



**Universidad Nacional de La Plata**

**Facultad de Ciencias Exactas**

**2012**

*Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana*

*Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas*

*Lic. Pablo Martín Demetrio*

*Director: Dra. Alicia E. Ronco*

*Co- director: Dr. Carlos A. Bonetto*

## *Agradecimientos*

Al CIMA y la Facultad de Ciencias Exactas por otorgarme el lugar para desarrollar mis tareas. A la ANPCyT y CONICET por permitir que dedique mi tiempo a esta tesis.

A mis directores, Alicia Ronco y Carlos Bonetto, por guiarme, respertarme, escucharme y confiar en mí; por la predisposición constante de ambos.

A Gustavo Bulus, por su apoyo constante y desinteresado. A Federico Rimoldi, que siempre estuvo cuando lo necesité. A Hernán Mugni, por su compañerismo y generosidad. A Damián Marino y Estebán Colman, por estar siempre dispuestos para mis inquietudes. A Guillermo Natale por su manera de transmitirme motivación. A Leticia Peluso, Marilina Fogel, Ariel Paracampo, Pedro Carriquiriborde; Nicolás Notarangelo, Paola Amoedo. A Jeza, Coty, Agus, Juan Manuel y Julio. A todos aquellos que en este tiempo compartimos laboratorio, trabajo de campo o simplemente una charla con mate de por medio.

A mi familia que siempre me apoyó incondicionalmente. A mi mamá, por enseñarme a no bajar los brazos. A mi papá, por enseñarme con el ejemplo. A mis hermanos, por siempre estar. A mi tío por siempre brindarse. Agradezco a mi abuela, por motivarme el espíritu, y a mi abuelo, por contagiarme la curiosidad por las cosas que me rodean.

A Agustina por acompañarme en el último tramo de este camino.

"Al mismo tiempo que ansiamos  
explorarlo y comprenderlo todo,  
necesitamos que todo sea misterioso  
e insondable".

Henry David Thoreau

## ***Producción científica vinculada al desarrollo de la presente tesis***

### *Publicaciones*

Toxicity Persistence Following an Experimental Cypermethrin and Chlorpyrifos Application in Pampasic Surface Waters (Buenos Aires, Argentina) Mugni, H., **Demetrio, P.**, Marino, D., Ronco, A., & Bonetto, C. - *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* - 84 (5) 524-8 **2010**

Effect of Aquatic Vegetation on the Persistence of Cypermethrin Toxicity in Water. Mugni, H., **Demetrio, P.**, Bulus, G., Ronco, A., & Bonetto, C. - *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* - 86 (1) 23-7 **2011**

Effects of Pesticide Formulations and Active Ingredients on the Coelenterate *Hydra attenuata* (Pallas, 1766). **Demetrio, P.**, Bulus, G., & Ronco, A., - *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88 (1) 15-9 **2011**

Toxicity persistence in runoff and soil from experimental soybean plots following insecticide applications. Paracampo, A., Mugni, H., **Demetrio, P.**, Pardi, M., Bulus, G., Asborn, M. & Bonetto, C. - *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2012 (en prensa)**

### *Presentaciones a Congresos*

Efectos letales de mezclas de agroquímicos sobre *Hydra attenuata* (Cnidaria: Hidrozoa). **Demetrio, P.**, Bullus, G., & Ronco, A. / II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) / Mar del Plata 26-28 de Noviembre **2008**

Efectos letales de Roundup® Max sobre *Hydra plagiodesmica* y su aposimbionte. **Demetrio, P.**, Bulus, G., Ronco, A. / II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) / Mar del Plata 26-28 de Noviembre **2008**

Evaluación de riesgo preliminar del formulado Roundup® Max y sus componentes (glifosato y POEA). Martin, L., **Demetrio, P.**, Natale, G., Paracampo, A., & Bulus, G. / II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) / Mar del Plata 26-28 de Noviembre **2008**

Comparación del efecto del Roundup Max® y sus componentes (glifosato y POEA) sobre *Hydra attenuata*, *Hydra plagiodesmica* y su aposimbionte. **Demetrio, P.**, Bulus, G., Bonetto, C., & Ronco, A. / IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Lima, Perú 5-9 de Octubre

