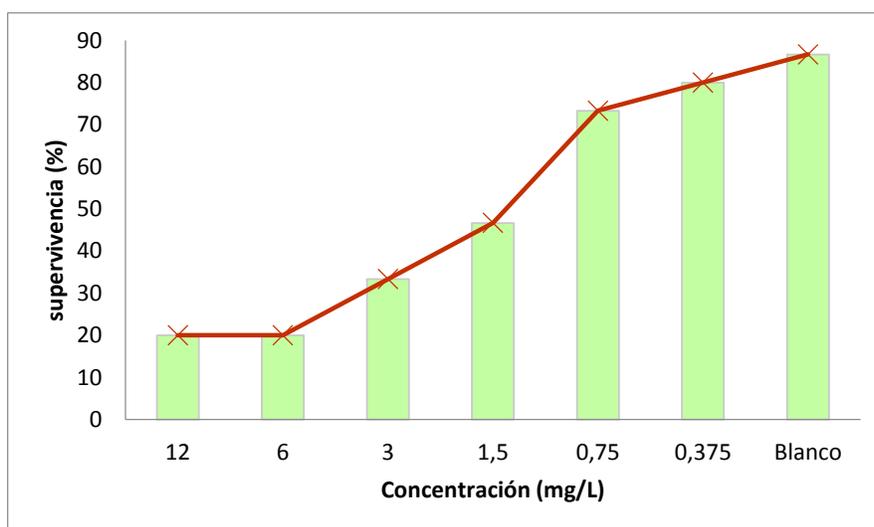
En los Anexos 4 y 5 se observa la respuesta de supervivencia y reproducción de los individuos de *D. pulex*, expuestos a varias concentraciones de atrazina durante 21 días.

Además, se realizó un análisis matemático de supervivencia, longevidad y parámetros reproductivos de los individuos expuestos reflejados en el Anexo 6.

##### 4.1.4.1. Supervivencia

La Figura 29 detalla la longevidad o supervivencia en porcentaje de 3 organismos en cada concentración evaluada. De esta manera a las concentraciones de 6 mg/L y 12 mg/L sobrevivieron 3 organismos (20%) a los 7 y 15 días, respectivamente. Por otro lado, desde la concentración de 3 mg/L los organismos sobrevivieron a la exposición durante los 21 días incrementando la supervivencia en las concentraciones más bajas. Estos valores se reflejan en el Anexo 6.

**FIGURA 29. SUPERVIVENCIA DE *D. pulex* A LOS 21 DÍAS DE EXPOSICIÓN A ATRAZINA**

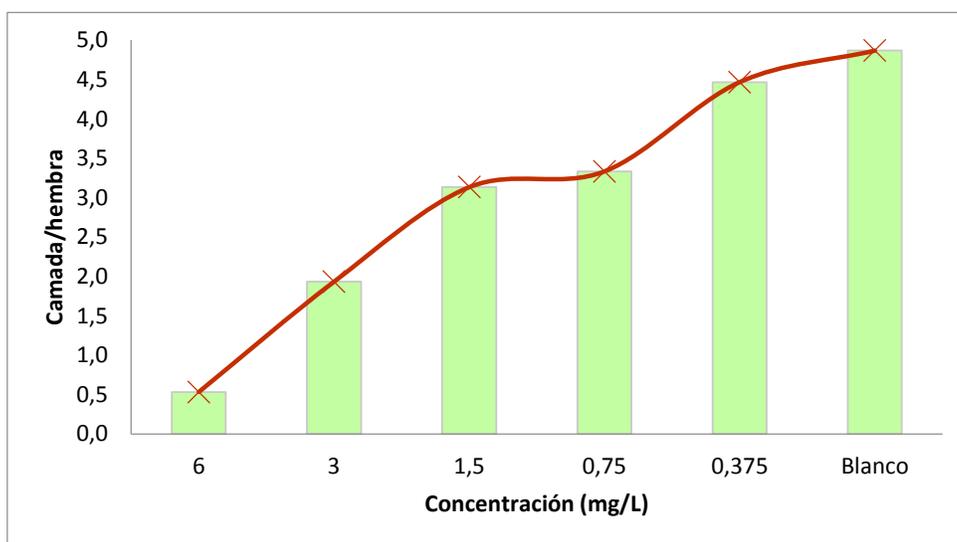


ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.1.4.2. Camadas por hembra

Los valores de camadas por hembra representan el número de partos que tuvo cada *Daphnia* expuesta durante los 21 días. Dichos valores se obtuvieron al observar directamente el útero de cada organismo y se reflejan en la Figura 30 y en el Anexo 7.

**FIGURA 30. CAMADAS POR ORGANISMO DE *D. pulex***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El número de camadas por hembra disminuye significativamente a partir de la concentración de 1,5 mg /L, llegando a un valor de 0,5 en la concentración de 6 mg/L. Es importante destacar que a la concentración de 12 mg/L las *Daphnias* no tuvieron ninguna camada. Estos valores están reportados en el Anexo 6.

Por otro lado, el análisis de varianza (Anova) en el cual se utilizó el test de homogeneidad de Levene y el test de normalidad de Shapiro-Wilks especificó la existencia de diferencias significativas entre el blanco y las concentraciones evaluadas, esto se verifica al analizar los valores de F calculado y crítico.

El valor de F calculado resultó mayor que el valor de F crítico, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre los valores registrados como se observa en la Tabla 29.

**TABLA 29. ANOVA PARA CAMADAS POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
Entre grupos	6	108,283	18,047	50,271	2,45
Intra grupos	28	10,052	0,359		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El test de Dunnetts reveló diferencias representativas ( $p < 0,05$ ) entre el blanco y las concentraciones correspondientes a 0,75 mg/L, 1,5 mg/L, 3,6 mg/L y 12 mg/L. El LOEC referente a la disminución del número de camadas por hembra correspondió a la concentración de 0,75 mg/L y el NOEC a la concentración de 0,375 mg/L como se muestra en la Tabla 30.

**TABLA 30. TEST DE DUNNETS PARA CAMADAS POR HEMBRA**

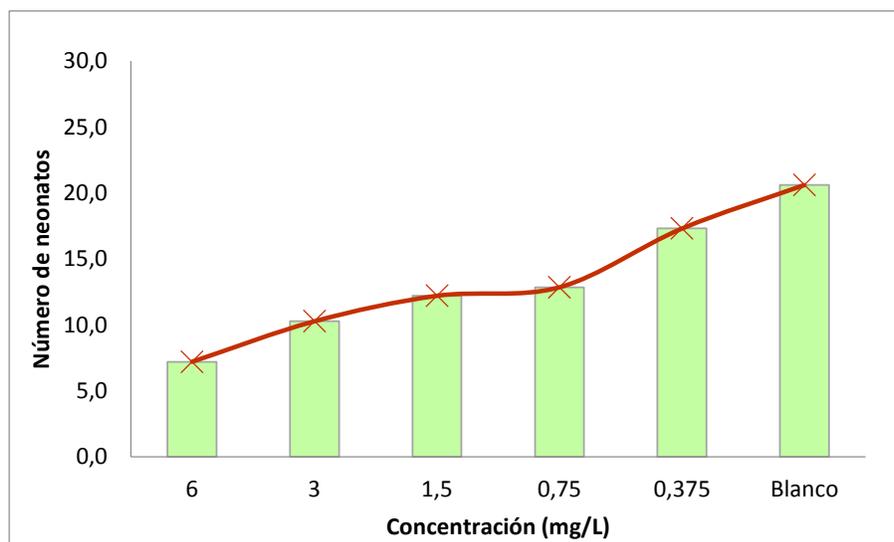
Concentración (mg/L)	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	4,80	4,80		
0,375	4,46	4,46	0,897	
0,75	3,32	3,32	3,906	*
1,5	3,50	3,50	3,431	*
3	1,94	1,94	7,547	*
6	0,40	0,40	11,611	*
12	0	0	12,667	*

Dunnet tabulado= 2,43 ( $p=0,05$  /  $df= 24,6$ )

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.1.4.3. Tamaño de camadas

Este parámetro refleja la media de la cantidad de neonatos por cada camada en cada una de las concentraciones evaluadas. Dichos valores se obtienen al relacionar el número total de neonatos de cada recipiente para el número de camadas de ese día como se expone en la Figura 31.

**FIGURA 31. TAMAÑO DE CAMADA POR *D. pulex***

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El herbicida atrazina tiene una participación representativa en el número de neonatos por camada a partir de la concentración de 0,75 mg/L donde el tamaño de camada disminuye 1,6 veces respecto al blanco mientras que a la concentración de 6 mg/L disminuye 2,86 veces. Estos valores se encuentran reportados en el Anexo 6.

El análisis de varianza (Anova) en el cual se utilizó el test de homogeneidad de Levene y el test de normalidad de Shapiro-Wilks evidenció la existencia de diferencias significativas entre el blanco y las concentraciones evaluadas.

El valor de F calculado resultó mayor que el valor de F crítico, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre los valores registrados como se observa en la Tabla 31.

**TABLA 31. ANOVA PARA TAMAÑO DE CAMADAS POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
<b>Entre grupos</b>	6	1420,686	236,781	39,184	2,45
<b>Intra grupos</b>	28	1169,20	6,043		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El LOEC referente a la disminución del tamaño de camadas por hembra corresponde a 0,75 mg/L mientras que el NOEC corresponde a 0,375 mg/L. Además el test de Dunnett mostró que las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se encuentran entre el blanco y las concentraciones que varían desde 0,75 mg/L y las superiores a la misma (Tabla 32).

**TABLA 32. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS**

Concentración (mg/L)	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	20,60	20,60		
0,375	17,40	17,40	2,058	
0,75	12,80	12,80	5,017	*
1,5	12,40	12,40	5,274	*
3	10,20	10,20	6,689	*
6	6	6	9,391	*
12	0	0	13,250	*

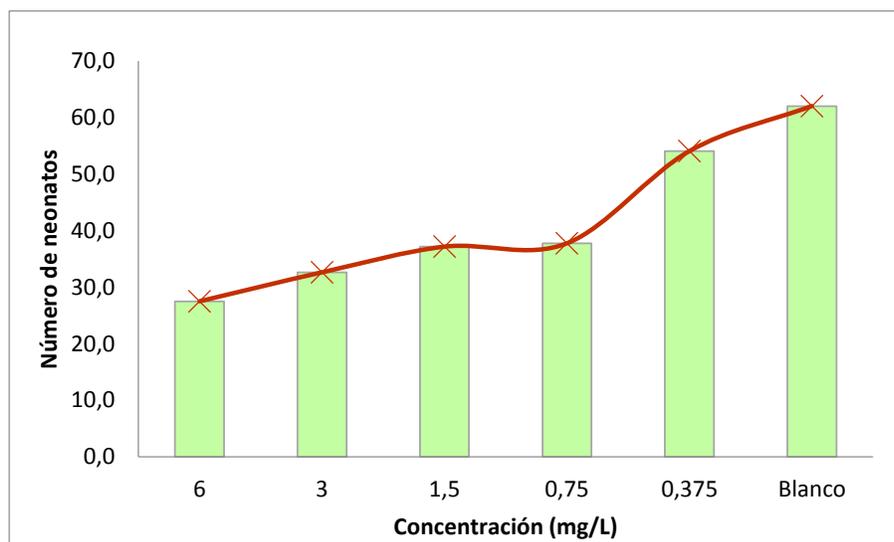
Dunnett tabulado= 2,43 ( $p=0,05$  /  $df= 24,6$ )

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.1.4.4. Neonatos totales por hembra

Este parámetro indica el número de neonatos que tuvo cada hembra expuesta a las concentraciones de atrazina durante los 21 días del ensayo. Este resultado se obtiene al dividir los neonatos totales para el número de camadas por hembra como se detalla en el Anexo 6 y en la Figura 32.

Además, en el Anexo 6 se refleja que el número de neonatos disminuye a medida que aumenta la concentración de atrazina. Mientras que en el blanco la producción de neonatos por hembra a los 21 días corresponde a 62 en la concentración de 6 mg/L la producción se reduce a 27,5; es decir disminuye 2,25 veces.

**FIGURA 32. NEONATOS TOTALES POR *D. pulex***

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El análisis de varianza (Anova) evidenció que el valor de F calculado es mayor al valor de F crítico, por tanto, existen diferencias significativas entre los valores registrados y se rechaza la hipótesis nula como se observa en la Tabla 33.

**TABLA 33. ANOVA PARA NEONATOS TOTALES POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
<b>Entre grupos</b>	6	1456,215	221,869	37,732	2,45
<b>Intra grupos</b>	28	1636,134	64,319		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El test de Dunnett's mostró que las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se encuentran entre el blanco y las concentraciones que varían desde 0,75 mg/L y las superiores a la misma. En consecuencia, el LOEC para este parámetro es 0,75 mg/L y el NOEC corresponde a 0,375 mg/L. Estos valores se reflejan en la Tabla 34.

