

UNIVERSIDAD  
**CIENTÍFICA**  
DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

“EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE LOS INSECTICIDAS FIPRONIL E  
IMIDACLOPRID EN EL CAMARÓN DE RÍO (*Cryphiops caementarius*)”

Tesis para optar el título de:

INGENIERO(A) AMBIENTAL

Presentado por:

Fiorella Alexandra Cáceres Del Carpio

Asesor:

Dr. José Alberto Iannacone Oliver

Lima - Perú

2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Lima, 2 de julio de 2019.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dra. Susan Mery Medina Canzio
Integrante: Ing. Víctor Agustín Barrantes Santos
Integrante: Ing. Juan Alberto Palomino Vega

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

**Evaluación del Riesgo Ambiental de los Insecticidas Fipronil e Imidacloprid en el Camarón de Río (*Cryophiops Caementarius*).**

Presentada por la bachiller:

- **Fiorella Cáceres Del Carpio**

Para optar el Título Profesional de **Ingeniera Ambiental**

Asesorada por:

- **Dr. José Alberto Iannacone Oliver**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller en la sustentación, concluyen de manera unánime (  ) por mayoría simple (  ) calificar a:

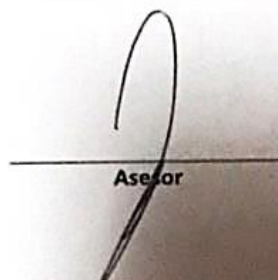
Integrante 1: <b>Fiorella Cáceres Del Carpio</b>			Nota (escrito): <b>CATORCE</b>
Aprobado ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Aprobado - Muy buena ( <input type="checkbox"/> )	Aprobado - Sobresaliente ( <input type="checkbox"/> )	Desaprobado ( <input type="checkbox"/> )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

  
Presidente del Jurado

  
Miembro del Jurado

  
Miembro del Jurado

  
Asesor

*Agradecimientos:*

*Quiero agradecer a mi asesor el Dr. José Iannacone, por el apoyo, paciencia, asesoramiento y sobre todo interés en el adecuado desarrollo del presente trabajo, compartiendo sus amplios conocimientos y expertiz en el tema.*

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	1
<b>II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES</b> .....	4
1. Antecedentes .....	4
2. Marco Teórico .....	8
2.1. <i>Ecotoxicología</i> .....	8
2.2. <i>Bioensayos Toxicológicos</i> .....	9
2.3. <i>Plaguicidas</i> .....	12
2.4. <i>Camarón de río - Cryphiops caementarius (Molina, 1782)</i> .....	22
2.5. <i>Evaluación de Riesgo Ambiental</i> .....	28
2.6. <i>Legislación y Normativa</i> .....	34
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	36
1. Hipótesis .....	36
2. Objetivos .....	37
<b>IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	39
1. Tipo y Diseño .....	39
2. Metodología .....	40
2.1. <i>Modelo Biológico</i> .....	41
2.2. <i>Parámetros fisicoquímicos del medio</i> .....	42
2.3. <i>Bioensayos</i> .....	43
2.4. <i>Análisis de datos y Evaluación del Riesgo Ambiental</i> .....	46
<b>V. RESULTADOS</b> .....	50
1. Pruebas de Toxicidad Aguda: Mortalidad e Hipoactividad natatoria (hNPL) .....	50
2. Evaluación del Riesgo y Toxicidad .....	57
<b>VI. DISCUSION</b> .....	62
1. Pruebas de Toxicidad Aguda: Mortalidad e Hipoactividad natatoria (hNPL) .....	62
2. Evaluación del Riesgo y Toxicidad .....	65
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	74
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	75
<b>X. ABREVIATURAS</b> .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química del fipronil.....	16
Figura 2.	Morfología del camarón de río, <i>Cryphiops caementarius</i> .....	23
Figura 3.	Obtención de las postlarvas de <i>C. caementarius</i> del río Cañete en el distrito de Calango.....	96
Figura 4.	Aclimatación de las postlarvas en el laboratorio de Acuicultura de la UCSUR por diez días, en un tanque de 750 L con aireación constante y alimentación diaria.....	97
Figura 5.	Materiales, instalación y proceso del bioensayo en el laboratorio de Investigación de la UCSUR.....	97
Figura 6.	Individuo vivo al estereoscopio (izquierda) e individuo minutos después de la muerte (derecha).....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1 .</b>	Relación de organismos utilizados en bioensayos de toxicidad. ...	12
<b>Tabla 2 .</b>	Propiedades físicoquímicas del fipronil.....	17
<b>Tabla 3 .</b>	Características físicoquímicas del imidacloprid.....	20
<b>Tabla 4 .</b>	Porcentaje de mortalidad y parámetros subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil a diferentes tiempos de exposición. ....	51
<b>Tabla 5 .</b>	Porcentaje de mortalidad y parámetros subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición.....	53
<b>Tabla 6 .</b>	Concentración letal media (CL <sub>50</sub> , Límites superiores e inferiores) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil a diferentes tiempos de exposición. ....	54
<b>Tabla 7 .</b>	Concentración letal media (CL <sub>50</sub> , Límites superiores e inferiores) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición.....	55
<b>Tabla 8 .</b>	Concentración más baja donde se observa efecto (LOEC) y concentración de efecto no observado (NOEC) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil a diferentes tiempos de exposición.....	56
<b>Tabla 9 .</b>	Concentración más baja donde se observa efecto (LOEC) y concentración de efecto no observado (NOEC) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición.....	56
<b>Tabla 10 .</b>	Concentración sin efecto observable prevista (PNEC) en base a la CL <sub>50</sub> para parámetros letales y subletales (hNPL) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil e imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en µg.l <sup>-1</sup> .....	57
<b>Tabla 11 .</b>	Concentración sin efecto observable prevista (PNEC) en base a la LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil e imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en µg.L <sup>-1</sup> .....	58
<b>Tabla 12 .</b>	Cociente de riesgo en base a la CL <sub>50</sub> , LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el fipronil a diferentes tiempos de exposición .....	59
<b>Tabla 13 .</b>	Cociente de riesgo en base a la CL <sub>50</sub> , LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en <i>Cryphiops caementarius</i> para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en dos escenarios .....	60

**ÍNDICE DE ANEXOS**

1. Fotografías del procedimiento experimental.....	96
--	----

## RESUMEN

En el presente estudio se ha evaluado el riesgo ambiental (ERA) de los ingredientes activos fipronil e imidacloprid individualmente en las postlarvas del camarón de río (*Cryphiops caementarius*). Se realizaron los ensayos de toxicidad aguda correspondientes donde se halló la  $CL_{50}$  usando el programa Probit 1.5 con un nivel de confianza al 95% y el modelo de regresión fue verificado con el estadístico Chi-cuadrado (mortalidad e hipoactividad natatoria), obteniendo una  $CL_{50}$  de  $0,035 \mu\text{g.l}^{-1}$  para el fipronil a las 24 h y  $2,233 \mu\text{g.l}^{-1}$  para el imidacloprid a las 96 h. Asimismo, los parámetros LOEC y NOEC fueron calculados con el programa estadístico Past 3.2 mediante las pruebas de Krustal-Wallis para establecer las diferencias significativas entre las soluciones problema y los tiempos de exposición, y Mann-Withney para la determinación de los rangos; los resultados para la LOEC fueron de  $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) para el fipronil y de  $28,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h) para el imidacloprid. Asimismo, para la NOEC  $<0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) para el fipronil y de  $<28,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96h) para el imidacloprid. Seguidamente se halló la PNEC usando el factor de valoración de 1000 establecido para ensayos de toxicidad aguda en una especie o más y los estándares ambientales disponibles para la PEC. De esta manera, mediante la relación de PEC/PNEC se pudo establecer el cociente de riesgo el cual fue mayor a 1 en repetidas ocasiones, por ejemplo: 02 a las 24h para el fipronil, y 858,4 (escenario 1) y 35,6 (escenario 2) a las 96 h para el imidacloprid significando un alto riesgo ambiental de los insecticidas estudiados.

**Palabras clave:** Bioensayo, riesgo ambiental, toxicidad aguda.



## ABSTRACT

In the present study the environmental risk (ERA) of the active ingredients fipronil and imidacloprid was evaluated individually in the postlarvae of river shrimp (*Cryphiops caementarius*). The acute toxicity tests were performed where the  $LC_{50}$  was found using the Probit 1.5 program with a 95% confidence level and the regression model was performed with the Chi-square statistic (mortality and swimming hypoactivity), obtaining an  $LC_{50}$  of  $0.035 \mu\text{g.l}^{-1}$  for fipronil at 24 h and  $2,233 \mu\text{g.l}^{-1}$  for imidacloprid at 96 h. Likewise, the LOEC and NOEC parameters were calculated with the statistical program Past 3.2 through the Krustal-Wallis tests to establish the differences between the problem solutions and the exposure times, and Mann-Whitney for the determination of the ranges; The results for the LOEC were  $0.02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) for fipronil and  $28.8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h) for imidacloprid. Also, for NOEC  $<0.02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) for fipronil and  $<28.8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h) for imidacloprid. Subsequently, the PNEC was obtained using the valuation factor of 1000 established for the acute toxicity tests in one or more species and the environmental means available for the PEC. In this way, through the relationship of  $PEC / PNEC$ , the risk quotient could be established, which was greater than 1 repeatedly, for example: 02 at 24h for fipronil, and 858.4 (scenario 1) and 35, 6 (scenario 2) at 96 h for imidacloprid mean a high environmental risk of the insecticides studied.

**Key words:** Bioassays, environmental risk, acute toxicity.

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre los años 1960 y 2010, la producción global sólo de los principales cereales (trigo, arroz, maíz), ha tenido un incremento constante, pasando de 643 mill de toneladas (tn) a 2 200 mill de tn para alimentar a una población que en igual período creció de 3 039 mill (1960) a 6 854 millones (2010) (Godfray *et al.*, 2010); de igual manera y por consiguiente, el uso de plaguicidas ha ido en aumento para el control de plagas de dichos cereales. El volumen de plaguicidas formulados en el mundo en el año 2005 alcanzó casi 6 millones de tn (Carvalho, 2006); asimismo Tilman *et al.* (2002) estiman que en 2020 se alcanzarán los 6,5 mill de tn de ingrediente activo de no ocurrir cambios en el manejo de plagas. El uso agrícola de plaguicidas es sólo un fragmento del espectro más amplio de productos químicos industriales usados en la actualidad (March *et al.*, 1993). Aproximadamente 3 mill de personas por año terminan envenenadas con plaguicidas, siendo su mayoría de países en vías de desarrollo y, cada año mueren alrededor de 20 000 de éstas víctimas por envenenamiento (OMS, 2016).

Si bien es cierto, en el Perú el uso de plaguicidas viene siendo regulado por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para la protección de la salud y medio ambiente, sigue siendo un tema preocupante ya que una gran variedad de microcontaminantes orgánicos (sustancias que pueden ejercer efectos sobre los organismos vivos y su medio a bajas concentraciones) se incluyen en los plaguicidas y tienen efectos ecológicos (Ongley, 1997), por lo cual es difícil realizar afirmaciones generales ya que las distintas categorías

de plaguicidas tienen diferentes tipos de repercusión en los organismos vivos y la salud humana. Asimismo, Ongley (1997) menciona que los plaguicidas tienen sin duda efectos en la superficie terrestre, pero el principal medio de daños ecológicos es la contaminación de los cuerpos y cursos de agua por la escorrentía de los plaguicidas. Además, estudios realizados en Suecia aseguran que la aplicación de plaguicidas es uno de los factores que más influyen en la biodiversidad (Jonsson y Ebert, 2000).

Según el INEI (2018), la importación de insecticidas en el Perú ha aumentado de 3 481 tn a 5 037 tn en los años 2007-2017, cantidades que fueron usadas en su mayoría en campos agrícolas aumentando así el riesgo por exposición de la biodiversidad que habita en los cuerpos de aguas.

Los factores abióticos (volatilización, adsorción, fotólisis e hidrólisis) y factores bióticos (bioacumulación y biotransformación) influyen significativamente en la evolución de los plaguicidas; por ello, el empleo no controlado de estos compuestos puede suponer un grave riesgo y efectos negativos (Cebrián *et al.*, 1988). Por otro lado, cabe recalcar que los ambientes acuáticos funcionan también como sumideros o reservas de los plaguicidas, los cuales pueden alterar las características propias de dichos ecosistemas como la función (transferencia de energía y nutrientes), estructura (diversidad) y reducción de la diversidad provocada por un tóxico que hace posible su estabilidad (Rand y Petrocelli, 1985).

Lo explicado anteriormente hace que se requiera la realización de más investigaciones acerca del efecto de plaguicidas altamente usados en la agricultura sobre los medios acuáticos y su repercusión en las especies, sobre

todo si estas son fuente de alimento o constituyen parte importante de la economía del lugar, como es el caso del camarón de río (*Cryphiops caementarius*, Molina 1782), especie endémica de la costa sur del Perú y Norte de Chile, el cual según el IMARPE (2007) registra las más altas poblaciones en los ríos del departamento de Arequipa, principalmente en Ocoña, Majes, Camaná y Tambo, debido a que los ríos llevan mayor caudal de agua; regiones en donde el cultivo de arroz y cebolla es predominante debido a la demanda hídrica que requieren, especialmente el arroz (MINAGRI y ANA, 2015). En dichos cultivos, los insecticidas fipronil e imidacloprid son ampliamente empleados para el control de plagas, lo cual manifiesta una preocupación al no existir información disponible de la sensibilidad del camarón de río ante estos plaguicidas.

## II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 1. Antecedentes

Omar *et al.* (2016), evaluaron la toxicidad de los insecticidas acetamiprid, imidacloprid y fipronil en el crustáceo marino *Marsupenaeus japonicus* Bate, 1888, los ensayos determinaron que el fipronil era el más potente en términos de letalidad aguda independientemente de la exposición. La concentración letal ( $CL_{50}$ ) para este componente fue de 5,8  $mg.l^{-1}$ , 1,29  $mg.l^{-1}$  y 0,56  $mg.l^{-1}$  después de la exposición por 48 h, 72 h y 96 h, respectivamente; para el Imidracloprid fue de 1011,30  $mg.l^{-1}$ , 240,81  $mg.l^{-1}$  y 141,42  $mg.l^{-1}$  48 h, 72 h y 96 h de exposición, respectivamente. En términos de mortalidad el fipronil y el imidacloprid presentaron un nivel de mortalidad de 76% y 83,33%, respectivamente. Los resultados revelan que la concentración máxima de exposición al fipronil fue 20 veces mayor que la de los dos neonicotinoides.

Paredes y Anaya (2015), estudiaron el efecto agudo del Oxicloruro de Cobre y del Butaclor sobre el “Camarón de río” (*C. caementarius*), donde se emplearon ejemplares juveniles expuestos a 96 h con Butaclor y oxicloruro de cobre y sus respectivos controles. En el caso de butaclor, a las 96 h se obtuvo un rango de  $CL_{50}$  de 3,18  $mg.l^{-1}$  – 6, 25  $mg.l^{-1}$ , mientras que para el oxicloruro de cobre, un  $CL_{50}$  de 2 607,72  $mg.l^{-1}$ . Se utilizó el diseño en bloques completamente aleatorizado, análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey, en el programa Probit. La metodología usada en la misma especie y el análisis estadístico de datos aportan al desarrollo del bioensayo.

Mendoza-Rodríguez (2009), evaluó la toxicidad del sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en postlarvas de camarón *C. caementarius* mediante pruebas de toxicidad aguda. Donde se encontró que las concentraciones peligrosas fueron  $7,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $12,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (90 y 100% de mortalidad antes de 24 h, respectivamente); las concentraciones de  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  fueron tolerables alcanzando 100% de sobrevivencia para 48 h. Se utilizó como referencia: Hiperactividad natatoria postlarval (HNPL), Actividad natatoria postlarval normal (ANNPL), Hipoactividad natatoria postlarval (hNPL) y Muerte (M) para valorar el desempeño de la actividad natatoria en postlarvas. Los parámetros fueron determinados con el programa Probit y verificado con Chi-cuadrado de igual manera para las concentraciones efectivas.

Overmyer *et al.* (2005) evaluaron la toxicidad aguda de los insecticidas fipronil e imidacloprid en un insecto acuático *Simulium vittatum* Zetterstedt, 1838, para establecer la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) dentro de las 48 h. Se probaron seis concentraciones de insecticidas y dos controles; un control de agua de prueba y un vehículo (acetona), en un agitador con cinco matraces por concentración y control siendo finalmente 40 matraces y 600 larvas. Los resultados evidenciaron que el fipronil fue más tóxico que el imidacloprid, presentando una  $\text{CL}_{50}$  en un rango de  $0,29 \mu\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,19 \mu\cdot\text{l}^{-1}$ , mientras que el imidacloprid tuvo una  $\text{CL}_{50}$  de  $9,54 \mu\cdot\text{l}^{-1}$  a  $6,75 \mu\cdot\text{l}^{-1}$ . Estas concentraciones fueron halladas con el programa Probit proporcionado por la EPA. Esta información significa un aporte en la aproximación de las concentraciones madre para el bioensayo.