- Comparación de efectos letales sobre *Hydra attenuata* (Cnidaria: Hydrozoa) de los formulados e ingredientes activos de tres plaguicidas asociados al cultivo de soja RR. Demetrio, P., Bulus, G., Bonetto, C., & Ronco A / IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Lima, Perú 5-9 de Octubre **2009**
- Persistencia de la toxicidad de cipermetrina y clorpirifos posterior a un evento de aplicación en aguas superficiales de la región pampásica (Buenos Aires, Argentina) Mugni H, **Demetrio P**, Marino D, Ronco A, Bonetto C / IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Lima, Perú 5-9 de Octubre **2009**
- Evaluación de la persistencia de la toxicidad de tres insecticidas en agua de escorrentía de un cultivo experimental de soja RR **Demetrio, P**, Mugni, H., Pardi, M., Ronco, A., & Bonetto, C. / IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Lima, Perú 5-9 de Octubre **2009**
- Evaluación de la persistencia de la toxicidad de tres insecticidas en agua de escorrentía y suelo de un cultivo experimental de soja. Mugni, H., **Demetrio, P.**, Marrochi, N., Paracampo, A., Pardi, M., Ronco, A., & Bonetto, C. / IX Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Lima, Perú 5-9 de Octubre **2009**
- Comparación de la toxicidad del Roundup Max, glifosato técnico y POEA sobre el pez *Cnesterodon decemmaculatus* y el anfípodo *Hyaella curvispina* **Demetrio, P.**, Peluso, L., Bulus, G., & Ronco, A. / III Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina / Santa Fé, Argentina. 12-14 de Mayo **2010**
- Efectos letales de mezclas de tres plaguicidas asociados al cultivo de soja RR sobre *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). **Demetrio, P.**, Bonetto, C., & Ronco A / III Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina / Santa Fé, Argentina. 12-14 de Mayo **2010**
- Persistencia de la toxicidad del insecticida clorpirifos en agua de escorrentía en cultivos de soja con siembra directa y convencional. Paracampo, A., Mugni, H., **Demetrio, P.**, Marrochi, N., Scalise, A., Pardi, M., Ronco, A., & Bonetto C / III Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina / Santa Fé, Argentina. 12-14 de Mayo **2010**
- Efectos subletales de formulados de plaguicidas de soja RR en *Hydra attenuata* **Demetrio, P.**, Bulus, M., & Ronco, A. / X Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC América Latina / Cumaná, Venezuela 11-15 de Octubre **2011**

## ***Indice***

***Resumen***

***Glosario***

### ***Capítulo I: Introducción***

*El cultivo de la soja transgénica, 5*

*Plaguicidas asociados a la soja RR, 9*

*Evaluación de Riesgo Ambiental, 15*

*Hipótesis y Objetivos, 20*

### ***Capítulo II: Evaluación de Efectos***

*Introducción, 25*

*Materiales y Métodos, 27*

*Resultados, 38*

*Discusión, 55*

### ***Capítulo III: Escenarios de Exposición***

*Introducción, 68*

*Materiales y Métodos, 69*

*Resultados, 81*

*Discusión, 88*

### ***Capítulo IV: Evaluación de Riesgo***

*Introducción, 100*

*Materiales y Métodos, 102*

*Resultados, 105*

*Discusión, 115*

***Conclusiones, 125***

***Referencias, 130***

## Resumen

En la actualidad Argentina se encuentra dentro de los países que lideran la producción de soja RR a nivel mundial; alcanzando la misma y sus derivados a representar casi el 25% de la totalidad de las exportaciones de todo el país. El aumento de la producción en los últimos años no puede explicarse solamente por el aumento del área sembrada, sino también por un cambio en la organización de la producción y la tecnología asociada al mismo. El paquete tecnológico incluye semillas transgénicas, plaguicidas y el proceso de siembra directa. Entre los plaguicidas se incluye el glifosato como único o principal herbicida, y dentro de los insecticidas, el organofosforado clorpirifos y el piretroide cipermetrina son los más usados en nuestra región.

Se utilizaron bioensayos de toxicidad como herramienta bioanalítica para evaluar en laboratorio formulaciones (F) de los 3 plaguicidas mencionados, sus respectivos ingredientes activos (i.a.) y el coadyuvante POEA; posteriormente se evaluaron los efectos de mezclas binarias y ternarias de las formulaciones comerciales. Los bioensayos utilizados consideraban efectos letales en exposiciones agudas sobre el cnidario *Hydra attenuata* y el cladóceros *Daphnia magna*. Los resultados indican una toxicidad relativa para *H. attenuata*: clorpirifos F e i.a > POEA > cipermetrina F e i.a > glifosato F e i.a. En el caso de *D. magna* el orden es clorpirifos F e i.a > cipermetrina F e i.a >> POEA > glifosato F e i.a, existiendo en este caso una diferencia de potencia de tres órdenes de magnitud ( $\mu\text{g/L}$  a  $\text{mg/L}$ ) entre los valores de los insecticidas y sus formulaciones, con el herbicida (F e i.a.) como con el POEA. En el caso del glifosato F, se observa que el POEA explica parte de la toxicidad de la formulación de la cual forma parte. Se concluye la preferencia de las F sobre los i.a. para la valoración ecotoxicológica de los plaguicidas considerados.

Utilizando los mismos bioensayos de toxicidad mencionados, se evaluaron 25 combinaciones binarias y 22 ternarias tanto para *H. attenuata* como para *D. magna* resultando en 194 combinaciones en total. Los resultados observados, en conjunto, mostraron 52 combinaciones que no se alejaron de la aditividad, 141 combinaciones en las cuales se observó sinergismo y 1 combinación donde se observó antagonismo.