TABLA 34. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS

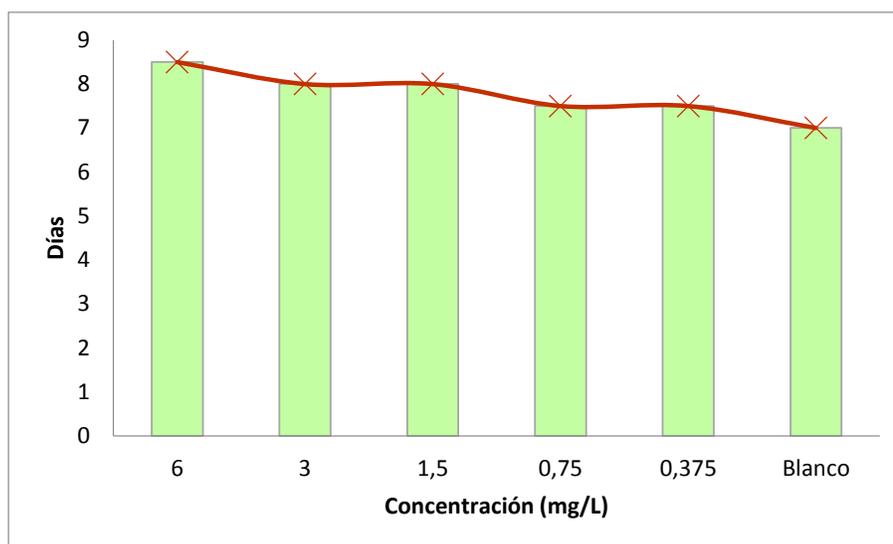
Concentración (mg/L)	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	62,20	62,20		
0,375	54,240	54,240	1,569	
0,75	37,646	37,646	4,841	*
1,5	36,940	36,940	4,98	*
3	32,560	32,560	5,84	*
6	11	11	10,09	*
12	0	0	12,263	*

Dunnet tabulado= 2,43 (p=0,05 / df= 24,6)

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.1.4.5. Primera camada

Representa el tiempo medio en el cual se obtuvo la primera camada en cada una de las concentraciones ensayadas (Figura 33).

FIGURA 33. PRIMERA CAMADA DE *D. pulex*

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Desde el blanco hasta las concentraciones correspondientes a 0,375mg/L y 0,75 mg/L se obtuvo la primera camada a partir del día 7. A concentraciones superiores la primera camada se obtuvo a partir del día 8 y 9.

Investigaciones realizadas por Hill et al (1994) muestran que la atrazina refleja un valor de NOEC correspondiente a 0,12 mg/L. Por otro lado, según PPDB (2018) el NOEC es equivalente a 0,25 mg/L y el LOEC a 0,8 mg/L.

En esta investigación la toxicidad subletal de *D. pulex* a nivel reproductivo equivale a NOEC y LOEC de 0,375 mg/L y 0,75 mg/L, respectivamente.

Al analizar comparativamente estos resultados se puede evidenciar que la toxicidad de atrazina no ha cambiado respecto a los resultados obtenidos hace más de 40 años.

## **4.2. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LA EXPOSICIÓN DE DIAZINÓN EN *A. Salina* Y *D. Pulex***

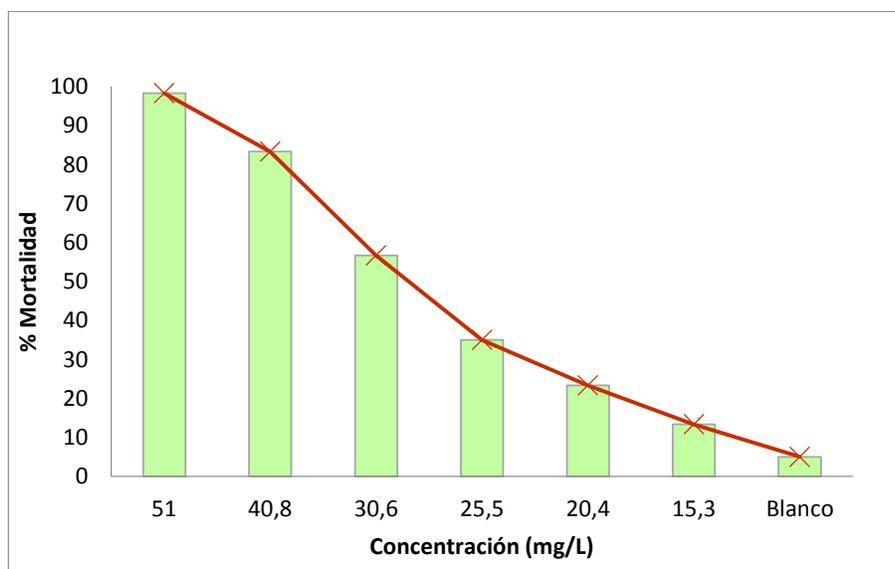
### **4.2.1. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *A. salina***

Los resultados del estudio de la toxicidad aguda del diazinón sobre *A. salina* se exponen en el Anexo 8 donde se muestran las concentraciones evaluadas del insecticida, así como el número de individuos muertos y el porcentaje de mortalidad por concentración.

Con los resultados obtenidos se realizó la curva dosis - respuesta, es decir, el porcentaje de mortalidad respecto a la dosis administrada del insecticida como se observa en la Figura 34.

En la solución de diazinón se verifica una mortalidad mayor al 50% a partir de la concentración correspondiente a 30,6 mg/L. Adicionalmente en la mínima concentración evaluada (15,3 mg/L) la mortandad fue de 13%. Cuando aumenta la concentración de diazinón incrementa también el número de organismos muertos.

**FIGURA 34. CURVA DOSIS- RESPUESTA DE METANAUPLIOS DE *A. salina* EXPUESTOS A DIAZINÓN**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Los resultados se analizaron estadísticamente a través del software *EPA- Probit*, se determinó que los valores obtenidos son paramétricos, al evidenciar que los valores de heterogeneidad calculado y tabulado son de 1,878 y 9,488 respectivamente, por lo tanto, el uso del software es aceptado. Los resultados de concentraciones letales se exponen en la Tabla 35.

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de diazinón sobre *A. salina* a 48 h de exposición corresponde a 29,534 mg/L con intervalos de confianza al 95% de 26,094 y 32,448 mg/L.

Estudios realizados por Jaramillo et al. (2013) dieron como resultado una  $CL_{50}$  a 48 h de diazinón comercial sobre *A. franciscana* de 10,57 mg/L. Por otro lado, Bustos y Vargas (2010) reportan una toxicidad aguda menor con una  $CL_{50}$  a 48 h de la marca diazinon 60E, con una concentración de 60% del ingrediente activo sobre *A. salina* de 1,27 mg/L. Asimismo, estudios realizados por Máchová et al. (2007) a las 96 h del formulado comercial Diazol 60 EC con 600 mg/L de ingrediente activo sobre organismos acuáticos *Poecilia reticulata* y *Cyprinus carpio* dieron como resultado una  $CL_{50}$  de 10 mg/L y 25 mg/L, respectivamente. Una investigación realizada por

Henao et al. (2005) donde emplearon diazinón con 97,7% de pureza, de la marca Syngenta sobre *Oreochromis sp* mostraron una toxicidad menor con una CL<sub>50</sub> a 96 h de 3,990 mg/L, con un intervalo del 95% de confianza de 3,500-4.330 mg/L.

**TABLA 35. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL INSECTICIDA DIAZINÓN PARA *A. salina***

Punto	Concentración (mg/L)	Intervalos de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC <sub>1</sub>	14,586	9,376	18,250
LC <sub>5</sub>	17,934	12,777	21,389
LC <sub>10</sub>	20,023	15,050	23,310
LC <sub>15</sub>	21,569	16,793	24,727
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>29,534</b>	<b>26,094</b>	<b>32,448</b>
LC <sub>85</sub>	40,411	36,583	47,193
LC <sub>90</sub>	43,563	39,024	52,364
LC <sub>95</sub>	48,637	42,746	61,368
LC <sub>99</sub>	59,801	50,329	83,266

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Al realizar un análisis comparativo entre los datos de CL<sub>50</sub> bibliográficos de investigaciones anteriores y resultados obtenidos se puede establecer una menor toxicidad del compuesto comercial Confiable en relación con compuestos donde se analizó el ingrediente activo con mayor concentración de pureza, es así que se puede evidenciar la influencia de coadyuvantes utilizados en productos comerciales de este plaguicida.

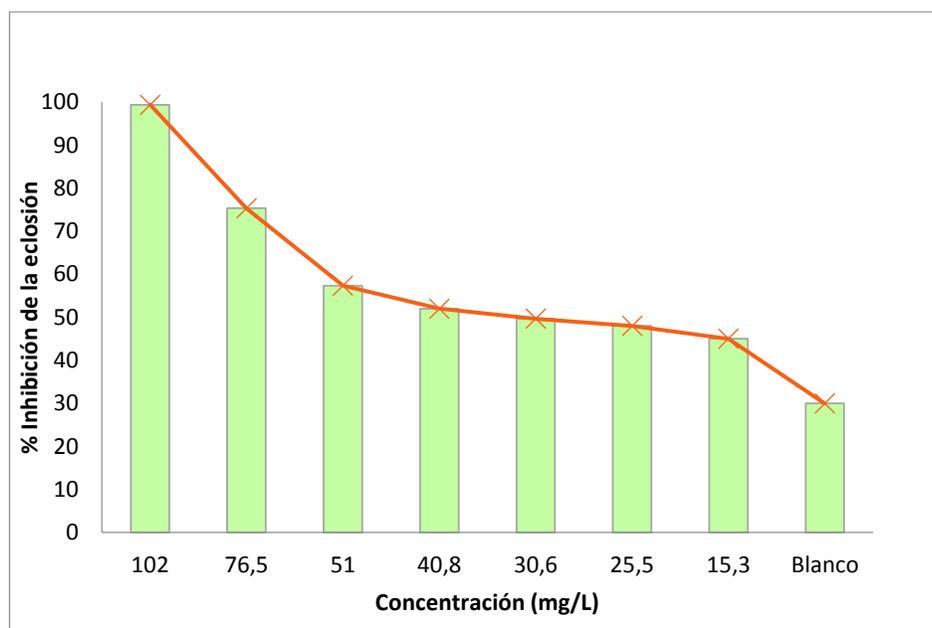
La marca utilizada en este trabajo investigativo se encuentra compuesta por aditivos c.s.p (cantidad suficiente para) 1 L, y sirven para incrementar la vida útil del plaguicida, atraer la plaga, y propagar el insecticida de forma más uniforme.

#### 4.2.2. EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina*

El Anexo 9 muestra los resultados del análisis de inhibición de la eclosión sobre *A. salina*, allí se exponen las concentraciones evaluadas, así como el número de organismos eclosionados incluyendo los individuos en estado de umbrela, los no eclosionados y el porcentaje de inhibición.

Con los resultados del Anexo 9 se realizó la gráfica correspondiente al porcentaje de inhibición de eclosión respecto a la dosis administrada del herbicida como se observa en la Figura 35

**FIGURA 35. CURVA DOSIS-RESPUESTA PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A DIAZINÓN**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El insecticida diazinón a la concentración de 102 mg/L provocó un porcentaje de inhibición de la eclosión al 100% mientras que a la concentración de 15,3 mg/L la inhibición fue de 45%. Al aumentar la concentración del insecticida aumenta también el porcentaje de inhibición de la eclosión.

En la Tabla 36 se exponen los resultados de los porcentajes de inhibición de la eclosión en quistes de *A. salina* obtenidos para diferentes concentraciones de diazinón.

**TABLA 36. RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN PARA *A. salina***

<b>CONCENTRACIÓN (mg/L)</b>	<b>% DE INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN</b>
Blanco	30
15,3	45
25,5	48
30,6	49,67
40,8	52
51	57,34
76,5	74,67
102	99

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

La toxicidad de un compuesto depende de la proporción en que el pesticida es absorbido. La degradación de pesticidas organofosforados como el diazinón ocurre por hidrólisis hepática; sin embargo, la degradación es relativamente lenta acumulándose en el tejido graso de los organismos expuestos y mostrando efectos adversos tardíos (García et al., 1995).