Shan *et al.* (2003), realizaron el estudio del impacto del Fipronil en crustáceos acuáticos en campos de arroz por inundación en la especie *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879, *Macrobrachium nipponensis* De Haan, 1849 y *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853. Se construyó una simulación del sistema de cultivo de arroz, donde el fipronil fue rociado y luego de pruebas posteriores se sometió a los organismos a los lixiviados del sistema de cultivo artificial a diferentes concentraciones, en contenedores de 25 L de capacidad, en cada repetición se usaron 10 organismos, se verificaron los efectos cada 24 h. Los tres organismos presentaron alta sensibilidad al fipronil. A las 96 h la CL<sub>50</sub> fue de: 0,98  $\mu\text{l}^{-1}$ ; 4,32  $\mu\text{l}^{-1}$ ; y 8,56  $\mu\text{l}^{-1}$  para cada especie, respectivamente. Se tomarán como referencia las concentraciones usadas, y la discusión de datos por ser una especie cercana a la que será evaluada.

Keyt *al.* (2006), examinaron la toxicidad de tres plaguicidas, solos y en mezcla en las larvas de camarones de hierba (*Palaemonetes pugio* Holthuis, 1949). Se usaron el herbicida atrazina y los insecticidas fipronil e imidacloprid, dando como resultado que el fipronil fue el más tóxico para las larvas de camarón a las 96 h con un CL<sub>50</sub> de 0,68 mg.l<sup>-1</sup> y que las larvas de camarones eran menos sensibles a imidacloprid con un CL<sub>50</sub> de 308,8 mg.l<sup>-1</sup>. Estos datos servirán de referencia en las discusiones y en el cálculo de las concentraciones iniciales para el bioensayo.

En el estudio de Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) derivados de uso del fungicidas azólicos empleados en el cultivo del arroz contra *Pyricularia oryzae* Saccardo, 1880, realizado por Sánchez (2008); se expone en detalle la metodología de Evaluación de riesgo ambiental para plaguicidas sobre el

cultivo de arroz en las albuferas de Valencia-España; bajo el siguiente esquema: Evaluación de la relación concentración-efecto (PNEC), Evaluación de la exposición (PEC) y caracterización del riesgo (PEC/PNEC). Uno de los puntos resaltantes a referir se centra en la metodología.

En el estudio de los efectos de la exposición de dos especies de crustáceos, *Asellus aquaticus* Linnaeus, 1758 y *Gammarus fossarum* Koch, 1836, a la atrazina e imidacloprid realizado por Lukancic *et al.* (2010). Se midieron la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y la dosis letal media ( $CL_{50}$ ). Las concentraciones de imidacloprid fueron de 1  $mg.l^{-1}$ , 3  $mg.l^{-1}$ , 10  $mg.l^{-1}$  y 30  $mg.l^{-1}$ ; y 100  $mg.l^{-1}$ . Como conclusión se determinó que *G. fossarum* es más sensible a la exposición de pesticidas a corto plazo.

Hayasaka *et al.* (2012), en el estudio de impactos ecológicos acumulativos de dos tratamientos anuales sucesivos de imidacloprid y fipronil, se sometieron a especies de la familia de zooplankton, organismos bentónicos y artrópodos que viven en la superficie del agua a diferentes concentraciones de ambos insecticidas. Se usaron las pruebas de ANOVA para establecer diferencias significativas entre los tratamientos y resultados. Como conclusión general las especies presentaron mayor sensibilidad al fipronil que al imidacloprid. Se da una visión amplia de los efectos de ambos plaguicidas aplicados a los mismos organismos sometidos a una misma evaluación.

Thuyet *et al.* (2011) investigaron la fotodegradación de los insecticidas, imidacloprid y fipronil, en agua arroz, mediante la temperatura del ambiente. Las concentraciones iniciales se fijaron en 58,8  $mg.l^{-1}$  y 3,1  $mg.l^{-1}$  para el imidacloprid y fipronil, respectivamente, de acuerdo con sus concentraciones



iniciales reportadas en el campo de arroz. La vida media ( $DT_{50}$ ) de imidacloprid y fipronil fueron 24,2 h y 36,7 h, respectivamente. Los datos hallados, en conjunto con otra información, establecen una referencia de la  $DT_{50}$  para hallar la concentración esperada en el medio (PEC).

## **2. Marco Teórico**

### ***2.1. Ecotoxicología***

La preocupación por los ecosistemas y la fauna silvestre surge como por el aumento del uso masivo de los plaguicidas luego de la Segunda guerra Mundial (Moriarty, 1988). Una de las primeras personas en acuñar este término en base a los conceptos de la toxicología fue Truhaut por el año 1969, quien la definió como el estudio de los efectos de los contaminantes sintéticos o naturales sobre los componentes de un ecosistema, incluyendo al hombre, plantas y microorganismos. Este concepto fue cambiando con el tiempo hasta la realización del Comité de Bruselas en julio de 1976, en el cual finalmente su definición fue aceptada como: Estudio de la emisión y entrada de contaminantes con su distribución y destino en el ambiente abiótico, así como la entrada y el destino de estos en la biosfera, con el importante problema de la contaminación de las cadenas biológicas; asimismo, el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos tóxicos de los contaminantes químicos a un cierto nivel ecosistémico con investigación del impacto sobre el hombre (Truhaut, 1977).

Los resultados de estos estudios empezaron a jugar un rol importante en la toma de decisiones ambientales ya desde el año 1972, como lo demuestra la prohibición del uso del pesticida DDT en Estados Unidos en ese mismo año.

Es así que la utilidad de estos estudios para la toma de decisiones de manejo ambiental permite tener una sólida base científica para la definición de estándares de calidad ambiental que promueven la conservación de los ecosistemas y la biodiversidad que estos albergan (Ramírez-Romero *et al.*, 2012).

## **2.2. Bioensayos Toxicológicos**

Reish y Oshida (1987) definen los bioensayos como pruebas donde se determina la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida mediante el empleo de un tejido vivo, organismo o grupo de organismos para determinar su potencia, permitiendo conocer la sensibilidad de las diversas especies y comparar la toxicidad de diferentes compuestos. (p.18).

Estos ensayos, consisten en la exposición a determinadas concentraciones del tóxico a grupos de organismos durante un tiempo determinado, los cuales deben estar en condiciones adecuadas de desarrollo, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo y mantenerse en condiciones ambientales constantes. Asimismo, se incluyen grupos de control, que no son expuestos al tóxico. Luego se registran y miden los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, finalmente se realiza un análisis estadístico con los datos obtenidos (Reish y Oshida, 1987).

Según Giesy y Graney (1989), el objetivo de estas pruebas es la obtención de información para su posterior uso en evaluaciones de riesgo ambiental. En función a la información que se desea obtener los bioensayos se clasifican en:

- Ensayos de toxicidad aguda: Consiste en la exposición de un grupo de individuos de una misma especie a diferentes concentraciones de una determinada sustancia en el laboratorio durante un breve periodo de tiempo (generalmente, entre 24 h y 96 h); la mortalidad es el efecto buscado (efectos letales) y el parámetro ecotoxicológico es la concentración letal, concentración a la que el 50% de los organismos muere (CL<sub>50</sub>).
- Ensayos de toxicidad crónica: evalúan los efectos que se producen luego de una exposición prolongada en los organismos, en relación al tiempo de vida del organismo. Los efectos más importantes son aquellos relacionados a aspectos fisiológicos como reproducción, eclosión, nado, entre otros (subletales), y los parámetros más relevantes son NOEC (concentración más alta a la que no se observa efecto) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto).

Se ha venido realizando un considerable esfuerzo para desarrollar diversos procesos bajo estándares y protocolos bien definidos para la realización de bioensayos, con distintas especies de organismos pertenecientes a diferentes niveles dentro de la escala de organización biológica (Sánchez, 2008). Para la realización de estos bioensayos con distintas especies, diferentes organizaciones internacionales (e.g., ISO, USEPA, CETESB, CEE, ASTM)

han estandarizado metodologías, en donde se describen métodos de cultivo, condiciones de los experimentos, ámbito de aplicación y restricciones (Silva *et al.*, 2007).

En el caso de los bioensayos en organismos acuáticos y terrestres, utilizados para la evaluación de riesgos que sirven para el registro y comercialización de sustancias y productos químicos, existen protocolos muy bien definidos para su realización, que han sido estandarizados por entidades como la OCDE y EPA fundamentalmente.

A continuación, en la Tabla 1 se presenta la relación de organismos utilizados mayormente en bioensayos de toxicidad.

**Tabla 1 .**Relación de organismos utilizados en bioensayos de toxicidad.

Organismo	Adaptabilidad del organismo		Empleado habitualmente como organismo en bioensayos
	Cultivo en laboratorio	Recolección en campo	
Algas	Excelente	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Sí
Protozoos	Excelente	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Muy limitado
Invertebrados			
Rotíferos	Bueno	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Limitado
Cladóceros	Excelente	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Si
Copépodos	Medio	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Limitado
Camarones	Bueno	Bueno	Si
Anélidos	Medio	Medio	Limitado
Insectos	Bajo	Medio	Si
Moluscos	Bueno	Medio	Si
Crustáceos	Bajo	Medio	
Peces	Excelente	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Si

Fuente: Henry (1988). Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos.

### **2.3. Plaguicidas**

Según el artículo 2° del Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas (FAO, 2014) los plaguicidas son:

“Cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas”. (p. 6)

La agricultura es una de las pocas actividades donde deliberadamente se descargan en el ambiente productos químicos acabando con algunas formas de vida, a pesar de que el uso de estos productos se reduce a un número limitado de compuestos en la agricultura (Ongley, 1997). Asimismo, los factores que influyen en la toxicidad de los plaguicidas en los sistemas acuáticos son:

- Toxicidad: El grado al cual una sustancia o mezcla de sustancias puede causar daño a los seres humanos o animales; ésta a su vez puede ser expresada en: toxicidad aguda, la cual se refiere a efectos biológicos severos o mortales mediante una exposición a corto plazo; y toxicidad crónica, la cual se refiere a la capacidad de una sustancia o mezcla de sustancias en causar efectos dañinos a largo plazo (EPA, 2016).
  
- Persistencia: Medida en términos de vida media (tiempo necesario para que la concentración ambiental disminuya un 50 %). Los procesos bióticos (biodegradación y el metabolismo) y abióticos de degradación (hidrólisis, fotólisis y oxidación) son los que determinan la persistencia (Calamari y Barg, 1993). Los plaguicidas modernos suelen tener una vida media corta, lo cual refleja el período durante el cual la plaga debe ser controlada.
  
- Productos degradados: Son el resultado del proceso de degradación y cuya toxicidad puede ser mayor, igual o menor que la del compuesto original. Por ejemplo, el DDT se degrada en DDD y DDE.

- Destino ambiental: El destino ambiental o entendido como comportamiento de un plaguicida, depende de la afinidad natural de la sustancia química con respecto de uno de los cuatro compartimentos ambientales (Calamari y Barg, 1993): materia sólida (materia mineral y carbono orgánico en partículas), líquido (solubilidad en aguas superficiales y aguas del suelo), forma gaseosa (volatilización) y biota. Este comportamiento comprende, respectivamente, la determinación de los siguientes aspectos: coeficiente de adsorción del suelo ( $K_{oc}$ ); solubilidad; Constante de Henry (H) y el coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ), los cuales son muy importantes para prever su evolución ambiental.

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993). Los plaguicidas fipronil e imidacloprid que son materia del presente trabajo, según los organismos que controlan son insecticidas pertenecientes a la familia química de los fenilpirazoles y Neonicotinoides respectivamente. Los cuáles serán descritos a continuación:

### **2.3.1. Fipronil**

Es un insecticida de la familia de los fenilpirazoles, el cual fue sintetizado en 1987 por la compañía Rhône-Poulenc, introducido en 1993 en el mercado europeo y registrado en Estados Unidos de América en 1996 (Ware, 2000). Alrededor del año 1997 se producían 480 tn anuales, se registró su uso urbano

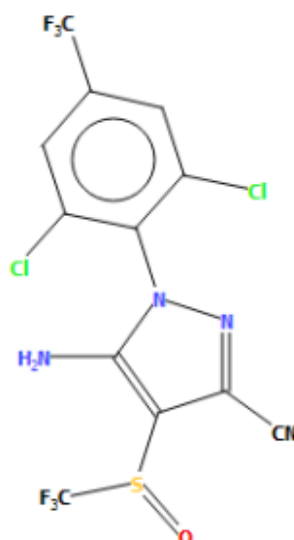
en 63 países y su uso agrícola en 51 países (Tingle *et al.*, 2000). Solo en Estados Unidos se ha incrementado su uso de 300 kg a 44 803 kg del año 2000 al 2006, por lo cual se espera un crecimiento constante en la demanda de este insecticida (CDPR, 2006).

El fipronil no sólo es empleado contra las principales plagas (lepidópteros y ortópteros y larvas de coleópteros en los suelos) en una amplia variedad de cultivos de campo y plantaciones hortícolas; sino que es empleada además en el control de las cucarachas, hormigas y pulgas en perros y gatos (BASF, 2005).

Este insecticida contempla frente a otros insecticidas por su alta potencia, selectividad, alta eficiencia, amplio espectro en insectos y baja resistencia (Gunasekara y Troung, 2007). Asimismo, se ha demostrado su eficacia contra insectos que han adquirido resistencia a insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos, aún a bajas dosis de aplicación (Bobe *et al.*, 1998).

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el nombre químico del fipronil es: 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile, dicha estructura está representada en la Figura 1; el sitio activo de la molécula llamado trifluorometilsulfinil, es el único sustituyente de ésta.





Fuente: PPDB, 2018

**Figura 1 .** Estructura química del fipronil.

### ***Destino Ambiental***

Cuando se libera una sustancia al medio ambiente le suceden una serie de hechos, los cuales pueden resultar dañinos, ya que no toda la sustancia aplicada llega al sitio objetivo. El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias permite predecir la partición ambiental, siendo los parámetros más útiles la solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de partición octanol-agua (K<sub>ow</sub>), coeficiente de partición octanol-aire (K<sub>oc</sub>), entre otros. (Cesna, 2009).

A continuación, en la Tabla 2 se presentan las propiedades fisicoquímicas del fipronil.

**Tabla 2 . Propiedades físicoquímicas del fipronil.**

Estado físico	Líquido, suspensión
Peso Molecular	437,15 g.l <sup>-1</sup>
Densidad	1,48 – 1,63 g.ml <sup>-1</sup> a 20°C
Punto de fusión	200 -201 °C
Constante de Henry	2,31 x 10 <sup>-4</sup> Pa.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
Explosividad	No explosivo
Fotólisis (días; pH=7)	0,33
Tiempo de vida media (hidrólisis)	pH = 7; Estable
Coeficiente n-octanol/agua	3,75 Log Kow
Solubilidad en agua	3,78 mg.l <sup>-1</sup>

Fuente: Adaptado de PPDB, 2018

Ngim y Crosby (2001) sustentan que el destino ambiental se ve influenciado por la formulación del compuesto, debido a que encontraron que el producto granular de fipronil fue más persistente que otras formulaciones en agua, con un tiempo de vida media de 125 h en el agua y de 438 h en el suelo.

La constante de Henry del fipronil es de  $2,31 \times 10^{-4} \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ , por lo cual se le considera moderadamente volátil y presenta baja solubilidad (3,78 mg.l<sup>-1</sup>) en agua.

Cabe mencionar que el fipronil presenta un coeficiente de partición n-octanol/agua (log Kow) de 3,75, valor significativo que guarda relación directa con la presencia de bioacumulación (Borrirukwisitsak *et al.* 2012) y en consecuencia la presencia de biomagnificación.

El ingrediente activo fipronil tiene una vida media de 0,33 días por fotólisis en el agua, pero es estable por hidrólisis, lo cual indica que es persistente en el

agua superficial. Asimismo, tiene una lixiviación moderada ya que presenta un valor de 2,45 (estado de transición) acorde con la ecuación de Gusstaffson (GUS) (Spadotto *et al.*, 2002), la cual se presenta a continuación:

$$GUS = \text{Log } T_{\frac{1}{2}}(4 - \text{Log } K_{oc})$$

Donde:

$T_{1/2}$  = vida media de la sustancia en días

$K_{oc}$  = coeficiente de partición de la sustancia entre el carbono orgánico del suelo y el agua

### ***Modo de Acción***

Como muchos insecticidas, actúa por ingestión y contacto; se produce una hiper-excitación en el insecto provocándole la muerte mediante su acción en el sistema nervioso central, debido a que el fipronil inhibe el flujo de iones cloro hacia el interior de la neurona. Normalmente, este flujo es regulado por el GABA (ácido gamma-aminobutírico), sin embargo el ingrediente activo se asocia al receptor del GABA e interfiere con el flujo de iones cloro durante la transmisión nerviosa (Cole *et al.*, 1993). A pesar del hecho que el canal GABA es importante en la neurotransmisión en los animales vertebrados, éste difiere significativamente del de los invertebrados, lo que explica el gran margen de seguridad en su aplicación a ciertos mamíferos (Laforé, 2005).