Se destaca que en las menores relaciones de concentraciones ensayadas el sinergismo observado es mayor y que debido a que las aplicaciones en campo son generalmente mezclas de formulaciones de plaguicidas se estaría subestimando los efectos.

Para establecer los escenarios de exposición en un cuerpo de agua de la región se realizó un monitoreo de un tributario de la zona interior del Arroyo El Pescado. Se tomaron 3 puntos de muestreo sobre el arroyo (S1, S2 y S3) siguiendo la dirección O-E, durante el calendario de siembra de soja RR desde la temporada 2007/8 hasta la 2009/10. Se determinaron los insecticidas cipermetrina, clorpirifos y endosulfán en agua y sedimentos; el herbicida glifosato se determinó en muestras de agua en la temporada 09/10. La detección en las muestras ambientales del cuerpo de agua se asoció principalmente a eventos de aplicación de plaguicidas o eventos de lluvias posteriores. La tasa de detección siguió el orden S1>S2>S3, coincidente con el gradiente en la utilización del uso del suelo para soja RR en el Arroyo El Pescado.

Se realizaron aplicaciones de los tres insecticidas en parcelas experimentales de cultivos de soja simulando eventos de lluvias posteriores al mismo. Se observó la persistencia de la toxicidad en el agua de la escorrentía; el orden obtenido fue clorpirifos > endosulfán > cipermetrina. La persistencia de la toxicidad en la misma, varía de menos de un mes a más de 3 meses dependiendo de las condiciones ambientales y culturales en el momento de la aplicación de los plaguicidas.

Se evaluó el riesgo para invertebrados acuáticos asociado a eventos de aplicación de cipermetrina, clorpirifos y glifosato para la región. Se utilizó un abordaje secuencial que incluyó Cocientes de Peligro, Evaluación de Riesgo Probabilística basada en la Distribución de Sensibilidad de Especies y la predicción de efectos para ecosistemas controlados según el modelo PERSPEST. Los resultados son consistentes entre sí, asociando un orden de riesgo cipermetrina>clorpirifos>>glifosato. En el caso de las mezclas, la presencia de cipermetrina determinó siempre un riesgo mayor a 0,5 (50%).

La entrada del plaguicida al cuerpo de agua tendría un carácter pulsátil, asociado a eventos de aplicación o lluvias posteriores, generando escenarios agudos de exposición. Se demostró que existe riesgo marcado para la biota de los cuerpos de

agua de la región asociados a cultivos de soja RR. Si bien existen muchas variables que pueden relacionarse con el impacto, se observa que el mismo varía en función del tipo de plaguicida aplicado en la mezcla y las condiciones ambientales en el momento de la aplicación. Considerando de manera integral los resultados se pueden establecer pautas de manejo, que si bien están supeditadas a consideraciones productivas, deberían ser tenidas en cuenta al momento de tomar decisiones de aplicaciones con una base ambiental.



## **Glosario**

**AI:** Acción Independiente

**CA:** Concentración Adición

**CPC:** Curva de Probabilidad Conjunta

**DCE:** Distribución de Concentraciones de Exposición

**DL<sub>50</sub>:** Dosis Letal para el 50% de la población de ensayo

**DSE:** Distribución de Sensibilidad de Especies

**EC<sub>50</sub>:** Concentración de Efecto para el 50% de la población de ensayo

**EC<sub>x</sub>:** Concentración de Efecto para x% de la población de ensayo

**ERA:** Evaluación de Riesgo Ambiental

**F:** Formulado

**HC:** Concentración de Peligro

**HQ:** Cociente de Peligro

**i.a.:** Ingrediente Activo

**IPV:** Índice Planeta Vivo

**LC<sub>50</sub>:** Concentración Letal para el 50% de la población de ensayo

**LC<sub>x</sub>:** Concentración Letal para x% de la población de ensayo

**PAF:** Potencial Fracción Afectada

**PAF<sub>i</sub>:** Potencial Fracción Afectada por las sustancia i

**PAF<sub>RA</sub>:** Potencial Fracción Afectada por una mezcla de sustancias con Respuesta Aditiva

**PERA:** Evaluación de Riesgo Probabilística

**REE:** Riesgo Ecológico Esperado

**TER:** Relación Toxicidad-Exposición

**USEPA:** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

**Capítulo I:**  
**Introducción**

En los últimos 50 años los ecosistemas han cambiado más rápida y extensamente que en cualquier otro período comparable de la historia humana; en gran parte para satisfacer la creciente demanda de alimentos, agua dulce, madera, fibra y combustible a nivel global. El cambio más significativo ha sido la transformación de aproximadamente un cuarta parte (24%) de la superficie terrestre a sistemas de cultivo (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

La población mundial en el 2010 se estimó en más de 6895 millones de personas, con una tasa de crecimiento para el lustro 2005-2010 de 1,162 (United Nations, 2011). Los modelos demográficos más favorables, que asumen una disminución de la tasa de crecimiento en la población global, proyectan más de 8131 millones de habitantes para el año 2045 (United Nations, 2011). La FAO (Food and Agriculture Organization) estimó el record histórico de más de 900 millones de personas en condiciones de subnutrición en todo el globo a partir de 2008. Los últimos datos actualizados corresponden a estimaciones del año 2010, que llevarían a contabilizar 925 millones de personas subnutridas en el mundo; representando la segunda cifra más alta desde que comenzó a registrar este dato en el año 1969 (FAO, 2011).