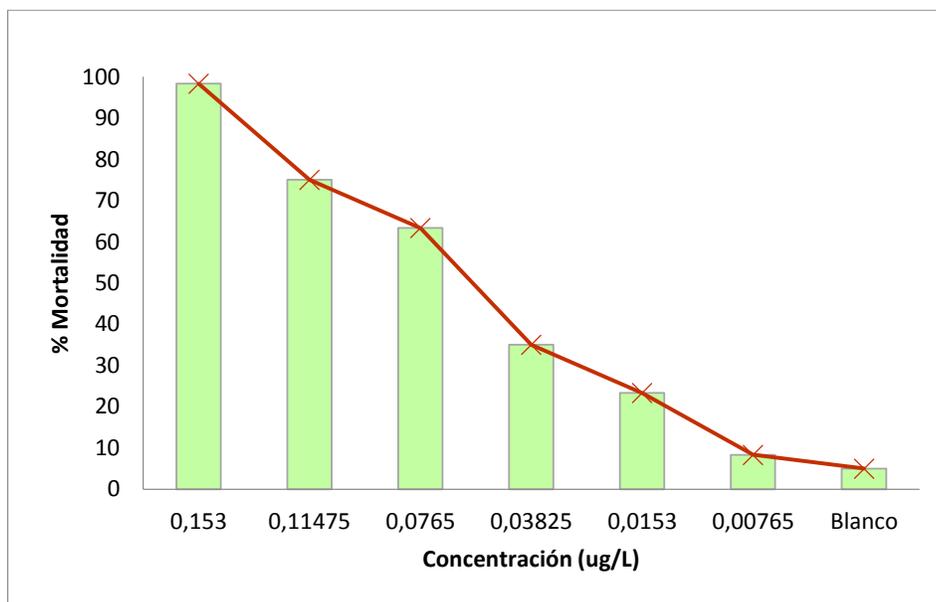
No existen reportes de ensayos de inhibición de la eclosión de quistes de *A. salina* con el insecticida analizado. La concentración letal media de diazinón en estos organismos obtenida en esta investigación corresponde a 29,5 mg/L, concentración a la cual la mitad de los quistes expuestos no logran eclosionar. Esto indica que el pesticida probablemente ingresa por la membrana cuticular de los quistes impidiendo su desarrollo.

#### 4.2.3. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA SOBRE *D. pulex*

Los resultados del estudio de la toxicidad aguda del diazinón sobre *D. pulex* se exponen en el Anexo 10 donde se muestran las concentraciones evaluadas del insecticida, así como el número de neonatos muertos y el porcentaje de mortalidad por concentración.

La curva dosis–respuesta (Figura 36) evidencia que cuando aumenta la concentración de diazinón también se incrementa el número de organismos muertos.

**FIGURA 36. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE NEONATOS DE *D. pulex* EXPUESTOS A DIAZINÓN**



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

La prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) determinó que los valores de heterogeneidad calculado y tabulado obtenidos fueron 6,868 y 9,488, respectivamente, son paramétricos, por tanto, el uso del software es aceptado. Los resultados de concentraciones letales se exponen en la Tabla 37.

**TABLA 37. VALORES DE CONCENTRACIONES LETALES DEL INSECTICIDA DIAZINÓN PARA *D. pulex***

Punto	Concentración (µg/L)	Intervalos de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC <sub>1</sub>	0,007	0,002	0,014
LC <sub>5</sub>	0,013	0,004	0,022
LC <sub>10</sub>	0,018	0,007	0,028
LC <sub>15</sub>	0,022	0,009	0,033
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>0,053</b>	<b>0,036</b>	<b>0,068</b>
LC <sub>85</sub>	0,128	0,099	0,194
LC <sub>90</sub>	0,158	0,119	0,265
LC <sub>95</sub>	0,216	0,153	0,427
LC <sub>99</sub>	0,387	0,239	1,070

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de diazinón sobre *D. pulex* a 24 h de exposición corresponde a 0,053 µg/L con intervalos de confianza al 95% de 0,036 y 0,068 µg/L.

Estudios de toxicidad de diazinón con pureza del 99% realizados por Aronzon et al. (2014) sobre larvas de *Rhinella arenarum* reportan una CL<sub>50</sub> a las 24 h de 11.2 mg/L. Asimismo, una investigación realizada por Velki et al. (2017) donde emplearon diazinón con pureza del 99% de la marca Sigma-Aldrich sobre larvas de pez cebra mostraron una toxicidad mayor con una CL<sub>50</sub> a las 96 h de 6.72 ± 0.16 mg/L. Adicionalmente, en una investigación realizada por Riva et al. (1998) del formulado comercial diazinón de DRAGON sobre las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus subspicatus* arrojaron una CL<sub>50</sub> a las 72 h de exposición y límites de confianza al 95% de 17,30 (5,32-11,98) mg/L y 41,71(30,28-53,14) mg/L, respectivamente. Por otro lado, investigaciones realizadas por Sánchez (2006) sobre el bioindicador *D. magna* dieron como resultado una CL<sub>50</sub> a las 24 h de 0,86 mg/L al aplicar diazinón técnico de 96,1% pureza.

Al realizar un análisis comparativo entre los resultados de  $CL_{50}$  obtenidos y los datos bibliográficos de investigaciones anteriores se puede establecer una mayor toxicidad del compuesto comercial Confiable en relación con compuestos donde se analizó el ingrediente activo con mayor concentración de pureza, es así que se puede evidenciar la influencia de coadyuvantes empleados en este plaguicida. Es necesario recalcar que en la hoja de seguridad del compuesto en estudio se establece que esta sustancia resulta muy tóxica para organismos acuáticos y que puede provocar efectos adversos duraderos en el ambiente acuático. (AFECOR, 2017).

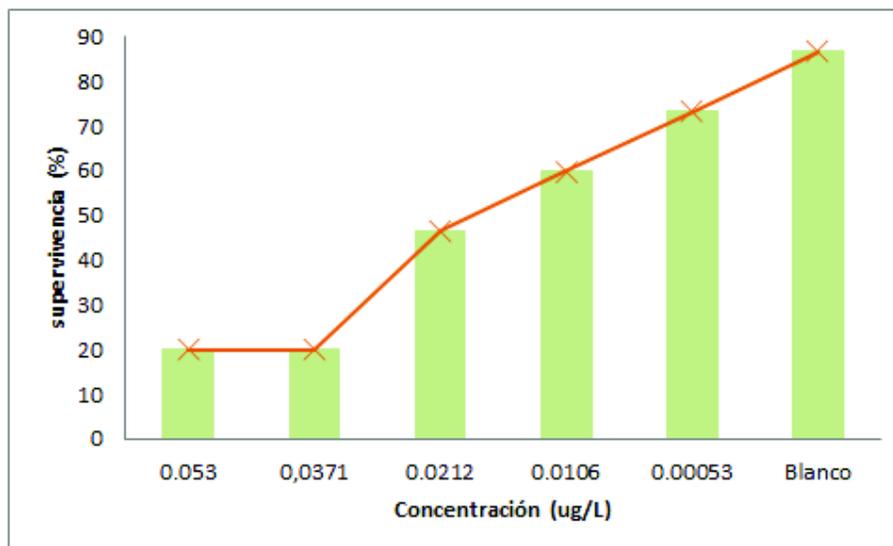
#### **4.2.4. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE *D. pulex***

En los Anexos 11 y 12 se observan los datos obtenidos de los ensayos toxicológicos subletales referentes a supervivencia y reproducción realizados a los 21 días para cada una de las concentraciones ensayadas. Asimismo, se analizó estadísticamente la supervivencia, longevidad y parámetros reproductivos de los individuos, lo cual se encuentra reflejado en el Anexo 13.

##### **4.2.4.1. Supervivencia**

Los datos relacionados a longevidad evaluaron la supervivencia de 3 individuos colocados en cada envase a las diferentes concentraciones establecidas para el caso del diazinón.

A las concentraciones mayores de 0,053 y 0,0371  $\mu\text{g/L}$  a los 15 y 21 días, respectivamente la sobrevivencia de los 3 organismos fue del 20%, mientras que a dosis menores el porcentaje aumentó considerablemente hasta el control cuyo valor es 86,7%. Por otro lado, desde la concentración de 0,0371  $\mu\text{g/L}$  los organismos sobrevivieron a la exposición durante los 21 días incrementando la supervivencia en las concentraciones más bajas. Estos valores se reflejan en el Anexo 13 y en la Figura 37 se muestran los porcentajes de supervivencia para cada concentración ensayada.

**FIGURA 37. SUPERVIVENCIA DE *D. pulex* A LOS 21 DÍAS DE EXPOSICIÓN**

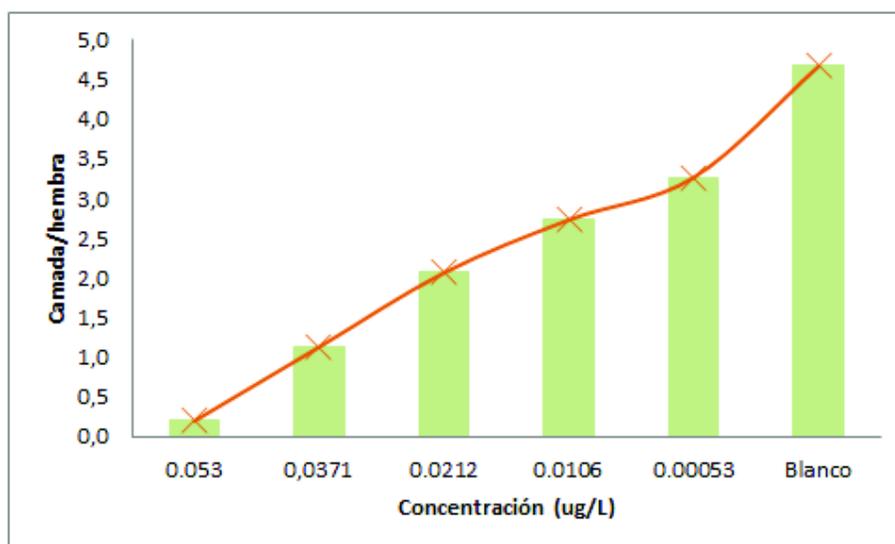
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.2.4.2. Camadas por hembra

Los datos obtenidos para el análisis de camadas por hembra significan el número de partos logrados por cada organismo *Daphnia* expuesto durante los 21 días. Dichos valores se obtuvieron al observar el útero de cada individuo, sea de forma directa o con ayuda del estereoscopio. Los resultados de esta variable para el caso del insecticida diazinón se reflejan en la Figura 38 y en el Anexo 14.

El número de camadas por hembra disminuye significativamente de la concentración más alta hasta la más baja, llegando a un valor de 0,2 en la concentración de 0.053  $\mu\text{g/L}$ . Estos valores fueron reportados en el Anexo 13.

El análisis de varianza (Anova), en el cual se utilizó el test de homogeneidad de Levene y el test de normalidad de Shapiro-Wilks especificó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre el blanco y las concentraciones evaluadas, debido a que valor de F calculado resultó mayor que el valor de F crítico, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre los valores registrados como se observa en la Tabla 38.

**FIGURA 38. CAMADAS POR ORGANISMO DE *D. pulex***

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

**TABLA 38. ANOVA PARA CAMADAS POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
<b>Entre grupos</b>	5	63,106	12,621	29,171	2,62
<b>Intra grupos</b>	24	10,384	0,433		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El test de Dunnetts reveló diferencias representativas ( $p < 0,05$ ) entre el blanco y las concentraciones correspondientes a 0,00053  $\mu\text{g/L}$ , 0,0106  $\mu\text{g/L}$ , 0,0212  $\mu\text{g/L}$ , 0,0371  $\mu\text{g/L}$  y 0,053  $\mu\text{g/L}$ . El LOEC referente a la disminución del número de camadas por hembra correspondió a la concentración de 0,00053  $\mu\text{g/L}$  y el NOEC a una concentración menor a 0,00053  $\mu\text{g/L}$ , que no se ha considerado en el actual estudio, como se muestra en la Tabla 39.

**TABLA 39. TEST DE DUNNETS PARA CAMADAS POR HEMBRA**

Concentración (µg/L)	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	4,66	4,66		
0,00053	3,26	3,26	3,365	*
0,0106	2,74	2,74	4,615	*
0,021	2,06	2,06	6,250	*
0,0371	1,20	1,20	8,509	*
0,053	0,18	0,18	10,769	*

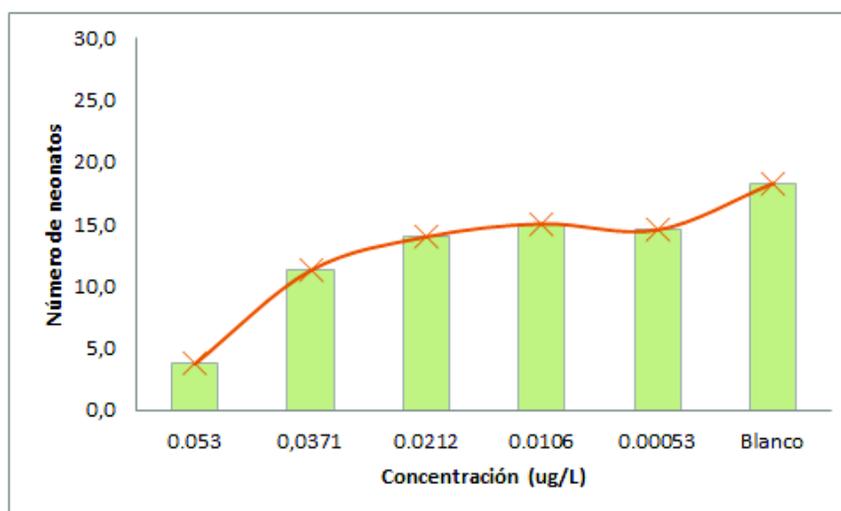
Dunnet tabulado= 2,36 (p=0,05 / df= 24,5)

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.2.4.3. Tamaño de camadas

Este parámetro se obtuvo al relacionar el número total de neonatos de cada recipiente para el número de camadas de ese día como se expone en la Figura 39

**FIGURA 39. TAMAÑO DE CAMADA POR *D. pulex***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El número de neonatos por camada representativamente para el insecticida diazinón a partir de la concentración de 0,0212 µg/L donde el tamaño de camada disminuye 1,3 veces respecto al blanco mientras que a la concentración de 0,053 µg/L disminuye 4,8 veces. Estos valores se encuentran reportados en el Anexo 6.