### ***Toxicidad en especies acuáticas***

El fipronil es altamente tóxico para invertebrados acuáticos, presenta una alta toxicidad en crustáceos como camarones y también en ostras (EPA, 1996). Es altamente tóxico para la trucha arcoíris  $CL_{50}$  (96 h) de  $248 \mu\text{g.l}^{-1}$  y para la carpa europea  $CL_{50}$  (96 h) de  $430 \mu\text{g.l}^{-1}$  (EPA, 1996). Se presentaron casos en los que los productos de degradación son más tóxicos que el activo original a concentraciones inferiores a la  $CL_{50}$  ( $6,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ ).

El fipronil presenta una estructura quiral y en el ambiente se encuentra en mezclas racémicas; se han reportado estudios donde se concluye que la toxicidad del enantiómero es más común en crustáceos que en otros organismos acuáticos, donde el enantiómero (S+) es significativamente más tóxico para los cangrejos y camarones de río (Overmayer *et al.*, 2007).

Mize *et al.* (2008) indican que algunos reportes arrojan que las comunidades de macroinvertebrados disminuyeron significativamente con aumentos en las concentraciones de compuestos de fipronil y la intensidad de uso del suelo en el cultivo del arroz.

#### ***2.3.2. Imidacloprid***

Imidacloprid es un insecticida sistémico perteneciente a la familia de los neocotinoides, ampliamente utilizado para controlar varios géneros de pulgones, minadores, cochinillas, moscas blancas, gusanos de suelo y trips. Ha sido usado en una amplia variedad de cultivos, durante la última década, a pesar de su persistencia en el suelo (Turner, 2013), asimismo es empleado como antipulgas en la medicina veterinaria.

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el nombre químico del imidacloprid es: N-{1-[(6-Chloro-3-pyridyl) methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl-nitramide; dicha estructura está representada en la Figura 2.

### ***Destino Ambiental***

Cuando se libera una sustancia al medio ambiente le suceden una serie de hechos, los cuales pueden resultar dañinos, ya que no toda la sustancia aplicada llega al sitio objetivo. El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias permite predecir la partición ambiental, siendo los parámetros más útiles la solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), coeficiente de partición octanol-aire ( $K_{oc}$ ), entre otros. (Cesna, 2009).

En la Tabla 3 se observan las principales propiedades fisicoquímicas del imidacloprid.

**Tabla 3 .** Características fisicoquímicas del imidacloprid.

Estado físico	Líquido, suspensión
Peso Molecular	255,7 g.l <sup>-1</sup>
Densidad	1,54 g.ml <sup>-1</sup> a 23°C
Punto de fusión	144 a 20 °C
Constante de Henry	1,7 x 10 <sup>-10</sup> (Pa.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )
Explosividad	No explosivo
Fotólisis (días; pH=5)	4 hrs
Tiempo de vida media (hidrólisis)	pH = 7; Estable
Coeficiente n-octanol/agua	0,57 Log Kow
Solubilidad en agua	610 mg.l <sup>-1</sup>

Fuente: PPDB, 2018

El imidacloprid presenta un baja tendencia a ser absorbida por partículas del suelo debido a su alta solubilidad en agua y bajo Koc; por otro lado, presenta alta posibilidad de lixiviación ya que presenta un índice de 3,74 acorde con la ecuación de Gusstaffson (GUS) (Spadotto *et al.*, 2002). Estudios han probado que el imidacloprid tiene una persistencia media en el suelo de 27 a 229 días (Miles, 1993), su vida media en el suelo depende del tipo de suelo, del uso de fertilizantes orgánicos y de la presencia o ausencia de cobertura en la tierra (DT<sub>50</sub> 48 días frente a 190 días sin vegetación) (Turner, 2013). El proceso de degradación ocurre en dos fases, primero se produce el ácido 6-cloronicotínico y luego dicho metabolito es mineralizado hasta bióxido de carbono.

La constante de Henry del imidacloprid es de  $1,7 \times 10^{-10} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ , por lo cual se le considera no volátil y presenta alta solubilidad ( $610 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en agua.

Su vida media en el agua es mayor de 31 días a distintos valores de pH. En las plantas puede ser transportado por el tallo antes de ser metabolizado hasta los brotes. En el metabolismo de los tejidos vegetales primero pierde el grupo nitro y luego, por reacciones de hidroxilación en el anillo imidazolidino e hidrólisis, se forma el ácido 6-cloronicotínico y varios compuestos conjugados. Presenta un potencial de bioconcentración bajo en organismos acuáticos (Raymond-Delpech y Matsuda, 2005).

### ***Modo de Acción***

El imidacloprid actúa por contacto e ingestión bloqueando los receptores e interrumpiendo la transmisión de impulsos de entre las células nerviosas; éste actúa sobre el sistema nervioso central y periférico de los insectos, interfiriendo la membrana nerviosa, causando el bloqueo irreversible de los canales de sodio y receptores de acetil colina de tipo nicotínico (Cox *et al.*, 1998). La intoxicación es poco común en mamíferos, ya que estos son poco sensibles al neocotinoide, por lo cual se necesitarían altas dosis.

### ***Toxicidad en especies Acuáticas***

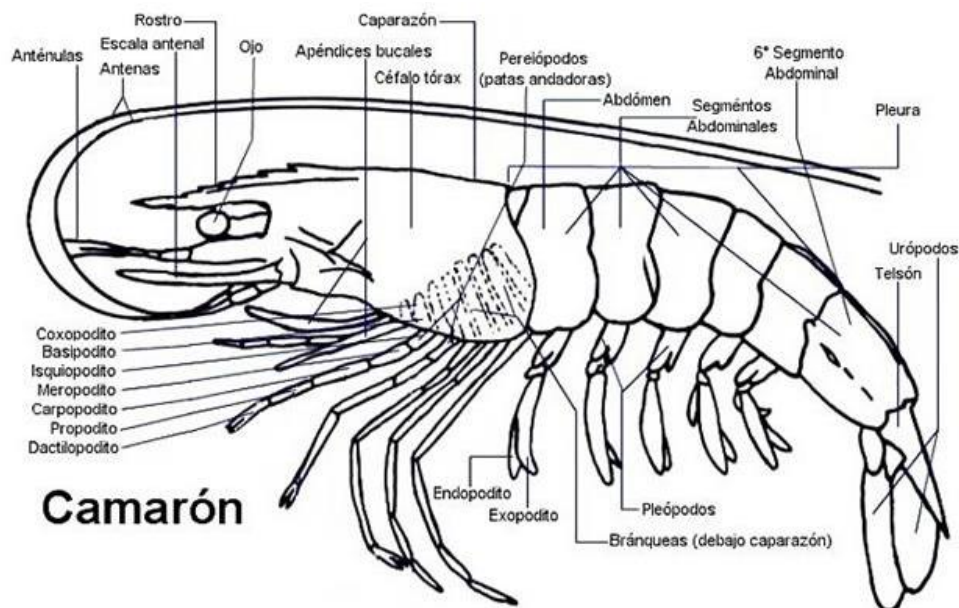
Un estudio reciente de los científicos Wood y Goulson (2017), revelaron que los análisis sobre la sensibilidad de los organismos acuáticos a los neonicotinoides muestran que muchas especies de insectos acuáticos tienen una sensibilidad a estos compuestos varias órdenes de magnitud por encima que los organismos del modelo tradicional que se emplea en las evaluaciones reglamentarias para el uso de plaguicidas, como por ejemplo la pulga de agua (Chahil *et al.*, 2015).

#### **2.4. Camarón de río - *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782)**

##### **a. Aspectos Morfológicos**

Esta especie es un artrópodo del orden de los decápodos, de la familia Palaemonidae del género *Cryphiops*. Es un animal robusto, de abdomen largo, rostrum con cresta dorsal adornada por fila de 6 a 7 dientes gruesos,

puede tener dientes (a lo largo del borde ventral) o no presentarlos (Jara, 1994). Su primer y segundo par de patas caminadoras presenta una quela o tenaza terminal, siendo el segundo par más grande, con una de las dos patas opuestas más grande (Jara, 1994). En el macho se evidencia un dimorfismo sexual al tener el segundo par de patas diferente al de la hembra, ya que estos presentan mayor anchura de los extremos del segundo segmento abdominal, en cuanto a la relación cefalotorácica y proporción a la longitud del abdomen (Castro, 1966) en comparación con el de las hembras que son del mismo tamaño. El espécimen macho más grande registrado en la literatura alcanzó 7 mm (Jara, 1994). A continuación se presenta en la Figura 3 la morfología del camarón de río.



Fuente: IMARPE, 2007

**Figura 2 .** Morfología del camarón de río, *Cryphiops caementarius*.



### ***b. Distribución geográfica***

Camarón *C. caementarius*, es una especie endémica de los ríos de la costa del Perú (desde Lambayeque al sur) y del norte de Chile, el cual tiene una alta demanda comercial (IMARPE, 2007). Según la evaluación poblacional del Camarón *C. caementarius* en ríos de la Costa Sur del Perú la cual viene siendo realizada desde el año 1996 por el IMARPE, establece que la distribución geográfica del camarón de río se encuentra en la zona comprendida entre los 10° y 30° L.S. y mencionan que los ambientes dulceacuícolas de la Vertiente Occidental de los Andes y los de la Vertiente Oriental tienen camarones. Sin embargo, estos prefieren los ambientes lóticos que surcan transversalmente la costa, por lo cual indican mayor densidad en la zona sur, estimándose que aproximadamente el 80% del recurso se distribuye en el río Arequipa (Wasiw y Yépez, 2015), presentando las más altas poblaciones de este crustáceo principalmente en Ocoña, Majes, Camaná y Tambo, debido a que estos ríos llevan mayor caudal de agua. En cuanto a su distribución altitudinal, han sido hallados entre el nivel del mar y los 1400 msnm en el río Pativilca. (Wasiw y Yépez, 2015).

### ***c. Hábitat***

El camarón de río al ser un artrópodo dulceacuícola, vive en aguas dulces ya sean éstas ríos o riachuelos, en las cuales se hallan en las partes profundas entre las piedras durante el día y en las noches para buscar alimento, se desplazan a lugares de menor profundidad, (Vila y Bahamonde, 1971), es por esto que las capturas se realizan de noche. Suelen refugiarse en el interior de

las cuevas que construyen con limo o arcilla entre las piedras, huecos y hierbas, dejando sobresalir las antenas y quelas durante el día. Cabe mencionar que, los camarones adultos suelen encontrarse en zonas de mayor profundidad, mientras que los juveniles en zonas más someras, como bordes de los ríos u orillas de estos. Asimismo, el camarón de río convive con otras especies como pejerreyes y lisas.

Durante la mayor parte del año los ejemplares adultos de mayor tamaño suelen permanecer en los estratos altitudinales superiores, mientras que los machos maduros e inmaduros, ejemplares juveniles y hembras inmaduras se presentan con mayor cantidad en zonas medias y altas de las cuencas de los ríos. Asimismo, las hembras que portan huevos y las maduras se distribuyen mayormente en zonas cercanas a la desembocadura y zonas bajas del río, presentando una mayor concentración en los últimos 30 km que es donde se produce la eclosión de los huevos (Castro, 1966).

Las mayores concentraciones de larvas se encuentran en las desembocaduras de los ríos, debido a una afinidad a la salinidad por parte de este estadío, posteriormente es que estas van subiendo al río, es así que a mayor altura menor abundancia y viceversa, sin embargo a mayor altura se manifiestan de mayor tamaño (SERNAPESCA, 1996).

#### ***d. Alimentación***

En líneas generales esta especie presenta una alimentación omnívora. Rudolph (1984), afirma que soporta muy bien condiciones de cautiverio aceptando diferentes tipos de alimento como vísceras de pollo, harina de

pescado, crustáceos, lisa, carpas, lombrices de tierra, insectos, carne de pescado y vacuno, entre otros. Asimismo, García-Huidobro (1995), señala que las preferencias alimenticias están ligadas al estadio de la especie. Es así que las larvas son fitófagas y zooplanctófagas, los juveniles son fito y zooplanctófagos e incluso dentritívoros, y los adultos son depredadores y dentritívoros de algas, insectos acuáticos, moluscos e incluso de su misma especie.

#### ***e. Aspectos Reproductivos***

Presentan dimorfismo sexual marcado; los machos que son los de mayor tamaño presentan el orificio genital al nivel del quinto par de patas, mientras que las hembras de menor tamaño, presentan el orificio genital al nivel del tercer par de patas (IMARPE). Ambos sexos presentan diferencias en el tamaño en el segundo par de patas, como fue mencionado en la morfología.

Los machos suelen aparearse con alrededor de 10 hembras (poligamia), son territoriales y realizan mudas (ecdisis) con la finalidad de crecer despojándose de su caparazón durante todo su ciclo de vida dependiendo de la disponibilidad de alimento y las temperaturas adecuadas.

Para la reproducción, la mayoría de los ejemplares migran hacia la desembocadura de los ríos y liberan las larvas en los estuarios; las hembras son fertilizadas después de la muda. Los huevos son pequeños, de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, los cuales varían de acuerdo al tamaño de las hembras: de 1 000 a 3 000 huevos en las hembras medianas (13 mm), de 10 a 15 000 huevos en hembras medianas (26 mm) y hasta 67

000 en las hembras más grandes (36 mm). Los huevos son llevados durante 15 a 21 días (depende de la temperatura) por la hembra en una especie de incubadora formada por las pleuras abdominales. Y según Gesam Consultores, (2006), después de la fertilización los machos mueren. El periodo de incubación es desconocido, luego de éste tiempo las larvas de vida pelágica eclosionan y migran aguas arriba. En el caso de las hembras no lleguen al mar, las larvas son liberadas en agua dulce. Asimismo, se han encontrado larvas de esta especie en el mar, sin embargo, se desconoce la cantidad o proporción que regresan al río una vez completada la vida larvaria (Jara, 1994).

#### ***f. Estadios Larvarios***

La primera parte de la vida larvaria transcurre en las zonas donde el agua del mar y los ríos se mezclan (estuarios). Alcanzan su mayor actividad reproductiva entre los meses de diciembre y marzo, la que coincide con la estación de avenidas y periodo en el que el R.M. N.º 312-2006-PRODUCE decreta veda para su captura.

Desde el momento de la eclosión hasta el cuarto estadio, la larva de *C. caementarius* pasa por tres mudas (Castro, 1966): el primer estadio larvario (1 – 3 días) tiene una longitud de alrededor de 2 mm, presenta cuerpo, con tres a 4 cromatóforos pequeños de color rojo brillante y dentritas largas entre la unión del ojo y el borde orbitario del rostrum; el segundo estadio larvario (4 – 15 días) tiene una longitud de alrededor de 2,30 mm, con un solo cromatóforo rojo brillante y largas dentritas en el pedúnculo antenular; el tercer

estadio larvario (16 – 21 días), tiene una longitud de 2,4 a 2,8 mm y presenta numerosos cromatóforos de color amarillo y rojo en todo el cuerpo; y finalmente el cuarto estadio larvario (21 días), tienen una longitud de 2,8 a 3 mm con un cromatóforo pequeño de color rojo brillante y con largas dentritas en el pedúnculo ocular en el que se encuentran cuatro cromatóforos pequeños. En todos los estadios mencionados, el camarón presenta color transparente.

Una vez terminado el estadio larval, alcanzan su primera madurez convirtiéndose en post-larvas con aproximadamente 2 cm, las cuales empezaran a migrar a contra corriente, río arriba (reotaxia negativa) para completar su desarrollo.

### ***2.5. Evaluación de Riesgo Ambiental***

Las pruebas ecotoxicológicas o bioensayos son usadas para la conservación a través de las Evaluaciones de Riesgo Ambiental (ERA), en las cuales se calcula la probabilidad de que se presenten efectos negativos en los ecosistemas y sus componentes biológicos debido a actividades específicas realizadas por el hombre (Romero y Cantú, 2008). Este tipo de estudio es usado por las autoridades en varios países para tomar decisiones de manejo ambiental así como identificar valores de interés, los contaminantes más importantes y los vacíos de información. Asimismo, constituye una herramienta esencial para respaldar la toma de decisiones de una manera científica en un vasto rango de disciplinas (como la regulación de las

sustancias químicas), gracias a que puede estimar la magnitud y probabilidad de un evento (Villa *et al.*, 2003).