El escenario alimentario es más crítico considerando el nuevo mapa socio-económico global, que resultaría del crecimiento del BRIC (Brasil, Rusia, India y China) que concentra actualmente más del 42% de la población mundial y consecuentemente aumentaría la demanda de alimentos de una manera sustantiva. El cambio no sólo es un aumento cuantitativo, sino también cualitativo; si los países emergentes siguen tendencias similares a los modelos alimentarios de los países desarrollados caracterizados por una mayor relación animal/vegetal en la fuente de proteínas, la situación se agravaría. La pauta general en estos países desarrollados marca una fuerte disminución del consumo de cereales y leguminosas, acompañado de un gran incremento en el consumo de carnes y productos lácteos; pero se necesita de tres a quince veces más superficie para producir la misma cantidad de proteínas de origen animal en relación con las de origen vegetal (El Atlas del medio ambiente, 2008).

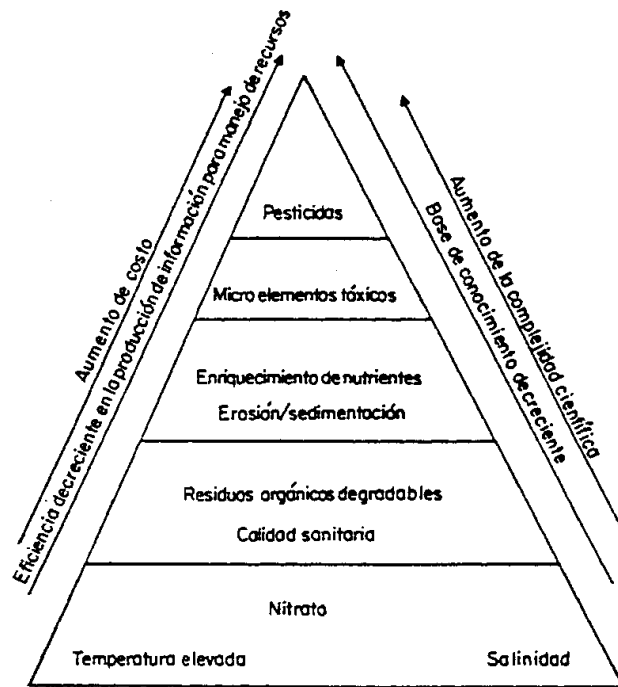
La principal fuente de alimentos del mundo, directa o indirectamente, es la agricultura. Es claro que en esta actividad productora de alimentos el agua es el

principal insumo, consumiendo la misma más del 70% de todos los suministros hídricos superficiales. De la actual superficie agrícola de todo el mundo, el 80% practica la agricultura de secano; pero es el 20% dependiente del riego artificial la que produce más del 40% de los cultivos alimentarios del mundo. La cantidad y calidad del recurso hídrico que entra al sistema agrícola, o agroecosistema, es un limitante de la productividad. El uso de agua por el sector agrícola compite con los usos doméstico e industrial. Pero aún en los países desarrollados es comparativamente bajo el uso de los otros sectores; si una persona necesita entre 2 a 4 litros de agua de ingesta diaria, el número se hace pequeño comparado con los 2.000 a 5.000 litros necesarios para producir el alimento ingerido en un día (FAO, 2011). Por esta razón el concepto de “agua virtual”, o sea la cantidad de agua por unidad de alimento que es consumida para su producción, es de suma importancia al considerar los balances de importación/exportación en el mercado agroalimentario (Pengue, 2006).

Un agroecosistema se diferencia de un ecosistema natural porque necesita energía auxiliar que aumenta o subsidia la solar, como es el caso de los fertilizantes, plaguicidas, agua de riego y/o procesos dependientes de maquinaria; además de tener una baja diversidad apuntando a la producción de una o pocas especies que están sometidas a una selección artificial (Odum & Warrett, 2006).