Al igual que en el parámetro anterior el análisis de varianza Anova a través del test de homogeneidad de Levene y el test de normalidad de Shapiro- Wilks evidenció la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre el blanco y las concentraciones evaluadas. El valor de F calculado resultó mayor que el valor de F crítico, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, como se observa en la Tabla 40.

**TABLA 40. ANOVA PARA TAMAÑO DE CAMADAS POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
<b>Entre grupos</b>	5	711,467	142,7293	28,459	2,62
<b>Intra grupos</b>	24	120,000	5,000		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El test de Dunnett manifestó que las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) que se encuentran entre el blanco y las concentraciones varían desde  $0,00053 \mu\text{g/L}$  y todas las superiores a la misma (Tabla 41). El LOEC referente a la disminución del tamaño de camadas por hembra corresponde a  $0,00053 \mu\text{g/L}$  mientras que el NOEC corresponde a una concentración menor de  $0,00053 \mu\text{g/L}$ , la cual no ha sido considerada en el actual estudio.

**TABLA 41. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS**

Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	18,60	18,60		
0,00053	14,80	14,80	2,687	*
0,0106	15,20	15,20	2,404	*
0,021	14,00	14,00	3,253	*
0,0371	11,60	11,60	4,950	*
0,053	3,00	3,00	11,031	*

Dunnet tabulado= 2,36 ( $p=0,05 / df= 24,5$ )

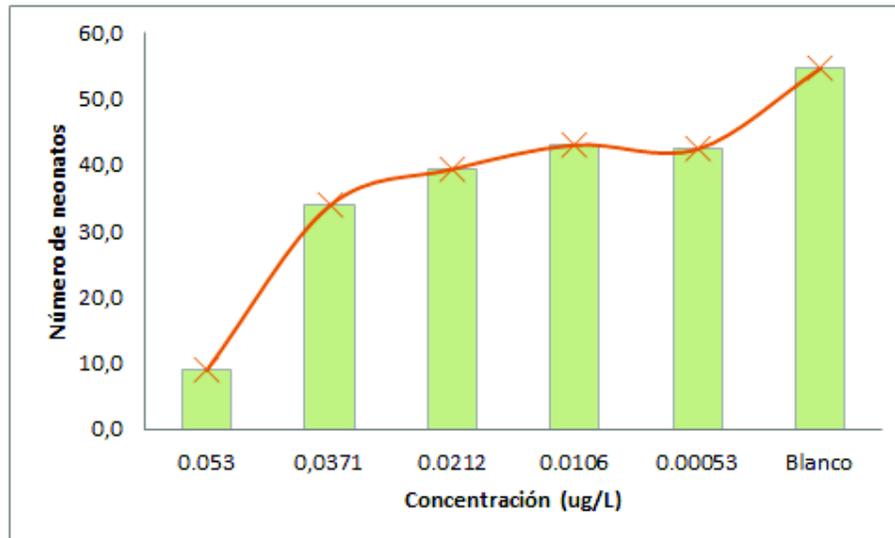
ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.2.4.4. Neonatos totales por hembra

Este parámetro se consigue al dividir los neonatos totales para el número de camadas por hembra como se detalla en el Anexo 13 y en la Figura 40.

Según los datos obtenidos correspondiente a este parámetro se evidencia que a medida que se incrementa la dosis de diazinón, el número de neonatos disminuye. Es así que, mientras en el blanco el nacimiento de neonatos por hembra a los 21 días fue de 54,6 en la concentración más alta del insecticida (0,053  $\mu\text{g/L}$ ) la reproducción se reduce a 9; es decir disminuye 6 veces.

**FIGURA 40. NEONATOS TOTALES POR *D. pulex***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El análisis de varianza (Anova) evidenció que existen diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los valores registrados, dado que el valor de F calculado es mayor al valor de F crítico, por tanto, se rechaza la hipótesis nula como se observa en la Tabla 42.

**TABLA 42. ANOVA PARA NEONATOS TOTALES POR HEMBRA**

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	F Crítico
<b>Entre grupos</b>	5	5876,207	1175,241	25,593	2,62
<b>Intra grupos</b>	24	6978,299	45,920		

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

El test de Dunnett mostró que las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) que se encuentran entre el blanco y las concentraciones varían desde  $0,00053 \mu\text{g/L}$  y todas las superiores a la misma (Tabla 43). En consecuencia, el LOEC para este parámetro es  $0,00053 \mu\text{g/L}$  mientras que el NOEC corresponde a una concentración menor de  $0,00053 \mu\text{g/L}$  no considerada en el actual estudio.

**TABLA 43. TEST DE DUNNETS PARA TAMAÑO DE CAMADAS**

Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Valor transformado	Valor calculado	T-stat	Significancia
Blanco	54,60	54,60		
0,00053	42,46	42,46	2,833	*
0,0106	43,16	43,16	2,669	*
0,021	39,32	39,32	3,565	*
0,0371	34,10	34,10	4,783	*
0,053	9,00	9,00	10,640	*

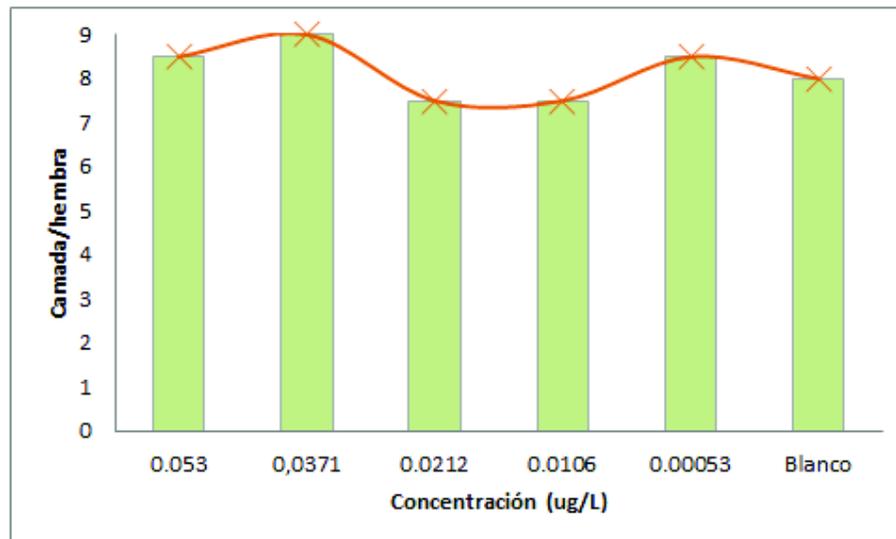
Dunnett tabulado= 2,43 ( $p=0,05 / df= 24,6$ )

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.2.4.5. Primera camada

Representa el tiempo medio en el cual se obtuvo la primera camada en cada una de las concentraciones analizadas (Figura 41).

**FIGURA 41. PRIMERA CAMADA DE *D. pulex***



ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

Los datos obtenidos para este parámetro lograron establecer que a una mayor concentración de diazinón aumenta el tiempo de nacimiento de la primera camada, es así que mientras en el control tardó 8 días, las concentraciones analizadas para este insecticida aumentaron de entre 8,5 a 9 días. Siendo 0,0371  $\mu\text{g/L}$  la concentración que más retrasó el nacimiento de neonatos.

Análisis subletales realizados por Sánchez (2006), sobre *D. magna* evaluando la sustancia diazinón evidenciaron una disminución del número medio de neonatos por hembra, con un NOEC de 0,05  $\text{ng/L}$  y LOEC de 0,1  $\text{ng/L}$ . Al realizar una comparación de los datos obtenidos para el presente trabajo investigativo se evidencia que el plaguicida Confiable es menos tóxico en ese parámetro reproductivo a comparación de diazinón evaluado en el estudio.

### 4.3. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD OBTENIDOS ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN

#### 4.3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE *A. salina*

Se puede observar en la Tabla 44 que la toxicidad aguda resultó 33 veces mayor para el insecticida diazinón en comparación del herbicida atrazina sobre *A. salina*. Probablemente la salinidad es un factor determinante en reducir la toxicidad. Atrazina al disolverse en un medio salino se dispersa y se acumula, provocando que el herbicida se vuelva más persistente; un incremento de salinidad impide la mineralización de este plaguicida, lo que lo hace menos disponible para microorganismos y a su vez produce su aglomeración en el medio. Mientras que el diazinón en su forma comercial se disuelve fácilmente y con una dosis menor logra fácilmente afectar a los organismos en análisis.

**TABLA 44. COMPARACIÓN DE CL<sub>50</sub> ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN PARA *A. salina***

Organismo	Plaguicida	Ingrediente activo	CL <sub>50</sub> (48 h) (mg/L)
<i>A. salina</i>	Gesaprim	Atrazina	971,00
	Confiable	Diazinón	29,534

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.3.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE *D. pulex*

Al realizar un análisis comparativo entre los resultados de CL<sub>50</sub> obtenidos para *D. pulex* y los plaguicidas en análisis se puede establecer una mayor toxicidad del compuesto comercial Confiable, como se muestra en la Tabla 45. La toxicidad de diazinón es 226 veces mayor que el herbicida atrazina, es así que se puede

evidenciar la influencia de coadyuvantes empleados en este plaguicida, los cuales permiten una mejor distribución de la sustancia al mezclarse con el agua, aumentando su toxicidad.

Es importante recalcar que los plaguicidas organofosforados, poseen menor persistencia que los pesticidas organoclorados, debido a que los procesos de transformación en el ambiente se ejecutan con mayor eficiencia sobre los enlaces fósforo-éster en sus moléculas (Narváez et al., 2012). La transformación parcial puede generar mayor toxicidad en los subproductos que en el compuesto parental (Vittozzi et al., 2001), razón por la cual el diazinón resulta altamente tóxico a diferencia de la atrazina para este caso.

**TABLA 45. COMPARACIÓN DE CL<sub>50</sub> ENTRE ATRAZINA Y DIAZINÓN PARA *D. pulex***

Organismo	Plaguicida	Ingrediente activo	CL <sub>50</sub> (24 h) (mg/L)
<i>D. pulex</i>	Gesaprim	Atrazina	12,011
	Confiable	Diazinón	0,000053

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### **4.3.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE QUISTES DE *A. salina* AL APLICAR ATRAZINA Y DIAZINÓN**

Se puede observar en la Tabla 46 que a partir de la menor concentración a la que se expuso los quistes de *A. salina* aumento el porcentaje de inhibición de eclosión de los quistes en referencia con el blanco. Adicionalmente, se puede determinar que el insecticida diazinón genera una mayor respuesta toxicológica debido que a una menor dosis (concentración) se produce totalidad de inhibición de eclosión a comparación del herbicida atrazina con la mayor concentración empleada para cada plaguicida.

**TABLA 46. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE QUISTES DE *A. salina* EXPUESTOS A ATRAZINA Y DIAZINÓN**

Organismo	Plaguicida	Ingrediente activo	Concentración (mg/L)		% de Inhibición de eclosión	
			Mayor	Menor	Mayor	Menor
Quistes de <i>A. salina</i>	Gesaprim	Atrazina	1800,00	450,00	98,67	51,33
	Confiable	Diazinón	102,00	15,30	99,33	45,00

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

#### 4.3.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD SUB-LETAL DE ATRAZINA Y DIAZINÓN SOBRE *D. pulex*

Al realizar un análisis comparativo (Tabla 47) entre los resultados de toxicidad subletal (LOEC Y NOEC) de los plaguicidas evaluados para *D. pulex* se puede establecer que los resultados no fueron concluyentes para el insecticida diazinón, debido a que no se logró establecer un valor de NOEC. Sin embargo, a partir de la concentración de 0,00053 µg/L ya se evidencian efectos adversos sobre el organismo en estudio. Mientras que para el herbicida atrazina se detectaron afectaciones de supervivencia y reproductivas, es decir, disminución de fertilidad, tamaño de la camada, reducción de nacimiento de neonatos y aumento del tiempo de nacimiento de la primera camada en las concentraciones iguales o mayores 0,75 y a 0,375 mg/L no se observa ningún efecto.