Cabe resaltar que la exposición a la sustancia, los efectos resultantes y los organismos expuestos, son factores importantes para la valoración de riesgo de una sustancia con potencial nocivo. De esta forma, la valoración del riesgo ambiental se puede definir como “la valoración cuantitativa de la probabilidad de que se verifique un cierto efecto ambiental como resultado de la exposición a una sustancia contaminante” (Vighi y Calamari, 1996). Para su correcta valoración se deberá valorar factores intrínsecos a la sustancia a probar, como factores extrínsecos dependientes de las características de las emisiones o de las propiedades ambientales (Peña *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la caracterización de la exposición y de los efectos de dicha exposición de manera integrada, son los puntos en los cuales está basada la evaluación del riesgo.

#### **a. Caracterización de la exposición y el riesgo**

La caracterización de la exposición se comprende como la interacción o contacto entre el patógeno o factor estresante y el componente ambiental receptor (Encina y Díaz, 2001). Debido a la poca disponibilidad de datos se usan modelos para procesar la información extraída, los más desarrollados son los que describen el transporte y la transformación de contaminantes específicos liberados al ambiente. Asimismo, se podrían emplear numerosos análisis sistemáticos de las concentraciones ambientales en caso de existir información suficiente (PNUMA/IPCS, 1999). La caracterización del riesgo

responde a la identificación de los efectos adversos causados por la capacidad de una sustancia, la estimación de la Concentración sin Efecto observado (recogida de datos ecotoxicológicos) y la predicción de un nivel por encima del cual es probable que ocurra un efecto adverso mediante la aplicación de un factor de valoración o seguridad (PNUMA/IPCS, 1999).

El agua es uno de los recursos que presenta más riesgo de contaminación por plaguicidas, especialmente donde la agricultura es intensiva; es por esto que es necesaria la identificación aproximada del tipo y destino ambiental de dichas sustancias.

***b. Procedimiento general para la caracterización del  
Riesgo Ambiental***

Según Sánchez (2008), en muchos casos, tras la emisión por accidente de un compuesto químico al medio ambiente, trae consigo daños ecológicos evidentes; pero en otros casos la presencia de niveles bajos de contaminantes ocasiona efectos a largo plazo, ya que, a ciertos niveles, estos son difíciles de identificar. Expone también, que la ERA consta de dos pasos básicos: la evaluación de los niveles de exposición a los cuales están sometidos los organismos en estudio, así como su duración y, la evaluación de los efectos producidos en los mismos.

Según la Unión Europea como cita Arrázola (2016), consiste en cuatro pasos: identificación de la amenaza, evaluación dosis-respuesta, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

La metodología a seguir en el presente estudio será la establecida según la directiva OCDE N° L 161/9 (1994), la cual comprende tres fases:

### ***Evaluación de la relación concentración efecto (PNEC)***

La información existente que podría ser útil para predecir los efectos en el ecosistema, son limitados para la mayoría de las sustancias, en estas circunstancias, es necesario el empleo de factores de evaluación derivados empíricamente para poder predecir un nivel por encima del cual es probable que ocurra un efecto adverso en el medio ambiente, lo que no descarta la posibilidad que por debajo de este nivel la sustancia es segura. El objetivo es establecer una concentración umbral sin efecto adverso para diferentes grupos de organismos receptores representativos del medio al que esté dirigido el estudio, la cual, si no se excede asegura una protección general del medio ambiente. Se puede hacer una extrapolación a partir de los datos de toxicidad a corto plazo de una sola especie a los efectos del ecosistema, por lo que se asume que la sensibilidad del ecosistema depende de las especies más sensibles, y que proteger la estructura del ecosistema protege la función de la comunidad.

Normalmente se calcula empleando los valores de  $CL_{50}$ ,  $EC_{50}$ , LOEC y NOEC, entre otros, los cuales se dividen por constantes definidas arbitrariamente (10-100-1000). Esta magnitud va a depender del nivel de conocimiento del sistema, entre mejor se conozca el sistema, la magnitud es menor; este valor es conocido como “factor de evaluación” o de seguridad que



ya se encuentra establecido según el organismo y medio en el que se esté trabajando. (Nikinmaa, 2014).

De esta manera el factor de 1000 que se emplea para datos de toxicidad aguda, es sumamente conservador, y este supone que cada una de las incertidumbres identificadas, contribuye de manera significativa a la incertidumbre general. Por otro lado, el factor 50 es empleado para datos de toxicidad crónica para diferentes grupos taxonómicos; y finalmente el factor de 10 para datos de toxicidad crónica en tres especies de tres grupos taxonómicos distintos. (PNUMA/IPCS, 1999).

### ***Evaluación de la Exposición (PEC)***

Hallar la concentración que va a alcanzar la sustancia en el medio ambiente (aire, agua o suelo), es uno de los pasos a seguir dentro de la caracterización del riesgo ambiental. De manera similar para la PNEC, para las sustancias nuevas no existe información suficiente disponible, por lo tanto, las concentraciones esperadas en el medio estudiado deben ser estimadas. Esta estimación no siempre depende de la realización de modelamientos, sino que son estimadas mediante la recopilación de datos sobre los niveles de concentración medidos en diferentes compartimentos ambientales para varias sustancias o, en muchos casos a partir de estos se obtiene un rango de concentraciones, las cuales pueden tener cierta incertidumbre asociada a las diferencias espaciales y temporales.

El primer paso para el cálculo de la PEC es la evaluación de la información primaria, luego se debe estimar la velocidad de liberación de la sustancia en función de su uso. Deben identificarse y analizarse todas las fuentes

potenciales de emisión y los compartimentos ambientales receptores (suelo, agua, aire, etc). Esto se logra considerando las posibles rutas de exposición y procesos bióticos y abióticos de transformación. La cuantificación de la degradación y distribución de la sustancia conduce a una estimación del  $PEC_{local}$  y  $PEC_{regional}$ .

La  $PEC_{local}$  representa la concentración esperada a cierta distancia de la fuente en un día en que ocurre la descarga y es calculada sobre la base de una tasa de liberación diaria, independientemente si la descarga es continua o intermitente. En cambio la  $PEC_{regional}$  toma en cuenta la distribución adicional y el destino del químico al momento de su liberación. Asimismo, proporciona una concentración de fondo para el cálculo de la  $PEC_{local}$  (EU Commission. (2003).

En el capítulo 2.4. Plaguicidas, se mencionan las características fisicoquímicas del fipronil e imidacloprid que usualmente son empleadas para la determinación de la PEC. Asimismo, se menciona cómo éstas están relacionadas con el impacto del medio ambiente.

### ***Caracterización del riesgo***

El riesgo medioambiental de una sustancia viene expresado por la relación entre  $PEC/PNEC$  también llamado cociente de riesgo (QR). Si el cociente de riesgo es  $\leq 1$ , no se requieren más estudios sobre el compuesto, asumiendo que el riesgo para el medio ambiente es bajo. Si, por el contrario, QR es  $> 1$  se necesitarían realizar estudios a más profundidad (De la Torre *et al.*, 2004).

## 2.6. *Legislación y Normativa*

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), maneja la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA), la cual prevé la regulación federal de la distribución venta y uso de los pesticidas. Todos los pesticidas distribuidos o vendidos en los Estados Unidos deben estar registrados por la EPA. A esto se le agrega el hecho de demostrar que el uso del pesticida no causa generalmente efectos adversos innecesarios en el medio ambiente. Asimismo, a través de la Directiva 91/414/EEC de la Comisión Europea, se proponen normas uniformes en materia de evaluación, autorización, comercialización y control dentro de la Unión Europea (UE) de productos fitosanitarios y de las sustancias activas que contienen, de las cuales únicamente están autorizadas las que figuren en la lista del Anexo I de la Directiva y que, si se utilizan en condiciones normales, no presentan riesgos para la salud humana o animal ni para el medio ambiente.

Actualmente, en el Perú las normas vienen dadas bajo el Reglamento para reforzar las Acciones de Control Post Registro de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola, aprobado mediante D.S. N° 008-2012-AG. Dicho decreto, tiene por objetivo el refuerzo del control post registro, para de esta manera minimizar los daños a la salud y el medio ambiente por el uso de plaguicidas, en el marco de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), como refiere Arrázola (2016). Seguidamente, en el año 2015 el MINAGRI aprobó el reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola mediante D.S N° 002-2015-MINAGRI, siendo su objetivo la prevención y protección de

la salud humana y el ambiente; de igual manera, orienta el uso y el manejo adecuado de los productos químicos durante todo su ciclo de vida.

Asimismo, existe el Manual Técnico Andino para el Registro de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola, el cual fue aprobado mediante Resolución N° 630 en el año 2002 por la Secretaría General de la Comunidad Andina, la cual debe ser aplicada en los países miembros. Este manual busca establecer criterios, métodos, protocolos y procedimientos de evaluación, así también como asegurar que los plaguicidas antes de ser distribuidos y comercializados, cumplan con estándares aceptables. Asimismo, el documento presenta un enfoque de los principios fundamentales para el análisis del riesgo ambiental presentado por la FAO, y ofrece algunas guías para los procedimientos de evaluación del riesgo ambiental, tomadas por la EPA y la Comunidad Europea.

Para el año 2009, el Ministerio del Ambiente (MINAM), desarrolló un Guía para la Evaluación de los Riesgos Ambientales, donde la evaluación es realizada en tres dimensiones: social, económica y ambiental. Asimismo ha establecido categorías de toxicidad de sustancias químicas para la ecología, utilizando el criterio de la CL<sub>50</sub> en aves, mamíferos y especies acuáticas. Esta herramienta ayuda a determinar el nivel de riesgos ambientales de un área de estudio para luego implementar acciones en base a los estudios previos.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1. Hipótesis

##### Hipótesis Principal

- **(H<sub>+</sub>)**: Los insecticidas fipronil e imidacloprid en el camarón de río (*Cryphiops caementarius*) representan riesgo ambiental significativo.
- **(H<sub>0</sub>)**: Los insecticidas fipronil e imidacloprid en el camarón de río (*Cryphiops caementarius*) no representan riesgo ambiental significativo.

##### Hipótesis Específicas:

- **(H<sub>a+</sub>)**: La concentración letal (CL<sub>50</sub>) hallada demuestra que existe un impacto significativo en la mortalidad del camarón de río (*Cryphiops caementarius*).
- **(H<sub>a0</sub>)**: La concentración letal (CL<sub>50</sub>) hallada demuestra que no existe un impacto significativo en la mortalidad del camarón de río (*Cryphiops caementarius*).
- **(H<sub>b+</sub>)**: Los efectos subletales (NOEC y LOEC) demuestran que existe toxicidad ante la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas Fipronil e Imidacloprid.

- **(Hb<sub>0</sub>):** Los parámetros subletales (NOEC y LOEC) demuestran que no existe toxicidad ante la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas Fipronil e Imidacloprid.
  
- **(Hc<sub>+</sub>):** El cociente de riesgo de la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas Fipronil e Imidacloprid es mayor a 1.
  
- **(Hc<sub>0</sub>):** El cociente de riesgo de la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas Fipronil e Imidacloprid es menor a 1.

## 2. Objetivos

### Objetivo Principal

- Evaluar el riesgo ambiental de los insecticidas fipronil e imidacloprid en el Camarón de Río (*Cryphiops caementarius*).

### Objetivos Específicos

- Determinar la concentración letal (CL<sub>50</sub>) de los insecticidas fipronil e imidacloprid en el camarón de río (*C. caementarius*).
  
- Definir los efectos subletales (NOEC y LOEC) de la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas fipronil e Imidacloprid.

- Estimar el cociente de riesgo de la exposición del camarón de río (*C. caementarius*) a los insecticidas fipronil e imidacloprid en el ambiente acuático

## IV. METODOLOGÍA

### 1. Tipo y Diseño

El nivel de investigación del presente estudio es explicativo, ya que se va a estudiar el efecto de dos tóxicos (insecticidas) sobre una especie expuesta, dando así una relación de causa efecto, es por eso que se espera obtener resultados que permitan resolver este vacío bibliográfico.

En cuanto a los diseños que se rige el proyecto, será de carácter experimental, ya que se van a manipular las variables independientes como es el caso de la concentración de los pesticidas; longitudinal porque existe el interés en analizar cambios a través del tiempo en determinadas variables (mortalidad, nado extraño, entre otras). Y se usará un diseño prospectivo, según el tiempo de ocurrencia de los hechos ya que se obtendrán datos desde un tiempo cero en adelante.

En base a lo expuesto líneas arriba, de acuerdo con “El Código de Ética en la Investigación” establecida por la Universidad en el año 2017, se siguieron los lineamientos para la realización de buenas prácticas en el proceso de la presente investigación, las cuales aseguran las máximas exigencias de rigor, honestidad y responsabilidad de los involucrados en el proceso. Asimismo, de acuerdo a la naturaleza de la presente investigación, en la cual se han involucrado animales y biodiversidad, en base al “Reglamento del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad”, se cumplieron con las obligaciones, funciones y procedimientos establecidos en éste.



## 2. Metodología

Para la realización de la presente investigación, se usó como referencia la metodología expuesta en “*Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1045 Penaeid Acute Toxicity Test*” (2016), en la cual se presenta un compendio de metodologías y protocolos científicos aceptados desarrollado por la Oficina de Prevención, Pesticidas y Sustancias Tóxicas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) para su uso en la prueba de pesticidas y sustancias tóxicas, así como el procesamiento de los resultados obtenidos en especies de *penaeidos*, la cual es la más cercana a la especie materia del presente proyecto (camarón de río), la cual fue sometida a distintas concentraciones de dos pesticidas (fipronil e imidacloprid) para evaluar la toxicidad de estos en dicha especie. Asimismo, se usó como referencia guías afines a ésta, como la “*Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP850.1020 Gammarid Amphipod Acute Toxicity Test*” (2016) y “*Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1010 Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids*” (2016). Cabe mencionar que la “Office of Chemical Safety and Pollution Prevention” (OCSPP) desarrolla estas guías destinadas a proporcionar información para la toma de decisiones reglamentarias en virtud de la “Toxic Substance Control Act” (TSCA), “Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act” (FIFRA) y/o “Federal Food, Drug, and Cosmetic Act” (FFDCA).

La evaluación del Riesgo Ambiental se implementó en base a los lineamientos planteados en el “*Manual Técnico Andino para el Registro de Plaguicidas*”

*Químicos de Uso Agrícola*”, el cual fue aprobado mediante Resolución N° 630 en el año 2002 por la Secretaría General de la Comunidad Andina; el cual establece entre sus objetivos buscar establecer criterios, métodos, protocolos y procedimientos de evaluación, así también como asegurar que todos los plaguicidas cumplan con estándares aceptables antes de ser distribuidos y comercializados. Y, la “*Guía Técnica para la Evaluación de Riesgos*” establecida por la Comisión Europea, la cual sirve de orientación técnica y para la evaluación de los riesgos de las sustancias químicas para la salud humana y el medio ambiente mediante una serie de fórmulas y procedimientos basados en la información proveniente de los bioensayos.

### **2.1. Modelo Biológico**

La especie objeto del bioensayo fue el camarón de río (*C. caementarius*) en su estadio de postlarva, las cuales tuvieron un tamaño estándar de 15 mm aproximadamente en promedio. Las postlarvas fueron obtenidas de su ambiente natural del río Cañete en el distrito de Calango por un pescador autorizado por el gremio de pescadores de la zona, debido que la reproducción de dicha especie en ambientes controlados no resulta rentable para su comercialización.

Las postlarvas fueron aclimatadas en los laboratorios de larvicultura de la Universidad Científica del Sur (UCSUR) dos semanas antes del inicio de los bioensayos siguiendo el siguiente esquema: cerca de 1000 postlarvas se mantuvieron en un contenedor de 750 L de capacidad con aireación

constante a una temperatura promedio de  $21 \pm 2$  °C, recibieron de alimento hígado de pollo precocido cada 24 h para evitar la muerte de los organismos y se le cambió de agua diariamente mediante sifoneo con agua de clorada con tiosulfado de sodio. Asimismo, fueron medidos, antes de la ejecución del bioensayo, para utilizar ejemplares de una talla promedio de 15 mm.

## **2.2. *Parámetros fisicoquímicos del medio.***

Se midieron seis parámetros durante la climatización y durante los bioensayos, como el pH, temperatura (°C), oxígeno disuelto (%) y conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) del medio en los controles y sus respectivas repeticiones con ayuda de un multiparámetro YSI Professional Plus, el cual tiene un electrodo de medición que se introduce en el medio acuoso donde se desea medir cada parámetro, seguidamente se procedió a enjuagar el electrodo con agua para evitar alterar las siguientes mediciones, asimismo se llevó un control mediante la toma de datos. El multiparámetro fue proporcionado por los laboratorios de larvicultura de la Universidad Científica del Sur (UCSUR).