La producción global de cultivos alimenticios puede crecer por la cantidad de superficie destinada a tal fin o por el aumento del rendimiento por hectárea (productividad). La superficie agrícola por persona está disminuyendo, reduciéndose de 0,38 hectáreas en 1970 a 0,23 en el año 2000 y se prevé que en el año 2050 sea solo de 0,15 hectáreas (FAO, 2011). Un 25% de la superficie del planeta está destinada a cultivo de algún tipo. La respuesta a la demanda de alimento en los últimos 50 años está asociada con el aumento de la producción más que al aumento de la superficie utilizada para cultivos; solo 29% del incremento es atribuible a esta última razón. Esto es beneficioso por un lado, porque disminuye la presión sobre los ecosistemas naturales por ser desplazados por cultivos. Por otro lado, se intensifica la presión sobre los suelos y los ecosistemas acuáticos continentales asociados, como es el caso de la contaminación difusa originada por fertilizantes y plaguicidas (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

El agua es esencial para la vida y como recurso es prioritario. Se considera a la agricultura el principal factor de degradación de los recursos hídricos superficiales y subterráneos (FAO, 2004). Estos reservorios de agua dulce dadas las características del ciclo hidrológico, aún siendo menos del 1% del agua del planeta, representan nuestra fuente básica de acceso al recurso. Ya en la década de los '90 la USEPA adjudicó a la agricultura el estar envenenando sus ríos y lagos; después de informar detalladamente como el uso del suelo con la actividad agrícola se asociaba a un aumento de sedimentos y nutrientes, conjuntamente con la presencia de plaguicidas (USEPA, 1994). El problema es complejo, las fuentes de entradas son no puntuales, lo que dificulta claramente su control, y por otro lado el sistema actual de producción agrícola es más demandante de sustancias químicas externas. Más se profundiza la cuestión considerando la cantidad de superficie que hoy tiene actividad agrícola. Si bien la agricultura es solo una de las potenciales fuentes de contaminación del ambiente acuático, es considerada la actividad que más contribuye en todas las categorías de contaminantes (FAO, 2004). La escorrentía representa un mecanismo de transporte para las distintas sustancias asociadas al uso de suelo por donde atraviesa el flujo; los sistemas acuáticos continentales son alimentados en parte por estos flujos superficiales. Los impactos de los distintos contaminantes varían ampliamente en magnitud, como en la escala espacial y temporal; el alcance y la complejidad relativa asociada a la contaminación difusa por la agricultura se puede ordenar jerárquicamente según Rickert (1993) de acuerdo a la Figura I.1. La protección de los sistemas acuáticos de agua dulce es una cuestión estratégica para preservar el recurso; evaluar la calidad y cantidad de lo que ingresa a estos sistemas es importante para poder tomar medidas de manejo racional.



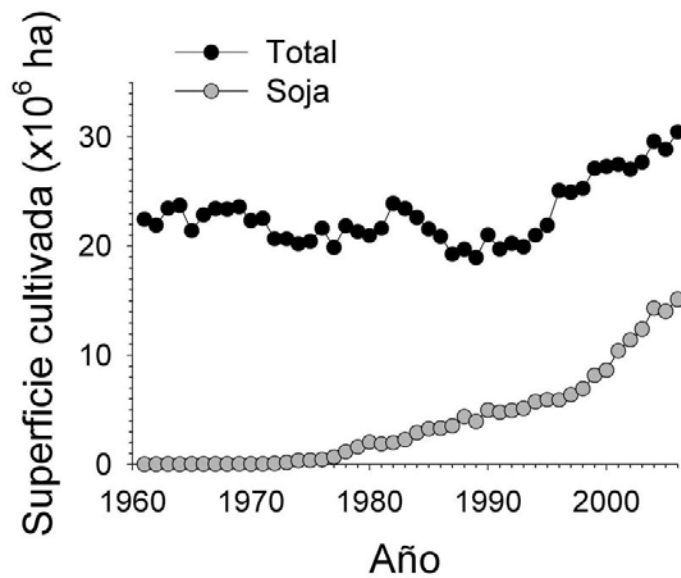
**Figura I.1.** Complejidad jerárquica de los problemas relacionados con la calidad del agua por la agricultura (Rickert, 1993)

El Índice Planeta Vivo (IPV) es utilizado a escala global para cuantificar las tendencias de cerca de 7953 poblaciones de 2544 especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. El IPV calcula la tasa anual de cambio promedio desde que se empezaron a tomar los datos (año 1970) hasta el año 2007; considerando los números de todo el planeta se observa una disminución del IPV del 30% (Collen *et al*, 2009). Si se analizan los datos de manera disgregada, obtenemos que el IPV de la región Neotropical es el segundo de mayor descenso respecto al resto de las regiones biogeográficas, llegando alrededor de 55%. El IPV global, considerando sólo los ambientes de agua dulce (2750 poblaciones de 714 especies), disminuyó en aproximadamente 35%; siendo mayor que lo observado para ambientes marinos y terrestres. Esta tendencia en la pérdida de diversidad biológica se considera un efecto asociado a la fuerte presión sobre los sistemas de agua dulce por la actividad humana (WWF, 2010).