**TABLA 47. COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD SUBLETAL SOBRE *D. pulex* EXPUESTOS DE ATRAZINA Y DIAZINÓN**

Organismo	Plaguicida	Ingrediente activo	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
<i>D. pulex</i>	Gesaprim	Atrazina	0,75	0,375
	Confiable	Diazinón	0,00000053	<0,00000053

ELABORADO POR: Miño y Rodríguez

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Las evaluaciones de toxicidad aguda del herbicida atrazina sobre *D. pulex* y *A. salina* evidenciaron que *D. pulex* es el organismo más sensible a este agroquímico. La concentración letal media en *A. salina* ( $CL_{50}= 0,971 \text{ g/L}$ ) es 80, 8 veces mayor que la concentración letal media en *D. pulex* ( $CL_{50}= 12,011\text{mg/L}$ ). Atrazina es un potencial contaminante en medios de agua dulce, reflejando que la salinidad es un factor determinante en la toxicidad de organismos.
- Los ensayos de toxicidad aguda del insecticida organofosforado diazinón muestran efectos adversos directos en los organismos evaluados. Sin embargo, *D. pulex* es el organismo más sensible al ser expuesto a este insecticida con una concentración letal media correspondiente a  $CL_{50}=0,053\mu\text{g/L}$ . *A. salina* por su parte reveló una  $CL_{50}= 29,534 \text{ mg/L}$  al ser expuesto al insecticida.
- Los análisis del porcentaje de inhibición de la eclosión de organismos de *A. salina* expuestos a atrazina y diazinón reflejan que el diazinón es el agroquímico que más afecta a la eclosión de los quistes. Con tan solo 102 mg/L del insecticida aproximadamente el 100% de los quistes no eclosionan, frente a 1,8 g/L de atrazina que inhibe la eclosión en el mismo porcentaje.
- Los resultados de la evaluación de toxicidad subletal a los 21 días para *D. pulex* determinaron efectos adversos en supervivencia y reproducción para atrazina desde la concentración de 0,75 mg/L, mientras que para el insecticida diazinón se puede observar afectaciones en los mismos parámetros a partir de la

concentración 0,53 ng/L. Por consiguiente, el diazinón es el agroquímico más tóxico.

- El Anexo 1 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) presenta el límite máximo permisible para plaguicidas organofosforados y organoclorados totales para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario, este límite corresponde a 10 µg/L para diazinón y atrazina. Sin embargo, de acuerdo a esta investigación se pueden observar efectos adversos en la reproducción de *D. pulex* a concentraciones menores a 0,53 ng/L para diazinón y 0,75 mg/L para atrazina, razón por la cual es necesario replantear la norma y establecer valores que se ajusten a un medio real donde se considere la influencia de factores ambientales, así como la interacción de una especie con otra.
- La presencia de salinidad en el medio ayuda a que los organismos expuestos resistan mayores concentraciones del contaminante, razón por la cual la duración de los ensayos de toxicidad aguda sobre *A. salina* fue de 48 h a diferencia *D. pulex* cuyo desarrollo en agua dulce y alta sensibilidad impiden una exposición mayor a 24 h.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- *Daphnia pulex* es un organismo muy sensible a contaminantes y parámetros ambientales como temperatura y presión, por lo tanto, se recomienda investigar otro bioindicador de agua dulce más resistente como organismos del género *Cyclops*, perteneciente a la clase *Maxillopoda*, género *Gammarus* o emplear organismos pertenecientes al mismo orden de las pulgas de agua (cladóceras) pero diferente género como las *Alonas*, que resultan más resistentes.
- Dado que el herbicida atrazina es un potencial contaminante al llegar a medios de agua dulce y que el aumento de salinidad en el medio impide la

mineralización de este herbicida, provocando la aglomeración del mismo, se recomienda el uso de Gesaprim en áreas donde la salinidad del agua sea mayor.

- Realizar investigaciones de toxicidad subletal sobre un organismo salino, en el cual la reproducción sea por partenogénesis como *Brachionus plicatilis* un rotífero de la familia Brachionidae del orden Ploimida con amplio espectro de salinidad.
- Debido a la alta capacidad tóxica del plaguicida Confiable, y a la influencia de coadyuvantes empleados en la formulación comercial se recomienda evitar el contacto del producto con ambientes acuáticos y en caso de fumigaciones se debe utilizar un sistema que garantice que el producto será absorbido solamente por las raíces y hojas de las malezas y que no llegará a un medio acuoso.
- Emplear el medio de Cultivo D descrito en esta investigación para el cultivo de *D. pulex*, debido que sus características físico-químicas permitieron el óptimo desarrollo de este organismo, facilitando su reproducción hasta la tercera generación y su permanencia durante los ensayos de toxicidad.
- Para disminuir el porcentaje de inhibición de eclosión de quistes en *A. salina* es preferible adquirirlos de un proveedor certificado que garantice el buen estado de los quistes para su posterior eclosión.
- La concentración de atrazina y diazinón en el agua depende de varios factores como las propiedades químicas del compuesto, la degradación, retención en los suelos, periodo de aplicación en campos, y las condiciones climáticas. Además, una vez en el medio, influyen también factores biológicos y ambientales propios de las comunidades. El uso de estos agroquímicos puede no producir eutrofización en el agua según los resultados obtenidos, pero afectan a organismos filtradores como las *Daphnias*. Se sugiere continuar con

el análisis de la sensibilidad frente a la atrazina de otros organismos como macrófitos, bentos, zooplancton y peces.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, G., & Masini, J. (2005). Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 (5), 936–943. Obtenido de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532005000600008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532005000600008)
- Adama. (2015). Hoja de datos de seguridad atranex® 90 wg. Recuperado de <https://www.adama.com/documents/369693/0/HDS+ATRANEX+90+2016+.pdf>
- AFECOR. (2017). Ficha técnica insecticida CONFIABLE. Recuperado de <https://www.afecor.com/wp-content/uploads/2018/02/CONFIABLE-DIAZINON.pdf>
- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – Agrocalidad. (2017). *Reporte de insumos agrícolas*. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/plaguicidas-registrados-19-05-2017.pdf>
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2006). *Resumen de salud pública. Diazinón*. Obtenido de <http://www.davidborowski.com/work/ATSDR%20ToxFAQs%20and%20PHS%202007/Data/Spanish/PHS%20for%20DIAZINON.pdf>
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2003). *Reseña Toxicológica de la Atrazina*. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2015). *Reseña Toxicológica del Diazinón*. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. Obtenido de [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs153.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs153.html)

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (2009). *Introducción a la toxicología*. Association of Occupational and Environmental Clinics. Obtenido de [https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology\\_curriculum/modules/1/es\\_lecturenotes.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/1/es_lecturenotes.html)
- Agrocalidad. (2015). *Informe Anual de licencias de importación de plaguicidas*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Ecuador.
- Agrocalidad. (2016). *Plaguicidas y productos afines registrados en Agrocalidad*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Ecuador.
- Alarcón, J., & Ardila, L. (2008). *Determinación de la concentración letal media (Cl50-48) de Daphnia pulex por medio de bioensayos de toxicidad acuática con aluminio y plata*. Universidad de la Salle. Colombia.
- Aliberti, M., Allan, E., Allar, S., Bauer, D., Carlson, B. & Travers, B. (2013). *An Image-Based Key to the Zooplankton Of North America*. Center for Freshwater Biology. Department of Biological Sciences. University of New Hampshire, Durham, USA. Obtenido de <http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/index.html>
- Anasac. (2017). Atrazina 90W. Obtenido de [http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/ATRAZINA-90-WG\\_HDS.pdf](http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/ATRAZINA-90-WG_HDS.pdf)
- Aronzon, C., Marino, D., Ronco, J., & Pérez, C. (2014). Differential toxicity and uptake of Diazinon on embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 100, 50-56. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514000150>
- Aveiga, A. (2012). Aplicación de un protocolo de manejo de Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas. Área de Emergencias del Hospital del Niño “Francisco Icaza Bustamante”. Universidad de Guayaquil, Ecuador.

- Badii, M. & Varela, S. (2008). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. *Culcyt*, 5(28), 5-17. Obtenido de <http://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/375/355>
- Banco Central del Ecuador [BCE]- (2016). Producto Interno Bruto por Actividad. Boletín Anuario N° 39. Obtenido de <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/327-ver-bolet%C3%ADn-anuario-por-a%C3%B1os>
- Basfar, A., Mohamed, K., Al-Abduly, A., Al-Kuraiji, T., & Al-Shahrani, A. (2007). Degradación de aguas contaminadas con Diazinón por radiación ionizante *Radiat. Phys. Chem.*, 76, 1474-1479.
- Bondarenko, S., Gan J., Haver D.L., Kabashima J.N. (2004). Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. *Environ Toxicol Chem*, 23(11):2649–54. doi:10.1897/03-436 PMID:15559280
- Bravo, N. (2017). *Estudio de la degradación Electroquímica de la Atrazina mediante el proceso electro fenton/BBD en un reactor tipo filtro prensa*. Escuela Politécnica Nacional, Ecuador. Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17454/1/CD-7953.pdf>
- Bustos, E. & Vargas, A. (2010). Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biological Research*, 43(3), 357-362. Obtenido de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071697602010000300013&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071697602010000300013&script=sci_arttext)
- Camacho, M., & Sánchez, S. (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *A. franciscana*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3 (1), 90-97.

- Candela, R. (2016). *Comportamiento de Atrazina y su relación con la práctica de fertilización nitrogenada en un suelo de la pedanía cañas, departamento colón, provincia de córdoba*. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Camean, A., & Repetto, M. (2012). Toxicología alimentaria. Edición Díaz de Santo. (112). Disponible en: <https://bit.ly/2y5EnWb>
- Castillo, G. (Ed). (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. México.
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. *Ciencias*, 1(91), 21-29.
- Cervantes, W. (2014). *Caracterización molecular y evaluación de la capacidad degradativa de la Atrazina por bacterias aisladas de suelos*. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Perú.
- Chaiña, A. (2015). Crecimiento y sobrevivencia de alevinos de *Odontesthes bonarienses* (pejerrey) alimentados con *Daphnia Pulex* y nauplios de *Artemia salina* en condiciones controladas. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
- Chávez, R. (2014). *El lunes inicia el segundo cultivo anual de maíz*. El telégrafo, págs. 9-11. Obtenido de <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/el-lunes-inicia-el-segundo-cultivo-anual-de-maiz>
- Correa, J. & Murici, J. (2012). Considerações sobre biología e utilização de *A. sp.* (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). *Revista electrónica de Veterinaria*. Obtenido de [http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121211/12\\_1104.pdf](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121211/12_1104.pdf)
- Díaz, S. (2004). *Toxicidad embrionaria en ratones pretratados con el pesticida organofosforado "Diazinón"*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.

- Ebert, D. (2005). Ecología, Epidemiología y Evolución del Parasitismo en *Daphnia*. Centro Nacional de Información Biotecnológica, USA. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>
- Environmental Protection Agency [EPA]. (2006). *Fact Sheet Final Recommended Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Diazinon*. National Service Center for Environmental Publications (NSCEP). Obtenido de <https://www.epa.gov/wqs-tech/learn-more-topic-example-aquatic-life-criteria-diazinon>
- Espíndola, C. (2004). *Prácticas de biología de organismos multicelulares*. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de <https://bit.ly/2sgk0Du>
- Esteve, M. & ElMasri, R. (2007). Sobrevivencia, producción y calidad de quistes de *Artemia* (cepa Araya), EDO, Sucre, Venezuela, Bajo combinaciones de tres dietas y tres salinidades. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 19(1), 3-13. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/4277/427739431002.pdf>
- Fenlon, K. A., Andreou K., Jones K.C., & Semple K.T. (2011). The formation of bound residues of diazinon in four UK soils: implications for risk assessment. *Environ Pollut*, 159(3):776–81. doi:10.1016/j.envpol.2010.11.039 PMID: 21183261
- Fernández, F. (2017). *Artemia*, información del género y la especie *Artemia franciscana*. *Revista Digital Animales, Mascotas, Naturaleza y Turismo*, 4(1), 23-27. Obtenido <https://invertebrados.paradaissphynx.com/artropodos/Agenerofranciscana.htm>
- Galíndez, S. (2010). Biodegradación simultánea de los herbicidas Atrazina y Simazina por un cultivo bacteriano binario en un reactor de biopelícula. Instituto Politécnico Nacional. México
- Garcés, R. (2013). *Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando D. magna (crustácea: cladócer) en el agua de*

*vertiente utilizada en el sector de huachi la libertad.* Universidad Técnica de Ambato. Ecuador

García, C. & Sigler, Y. (2010). *Programa Maestro del Comité Sistema Producto Camarón del estado de Colima.* Universidad de Colima, México.