Cabe mencionar que las mediciones de los parámetros mencionados durante los bioensayos sólo se realizaron en los controles para evitar la contaminación del electrodo con insecticida, ya que este es utilizado por la facultad para otros fines.

### 2.3. *Bioensayos*

Los bioensayos de toxicidad aguda se realizaron en el laboratorio de investigación de la UCSURS de forma individual para cada insecticida. Asimismo, se realizaron pruebas de hipo actividad natatoria (hNPL); para ello se fijaron concentraciones basadas en la bibliografía existente empleando concentraciones madre para poder obtener las concentraciones requeridas.

#### *a. Fipronil - Regent SC 250 g/L*

Se establecieron cinco concentraciones de fipronil ( $0,10 \mu\text{g.l}^{-1}$ ;  $0,26 \mu\text{g.l}^{-1}$ ;  $0,64 \mu\text{g.l}^{-1}$ ;  $1,6 \mu\text{g.l}^{-1}$  y  $4 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) y un control con cuatro repeticiones cada una; las cuales estuvieron basadas en la bibliografía mencionada en los antecedentes. Para la elaboración de las concentraciones, se preparó una solución madre utilizando 1,334 ml del insecticida para la obtención de la máxima concentración ( $4 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), y partir de ésta se realizó un plan de dilución para obtener las otras cuatro concentraciones. Cabe mencionar que el agua empleada se decloró con Nutrafin Aqua Plus®.

De acuerdo a la obtención de cada concentración se fueron colocando 2 L de dilución en contenedores de 3 L de capacidad, los cuales se encontraban conectados a un sistema de aireación constante en serie independiente para cada concentración con sus respectivas válvulas en

cada repetición. Luego se colocaron 10 ejemplares de post larvas en cada uno de los contenedores las cuales fueron debidamente climatizadas.

La duración del ensayo fue de 96 h, en donde se alimentaron a las post larvas de camarón cada 48 h con arroz cocido para evitar la muerte por canibalismo. Las mediciones de mortalidad e hNPL se realizaron a las 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición; los organismos fueron considerados muertos ante la ausencia total de movimiento durante dos minutos aproximadamente luego de ser tocados gentilmente con la ayuda de un paliglobo. Asimismo, la hipoactividad natatoria fue considerada ante falta de desplazamiento, falta de lucha, reacción a estímulos mecánicos brindados, sin reacción y síntomas de aletargamiento; y finalmente la actividad natatoria post larval normal fue considerada ante la búsqueda de alimento, desplazamiento en toda la columna de agua y reacción rápida a estímulos mecánicos brindados.

Cabe mencionar que los organismos muertos fueron retirados en cada medición y que las soluciones empleadas inicialmente fueron desechadas en contenedores de sustancias tóxicas del laboratorio para su adecuada disposición final.

Al finalizar el bioensayo para el fipronil, de acuerdo a la pronta mortalidad se decidió repetir el experimento con dos concentraciones subsecuentes a las establecidas en principio ( $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  y  $0,04 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) y un control. Se realizó bajo el mismo esquema explicado anteriormente.

### ***b. Imidacloprid - Imidamin 350 g/L***

Se establecieron cinco concentraciones de imidacloprid (28,8  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ; 71,9  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ; 179,8  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ; 449,6  $\mu\text{g.l}^{-1}$  y 1124  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) y un control con cuatro repeticiones cada una; las cuales estuvieron basadas en la bibliografía mencionada en los antecedentes. Para la elaboración de las concentraciones, se realizó una solución madre utilizando 13,33 ml del insecticida para la obtención de la máxima concentración (1124  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), y partir de ésta se realizó un plan de dilución para obtener las otras cuatro concentraciones. Cabe mencionar que el agua empleada se dechloró con Nutrafin Aqua Plus®.

De acuerdo a la obtención de cada concentración se fueron colocando 2 l de dilución en contenedores de 3 l de capacidad, los cuales se encontraban conectados a un sistema de aireación constante en serie independiente para cada concentración con sus respectivas válvulas en cada repetición. Luego se colocaron 10 ejemplares de post larvas en cada uno de los contenedores las cuales fueron debidamente climatizadas.

La duración del ensayo sobre *C. caementarius* fue de 96 h, en donde se alimentaron a las post larvas de camarón cada 48 h con arroz cocido para evitar la muerte por canibalismo. Las mediciones de mortalidad e hNPL se realizaron a las 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición; los organismos fueron considerados muertos ante la ausencia total de movimiento durante 2 minutos aproximadamente luego de ser tocados gentilmente con la ayuda de un paliglobo. Asimismo, la hipoactividad natatoria fue considerada ante falta de desplazamiento, falta de lucha,

reacción a estímulos mecánicos brindados, sin reacción y síntomas de aletargamiento; y finalmente la actividad natatoria post larval normal fue considerada ante la búsqueda de alimento, desplazamiento en toda la columna de agua y reacción rápida a estímulos mecánicos brindados.

Cabe mencionar que los organismos muertos fueron retirados en cada medición y que las soluciones empleadas inicialmente fueron desechadas en contenedores de sustancias tóxicas del laboratorio para su adecuada disposición final.

#### ***2.4. Análisis de datos y Evaluación del Riesgo Ambiental***

Se establecieron los porcentajes de mortalidad de acuerdo a las concentraciones y tiempos de exposición para poder establecer si existe una relación directa entre estos antes de delimitar los parámetros correspondientes.

Las concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ) fueron determinadas usando el programa Probit versión 1.5 con un nivel de confianza al 95% y el modelo de regresión fue verificado con el estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Asimismo, los parámetros LOEC y NOEC fueron calculados con el programa estadístico Past 3.2 mediante las pruebas de Krustal-Wallis para establecer las diferencias significativas entre las soluciones problema y los tiempos de exposición y Mann-Withney para la determinación de los rangos de los parámetros mencionados. Todas las pruebas fueron aplicadas

independientemente para la mortalidad e hipoactividad natatoria post-larval.

Una vez hallados los parámetros toxicológicos se procedió a evaluar el riesgo y la toxicidad mediante los siguientes pasos.

**a. Evaluación de la relación concentración – efecto (PNEC)**

El objetivo fue hallar la concentración prevista sin efecto conocido (PNEC) que corresponde normalmente al valor de CL<sub>50</sub>, LOEC, NOEC, etc., derivados de los resultados de los ensayos de toxicidad. A este parámetro se le aplicó el citado anteriormente “Factor de Evaluación” o seguridad. Se usó el factor de valoración establecido para ensayos de toxicidad aguda en una especie o más, el cual será de 1000, el cual es sumamente conservador y protector, y está diseñado para tratar de detectar todas las sustancias que puedan causar efectos adversos, a través de la evaluación. Asimismo, supone que cada una de las incertidumbres identificadas contribuye de manera significativa a la incertidumbre general (PNUMA/IPCS, 1999).

$$PNEC = \frac{\text{Dato de toxicidad más sensible}}{\text{Factor de valoración}}$$



### ***b. Evaluación de la Exposición (PEC)***

Se emplearon los estándares de calidad ambiental de la legislación extranjera existente como referencia para los insecticidas fipronil e imidacloprid, con el fin de emplearla como la concentración esperada en el medio (PEC), este mecanismo adoptado representa el escenario más conservador.

Se tomó a la legislación ambiental enmarcada para los Países Bajos y Alemania en la actualidad, en la cual los estándares de calidad ambiental (EQS, por sus siglas en inglés) son expresados en dos tipos de estándares. Uno es un Estándar de Calidad Ambiental (EQS) a largo plazo, expresado como una concentración promedio anual (AA-EQS) y normalmente se basa en datos de ecotoxicidad crónica; esta norma tiene como objetivo proteger el ecosistema contra los efectos adversos resultantes de la exposición a largo plazo. El otro es un estándar que tiene como objetivo proteger el ecosistema de picos de concentración a corto plazo, denominado EQS de (MAC-EQS) y basado en datos de ecotoxicidad aguda (EC, 2011).

### ***c. Caracterización del Riesgo (PEC/PNEC)***

Finalmente, se calculó el “cociente de riesgo” mediante la siguiente ecuación:

$$RQ = \frac{PEC_{agua}}{PNEC_{organismos acuáticos}}$$

Si la PEC mayor que la PNEC se considera que la sustancia es de bajo riesgo, mientras que cuando el cociente  $PEC/PNEC > 1$ , se identifica un riesgo que aumenta a medida que dicho valor va subiendo (De la Torre *et al.* (2004).

## V. RESULTADOS

### 1. Pruebas de Toxicidad Aguda: Mortalidad e Hipoactividad natatoria (hNPL)

En términos de mortalidad e hNPL, el fipronil presentó un mayor porcentaje llegando al 100% a las 48 h, mientras que el imidacloprid llegó al 87,5% y 100% para mortalidad e hNPL respectivamente, como se muestra en la Tabla 4 y Tabla 5.

**Tabla 4 .** Porcentaje de mortalidad y parámetros subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Parámetros		
	Concentración ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Mortalidad (%)	hNPL (%)
3 h	Control	0	0
	0,02	0	0
	0,04	0	0
	0,1	0	12,5
	0,26	7,5	32,5
	0,64	17,5	95
	1,6	47,5	100
	4	85	100
8 h	Control	0	0
	0,02	0	7,5
	0,04	0	22,5
	0,1	0	32,5
	0,26	27,5	92,5
	0,64	55	100
	1,6	65	100
	4	100	100
24 h	Control	0	0
	0,02	45	82,5
	0,04	52,5	92,5
	0,1	57,5	100
	0,26	100	100
	0,64	100	100
	1,6	100	100
	4	100	100
48 h	Control	2,5	2,5
	0,02	75	100
	0,04	97,5	100
	0,1	100	100
	0,26	100	100
	0,64	100	100
	1,6	100	100
	4	100	100
72 h	Control	5	5
	0,02	100	100
	0,04	100	100
	0,1	100	100
	0,26	100	100

Tiempo de exposición (h)	Parámetros		
	Concentración ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Mortalidad (%)	hNPL (%)
	0,64	100	100
	1,6	100	100
	4	100	100

**Tabla 5 .** Porcentaje de mortalidad y parámetros subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Parámetros		
	Concentración ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Mortalidad (%)	hNPL (%)
<b>3 h</b>	Control	0	0
	28,8	0	0
	71,9	0	0
	179,8	0	42,5
	449,6	0	62,5
	1124	5	65
<b>8 h</b>	Control	0	0
	28,8	0	2,5
	71,9	0	10
	179,8	0	50
	449,6	0	82,5
	1124	5	85
<b>24 h</b>	Control	0	0
	28,8	0	52,5
	71,9	0	57,5
	179,8	0	65
	449,6	5	77,5
	1124	15	82,5
<b>48 h</b>	Control	0	5
	28,8	25	80
	71,9	30	87,5
	179,8	22,5	87,5
	449,6	35	100
	1124	37,5	100
<b>72 h</b>	Control	5	10
	28,8	60	82,5
	71,9	65	90
	179,8	75	92,5
	449,6	77,5	100
	1124	82,5	100
<b>96 h</b>	Control	5	10
	28,8	75	92,5
	71,9	80	95
	179,8	85	100
	449,6	87,5	100
	1124	87,5	100

Se obtuvo los valores de CL<sub>50</sub> para cada insecticida mediante el Programa Probit 1.5 tal como se muestra en la Tabla 6 y Tabla 7, donde se presentan los resultados para dicho parámetro en términos de mortalidad y hNPL con sus límites superiores e inferiores al 95% y sus respectivos ajustes lineales (R<sup>2</sup>). En el caso del fipronil, todos los organismos murieron para las 48 h es por esto que no se pudieron obtener los parámetros mencionados. Asimismo, en el caso del imidacloprid, no se presentó mortalidad para las 3 h y 8 h, debido a esto tampoco se pudieron obtener los parámetros en cuestión.

**Tabla 6 .** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>, Límites superiores e inferiores) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Mortalidad CL <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	hNPL CE <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
3 h	0,901 (0,506 - 1,601)	0,989	0,252 (0,175 - 0,364)	0,994
8 h	0,679 (0,354 - 1,303)	0,975	0,074 (0,042 - 0,131)	0,96
24 h	0,035 (0,007 - 0,171)	0,872	0,003 (0,001 - 0,007)	0,996
48 h	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
72 h	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
96 h	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02

( ): Límites superiores e inferiores (95%)

CL<sub>50</sub>: concentración letal media

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación

**Tabla 7 .** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>, Límites superiores e inferiores) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Mortalidad CL <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	hNPL CL <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
3 h	-	-	260,5 (82,97 - 817,92)	0,836
8 h	-	-	246,7 (152,42 - 399,42)	0,948
24 h	5353,7 (1832,17 - 15643,56)	1	28,4 (6,62 - 122,17)	0,972
48 h	53540,8 (1032,89 - 2775350,23)	0,527	5,3 (1,11 - 25,66)	0,469
72 h	13,68 (1,72 - 109,11)	0,973	1,2 (0,14 - 9,83)	0,936
96 h	0,23 (0,01 - 6,37)	0,912	0,002 (0,00 - 0,16)	0,799

( ): Límites superiores e inferiores (95%)

CL<sub>50</sub>: concentración letal media

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación

Asimismo, se calcularon los parámetros de LOEC y NOEC con ayuda del programa estadístico Past 3.2 mediante las pruebas de Krustall Wallis para establecer las diferencias significativas y Mann Whitney debido a las características de los datos iniciales, los resultados se pueden apreciar en las Tablas 8 y 9 para los insecticidas fipronil e imidacloprid, respectivamente.



**Tabla 8 .** Concentración más baja donde se observa efecto (LOEC) y concentración de efecto no observado (NOEC) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (h)	Mortalidad ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )		hNPL ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	
	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC
3 h	1,60	0,64	0,26	0,10
8 h	0,26	0,1	0,04	0,02
24 h	0,02	< 0,02	0,02	< 0,02
48 h	0,02	< 0,02	0,02	< 0,02
72 h	0,02	< 0,02	-	-
96 h	-	-	-	-

LOEC: concentración más baja donde se observa efecto.

NOEC: concentración de efecto no observado.

**Tabla 9 .** Concentración más baja donde se observa efecto (LOEC) y concentración de efecto no observado (NOEC) para parámetros letales y subletales en base a la hNPL (Hipoactividad Natatoria) en *Cryphiops caementarius* para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición

Tiempo de exposición (h)	Mortalidad ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )		hNPL ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	
	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC
3 h	-	-	179,8	71,9
8 h	-	-	179,8	71,9
24 h	-	-	28,8	< 28,8
48 h	28,8	< 28,8	28,8	< 28,8
72 h	28,8	< 28,8	28,8	< 28,8
96 h	28,8	< 28,8	-	-

LOEC: concentración más baja donde se observa efecto.

NOEC: concentración de efecto no observado.

## 2. Evaluación del Riesgo y Toxicidad

A continuación se presentan los resultados de acuerdo a la metodología escogida para la evaluación del riesgo y toxicidad luego de realizados los bioensayos.

### 2.1. *Evaluación de la relación concentración – efecto (PNEC)*

En la Tabla 10 y 11 se presentan los valores obtenidos de la “concentración esperada sin efecto” (PNEC) para el fipronil e imidacloprid, la cual fue obtenida a través de los parámetros de CL<sub>50</sub>, LOEC y NOEC, tanto para la mortalidad como para los efectos subletales, utilizando un factor de evaluación de 1000.

**Tabla 10** . Concentración sin efecto observable prevista (PNEC) en base a la CL<sub>50</sub> para parámetros letales y subletales (hNPL) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil e imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en µg.l<sup>-1</sup>.

Tiempo de exposición (h)	PNEC (Mort)	PNEC (hNPL)
	fipronil	
3 h	0,000901	0,000252
8 h	0,000679	0,000074
24 h	0,000035	0,000003
	imidacloprid	
3 h	-	0,260508
8 h	-	0,246739
24 h	535,365	0,028442
48 h	5,354,082	0,005298
72 h	0,013679	0,001179
96 h	0,000233	0,000002

**Tabla 11** .Concentración sin efecto observable prevista (PNEC) en base a la LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil e imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Tiempo de exposición (h)	LOEC		NOEC	
	PNEC (Mort)	PNEC (hNPL)	PNEC (Mort)	PNEC (hNPL)
fipronil				
3 h	0,0016	0,00026	0,00064	0,0001
8 h	0,00026	0,00004	0,0001	0,00002
24 h	0,00002	0,00002	-	-
48 h	0,00002	0,00002	-	-
72 h	0,00002	-	-	-
96 h	-	-	-	-
imidacloprid				
3 h	-	0,1798	-	0,0719
8 h	-	0,1798	-	0,0719
24 h	-	0,0288	-	-
48 h	0,0288	0,0288	-	-
72 h	0,0288	0,0288	-	-
96 h	0,0288	-	-	-

Los valores de PNEC, fueron obtenidos en base a los datos de toxicidad provenientes de los bioensayos agudos ( $CL_{50}$ , LOEC y NOEC), los cuales de acuerdo a la literatura se dividieron por un factor de valoración de 1000, el cual es sumamente conservador y protector.