### ***El cultivo de la soja transgénica***

La agricultura seguirá siendo la fuente primaria de alimento del mundo, directa o indirectamente, y en un contexto global, según los actuales pronósticos, la demanda de alimentos seguirá en ascenso por lo menos en el corto y mediano plazo. Desde una visión regional, América Latina, cuyas exportaciones de alimentos casi se duplicaron durante la última década, se ha transformado en un proveedor muy importante de alimentos para el resto del mundo (FAO, 2011). Ejemplo de esto es el caso de la soja, donde Brasil y Argentina son productores líderes del cultivo, siguiendo a EEUU y superando a China. Estos cuatro países representan el 80,22% de la superficie cosechada y el 88,32% de los volúmenes producidos en el mundo para la soja en la campaña 09/10. En el caso concreto de Argentina las exportaciones agrícolas son las mayoritarias, llegando la soja y sus productos a superar el 22% del volumen total de las exportaciones de nuestro país; por detrás quedan el trigo y el maíz, que de manera conjunta constituyen un 8,5% de lo exportado (SAGPyA, 2011). La producción de soja en la Argentina alcanzó en la campaña 09/10 casi el 21% de los volúmenes producidos en el mundo, dato significativo dado que es un cultivo relativamente nuevo en nuestro país.

El crecimiento de la soja en Argentina fue exponencial, en el año 1971 solo 36.000 hectáreas estaban dedicadas al cultivo, pasando por las 8.580.000 en la campaña 99/00 y llegando a 18.130.904 de hectáreas en la campaña 09/10 (SAGPyA, 2011). Según los registros el área agrícola se mantuvo relativamente constante hasta mediados de la década del '90 alcanzando los 22 millones de ha. A partir de ese punto empezó a crecer de manera acelerada, llegando a más de 30 millones de ha en el año 2006 y más del 50% era soja (Satorre, 2005). La superficie total cultivada de nuestro país se ha incrementado aproximadamente 50% desde 1990 hasta la actualidad (Aizen *et al.*, 2009), esto lleva a concluir que la expansión de la frontera agrícola en Argentina puede explicarse en gran parte como consecuencia de la expansión del cultivo de soja (Figura I.2).



**Figura I.2.** Superficie total cultivada y sembrada con soja en Argentina en el período 1961-2006 (tomado de Aizen *et al*, 2009)

Es de destacar que en Argentina el aumento en la producción no puede explicarse solamente por el aumento en el área sembrada. Este fenómeno de aumento productivo tiene dos causas sustantivas (Bisang, 2008), que son las nuevas maneras de organizar la producción, por un lado, y la incorporación masiva de la nueva tecnología por el otro. La agricultura de nuestro país siguió la tendencia global de la conocida revolución verde, aunque con un manifiesto atraso temporal en relación a países desarrollados, teniendo como pilares la mecanización de los procesos agrícolas, el uso masivo de fertilizantes y la utilización de variedades híbridas de semillas. Desde mediados de la década de los '90 y siguiendo la tendencia global mencionada, el cultivo de soja en el país fue quizás el ejemplo más destacado. En relación a la organización de la producción, hubo cambios radicales, pasando de la situación en la cual los dueños de los campos realizaban el laboreo y siembra a principios de los '90, hasta llegar al actual modelo que tuvo como resultado ya en el año 2002 que las dos terceras partes de la siembra en el país fue realizada por empresarios sin tierra propia, y lo hacían aplicando un proceso totalmente mecanizado conocido como siembra directa. Esta tendencia que en la actualidad sigue creciendo resulta en una concentración de gran parte de la producción en un pequeño grupo de empresarios.

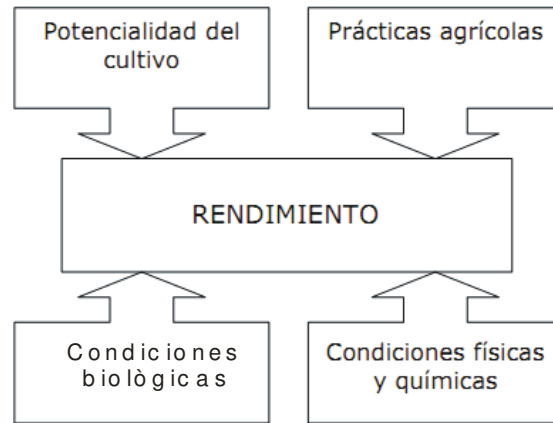


El modelo cambió profundamente, el clásico sector primario de la economía argentina es cada vez más interdependiente del sector secundario, la industria que provee los insumos, y terciario, que provee los servicios relacionados conjuntamente con el asesoramiento. Esto dio un empuje sin precedentes formando redes de producción e innovación que fomentan el desarrollo de capacidades técnicas y operativas de los actores que hoy conforman la actividad. Pero es de destacar también que en el caso de la soja, la cual más del 95% sembrada en nuestro país es transgénica (Pengue 2000; Satorre 2005), el productor adquiere un paquete de insumos, que incluye las semillas transgénicas, el herbicida glifosato y un conjunto variable de plaguicidas, que conjuntamente con el proceso de siembra directa mencionado, conforman hoy el paquete tecnológico de la soja RR. La mayor producción se centra en la provincia de Buenos Aires, seguida por Córdoba y Santa Fé, dentro de los límites de la ecorregión Pampa establecida por Burkart *et al.* (1999).