García, R., Martínez, D., & Reppeto, M. (1995). Coefficient of distribution of some organophosphorus pesticides in rat tissue. *Vet Hum Toxicol*; 37, 226.

Gava, M. & Lourenço, R. (2007). *Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando Artemia salina.* Pontifícia Universidad Católica do Rio de Janeiro, Brasil.

Golla, V., Nelms J., Taylor R. & Mishra S. (2011). Pesticide concentrations in drinking water from farm homes: biodegradación de atrazina pura y comercial 71 Variation between community water supply and wellwater. *J. Environ. Sci. Eng.* 5, 955-961.

Gómez, L. (2015). *Un poco de historia sobre el Diazinón.* El Desinsectador, control de plagas en el área de Barcelona. Obtenido de <https://desinsectador.com/2015/05/27/un-poco-de-historia-sobre-el-diazinon/>

Gómez, J., Peña, B., Guzmán, J. & Gallardo, V. (2013). Composición, abundancia del zooplancton y calidad de agua en un microreservorio en el estado de Morelos. *Revista Hidrobiológica*, 23 (2), 227-240.

González, L. & Hansen, A. (2009). Adsorción y mineralización de Atrazina y relación con parámetros de suelos del DR 063 Guasave, Sinaloa. (26) 3.

Hang, S. & Nassetta, M. (2003). Evolución de la degradación de Atrazina en dos perfiles de suelo de la provincia de Córdoba. *RIA* 32 (1): 57-69.

Hang, S., Andriulo, A., Sasal, C., Nassetta, M., Portela, S., & Cañas, A. (2010). Integral study of atrazine behavior in field lysimeters in argentinean humid pampas soils. *Chilean Journal of Agriculture research.*

- Hansen, A., Treviño, Luis., Márquez, Henri., Villada, M., González, L., Guillén, R., & Hernández, A. (2013). Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958004>
- Hayes, T., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, A., Park, A., & Brown, T. (2011). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10): 4612–4617. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842049/>
- Helling, C.S. (2005). The science of soil residual herbicides. p. 3-22. In: Van Acker, R.C. (ed). Soil residual herbicides: science and management. Topics in Canadian weed science. V. 3. Quebec (CA): Canadian Weed Science Society.
- Henao, B., Palacio, A. & Camargo, M. (2005). Evaluación genotóxica de los plaguicidas cipermetrina y Diazinón en Tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Actual Biol*, 27 (82), 43-55. Obtenido de <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2005v27n82art5.pdf>
- Hernández, A. & Hansen, A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 115-127. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018849992011000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992011000200003)
- Hernández, A., Martínez, A., Hernández, F., Conde, L., & Guarnido, O. (2011). *Toxicología Básica*. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría. Universidad de Granada, España. Obtenido de <https://www.ugr.es/~ajerez/proyecto/t2-8.htm>

- Hill, I., Heimbach, F., Leeuwangh, P., & Mathiessen, P. (1994). Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals. Disponible en <http://bit.do/eAJE8>
- Huaraca, L. (2017). *Evaluación ecotoxicológica de aguas contaminadas con glifosato a partir de los Bioindicadores Daphnia magna y Artemia salina*. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador.
- Huertas, C., & Arrieta, L. (2015). Revisión taxonómica de los subgéneros HyaloD. y D. (género D.), mediante el uso de marcadores moleculares y Código de Barras (COI). *Revista Ciencia en Desarrollo*, 6 (1), 77-86.
- Huovinen, P., & Gómez, I. (2017). Algas en ecotoxicología: Hacia el desarrollo de microbioensayos. *Rev-VD27-IDEAL*. (1) 42-44.
- Ibarra, R. (2006). *Efectos de los herbicidas Atrazina y fenoxaprop-etil en la fertilización in vitro de ovocitos porcinos*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censos [INEC]. (2016). Información Ambiental en la Agricultura 2016(1). Recuperado de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Encuestas\\_Ambientales/Informacion\\_ambiental\\_en\\_la\\_agricultura/2016/PRESENTACION\\_AGRO\\_AMBIENTE\\_2016.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf)
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (1996). *Plaguicidas. Clasificación Toxicológica*. Disponible en <https://bit.ly/2OuCNYP>
- Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo [INSSBT]. (2011). *Valores límite ambientales, Diazinón*. Ministerio de trabajo, migraciones y Seguridad Social, Gobierno de España. Obtenido de <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.cfcbb9e77253bfa0f42feb10060961ca/?vgnnextoid=1d19bf04b6a03110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD&do=Search&x=0&text=diazinon&y=0>

International Agency for Research on Cancer [IARC]. (2015). Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. World Health Organization. Obtenido de [https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-09.pdf#4c9b-b8a16ff6ab7a5a51&acdnat=1522541875\\_464591303ab78e0a857e849721060622](https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-09.pdf#4c9b-b8a16ff6ab7a5a51&acdnat=1522541875_464591303ab78e0a857e849721060622)

International Organization for Standardization [ISO]. Determination of the inhibition of mobility of *D. sp* (Cladocera, Crustacea) ISO: 6341. (1996). Water quality, acute toxicity test, Swedish, 12pp.

Jaramillo, B., Martelo, I., & Duarte, E. (2013). Toxicidad aguda de pesticidas Organofosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad (QSAR). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria*, 11(2), 76-84. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n2/v11n2a09.pdf>

Jiménez, N., & González, L. (2009). *Evaluación del tratamiento realizado al vertimiento de la industria galvanica "nicrozinc Ltda", teniendo como referencia la concentración letal media (CI50-48) de cianuro y cadmio sobre Daphnia pulex*. Universidad de la Salle. Colombia

Kuolombus, V., Hiskia, A. & Nikolic, D. (2003). Identification of Photocatalytic Degradation Products of Diazinon in TiO<sub>2</sub> Aqueous Suspensions Using GC/MS/MS and LC/MS with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. American Society for Mass Spectrometry. Obtenido de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1016/S1044-0305%2803%2900333-7.pdf>

Lavens, P., Sorgeloos, P., Lè,P., Tackaert,W., & Versichele, D. (1986). *Producción de nauplios de A. y quistes descapsulados para usarlos como alimento en centros de puesta de peces y crustáceos*. Obtenido de [http://www.fao.org/3/contents/ffb7b54e-65ee-5d8f-bfdb85022dbed29a/AB474S\\_00.htm](http://www.fao.org/3/contents/ffb7b54e-65ee-5d8f-bfdb85022dbed29a/AB474S_00.htm)

- Lomas, G., Sala, J., García, C. & Alonso, M. (2015). *Orden Anostraca. Revista IDE@-SEA*. Obtenido de [http://sea-entomologia.org/IDE@/revista\\_67.pdf](http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_67.pdf)
- Máchová, J., Prokeš, M., Svobodová, Z., Žlábek, V., Peňáz, M. & Baruš, V. (2007). Toxicity of Diazinon 60 EC for *Cyprinus carpio* and *Poecilia reticulata*. *Aquacult Int*, 5, 267–276. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-007-9078-1>
- Mahía, J., & Díaz, M. (2007). Atrazine degradation and residues distribution in two acid solids from temperate humid zone. *Journal of Environmental Quality*, 36 (3), 826-831
- Maier, R., & Lantz, R. (2016). *Toxicología ambiental*. Programa de investigación online. Universidad de Arizona, USA. Obtenido de <https://superfund.arizona.edu/content/25-relacion-dosis-respuesta>
- Mansour, M.; Feicht, E.; Behechti, A.; Schramm, K.-W.; Kettrup, A. (1999). Determination Photostability of Selected Agrochemicals in Water and Soil. *Chemosphere* 39, 575–585
- Martínez, I., Quintero, G., Márquez, L., González, L., Álvarez, A. & Zarragoitía, A. (2006). Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt mediante el Método de la *Artemia salina*. *Acta Farm.Bonaerense*, 25 (3), 429-431
- Martínez, T., Tsui, L. & Chu, M. (2013). Aquatic toxicity of Atrazina - based formulations: comparison between different organism and the effects of environmental factors, *Chemosphere*, 52, 1189-1197.
- McMahon, J. (2016). *Daphnia pulex*. EurekaAlert the Global Source for Science News. University of Illinois, USA. Obtenido de <https://www.eurekaalert.org/multimedia/pub/120145.php>
- Mejía, J., Barrera, T., Arredondo, J., Hernández, L., Castro, G., Lara, R., & Dosta, M. (2009). La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia*

- sp. *El Hombre y su Ambiente*, 5-15. Obtenido de <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n73ne/Artemia.pdf>
- Miller, C. 2000. *Daphnia pulex*, Animal Diversity Web. Museum of zoology. Michigan University. Obtenido de [http://animaldiversity.org/accounts/D.\\_pulex/](http://animaldiversity.org/accounts/D._pulex/)
- Mohammad, H., Badii, Z., Cuevas, R., Garza, A., Landeros, J. (2005). Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados. *CULCyT//*, 2(6). 4-20. Obtenido de <http://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/viewFile/593/572>
- Monteros, A., Sumba, E., & Salvador, S. (2015). Productividad agrícola en el Ecuador. Recuperado de [http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios\\_agroeconomicos/indice\\_productividad.pdf](http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/indice_productividad.pdf)
- Morales, N. (2011). ¿Qué es un bioindicador? Aprendiendo a partir del ciclo de indagación guiada con macroinvertebrados bentónicos. Propuesta Metodológica. Universidad Nacional de Colombia.
- Mudhoo, A. & Garg, V. (2010). Sorption, Transport and Transformation of Atrazine in Soils, Minerals and Composts: A Review. *Elsevier B.V. and Science Press*, 21 (1): 11–25.
- Narváez, J., Palacio, A., & Molina, F. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Revista Gestión y Ambiente*, 15 (3), 27-38. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/35839/1/36278-151112-1-PB.pdf>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2015). Compound summary for CID 3017. Diazinon. PubChem Open Chemistry Database. Obtenido de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

- National Institutes of Health [NIH]. (2005). *Diazinon, Compound Summary for CID 3017*. Base de datos: Química abierta. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diazinon#section=Top>
- National Pesticide Information Center [NPIC]. (2011). *Diazinon Technical Fact Sheet*. Health & Environment. Obtenido de <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/diazinontech.html#mod>
- Neli. (2015). *Artemia salina (Parte II)*. Obtenido de <http://www.planetaneli.es/index.php/2015/10/20/A.-salina-parte-ii/>
- Nödler, K., Licha, T., Voutsas, D. (2013). Twenty years later – Atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 70: 112–118. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.02.018.
- Nufarm. (2018). Atrazina 90WG. Hoja técnica. Obtenido de <http://www.nufarm.ec/assets/28136/1/HojatecnicaAtrazina90WG.pdf>
- Núñez, M., & Hurtado, J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de Biología*, 12, 165-170
- Ocampo, L., Botero, M., & Restrepo, L. (2010). Evaluación del crecimiento de un cultivo de *D. magna* alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* y un enriquecimiento con avena soya. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 23 (1). Recuperado de <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324532/20781734>
- Organización de Estudios de Salud Agrícola de Estado Unidos [AHS]. (2017). *Rheumatoid Arthritis*. National Institute of Environmental Health Sciences, USA. Obtenido de <https://aghealth.nih.gov/news/AHS%20Update%202017%20Final.pdf#search=atrazine>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2000). Evaluación de la Contaminación del suelo. *Hojas de datos sobre los plaguicidas*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S09.htm>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2010). Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas. Recuperado de [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Code/Spanish\\_Policy10.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Spanish_Policy10.pdf)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2003). Atrazine in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality G. Health criteria and other supporting information. Obtenido de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/atrazinerev0305.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/atrazinerev0305.pdf)
- Organization for Economic Co-operation and Development [OCDE]. (2000). Section 2. Guideline 202. *D. sp.* acute immobilisation test and reproduction test. Technical report, Guidelines for testing chemicals, Paris, 10pp.
- Orta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, 6 (3), 55-62. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118292006.pdf>
- Osuna, I., López, D., Galindo, J. & Riva, M. (2000). Evaluación toxicológica de Metil paratión, metil azinfós, clorpirifos, diazinon y metamidofos, en camarones del género *Penaeus sp.* *Boletín Intexter (U.P.C)*, 111(1), 65-71.
- Pacheco, J. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) de la toxicidad aguda del extracto de polvillo de carbón frente a las larvas de A. franciscana*. Departamento de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/4320/1/598923.2011.pdf>
- Parada, 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 (verbascosido). Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacéuticas. Obtenido de Universidad de Chile: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/116565/parada\\_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/116565/parada_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Pastorino, X. (2003). *Caracterización morfológica y reproductiva de la población de A. persimilis (crustacea branchiopoda:Anostraca) de la Laguna Colorada Chica*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Peña, C., Carter, D., & Fierro, F. (2001). *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Southwest Hazardous Waste Program A Superfund Basic Research and Training Program. The University of Arizona, USA. Obtenido de <http://www.ingenieroambiental.com/informes2/toxamb.pdf>