## 2.2. Evaluación de la Exposición (PEC)

Para efectos de la presente investigación se trabajó con el MAC-EQS ( $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), y con el AA-EQS ( $0,0083 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como segundo escenario para el imidacloprid; y en el caso del fipronil, se trabajó con la concentración máxima permisible (MPC) de  $0,00007 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ya que es la única disponible para dicho insecticida en la presente legislación.

### 2.3. Caracterización del Riesgo (PEC/PNEC)

De acuerdo a la metodología expuesta en el capítulo 3.4, se estableció la relación de la PEC y PNEC para determinar el riesgo existente de los dos insecticidas, los resultados se evidencian a continuación en la Tabla 12 y 13 basados en los parámetros hallados anteriormente:

**Tabla 12** .Cociente de riesgo en base a la CL<sub>50</sub>, LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en *Cryphiops caementarius* para el fipronil a diferentes tiempos de exposición

Tiempo de exposición (h)	CL <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )		LOEC (µg.l <sup>-1</sup> )		NOEC (µg.l <sup>-1</sup> )	
	RQ (mort)	RQ (hnpl)	RQ (mort)	RQ (hnpl)	RQ (mort)	RQ (hnpl)
3 h	0,00	0,00	0,04	0,26	0,10	0,7
8 h	0,10	0,00	0,26	1,75	0,70	3,5
24 h	2,00	0,02	3,5	3,5	-	-
48 h	-	-	3,5	3,5	-	-
72 h	-	-	3,5	-	-	-
96 h	-	-	-	-	-	-

**Tabla 13 .**Cociente de riesgo en base a la CL<sub>50</sub>, LOEC y NOEC para parámetros letales y subletales (hNPL) en *Cryphiops caementarius* para el imidacloprid a diferentes tiempos de exposición en dos escenarios

Tiempo de exposición (h)	CL <sub>50</sub>		LOEC		NOEC	
	RQ (mort)	RQ (hnpl)	RQ (mort)	RQ (hnpl)	RQ (mort)	RQ (hnpl)
MAC-EQS = 0,2 µg.l <sup>-1</sup>						
3 h	-	0,76	-	1,11	-	2,78
8 h	-	0,81	-	1,11	-	2,78
24 h	0,03	7,03	-	6,94	-	-
48 h	0,01	37,75	6,94	6,94	-	-
72 h	14,62	169,63	6,94	6,94	-	-
96 h	858,36	100000	6,94	-	-	-
AA-EQS = 0,00832 µg.l <sup>-1</sup>						
3 h	-	0,00003	-	0,04	-	0,11
8 h	-	0,00003	-	0,04	-	0,11
24 h	0,0016	0,0003	-	0,28	-	-
48 h	0,0002	0,001	0,28	0,28	-	-
72 h	0,60	0,007	0,28	0,28	-	-
96 h	35,62	4,15	0,28	-	-	-

De acuerdo a los resultados obtenidos, para el fipronil se obtuvieron siete valores mayores a uno, que van desde 1,75 a 3,5, los cuales representan riesgo a medida que se van incrementando, habiendo mayor incidencia procedente de la LOEC.

De acuerdo a los dos escenarios manejados para el imidacloprid, en el escenario donde se empleó el MAC-EQS (0,2 µg.l<sup>-1</sup>), la mayoría de los valores obtenidos sobrepasaron considerablemente el factor uno; sin embargo, para el escenario donde se usó el AA-EQS (0,00832 µg.l<sup>-1</sup>) sólo

dos valores pasaron el factor uno, representando una disminución en el riesgo de exposición considerablemente.

## VI. DISCUSION

### 1. Pruebas de Toxicidad Aguda: Mortalidad e Hipoactividad natatoria (hNPL)

De acuerdo a la bibliografía existente, no se han realizado bioensayos de toxicidad de fipronil e imidacloprid en *C. caementarius*, el cual fue uno de los motivos para realizar esta investigación, de esta manera, se usaron investigaciones con especies cercanas. En este estudio *C. caementarius* presentó efectos en la mortalidad y en la hipoactividad natatoria (hNPL), la cual es manifestada en la falta de reacción ante estímulos brindados, reducción del movimiento y nado extraño (Mendoza-Rodríguez, 2009), los resultados obtenidos variaron a medida que el tiempo de exposición y las concentraciones aumentaban en ambos insecticidas.

Para el caso del fipronil, a las 24 h se obtuvo un  $CL_{50}$  de  $0,035 \mu\text{g.l}^{-1}$  para la mortalidad, a diferencia de los resultados obtenidos en la investigación de Shan *et al.*, (2003) realizada en las especies *Macrobrachium rosenbergii*, *Macrobrachium nipponensis*, especies más cercanas al *C. caementarius* encontradas en la bibliografía, y en las que se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $6,41 \mu\text{g.l}^{-1}$  y  $>25,70 \mu\text{g.l}^{-1}$  a las 24 h, respectivamente, dichos resultados manifestaron ser altamente sensibles al fipronil al igual que lo reflejan los resultados en el presente estudio. Las diferencias en las concentraciones de los parámetros obtenidos pueden deberse a la diferencia en la metodología empleada en los bioensayos, ya que en el estudio se realizó una simulación de los campos de arroz en un laboratorio y se trabajó con las concentraciones de lixiviación.

Asimismo, en la investigación realizada por Key *et al.* (2003), en la cual se trabajó con fipronil e imidacloprid en un camarón pequeño (*Palaemonetes pugio*), mostró que a las 96 h se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $0,68 \mu\text{g.l}^{-1}$  para las larvas y una  $CL_{50}$  de  $0,32 \mu\text{g.l}^{-1}$  para los adultos ante el fipronil y, para el imidacloprid presentó una  $CL_{50}$  de  $308 \mu\text{g.l}^{-1}$  la que fue significativamente más tóxica en las larvas que en los adultos con una  $CL_{50}$  de  $563,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  a diferencia del fipronil. En contraste con lo mencionado, en el caso del *C. caementarius*, la exposición ante el imidacloprid a las 96 h tuvo una  $CL_{50}$  de  $0,233 \mu\text{g.l}^{-1}$  para la mortalidad en post larvas de camarón, la cual evidencia una significativa diferencia con el estudio mencionado en las concentraciones letales medias obtenidas, exceptuando que para las 8 h el fipronil obtuvo una  $CL_{50}$  cercana ( $0,679 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) a la obtenida en el *P. pugio*. Asimismo, se hallaron los parámetros de LOEC y NOEC para la mortalidad los cuales fueron de  $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  y  $<0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) para el fipronil, respectivamente, y de  $28,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  y  $<28,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h) para el imidacloprid, respectivamente. Ambos valores se contrastan con los obtenidos en la investigación de Key *et al.* (2003), al ser estos mayores que los obtenidos en la presente investigación.

Sin embargo, se comprobó que el fipronil fue más tóxico que el imidacloprid al igual que en el estudio realizado por Omar *et al.* (2016), en la especie *Marsupenaeus japonicus*, donde los resultados varían de acuerdo al estadio del crustáceo y los efectos de los insecticidas varían de acuerdo a éste.



Resultados obtenidos de la especie *Penaeus monodon* por Hook *et al.* (2018), un crustáceo marino criado ampliamente para la alimentación en el sudeste de Asia, y que a pesar de su importancia comercial no es comúnmente usada como especie de prueba en toxicología ambiental (Motoh, 1985) al igual que el *C. caementarius*, fue sometido al fipronil e imidacloprid en el estadio de postlarvas donde se halló a las 48 h una  $CL_{50}$  de  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $175 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , respectivamente, los cuales también difieren en resultados al presente estudio para las mismas horas. Sin embargo, la  $CL_{50}$  del fipronil mencionada es muy cercana a la obtenida en el *C. caementarius* a las 8 h, lo que indicaría que ésta presentó mayor mortalidad en un periodo menos prolongado. Los artrópodos se encuentran entre los taxones más sensibles al fipronil, y las especies relacionadas pueden tener sensibilidades muy diferentes a este insecticida (Stevens *et al.*, 2011), y esto se debe a que el fipronil puede ser más tóxico una vez metabolizado, ya que el sulfuro de fipronilo y la sulfona de fipronilo son generalmente dos a tres veces más tóxicos que el compuesto original (Weston y Lydy, 2014). Asimismo, existe una gama muy amplia en la sensibilidad de los crustáceos al imidacloprid, con valores de  $CL_{50}$  que varían de 1 a  $52\,500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (revisado en Smit *et al.*, 2015).

Para el parámetro de hNPL, se halló una  $CL_{50}$  en un rango de  $0,002 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $260,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , medidos entre las 3 h y 96 h para el imidacloprid y un rango de  $0,003 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $0,252 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  obtenidos entre las 3 h y 24 h de exposición para el fipronil, y es precisamente en este parámetro donde se observan las diferencias de los efectos de ambos insecticidas. El fipronil a diferencia del imidacloprid, causó nado errático en todas las direcciones o

convulsiones y reacción inmediata ante el estímulo del movimiento, mientras que ante el imidacloprid las postlarvas presentaron aletargamiento, disminución del nado en la columna de agua, y reacción tardía ante la estimulación del movimiento. Para ambos insecticidas se presentó lucha por la comida, ausencia total del desplazamiento antes de la muerte, pese al intento de nado que se reflejó en la movilidad de los endópodos y exópodos (partes que utilizan al nadar) y cambio en la coloración a rosado horas después de morir.

Los diferentes efectos que presentaron las postlarvas ante ambos insecticidas se deben al modo de acción de cada uno. El fipronil pertenece al grupo de los fenilpirazoles los cuales son antagonistas del canal de cloruro regulado por GABA, interfieren con los canales de cloruro en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas, provocando así hiperexcitación y convulsiones (Cole *et al.*, 1993), mientras que el imidacloprid pertenece al grupo de los neonicotinoides, los cuales son antagonistas del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico causando una variedad de síntomas desde hiperexcitación hasta letargo y parálisis (Cox *et al.*, 1998).

## **2. Evaluación del Riesgo y Toxicidad**

Para el ingrediente activo del fipronil e imidacloprid, los resultados obtenidos del cociente de riesgo agudo muestran valores de alta toxicidad, significando la existencia del riesgo ambiental, lo cual concuerda con los

estudios de Van der Sluijs *et al.* (2014), que muestran los riesgos para la biodiversidad y el funcionamiento del ecosistema que plantea el uso generalizado de neonicotinoides y fipronil. Asimismo, se han encontrado que muestras tomadas en aguas subterráneas y superficiales que superan los límites basados en los umbrales ecológicos establecidos en diferentes países en América del Norte y Europa; lo cual indica que existe una fuerte evidencia de que los suelos, las vías fluviales y las plantas en entornos agrícolas, urbanos y en áreas de drenaje están contaminadas con concentraciones muy variables de mezclas de neonicotinoides o fipronil y sus metabolitos (Bonmatin *et al.*, 2015). Asimismo, en la recopilación de Van der Sluijs *et al.* (2014) muestra una creciente evidencia publicada que es estos insecticidas representan un alto riesgo de daño para una amplia gama de taxones de invertebrados no objetivo, lo cual se espera tenga un impacto en las cadenas alimenticias de las que son parte.

Los pesticidas pueden ser lixiviados en zanjas y ríos por la lluvia; las aguas superficiales se pueden contaminar con un rociado directo, mediante la escorrentía y la lixiviación de los campos agrícolas (Vijver *et al.*, 2014). La emisión a las aguas superficiales está dictada por muchos factores, como la distancia del cultivo a la zanja, modo de aplicación, condiciones climáticas, etc. Esto supone una preocupación si no se siguen ciertos protocolos de aplicación o se desconocen los efectos potenciales en los ecosistemas acuáticos (Stoorvogel *et al.* 2003), tal es el caso del camarón de río el cual se encuentra a menudo en ríos cercanos a los campos de arroz y el fipronil e imidacloprid es de amplio uso.

Asimismo, la captación de pesticidas en invertebrados acuáticos se produce a través de la respiración (branquias y tráquea), la alimentación y la epidermis, ya sea cutícula o piel (Pisa *et al.*, 2015). Es por esto que en el bioensayo se pudo observar efectos instantáneos en las postlarvas cuando entraron en contacto con el medio soluble en las concentraciones mayores para ambos insecticidas.

Se han publicado varios estudios de laboratorio sobre la toxicidad del imidacloprid en una variedad de invertebrados acuáticos y curiosamente, el organismo de prueba estándar *Daphnia magna* Straus, 1820, es especialmente insensible a los neonicotinoides (imidacloprid) (Beketov y Liess, 2008). Un CL<sub>50</sub> agudo de alrededor de 7 000 ppb es varios órdenes de magnitud por encima de las concentraciones efectivas encontradas para otros invertebrados. Esto implica que *D. magna* no se puede utilizar como un organismo de prueba sensible protector para muchas especies, incluyendo a las postlarvas del *C. caementarius*. De igual manera, Ngim y Crosby (2001), encontraron que el fipronil es muy tóxico para los cangrejos residentes de los campos de arroz a niveles de ppb (14,3–19,5 mg.l<sup>-1</sup>).

Si bien es cierto que no se cuenta con información disponible de la toxicidad de estos insecticidas en el *C. caementarius*, existen estudios como el de Van Dijk *et al.* (2013), donde desarrollaron un análisis de regresión para la abundancia de especies de macro-invertebrados acuáticos y concentraciones de imidacloprid cercanas en aguas superficiales holandesas. Datos de ocho años de monitoreo nacional que cubren 7,380 ubicaciones diferentes de muestras de macro-invertebrados y 801 sitios

diferentes, descubrieron que la abundancia de macroinvertebrados disminuye constantemente a lo largo del aumento en la gradiente de la concentración del imidacloprid. En general, se encontró una relación negativa significativa ( $P < 0,001$ ) entre la abundancia de todas las especies de macro-invertebrados agrupadas y la concentración de imidacloprid cercana. Sin embargo, Beketov *et al.* (2013) analizaron el efecto de la presencia de pesticidas en la riqueza de especies de invertebrados en las corrientes europeas (Alemania y Francia) y australianas y los resultados de los estudios de laboratorio y de semicampo (mesocosmos) indican de que a pesar que los invertebrados acuáticos son muy sensibles al imidacloprid, para la evaluación del riesgo de plaguicidas, puede ser difícil predecir los efectos a nivel de comunidad utilizando los datos de toxicidad aguda y crónica bajo el esquema de evaluación de efectos acuáticos en niveles.

Como se indica en las investigaciones de Van Dijk (2009) el imidacloprid supera con frecuencia los estándares de calidad para aguas superficiales en los Países Bajos: 111 y 62 veces para el AA-EQS y el MAC-EQS respectivamente. Además de la probabilidad de exceder un estándar, también es importante la magnitud de la superación, ya que es probable que en magnitudes más altas los efectos ecológicos sean más severos e incluso duren más. Se predijo que el imidacloprid tendría un impacto relativamente grande en los ecosistemas en comparación con otros pesticidas, y obtuvo el tercer lugar en el Top 10 de pesticidas que violan los estándares de calidad ambiental con respecto a la frecuencia y magnitud de la superación.

Otro aspecto importante es la degradación de los insecticidas en el agua a través de la fotólisis y la hidrólisis, la cual produce metabolitos primarios y secundarios que también pueden ejercer efectos tóxicos (Zhen y Liu, 1999). Se ha encontrado que los productos de degradación del fipronil tienen una toxicidad similar o mayor: las  $CL_{50}$  de 96 h para la fipronilsulfona, el sulfuro de fipronilo y el fipronil-desulfino fueron 11,2, 15,5 y 68,6  $mg.l^{-1}$ , respectivamente. Cuando se comparó con el producto inicial, se encontró que la fipronil-sulfona y el fipronil-sulfuro son 6,6 y 1,9 veces más tóxicas, respectivamente, para los invertebrados de agua dulce (USEPA, 1996). Asimismo, aunque para el imidacloprid la hidrólisis es relativamente estable, el principal metabolito de imidacloprid en agua por hidrólisis es 1 - [(6-cloro-3-piridinil) metil] -2-imidazolidona (Zheng y Liu, 1999) y la fotólisis es la principal vía de degradación y se ha demostrado que produce hasta nueve metabolitos diferentes en el agua. Sin embargo, parece que para los metabolitos probados, su toxicidad relativa para los invertebrados acuáticos es típicamente menor que la de los compuestos originales, al menos en condiciones de exposición aguda de 24 o 48 horas (Malev *et al.*, 2012). Para la presente investigación no se evaluaron los efectos de la fotólisis en los resultados del bioensayo, por lo que se ignora si ésta tuvo relevancia en el efecto tóxico de los insecticidas.