### ***Tecnología asociada a la soja transgénica***

Los procesos productivos, no sólo en el sector agropecuario, intentan maximizar el rendimiento. En el caso de los cultivos podemos citar cuatro factores relacionados (Figura I.3) que son contemplados para determinar el mismo: las condiciones ambientales, las potencialidad del cultivo, las condiciones biológicas y las prácticas agrícolas (Cisneros, 1995). En el caso particular de la soja podemos observar claramente como la tecnología se pone al servicio de que estos factores sean óptimos para el desarrollo del cultivo. Por el tipo de clima y suelo de la región pampeana el mayor estrés ambiental puede ser el déficit hídrico en estadios críticos. Referido a la potencialidad del cultivo, las semillas hoy utilizadas tienen un linaje híbrido considerable, sumado a que están genéticamente modificadas para su supervivencia en los escenarios de aplicación masiva de herbicida glifosato. Las condiciones biológicas asociadas con las relaciones interespecíficas del agroecosistema también intentan optimizarse, por un lado se maximizan las positivas para el cultivo, como la simbiosis a través de inoculantes y, por otro lado se minimizan las negativas, como las vinculadas a plagas, malezas y enfermedades, a través del uso de plaguicidas principalmente. En referencia a la práctica agrícola, la técnica de siembra directa y su

mecanización permite extender el cultivo a zonas consideradas con poca factibilidad para la agricultura.



**Figura I.3.** Factores considerados para maximizar el rendimiento de un cultivo (tomado de Cisneros, 1995)

La producción agrícola se describe como un conjunto de decisiones orientadas a obtener el mejor rendimiento posible de un cultivar con un genotipo determinado en un ambiente dado. Existe un rendimiento potencial, un rendimiento alcanzable y un rendimiento alcanzado. El rendimiento potencial es aquel que se obtiene en condiciones óptimas y en ausencia de adversidades de tipo biótica o abiótica; sus factores definitorios se constituyen por la fisiología del cultivar, latitud y los ciclos anuales asociados a la radiación solar. El rendimiento alcanzable es el obtenido al ser limitado en recursos abióticos esenciales, como el agua y los nutrientes; su escasa provisión causa un rendimiento inferior al potencial. Por último, el rendimiento logrado o real, depende de escapar de los efectos de los factores reductores, tanto de índole abiótica, como el granizo o la contaminación, como de índole biótica como el caso de las plagas (Coonor & Loomis, 2002).

En sentido amplio plaga es todo organismo capaz de producir algún tipo de daño, directo o indirecto. Tiene una connotación antropocéntrica, dado que una población de organismos cuya densidad poblacional se encuentra por debajo de los niveles de daño económico, puede incrementar su número y, consecuentemente, convertirse en plaga (Ware, 2004; Matthews, 1984). Las pérdidas agrícolas pueden ser potenciales, las que

ocurrirían sin prácticas de protección, o reales, aquellas que ocurren aún con las prácticas de protección. A nivel global, dentro de los principales cultivos comerciales, las malezas son las que producen mayores pérdidas potenciales (34%), seguidos por los insectos (18%) y los hongos (16%). Para la soja se estiman entre 26-29 % las pérdidas potenciales globalmente; y si comparamos para las malezas, insectos y hongos la relación porcentual entre la pérdida potencial y real obtenemos -74%, -42% y -24%, respectivamente (Oerke, 2006).

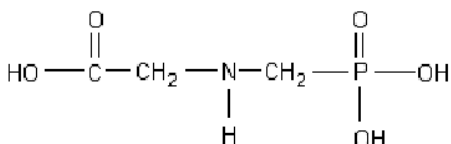
El control de plagas condiciona el rendimiento final y es un punto clave del manejo de ecosistema agrícola. Si bien desde los '70 se trabaja a nivel internacional para conjugar estrategias químicas y biológicas en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), en la actualidad el control químico mediante plaguicidas sigue siendo la herramienta de control más difundida en nuestro país. El glifosato es el herbicida obligado para el cultivo de soja transgénica que casi es la totalidad de la soja sembrada; siendo el principio activo de plaguicida más comercializado en la Argentina. Los principales insecticidas asociados a la soja son productos formulados basados en el piretroide cipermetrina, el organofosforado clorpirifos y, en menor medida, el organoclorado endosulfán. Este último con prohibición, de importación en 2012 y de uso en 2013, en el ámbito nacional (SENASA-Res. 511/11).