Pérez, M. (2008). *Género Daphnia* Centro de Ciencia Visionarium de Santa Maria da Feira, Brasil. Obtenido de <https://projectoD.magna.blogs.sapo.pt/3277.html>

Pérez, O. & Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Protección Vegetal*, 25(1), 124-138. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S101027522010000100008&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S101027522010000100008&script=sci_arttext&lng=pt)

Pesticides Properties Data Base [PPBD]. (2018). *Atrazine*. University of Hertfordshire. Obtenido de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/43.htm>

Pesticides Properties Data Base [PPBD]. (2018). *Diazinon-OMS 469*. University of Hertfordshire. Obtenido de <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports /212.htm>

- Piguave, Z. & Gutiérrez, C. (2010). Eficacia, toxicidad y biodegradabilidad de los dispersantes de petróleo comercializados en el Ecuador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Piña, L., Guzmán, J., Heredia, S., & Quintanilla, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. 202(2), 189-98. DOI: 10.1016/j.taap.2004.06.028
- Piñeros, G., & Quintero, J. (2008). *Determinación de la concentración letal media (Cl50) del glifosato roundup 747 sg ((nh4) c3h7no5p), por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia pulex*. Universidad de la Salle. Colombia.
- Pocar, P., Fischer B., & Gandolfi, F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125, 313-325.
- Poet, T., Kousba, A., Dennison, S., Timchalk, C. (2004). Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for the Organophosphorus Pesticide Diazinon. 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.03.002>
- Prata, F., Lavorenti, A., Vanderborght, J. Burauel, P., & Vereecken, H. (2003). Miscible displacement, sorption and desorption of atrazine in a Brazilian oxisol. *Vadose Zone J.* 2: 728-738
- Ramírez, J., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 2001; 4(2):67-75
- Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en el agua y suelo*. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
- Ramírez, R., Ramos, C. & Martínez, F. (2010). Efectos tóxicos de *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) en los cladóceros *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*. *Revista Hidrobiológica*, 2(3), 47-54. Obtenido de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972010000300002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972010000300002&script=sci_arttext)

Ramos, R., Carvajal, L., Carter, M. & Zúñiga, L. (2004). Patrones de migración vertical de tres poblaciones de zooplancton en un lago chileno. *Revista Chilena de Historia Natural*, 4(77), 29-41.

Repetto, M., & Repetto, G. Toxicología fundamental. Vol 1. 4ª ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. (2009). Obtenido de: [https://kupdf.net/download/toxicologia-a-fundamental-repetto-4a-edici-oacute-n\\_59f497d2e2b6f5ad20cbdb5b\\_pdf#](https://kupdf.net/download/toxicologia-a-fundamental-repetto-4a-edici-oacute-n_59f497d2e2b6f5ad20cbdb5b_pdf#)

Riva, M., López, D. & Fabián, L. (1998). Toxicidad de plaguicidas organofosforados en microalgas acuáticas. *Intexter*, 113, 25-29. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6440/Article03.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Roldán, G. (30 de Marzo de 2004). *La prohibición de dos insecticidas demuestra su efecto perjudicial sobre los bebés. El País*. Obtenido de [https://elpais.com/diario/2004/03/30/salud/1080597603\\_850215.html](https://elpais.com/diario/2004/03/30/salud/1080597603_850215.html)

Ruíz, O. (2008). *Caracterización de diversas poblaciones de Artemia salina desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares*. Universidad de Valencia. España.

Salgado, I. (2011). *La Artemia salina y su cultivo en el Perú*. Universidad Nacional de Piura. Perú.

Sánchez, M. (2006). Alteraciones fisiológicas como consecuencia de la exposición a plaguicidas en sucesivas generaciones de *D. magna*. Doctoral dissertation, Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia, Valencia, España, 17pp.

- Sarabia, R. (2002). *Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia*. Universidad de Valencia, España.
- Sarmah, A., Close, M. & Mason, N. (2009). Dissipation and sorption of six commonly used pesticides in two contrasting soils of New Zealand. *Journal of Environmental Science and Health*, 44 (3), 325-336. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03601230902800960>
- Savitz, D., Arbuckle, T., Kaczor, D., & Curtis, K. (1997). Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *American Journal of Epidemiology*, 146 (12), 1025-1036.
- Schwab, A., Splichal, P., Banks, M. Persistence of atrazine and Alachlor ind ground water aquifers and soil. *Water, Air, and Soil Pollution* (2006) 171: 203–235 DOI: 10.1007/s11270-005-9037-2
- Seachem. (2018). Saltwater. Obtenido de <https://www.seachem.com/vibrant-sea.php+>
- Silbergeld, E. (2001). *Toxicología*. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo España. Obtenido de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>
- Silva, J., Torrejón, G., Bay, E., & Larrain, A. (2007). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana (Concepción)*, 67(1), 87-96. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382003000100011>
- Souza, A., Leiliane, C.A., Amorin, N., & Zenilda, L. (2010). Studies of the Analysis of Pesticide Degradation in Environmental Samples *Current Analytical Chemistry*, 6, 237-248.

- Sungur, M. & Güven, M. (2001). Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *BioMed Central*, 5(4), 211–215. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC37406/>
- Syngenta. (2019). HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (HDS). Obtenido de [https://www.syngenta.cl/sites/g/files/zhg471f/hdsgesaprim90\\_may2017.pdf?token=1511172489](https://www.syngenta.cl/sites/g/files/zhg471f/hdsgesaprim90_may2017.pdf?token=1511172489)
- Syngenta. (2018). Hoja de Seguridad- Gesaprim 90 WDG. Obtenido de [https://www.syngenta.com.ar/sites/g/files/zhg331f/gesaprim\\_90\\_wdg\\_hoja\\_de\\_seguridad.pdf?token=1524251039](https://www.syngenta.com.ar/sites/g/files/zhg331f/gesaprim_90_wdg_hoja_de_seguridad.pdf?token=1524251039)
- Takizawa, T., Ueda, M., Imai, T., Onodera, H., & Mitsumori, K. (2005). Posibles efectos potenciadores de la Atrazina en el crecimiento de tumores mamarios inducidos por 7,12-dimetilbenz (a) antraceno en ratas Sprague-Dawley. *Cancer Science*, 65, 28-52. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.13497006.2005.00008.x>
- Troya, D. (2016). *Estudio de la degradación de Alaclor y Atrazina en muestras sintéticas*. Escuela Politécnica Nacional. Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/16782/1/CD-7378.pdf>
- Vargas, A. & Perea, Y. (2011). Determinación de la concentración letal medio, de bario e hidróxido de sodio, mediante bioensayos de toxicidad en un ecosistema, sobre *Daphnia magna*. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Saneamiento. Bogotá, Colombia. Obtenido de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14893/T41.11%20V426d.pdf?sequence=1>
- Velandia, L., & Montañez, Y. (2010). *Determinación de la concentración letal media (cl50-48) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia pulex*. Universidad de la Salle. Colombia
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T., & Hollert, S. (2017). Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute

- toxicity. *Chemosphere*, 180, 65-76. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517305404>
- Verdesoto, A. (2016). El cultivo del arroz en el invierno. *La Hora*, págs. 6-8. Obtenido de <https://lahora.com.ec/noticia/1101910467/el-cultivo-del-arroz-en-el-invierno>
- Villalobos, L. (2017). Distribution of *D.* in high mountain and temperate lakes of South America. *Revista Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 6(1), 2400- 2404.
- Villamar, C. (2000). La *Artemia salina* y su importancia en la producción camaronera. *Revista AquaTIC*, 11, 7-13. Obtenido de <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/viewFile/95/84>
- Villarroel, 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.
- Vittozzi, L., Fabrizi, L., Di Consiglio, E., & Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environment International*, 26(3), 125-129.
- Wang, C., & Shih, Y. (2015). Degradación y desintoxicación de Diazinón por procesos de sono-Fenton y similares a sono-Fenton. *ELSEVIER*, 140, 6-12. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586614006467#f0025>
- Wu, J., Lan, C., & Chan, G. (2009). Ozonación plaguicidas organofosforados y la formación de intermedios de oxón. *Chemosphere*, 76, 1308-1314.
- Zambrano, B., & Beltrán, J. (2008). *Determinación de la concentración letal media (Cl50-48) del fenol en los vertimientos de la clínica veterinaria de la*

*universidad de la salle – sede floresta, por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia pulex.* Universidad de la Salle. Colombia.

Zapata, E. (2015). *Instructivo Para la aprobación, ejecución y supervisión de ensayos de eficacia de plaguicidas y productos afines de uso agrícola en Ecuador.* Recuperado de:  
<http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/pdf/RegistroInsumosAgropecuarios/normativa/InstructivoparaEjecuciondeEnsayosdeEficacia.pdf>

## **ANEXOS**

**ANEXO 1.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA SOBRE**  
***A. salina***

AGROQUÍMICO: ATRAZINA ORGANISMO : <i>A. salina</i>												
Concentración (g/L)	ENSAYO 1					ENSAYO 2					TOTAL	
	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	% MORTALIDAD	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	% MORTALIDAD	MEDIA (%)	DESVIACIÓN
1,5	10	10	10	30	100	10	9	10	29	96,67	98,33	2,4
1,35	9	9	10	28	93,33	9	8	9	26	86,67	90	4,7
1,05	6	5	7	18	60	6	5	6	17	56,67	58,33	2,4
0,9	4	4	3	11	36,67	5	4	4	13	43,33	40	4,7
0,75	4	3	3	10	33,33	4	3	3	10	33,33	33,33	0,0
0,45	3	1	1	5	16,67	2	1	2	5	16,67	16,67	0,0
Blanco	0	1	1	2	6,67	0	0	0	0	0,00	3,33	4,7

**ANEXO 2.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE**  
**QUISTES DE *A. salina* AL APLICAR ATRAZINA**

ENSAYO 1											ENSAYO 2										
C (g/L)	OE	OU	TE	TNE	QE	% Eclósion de Eclósion	% Inhibición	OE	OU	TE	TNE	QE	% Eclósion de Eclósion	% Inhibición							
0,45	18	5	23	27	50	46	54	18	5	23	27	50	46	54							
	20	4	24	26	50	48	52	20	4	24	26	50	48	52							
	18	7	25	25	50	50	50	20	7	27	23	50	54	46							
			72	78	150	48,00	<b>52,00</b>			74	76	150	49,33	<b>50,67</b>							
0,75	16	5	21	29	50	42	58	16	5	21	29	50	42	58							
	17	5	22	28	50	44	56	17	5	22	28	50	44	56							
	16	4	20	30	50	40	60	14	4	18	32	50	36	64							
			63	87	150	42,00	<b>58,00</b>			61	89	150	40,67	<b>59,33</b>							
1,05	14	3	17	33	50	34	66	14	3	17	33	50	34	66							
	9	11	20	30	50	40	60	9	11	20	30	50	40	60							
	13	10	23	27	50	46	54	11	10	21	29	50	42	58							
			60	90	150	40,00	<b>60,00</b>			58	92	150	38,67	<b>61,33</b>							
1,35	8	9	17	33	50	34	66	8	9	17	33	50	34	66							
	10	9	19	31	50	38	62	10	9	19	31	50	38	62							
	13	7	20	30	50	40	60	11	7	18	32	50	36	64							
			56	94	150	37,33	<b>62,67</b>			54	96	150	36,00	<b>64,00</b>							
1,5	3	5	8	42	50	16	84	3	5	8	42	50	16	84							
	4	2	6	44	50	12	88	4	2	6	44	50	12	88							
	2	3	5	45	50	10	90	5	3	8	42	50	16	84							
			19	131	150	12,67	<b>87,33</b>			22	128	150	14,67	<b>85,33</b>							
1,8	0	1	1	49	50	2,00	98,00	0	0	0	50	50	0,00	100							
	0	1	1	49	50	2,00	98,00	0	1	1	49	50	2,00	98,00							
	0	0	0	50	50	0,00	100,00	0	0	0	50	50	0,00	100,00							

	2	148	150	1,33	<b>98,67</b>	2	150	0,67	<b>99,33</b>			
27	10	37	13	50	74	27	10	37	13	50	74	26
25	9	34	16	50	68	25	9	34	16	50	68	32
21	11	32	18	50	64	19	11	30	20	50	60	40
	103	47	150	68,67	<b>31,33</b>	101	49	150	67,33	<b>32,67</b>		

C= Concentración; OE= Organismos Eclosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella; TE= Total Eclosionados; TNE= Total No Eclosionados; QE= Número de Quistes Expuestos