En comparación a las magnitudes concernientes al nivel del riesgo obtenidos de la literatura (i.e.  $RQ \geq 1$  de alto riesgo,  $0,1 \leq RQ < 1$  de riesgo medio,  $0,01 \leq RQ < 0,1$  de bajo riesgo) (Sanchez-Bayo *et al.*, 2002), está claro que los insecticidas a ciertas concentraciones representan un alto riesgo, como en el caso del fipronil que alcanzó un cociente de 2 a las 24 h

basado en el parámetro del CL<sub>50</sub> aun cuando los datos obtenidos para dicho insecticida fueron limitados. Para el caso del imidacloprid, en el primer escenario (MAC-EQS=0,2 µg.l<sup>-1</sup>), se obtuvieron valores sumamente altos a las 96 h que van desde 7 hasta 100 000; sin embargo, para el segundo escenario (AAC-EQS=0,00832 µg.l<sup>-1</sup>) los valores se redujeron considerablemente alcanzando cifras hasta de 35,6 para las 96 h. En base a los resultados obtenidos no se puede determinar qué insecticida resultó ser más tóxico, debido a la limitada data que se obtuvo del bioensayo con fipronil, ya que las siete concentraciones con las que se trabajó fueron al parecer muy altas para completar el procedimiento hasta las 96 h. Para la concentración esperada en el medio (PEC) se utilizaron los estándares internacionales disponibles para ambos insecticidas, debido a que teóricamente son la referencia que no debería ser superada para mantener un ecosistema acuático en óptimas condiciones, sin embargo, el nivel del riesgo obtenido resultó siendo sumamente alto para las concentraciones de referencia escogidas en base a la literatura disponible, aun cuando éstas son considerablemente bajas. Esto supone que el *C. caementarius* debe ser considerado como especialmente sensible al momento de definir un estándar de calidad ambiental en ambientes acuáticos, ya que como anteriormente se ha mencionado, la especie estándar utilizada para estas decisiones es inesperadamente insensible a los insecticidas en cuestión, a diferencia del camarón de río.

En general, los resultados de la presente investigación y de la literatura publicada indican que dichos insecticidas tienen el potencial de causar daños significativos a los ecosistemas acuáticos al causar efectos

negativos en individuos y poblaciones de invertebrados acuáticos en concentraciones muy bajas.



## VII. CONCLUSIONES

- Ambos insecticidas obtuvieron efectos letales (mortalidad) y subletales (hNPL) significativos sobre el camarón de río. Las concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ) fueron considerablemente bajas a cortos tiempos de exposición, siendo el fipronil el más tóxico con una  $CL_{50}$  de  $0,035 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) y el imidacloprid con  $0,23 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h) para la mortalidad; y con valores similares para la hNPL el fipronil obtuvo  $CL_{50}$  de  $0,003 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) y el imidacloprid  $0,002 \mu\text{g.l}^{-1}$  (96 h).
- Los efectos subletales (LOEC y NOEC) evaluados para el fipronil, mostraron que a una concentración de  $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$  (24 h) ya se empiezan a observar efectos tanto letales como subletales, y que menor a esta concentración no se observa efecto alguno.
- Los efectos subletales (LOEC y NOEC) evaluados para el imidacloprid, mostraron que a una concentración de  $28,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  (72 h) ya se empiezan a observar efectos tanto letales como subletales, y que menor a esta concentración no se observa efecto alguno.
- De acuerdo con la evaluación de los parámetros subletales en la hipoactividad natatoria (hNPL), se observó que los resultados obtenidos están estrechamente ligados al modo de acción de ambos insecticidas, ya que éste mostró diferentes características sintomáticas en las postlarvas de camarón.

- Se estimó el cociente de riesgo de la exposición del camarón de río a ambos insecticidas, los cuales se encontraron por encima de 1 en repetidas ocasiones, lo cual indicó la existencia de riesgo ambiental, el cual se prevee ser incrementado de acuerdo al nivel de excedencia de este factor. Se obtuvo hasta 3,5 para el fipronil (24 h); y 858,4 (escenario 1) y 35,6 (escenario 2) para el imidacloprid (96 h).
  
- Se evaluó el riesgo ambiental de ambos insecticidas en el *Cryphiops caementarius* bajo escenarios sumamente conservadores y los resultados mostraron que estos compuestos presentan alto riesgo ambiental acuático a bajas concentraciones para el medio acuático, tanto para efectos letales como para los subletales.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Considerar al camarón de río para la toma de decisiones, ya que resultó ser especialmente sensible a los neocotinoídes en comparación con crustáceos considerados como “especies paraguas” para la protección del medio acuático.
- Utilizar los principios activos con 100% de pureza para evaluar con mayor certidumbre los efectos de estos.
- Replicar el bioensayo en contenedores más grandes, de preferencia entre 5 y 10 L de capacidad por repetición para eliminar el posible estrés, canibalismo y competencia entre las postlarvas.
- Replicar el bioensayo en otros estadíos, de preferencia en larvas de camarón y juveniles, para poder establecer si la toxicidad está ligada directamente al estadío del espécimen.
- Replicar el bioensayo con el fipronil a concentraciones más bajas para obtener resultados para las 96 horas.
- Considerar tener en cuenta la evaluación de la fotólisis e hidrólisis de los insecticidas para determinar si su degradación resulta en el aumento del riesgo ambiental o no.
- Realizar el bioensayo para efectos crónicos de larga exposición y evaluar la posible bioacumulación en dicha especie, ya que es de alto consumo humano.
- Por lo mencionado anteriormente, es necesaria la educación para los agricultores y otros profesionales y la necesidad de políticas y regulaciones para alentar la adopción de estrategias agrícolas alternativas para gestionar plagas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arrázola E. (2016). Evaluación del Riesgo Ambiental de la mezcla de alfa-cipermetrina e imidacloprid sobre la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). (Tesis de titulación, Universidad Científica del Sur. (Acceso el 05 de Junio del 2016).

Barberá, C. (1989). Pesticidas agrícolas, Ed. Omega S.A., Barcelona.  
 Recuperado de:  
[https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Barber%C3%A1+C.+%281989%29.+Pesticidas+agr%C3%ADcolas%2C+Ed.+Omega+S.A.%2C+Barcelona&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Barber%C3%A1+C.+%281989%29.+Pesticidas+agr%C3%ADcolas%2C+Ed.+Omega+S.A.%2C+Barcelona&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)

BASF, Agricultural Products. (2005). Fipronil worldwide technical bulletin.  
 Recuperado de:  
[http://www.agro.basf.com/p02/APIInternet/en\\_GB/function/conversions:/publish/upload/15377\\_Fipronilo\\_tech\\_bro.Pdf](http://www.agro.basf.com/p02/APIInternet/en_GB/function/conversions:/publish/upload/15377_Fipronilo_tech_bro.Pdf)

Beketov, M. A., y Liess, M. (2008). Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. Archives of environmental contamination and toxicology, 55(2), 247-253.

Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schäfer, R. B., y Liess, M. (2013). Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(27), 11039-11043.

Bobé, A., Cooper, J. F., Coste, C. M., y Muller, M. A. (1998). Behavior of fipronil in soil under Sahelian Plain field conditions. Pesticide Science, 52, 275-281.

- Borrirukwisitsak, S., Keenan, H. E., y Gauchotte-Lindsay, C. (2012). Effects of salinity, pH and temperature on the octanol-water partition coefficient of bisphenol A. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(5), 460.
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., y Noome, D. A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 35-67.
- Calamari, D. y Barg, U. 1993. Hazard assessment of agricultural chemicals by simple simulation models. En: *Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities. Actas de la Consulta de Expertos de la FAO, Santiago, Chile, 20-23 de octubre de 1992. Water Report 1. FAO, Roma. págs. 207-222*
- California Department of Pesticide Regulation. (2006). [www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur06rep/chmrpt06.pdf](http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur06rep/chmrpt06.pdf). Recuperado de: [www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur06rep/chmrpt06.pdf](http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur06rep/chmrpt06.pdf)
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental science y policy*, 9(7), 685-692. Recuperado de: [https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Agriculture%2C+Pesticides%2C+Food+Security+and+Food+Safety&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Agriculture%2C+Pesticides%2C+Food+Security+and+Food+Safety&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)
- Castro, C. (1966). *El camarón de río del norte Cryphiops caementarius* (Molina). *Estudio Oceanológico*, 2, 11-19 pp.

- Chahil, G. S., Mandal, K., Sahoo, S. K., y Singh, B. (2015). Risk assessment of mixture formulation of spirotetramat and imidacloprid in chilli fruits. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 1-8. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10661-014-4105-y>
- Cessna, AJ. (2009). Pesticides in the environment: Real or Imagined. Agriculture and Agri-food Canada, Research Centre, Lethbridge. Disponible en: <http://www.sasca.ca/conference/conference2005/Cessna.pdf.05.02.2009>.
- Cebrián, M., Carballas, T. y Gil-Sotres, F. (1988). Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an andic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 209-215.
- Cole, L. M., Nicholson, R. A., y Casida, J. E. (1993). *Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46, 47-54.
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., y Espindola, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830.
- Cox, L., Koskinen, W. C., Celis, R., Hermosin, M. C., Cornejo, J., y Yen, P. Y. (1998). Sorption of imidacloprid on soil clay mineral and organic components. *Soil Science Society of America Journal*, 62, 911-915. Recuperado de <https://dl.sciencesocieties.org/publications/sssaj/abstracts/62/4/SS0620040911>

Da Jansen, L. (2014). Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico. *Arq. Bras. Med*, 66(2), 593-601.

De la Torre, A., Nuñez, J., y Carballo, M. (2004). Evaluación Medioambiental y Ecotoxicológica. *Sanidad Ambiental*, 20–24. Recuperado de: <http://www.ritsq.org/wp-content/uploads/cd-toxamb/Documentos/10%20de%20la%20Torre%20FINAL.pdf>

Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ), (2013). Edicion 7.  
Recuperado de: <http://www.plmlatina.com.pe/deaq/index.html>

Domingos, F. X. V. (2006). Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

EC (European Commission), 2011. Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document No. 27. European Communities, Brussels, Belgium

Encina, F. y Díaz. O. (2001). Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección Asociado de algas bentónicas marinas. En: *Sustentabilidad Ambiental*. K. Alveal & Antezana Editores. Universidad de Concepción. 357-336 pp.

Environmental Protection Agency (EPA), (1996). New Pesticide Fact Sheet, PB96e181516. US EPA Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. EPA737-F- 96-005

Environmental Protection Agency (EPA), (2016). Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1045 Penaeid Acute Toxicity Test.

Recuperado de: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>

Environmental Protection Agency (EPA), (2016). Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1020 Gammarid Amphipod Acute Toxicity Test.

Recuperado de: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>

Environmental Protection Agency (EPA), (2016). Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1010 Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test,

Freshwater Daphnids. Recuperado de: <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850-ecological-effects-test-guidelines>

European Commission, (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment. Institute for Health and Consumer Protection. Recuperado de: [https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2\\_2ed\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf)

FAO. (2014). Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. Roma. Italia. Recuperado de:



[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Code/Code\\_Spanish\\_2015\\_Final.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Code_Spanish_2015_Final.pdf)

Galán-Huertos, E., J. L. Gómez-Ariza, N. Bellinfante Crocci, P. y Aparicio-Fernández. (2003). *Contaminación de suelos por compuestos orgánicos*. Informe final. Sevilla, España. 185 p.

García-Huidobro, T. 1995. Crianza intensiva e integral del camarón de río del Norte *Cryphiops caementarius*, base para el desarrollo de una nueva acuicultura en Chile. Fundación, Fondo de Investigación Agropecuaria. FIA. Ministerio de Agricultura.

Gesam Consultores, SERNAPESCA (2006). Obtención de Información Para La Clasificación de la Fauna Acuática Continental.

Giesy, J., y Graney, R. (1989). Recent developments in and intercomparasions of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hidrobiologia*, 188, 21-60.

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., y Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818.

Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., y Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32, 189-199. Recuperado de [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/32/3/32\\_3\\_189/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/32/3/32_3_189/_article)

Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Saito, F., Sánchez-Bayo, F., y Goka, K. (2012). *Cumulative ecological impacts of two successive annual*

*treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. Ecotoxicology and environmental safety, 80, 355-362.*

Henry, L. (1988). Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. Recuperado de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaca/fulltext/manual/parte2.pdf>

Hook, S. E., Doan, H., Gonzago, D., Musson, D., Du, J., Kookana, R., y Kumar, A. (2018). The impacts of modern-use pesticides on shrimp aquaculture: An assessment for north eastern Australia. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 770-780.

IMARPE (Instituto del Mar Peruano). Camarón del río. Recuperado de: [http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index.php?id\\_seccion=l0131010202010000000000](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index.php?id_seccion=l0131010202010000000000), Fecha de consulta 3 de Junio del 2016.

IMARPE (Instituto del Mar Peruano). (2007). Monitoreo poblacional de camarón de río, estimación de abundancia de adultos en ríos de la costa centro sur. Recuperado de: [http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe\\_26\)\\_informe\\_2007\\_camaron\\_de\\_rio\\_web.pdf](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_26)_informe_2007_camaron_de_rio_web.pdf)

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2018). Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2018. Lima, Perú. Recuperado de: [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1637/libro.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1637/libro.pdf)

Jara, C.G (1994). Camarones dulceacuícolas en Chile Informe técnico-científico. Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile. 15 pp.

Johnson, A. K. L., y Ebert, S. P. (2000). Quantifying inputs of pesticides to the Great Barrier Reef Marine Park—A case study in the Herbert River catchment of north-east Queensland. *Marine Pollution Bulletin*, 41, 302-309. Recuperado de: <https://scholar.google.com.pe/scholar?hl=es&q=Johnson%2C+A.+K.+L.+and+Ebert%2C+S.+P.%282000%29.+Quantifying+Inputs+of+Pesticides+to+the+Great+Barrier+Reef+Marine+Park+%E2%80%93+A+Case+Study+in+the+Herbert+River+Catchment+of+North-East+Queensland.+Marine+Pollution+Bulletin.+41%3A+302-309.&btnG=&lr=>

Key, P., Chung, K., Siewicki, T., y Fulton, M. (2007). Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2), 272-277.

Laforé, E. (2005). Evaluación de la tolerancia y efectos colaterales de una dosis normal de una formulación a base de Fipronil al 0.25%(Fipronex®)\* en cachorros menores de 2 meses de edad. Recuperado de: <http://www.agrovetmarket.com/pdf/antiparasitario/fipronex/Fipronex%20trabajo%20en%20cachorros%20menos%20de%208%20semana.pdf>

López CL. (1993). Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* N° 18. Instituto Nacional de Salud Pública. México

Lukančič, S., Žibrat, U., Mezek, T., Jerebic, A., Simčič, T., y Brancelj, A. (2010). Effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* L., and *Gammarus fossarum* Koch., to atrazine and

imidacloprid. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 84(1), 85-90.

Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., y Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. Pesticide biochemistry and physiology, 104(3), 178-186.

Malherbe, W., Van Vuren, J. H. J., y Wepener, V. (2013). *Preliminary risk assessment of common-use pesticides using PRIMET and PERPEST pesticide risk models in a semi-arid subtropical region*. Water Sa 39(5), 599-610.

Medina, M., y Encina, F. (2003). Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. Revista Ambiente y Desarrollo, 19(3), 19-27.

Mendoza-Rodríguez, R. (2009). Toxicidad aguda del sulfato de cobre en postlarvas de camarón *Cryphiops caementarius*. Archivos de zootecnia, 58(221), 103-110.

Meruane, J., Rivera, M., Morales, C., Galleguillos, C., y Hosokawa, H. (2006). Juvenile production of the freshwater prawn *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) under laboratory conditions in Coquimbo, Chile. *Gayana*, 70, 56-64.

Miles, INC. (1993). Environmental fate summary. Volume No. 51950–0113.

Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.

MINAGRI, ANA, WWF, (2015). Huella Hídrica del Perú. Sector

Agropecuuario. Recuperado de URL:

[http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/huella\\_hidrica.](http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/huella_hidrica.pdf)

[pdf.](http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/huella_hidrica.pdf)

Miyamoto, J., Mikami, N., y Takimoto, Y. (1990). The fate of pesticides in

aquatic ecosystems. In: Environmental Fate of Pesticides (Hutson, D.H.

and Roberts, T.R., eds.), 123-147

Mulla, M. S., y Mian, L. S. (1981). Biological and environmental impacts of

the insecticides malathion and parathion on nontarget biota in aquatic

ecosystems. In Residue reviews. New York. pp. 101-135.