CONCENTRACIÓN g/L	ENSAYO 1					ENSAYO 2				
	ECLOSIONADOS TOTAL	NO ECLOSIONADOS	% INHIBICIÓN	ECLOSIONADOS TOTAL	NO ECLOSIONADOS	% INHIBICIÓN	MEDIA	DESVIACIÓN		
BLANCO	103	47	31,33	101	49	32,67	32	0,948		
0,45	72	78	52	74	76	50,67	51,335	0,940		
0,75	63	87	58	61	89	59,33	58,665	0,940		
1,05	60	90	60	58	92	61,33	60,665	0,940		
1,35	56	94	62,67	54	96	64	63,335	0,940		
1,5	19	131	87,33	22	128	85,33	86,33	1,414		
1,8	2	148	98,67	2	148	98,67	99	0,467		

**ANEXO 3.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE ATRAZINA SOBRE**  
*D. pulex*

AGROQUÍMICO: ATRAZINA ORGANISMO: <i>D. pulex</i>												
Concen tración (mg/L)	ENSAYO 1					ENSAYO 2					TOTAL	
	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	%MORTA LIDAD	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	%MORTA LIDAD	MEDIA (%)	DESVIACIÓN
30	10	10	10	30	100	10	9	10	29	96,667	98,33	2,4
20	10	10	9	29	96,667	10	8	10	28	93,333	95	2,4
15	7	6	7	20	66,667	8	8	6	22	73,333	70,00	4,7
10	4	3	4	11	36,667	3	4	5	12	40	38,333	2,4
5	2	2	3	7	23,333	2	3	1	6	20	21,67	2,4
1	1	1	1	3	10	0	1	1	2	6,667	8,33	2,4
Blanco	0	1	0	1	3,333	0	0	0	0	0	1,67	2,4

**ANEXO 4.****TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE *D. pulex* (MORTALIDAD)**



**ANEXO 5.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE *D. pulex* (REPRODUCCIÓN)**

NEONATOS TOTALES POR RECIPIENTE																								
Día	Concentraciones (mg/L)																							
	6			3			1,5			0,75			0,375			Blanco								
7																								
8			15		12	19	25	30	15	25	35	27	10	26	21	39	41	32		75		59	63	71
9		7	5	8					12	8	15	5	18					14				34	28	30
10					8			15	19	19			17		10	37						25		
11									26	25		29				21		15	23	17				
12	FIN DE SEMANA																							
13	FIN DE SEMANA																							
14					12	10	21	19	13		21	15	23	31	29	25	35	28	50	50	65	79	73	58
15		4							18			32	4				15	23						
16						8	12			13	8		18		21						23	26	31	48
17					6				10	4	6	10	4	12	15				10	12	12	12	38	
18																			19			12	25	
19	FIN DE SEMANA																							
20	FIN DE SEMANA																							
21						5	8	23	10	16	31	13	33	12	17	23	28	16	21	33	41	38	45	33
																						26	30	73
																						76	80	80

**ANEXO 6.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE *D. pulex* (PROMEDIOS)**

Concentración (mg/L)	Longevidad (días)	Supervivencia (%)	Camadas por hembra		Tamaño de camada		Neonatos por hembra		Primera camada (días)	
			Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv
12	7	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-
6	15	20,0	0,5	0,38	7,2	1,16	27,5	4,9	8,5	0,71
3	21	33,3	1,9	0,55	10,3	1,86	32,63	6,58	8	0
1,5	21	46,7	3,1	0,84	12,2	1,93	37,16	4,21	8	0
0,75	21	73,3	3,3	0,75	12,9	0,41	37,8	7,48	7,5	0,71
0,375	21	80,0	4,5	0,73	17,3	4,06	54,1	2,27	7,5	0,71
Blanco	21	86,7	4,9	0,56	20,6	2,1	62,0	8,0	7	0

**ANEXO 7.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE ATRAZINA SOBRE *D. pulex* (CAMADAS POR  
RECIPIENTE)**

CAMADAS POR RECIPIENTE																				
Concentración (mg/L)																				
	12	6	3	1,5	0,75	0,375	Blanco													
7					2 2		3			3		3	2	3	3	2	3	3	2	2
8		2	1 2 2 3 1	2 3 2 2 2	2 3 3 2	3 3 3							2	1						2
9		1 1		2 1 2	1 1	2							2	2						2 3
10		1	1	2 2 1	1	2														
11				1 2	1	1 3 2														
12																				
13				FIN DE SEMANA																
14		1 1	1 1 2 2 1	2 1 2 2	2 2 2 2	2 3 3 3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	3	2	3	2
15		1		1	1 1					2 2										2
16			1 1	1	2	2 2 2								3						
17			1	1 1	1 2	1 1	1	1	2	1	1	1	2	2	2					2
18											1	1	2	2						
19											1	1	2							3
20				FIN DE SEMANA																
21			1	1 2 1 1 2 1 2 1 2 2 3 2 2 2 2 3 3 1 3 2 2 3 3																

**ANEXO 8.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE DIAZINÓN SOBRE A.**  
***salina***

AGROQUÍMICO: DIAZINÓN														
ORGANISMO: <i>A. salina</i>														
Concen tración (mg/L)	ENSAYO 1						ENSAYO 2						TOTAL	
	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	% MORTA LIDAD		Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	% MORTA LIDAD		MEDIA (%)	DESVIA CIÓN
51	9	10	10	29	96,67		10	10	10	30	100,00		98,33	2,4
40,8	8	8	9	25	83,33		9	8	8	25	83,33		83,33	0,0
30,6	5	6	5	16	53,33		5	7	6	18	60,00		56,67	4,7
25,5	3	4	4	11	36,67		3	3	4	10	33,33		35	2,4
20,4	2	2	2	6	20		2	3	3	8	26,67		23,33	4,7
15,3	2	1	1	4	13,33		1	2	1	4	13,33		13,33	0,0
Blanco	1	0	0	1	3,33		1	1	0	2	6,67		5,00	2,4

**ANEXO 9.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE**  
**QUISTES DE *A. salina* AL APLICAR DIAZINÓN**

ENSAYO 1											ENSAYO 2										
C (g/L)	OE	OU	TE	TNE	QE	% Inhibición de Eclósión		OE	OU	TE	TNE	QE	% Inhibición de Eclósión								
						% Eclósión	% Inhibición de Eclósión						% Eclósión	% Inhibición de Eclósión							
15,3	23	6	29	21	50	58	42	23	5	28	22	50	56	44							
	22	4	26	24	50	52	48	22	4	26	24	50	52	48							
	24	4	28	22	50	56	44	24	4	28	22	50	56	44							
25,5	19	8	27	23	50	54	46	19	8	27	23	50	54	46							
	21	3	24	26	50	48	52	21	3	24	26	50	48	52							
	23	4	27	23	50	54	46	23	4	27	23	50	54	46							
30,6	25	1	26	24	50	52	48	28	1	29	21	50	58	42							
	24	1	25	25	50	50	50	23	1	24	26	50	48	52							
	22	2	24	26	50	48	52	21	2	23	27	50	46	54							
40,8	18	6	24	26	50	48	52	17	7	24	26	50	48	52							
	15	8	23	27	50	46	54	15	9	24	26	50	48	52							
	21	3	24	26	50	48	52	21	4	25	25	50	50	50							
51	9	11	20	30	50	40	60	5	17	22	28	50	44	56							
	6	14	20	30	50	40	60	6	16	22	28	50	44	56							
	10	12	22	28	50	44	56	7	15	22	28	50	44	56							
			62	88	150	41,33	58,67			66	84	150	44,00	56,00							

3	10	13	37	50	26,00	74,00	3	12	15	35	50	30,00	70,00
4	8	12	38	50	24	76	4	8	12	38	50	24	76
76,5	3	9	12	38	50	24	2	10	12	38	50	24	76
	37	113	150	24,67	<b>75,33</b>		39	111	150	26,00	<b>74,00</b>		
1	0	1	49	50	0	100	0	1	1	49	50	2	98
0	0	0	49	50	2	98	0	1	1	49	50	2	98
102	0	0	50	50	0	100	0	0	0	50	50	0	100
	1	149	150	0,67	<b>99,33</b>		2	148	150	1,33	<b>98,67</b>		
27	8	35	15	50	70	30	27	8	35	15	50	70	30
30	11	41	9	50	82	18	30	16	46	4	50	92	8
BLANCO	22	8	30	20	60	40	16	7	23	27	50	46	54
	106	44	150	70,67	<b>29,33</b>		104	46	150	69,33	<b>30,67</b>		

C= Concentración; OE= Organismos Ecllosionados; OU= Organismos en Estado de Umbrella; TE= Total Ecllosionados; TNE= Total No Ecllosionados; QE= Número de Quistes Expuestos

CONCENTRACIÓN mg/L	ENSAYO 1				ENSAYO 2					
	ECLOSIONADOS TOTAL	NO ECLOSIONADOS	% INHIBICIÓN	% INHIBICIÓN	ECLOSIONADOS TOTAL	NO ECLOSIONADOS	% INHIBICIÓN	% INHIBICIÓN	MEDIA	DESVIACIÓN
BLANCO	106	44	29,33	29,33	104	46	30,67	30,67	30	0,947
15,3	83	67	44,67	44,67	82	68	45,33	45,33	45	0,467
25,5	78	72	48	48	78	72	48	48	48	0
30,6	75	75	50	50	76	74	49,33	49,33	49,665	0,474
40,8	71	79	52,67	52,67	73	77	51,33	51,33	52	0,948
51	62	88	58,67	58,67	66	84	56	56	57,335	1,888
76,5	37	113	75,33	75,33	37	113	74	74	74,665	0,940
102	1	149	99,33	99,33	1	149	98,67	98,67	99	0,467

**ANEXO 10.**  
**RESULTADOS OBTENIDOS DE TOXICIDAD AGUDA DE DIAZINÓN SOBRE *D.***  
***pulex***

AGROQUÍMICO: DIAZINÓN ORGANISMO: <i>D. pulex</i>													
Concen tración (µg/L)	ENSAYO 1						ENSAYO 2					TOTAL	
	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	%MORTA LIDAD	Ensayo	Réplica 1	Réplica 2	TOTAL MUERTOS	%MORTA LIDAD	MEDIA (%)	DESVIA CIÓN	
0,153	10	10	10	30	100	10	9	10	29	96,667	98,33	2,4	
0,11475	8	8	7	23	76,667	8	7	7	22	73,333	75,00	2,4	
0,0765	6	6	7	19	63,333	6	6	7	19	63,333	63,33	0,0	
0,03825	4	3	4	11	36,667	3	4	3	10	33,333	35,00	2,4	
0,0153	2	3	1	6	20	3	3	2	8	26,667	23,33	4,7	
0,00765	1	0	1	2	6,667	1	1	1	3	10	8,33	2,4	
Blanco	0	1	0	1	3,333	1	1	0	2	6,667	5,00	2,4	

**ANEXO 11.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE *D. pulex* (MORTALIDAD)**



**ANEXO 12.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE *D. pulex* (REPRODUCCIÓN)**



**ANEXO 13.****TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE *D. pulex* (PROMEDIOS)**

Concentración (mg/L)	Longevidad (días)	Supervivencia (%)	Camadas por hembra		Tamaño de camada		Neonatos por hembra		Primera camada (días)	
			Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv	Valor	Desv
0.053	15	20,0	0,2	0,18	3,8	2,63	9,0	3,0	8,5	0,71
0,0371	21	20,0	1,1	0,3	11,3	1,52	33,85	4,55	9	0
0.0212	21	46,7	2,1	0,64	14,0	1,82	39,38	5,56	7,5	0
0.0106	21	60,0	2,7	1,04	15,0	2,46	43,1	7,48	7,5	0,71
0.00053	21	73,3	3,3	0,95	14,5	2,24	42,4	7,36	8,5	0,71
Blanco	21	86,7	4,7	0,41	18,3	2,6	54,6	7,0	8	0

**ANEXO 14.**  
**TOXICIDAD SUBLETAL DE DIAZINÓN SOBRE *D. pulex* (CAMADAS POR**  
**RECIPIENTE)**

CAMADAS POR RECIPIENTE																																						
Días	Concentraciones (µg/L)																																					
	0,053			0,0371			0,0212			0,0106			0,0053			Blanco																						
7									1	2	1	1		2	2	2	1	2				3	3	3														
8	1			1	1	1	1		1	2	2		2	2	2	1		3	1	2		3	2	2	1													
9	1				1		1	2	1	1					1				1	1	1	3	2															
10				1		1					1	1			1			1	1						2													
11												1																										
12	FIN DE SEMANA																																					
13	FIN DE SEMANA																																					
14					1	1	1	1	2	1	1			2	2	2	3	2	1	1	2	3	2	3	3	3												
15				1				1	1	1	1					1	2					1	1															
16												1				1			2	1					3													
17								1					1	1	1	2		1	1				3		1													
18										1	1					1						2	3	2	3	3												
19	FIN DE SEMANA																																					
20	FIN DE SEMANA																																					
21	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	2	2	1	2	1	2	3	2	3	1	2	3	2	3	3												