Ministerio de la Producción R.M. N.º 312-2006-PRODUCE. Recuperado de:

[http://www.munizlaw.com/Productos/alerta-](http://www.munizlaw.com/Productos/alerta-legal/pesca/2013/RESOLUCION%20MINISTERIAL%20N%C2%BA%20312-2006-PRODUCE.pdf)

[legal/pesca/2013/RESOLUCION%20MINISTERIAL%20N%C2%BA%20](http://www.munizlaw.com/Productos/alerta-legal/pesca/2013/RESOLUCION%20MINISTERIAL%20N%C2%BA%20312-2006-PRODUCE.pdf)

[312-2006-PRODUCE.pdf](http://www.munizlaw.com/Productos/alerta-legal/pesca/2013/RESOLUCION%20MINISTERIAL%20N%C2%BA%20312-2006-PRODUCE.pdf)

Mize, S. V., Porter, S. D., y Demcheck, D. K. (2008). Influence of fipronil

compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate

communities in streams of southwestern Louisiana, USA. Environmental

pollution, 152(2), 491-503. Recuperado de :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910700320X>

Moriarty, F. (1988). Ecotoxicology. *Human & Experimental Toxicology*, 7,

437-441. Recuperado de: <http://het.sagepub.com/content/7/5/437.short>

Motoh, H. 1985. Biology and ecology of *Penaeus monodon* In: Taki, Y., Primavera, J. H. y Llobrera, J. A. (eds.) Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Iloilo City, Philippines: Iloilo City, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

Ngim, K. K., y Crosby, D. G. (2001). Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(5), 972-977.

OMAF, 1991. Grower Pesticide Safety Course. Ontario Ministry of Agriculture and Food, Toronto, Ontario, Canada.

Omar, H., Samir, H., Khalil, M. S., Ghorab, M. A., & Zwiernik, M. J. Acute Water Column Effects Concentrations (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>) for Three Commonly Used Insecticides, Two Neonicotinoids (Acetamiprid and Imidacloprid), and a Recently Registered Phenylpyrazole (Fipronil), Exposed to Common Commercially Cultured Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*).

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2016). Prevención y eliminación de Plaguicidas Obsoletos. Recuperado de: <http://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/what-dealing/obs-pes/es/>.

Ongley, E. A. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. FAO, Roma (Italia).

Overmyer, J., Rouse, D., Avants, J., Garrison, W., Lorenzo, M., Chung, K., y otros. (2007). *Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and*

*freshwater non-targets*. Journal of Environmental Science and Health, 42, 471-480.

Overmyer, J. P., Mason, B. N., y Armbrust, K. L. (2005). Acute toxicity of imidacloprid and fipronil to a nontarget aquatic insect, *Simulium vittatum* Zetterstedt cytospecies IS-7. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 74, 872-879.

Paredes, C., y Anaya, R. (2015). Efecto agudo del oxiclórico de cobre y del butaclor sobre el " camarón de río" *Cryphiops caementarius* (Molina 1782). Ecología Aplicada, 14, 71-74.

Peña, C. E., Carter, D.E. y Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología Ambiental: *Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Recuperado de: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>

Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., y Morrissey, C. A. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environmental Science and Pollution Research, 22(1), 68-102.

PNUMA/IPCS, (1999). Evaluation of chemical risks. Produced by the Program of the Nations United for the Ambient, the Organization the International of the Work and the Worldwide Organization of the Health, within the framework of the Inter-Organization for Programme the Sound Management of Chemical, 234 p

PPDB, 2018. Fipronil (Ref: BAS 350I). Recuperado de URL: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/316.htm>

PPDB, 2018. Imidacloprid (Ref: BAY NTN 33893) Recuperado de URL:  
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/397.htm>

Ramírez-Romero, P., Guzmán-Martínez, M. D. C., Barrera-Escorcía, G., y Guzmán-García, X. (2012). La Ecotoxicología, herramienta para la conservación y la óptima producción de organismos acuáticos. Acuicultura en México: Impacto en Producción, Manejo y Conservación. Editorial Académica Española.

Rand, G. M., y Petrocelli, S. R. (1985). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ. Recueprado de:  
[https://scholar.google.com.pe/scholar?q=rand+and+petrocelli+1985&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](https://scholar.google.com.pe/scholar?q=rand+and+petrocelli+1985&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)

Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B. M., Rauh, J. J., & Sattelle, D. B. (2005). *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides*. Invertebrate Neuroscience, 5, 119-133.

Reish, D.L. y Oshida, P. (1987). *Manual of methods in aquatic environment research*. Part 10, Short-Term static bioassays. FAO Fisheries Technical Paper 247. Food and Agriculture Organization of the United Nations

Romero, P. R., y Cantú, A. M. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología. Recuperado de:  
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=wdJWUOj81isC&oi=fnd&pg=PP13&dq=\(1998\).+Ensayos+toxicol%C3%B3gicos+para+la+evaluaci%C3%B3n+de+sustancias+qu%C3%ADmicas+en+agua+y+suelo.+La+](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=wdJWUOj81isC&oi=fnd&pg=PP13&dq=(1998).+Ensayos+toxicol%C3%B3gicos+para+la+evaluaci%C3%B3n+de+sustancias+qu%C3%ADmicas+en+agua+y+suelo.+La+)



experiencia+en+M%C3%A9xico.+1ra.+ed.+M%C3%A9xico:+Secretar%C3%ADa+del+Medio+Ambiente+y+Recursos+Naturales+(SEMARNAT).+&ots=DySkQsW7mU&sig=LMzKmGsrWe-kCFHxWIU74eTU9I8#v=onepage&q&f=false

Rudolph, E. (1984). Perspectivas del cultivo de camarones de agua dulce en Chile. Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult, 5(3), 769-773.

Sánchez-Bayo, F., Baskaran, S., y Kennedy, I. R. (2002). Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. Agriculture, Ecosystems & Environment, 91(1-3), 37-57.

Sánchez, O. E. A. (2008). Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo del arroz en el Parque Natural de La Albufera de Valencia (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

SENASA, (2015). D.S. N° 008-2012-AG. (Título) Recuperado de: [http://www.peru.gob.pe/normas/docs/DS\\_008\\_2012\\_AG.pdf](http://www.peru.gob.pe/normas/docs/DS_008_2012_AG.pdf)

SERNAPESCA (1996). Caracterización de la actividad extractiva y de cultivo sobre el recurso Camarón de Río del Norte, en la III y IV Regiones. 30 pp.

Silva, J., Fuentealba, C., Bay-Schmith, E., y Larrain, A. (2007). Estandarización del bioensayo de toxicidad acuática con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. Gayana (Concepción), 71, 135-141.

- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., y Goulson, D. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5-34.
- Shan, Z., Wang, L., Cai, D., Gong, R., Zhu, Z., y Yu, F. (2003). Impact of fipronil on crustacean aquatic organisms in a paddy field-fishpond ecosystem. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(, 0746-0752.
- Schlenk, D. B. Huggett, J. Allgood,, D. (2001). Toxicity of Fipronil and Its Degradation Products to *Procambarus* sp.: Field and Laboratory Studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(3), 325–332.
- Smit, C.E., Posthuma-Doodeman, C., van Vlaardingen, P.L.A., de Jong, F.M.W., (2015). Ecotoxicity of imidacloprid to aquatic organisms: derivation of water quality standards for peak and long-term exposure. *Human. Ecol. Risk Assess.* 21, 1608–1630.
- Spadotto, C. A., Gomes, M. A., y Hornsby, A. G. (2002). Pesticide leaching potential assessment in multilayered soils. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 12.
- Stevens, M.M., Burdett, A.S., Mudford, E.M., Helliwell, S., Doran, G., 2011. The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. *Acta Trop.* 117, 125–130.

- Stoorvogel, J. J., Jaramillo, R., Merino, R., y Kosten, S. (2003). Plaguicidas en el medio ambiente. In *Los Plaguicidas. Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador* (pp. 49-69). Centro Internacional de la Papa.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). *Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature*, 671-677. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167873>
- Tingle, C., Rother, J., Dewhurst, C., Lauer, S., y King, W. (2000). Health and environmental effects of fipronil. Recuperado de: Pesticides Network UK: <http://www.pan-uk.org/Publications/Briefing/Fipronil.pdf>
- Thuyet, D. Q., Watanabe, H., Yamazaki, K., y Takagi, K. (2011). Photodegradation of imidacloprid and fipronil in rice-paddy water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86, 548-553.
- Torres, R., González, P., y Peña, S. (2010). Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28(3), 703-712.
- Truhaut, T. (1977). *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1: 151-173. Recuperado de: <https://scholar.google.com.pe/scholar?q=Truhaut%2C+T.+1977.+Ecotoxicology%3A+objetives%2C+principles+and+perspectives.+Ecotoxicolo>

[gy+and+Environmental+Safety.+1%3A+151-173&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](http://bcpcdata.com/pesticide-manual.html)

Turner J. (2013). The pesticides manual. Manual on line:  
<http://bcpcdata.com/pesticide-manual.html>

USEPA, (1996). New Pesticide Fact Sheet: Fipronil. EPA-737-F-96-005. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.

Van den Brink, P. J., Roelsma, J., Van Nes, E. H., Scheffer, M., y Brock, T. (2002). Perpest model, a case-based reasoning approach to predict ecological risks of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2500-2506.

Van Dijk TC, Van Staalduinen M.A. y Van der Sluijs JP, (2013) Macroinvertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One* 8:e62374.

Van der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Van Lexmond, M. B., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., y Girolami, V. (2015). Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning.

Vila, I., y Bahamonde, N. (1971). *Sinopsis sobre la biología del camarón del Río del Norte* (No. CIDAB-SH351-B3s). Servicio Agrícola y Ganadero. Departamento de Biología (Chile).

- Villa, S., Vighi, M., Casini, S., & Focardi, S. (2003). Pesticide risk assessment in a lagoon ecosystem. Part II: Effect assessment and risk characterization. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(4), 936-942.
- Vighi, M., y Calamari, D. (1996). Quality objectives for aquatic life: the problem of mixtures of chemical substances. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2, 412-418.
- Vijver, M. G., y van den Brink, P. J. (2014). Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid: a rebuttal and some new analyses. *PLOS One*, 9(2).
- Wipfler, E. L., Adriaanse, P. I., Ter Horst, M. M. S., Vlaming, J., Van den Brink, P. J., Peeters, F. M., y Groenwold, J. G. (2014). PRIMET\_Registration\_Ethiopia\_1. 1, technical description and manual. Alterra report, 2573, 133.
- Ware, G. W. (2000). *The Pesticide Book*. (5 ed.). Fresno, CA: Thomson Publications. Recuperado de :  
<https://www.cabdirect.org/?target=%2fcabdirect%2fabstract%2f19901139597>
- Wasiw, J., y Yépez, V. (2015). Evaluación poblacional del camarón *Cryphiops caementarius* en ríos de la costa sur del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26, 166-181.

Wood, T., y Goulson, D. (2017). SANIDAD/GREENPEACE: El riesgo medioambiental de los insecticidas neonicotinoides. *Vida apícola: revista de apicultura*, 201, 22-27.

Zheng, W., y Liu, W. (1999). Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pesticide science*, 55(4), 482-485.

## X. ABREVIATURAS

AA-EQS	Estándar de Calidad Ambiental - Concentración promedio anual
ANA	Autoridad Nacional del Agua
ANNPL	Actividad Natatoria Postlarval Normal
ANOVA	Análisis de Varianza
CDPR	Departamento de Regulación de Pesticidas de California
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
DT <sub>50</sub>	Vida media
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ERA	Evaluación de Riesgo Ambiental
EQS	Estándar de Calidad Ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GUS	Ecuación de Gusstaffson
HNPL	Hiper actividad natatoria
Hnpl	Hipo actividad natatoria
IMARPE	Instituto del Mar Peruano
INEI	Instituto Nacional de Estadística e Informática

IPCS	Programa Internacional de Seguridad Química
K <sub>ow</sub>	Coeficiente de partición n-octanol/agua
KOC	Coeficiente de adsorción del suelo
LOEC	Concentración más baja donde se observa efecto
MINAGRI	Ministerio de Agricultura y Riego
MINAM	Ministerio del Ambiente
NOEC	Concentración de efecto no observado
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEC	Concentración esperada en el medio
PNEC	Concentración prevista sin efecto conocido
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente
QR	Cociente de Riesgo
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria



**XI. ANEXOS**

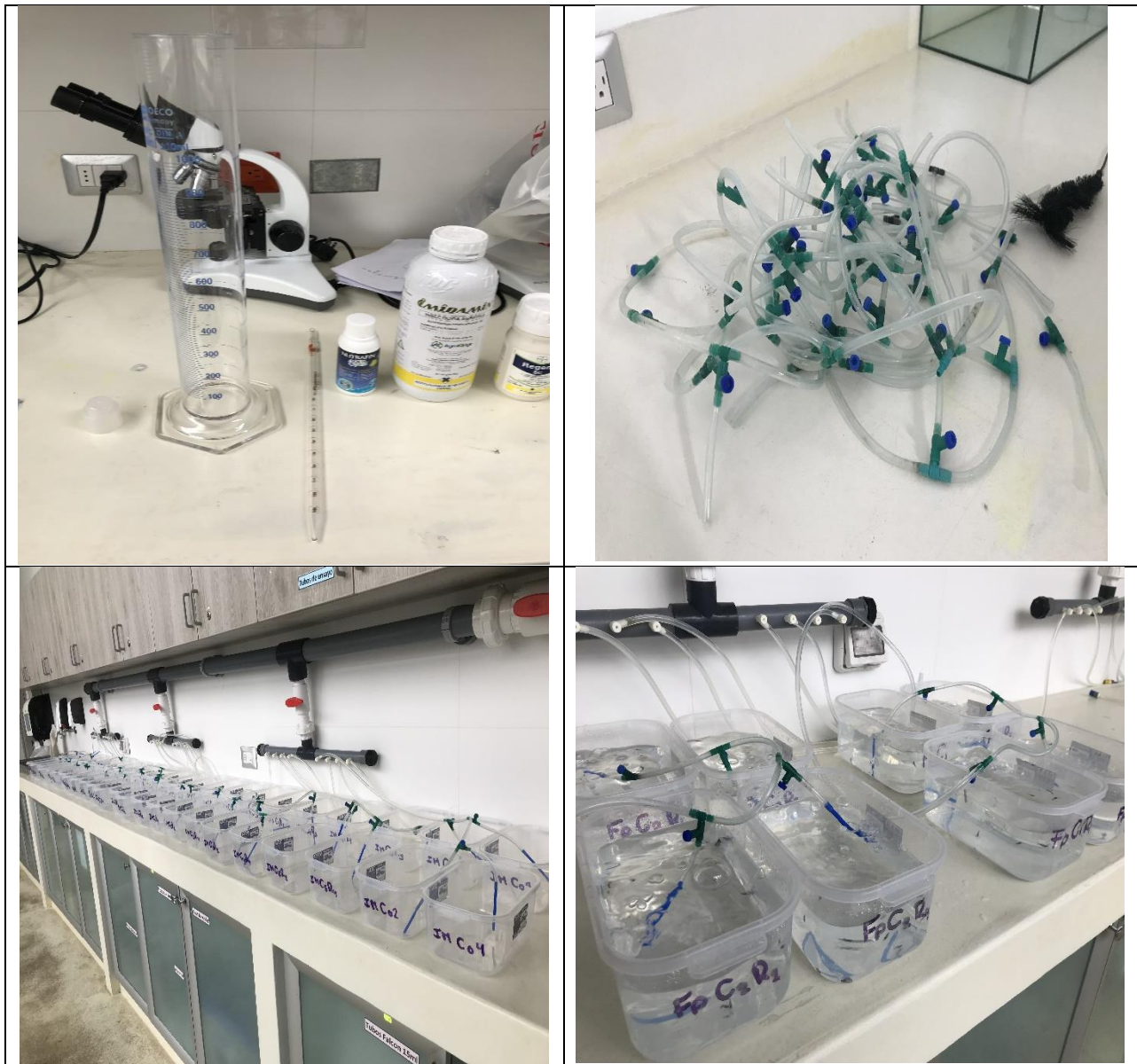
**1. Fotografías del procedimiento experimental**



**Figura 3 .** Obtención de las postlarvas de *C. camentarius* del río Cañete en el distrito de Calango



**Figura 4 .** Aclimatación de las postlarvas en el laboratorio de Acuicultura de la UCSUR por diez días, en un tanque de 750 L con aireación constante y alimentación diaria.



**Figura 5 .** Materiales, instalación y proceso del bioensayo en el laboratorio de Investigación de la UCSUR



**Figura 6.** Individuo vivo al estereoscopio (izquierda) e individuo minutos después de la muerte (derecha)