### ***Plaguicidas asociados a la soja RR***

#### ***Glifosato***

El glifosato (N-(fosfonometil) glicina / CAS 1071-83-6) ácido y sus sales son Categoría III, moderadamente tóxicos (USEPA, 1993). Tiene una masa molecular de 169,09 y su fórmula empírica es  $C_3H_8NO_5P$  (Figura I.4) Se presenta mayormente en las formulaciones como sal de isopropilamina (IPA), aunque puede encontrarse en otras formas como ácido o diversas contraiones, como es el caso del trimetilsulfonio. Puro se presenta como un sólido cristalino blanco, muy soluble en agua ( $>12.000$  mg/l, a  $25^\circ C$ ) y poco soluble en solventes orgánicos. Su presión de vapor es despreciable ( $<1 \times 10^{-5}$  Pa a  $25^\circ C$ ). El cociente octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) es bajo, siendo de -2,8 y posee un alto coeficiente de adsorción, estimándose mayor a 20.000. Es un

compuesto anfótero y se puede encontrar formando compuestos iónicos distintos en función del pH del medio (WHO, 1994).



**Figura I.4.** Estructura del glifosato.

Es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y postemergente. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la vía del ácido shiquímico; la cual proporciona la síntesis *de novo* de los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) en plantas y microorganismos, mientras que los animales los obtienen a través de la dieta. Estos aminoácidos son esenciales para la síntesis de tetrahidrofolato (cofactor de reacciones biosintéticas de proteínas y ácidos nucleicos), ubiquinona y vitamina K, indispensables para el desarrollo de todos los organismos. Las estructuras aromáticas se encuentran en gran número en los productos de metabolismo secundario de la planta, estimándose que hasta un 35% del peso seco de esta es producida a partir de la vía del ácido shiquímico (Stenersen, 2004). Dado que al ser asimilado por las hojas se trasloca por el floema tiene efecto sistémico (Franz *et al.*, 1997). Los compuestos surfactantes usados en las formulaciones comerciales disminuyen la tensión superficial entre las superficie foliar y la gota de la aplicación.

El glifosato es usado en distintas oportunidades a través del ciclo del cultivo, generalmente antes de la siembra para generar un barbecho químico, así como en la pre y postemergencia. Ocho de las diez formulaciones más comercializadas de plaguicidas en todo el país tienen como ingrediente activo (i.a.) el glifosato (CASAFE, 2011). Las dosis de aplicación recomendadas para el cultivo de soja varían dependiendo de las malezas presentes en los lotes y las formulaciones utilizadas. Para el caso del Roundup MAX<sup>®</sup> (Monsanto), se encuentran en el intervalo de 0,8 a 3,2 kg/ha, las cuales para su aplicación deben ser diluidas en 100 l/ha. Dado que el

formulado posee un 74,4% de glifosato, en una aplicación de 1 kg/ha, la concentración resultante en la misma es de 7440 mg/l.

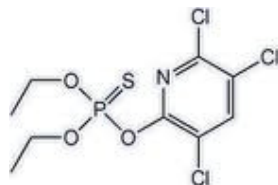
Su carácter anfótero se refleja en un Kd alto que resulta en una movilidad limitada en el suelo. Su persistencia en el mismo es moderada, con una vida media estimada en este compartimiento de 32 días, con datos de campo que varían entre 1 y 197 días (Giesy *et al.*, 2000). En nuestro país existen estudios en los que se informa asociación del compuesto al material en suspensión en aguas de lagunas, con una vida media de 5,77 días para una dosis de 6 mg/l y 7,73 días para una dosis de 12 mg/l (Perez *et al.*, 2007). Su degradación por microorganismos es la vía primaria de disipación en el ambiente, siendo la fotodegradación y la volatilización despreciables. Se estima una vida media de entre 7 a 14 días en el agua, según los datos reportados (Giesy *et al.*, 2000).

Referido a la toxicidad en mamíferos, el glifosato tiene una muy baja toxicidad aguda oral ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg) y dérmica ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg), siendo prácticamente no tóxico por estas vías. El glifosato técnico prácticamente no es tóxico para peces ( $LC_{50} > 80$  mg/l) ni anfibios y ligeramente tóxico para aves ( $LC_{50}$  dieta  $>4500$  mg/l). En el caso de invertebrados acuáticos puede ser ligeramente tóxico ( $LC_{50} > 10$  hasta aproximadamente 1000 mg/l), siendo informado efectos para insectos benéficos como las abejas (CONICET, 2009). Se reportaron variaciones de la toxicidad en función de los coadyudantes que acompañan al glifosato; el mayor número de estudios se centra en el surfactante POEA (polioxietilamina), evidenciando que las formulaciones con este compuesto son más tóxicas que aquellas que poseen uno alternativo (Bradberry *et al.*, 2004).

### ***Clorpirifos***

El clorpirifos (O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato/CAS 2921-88-2) es un plaguicida organofosforado clasificado como Clase II, moderadamente tóxico (USEPA, 2002), de amplio uso en la agricultura. Tiene un peso molecular de 350,6 y una fórmula empírica  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$  (Figura I.5). El producto técnico es un sólido blanco cristalino, con baja solubilidad en agua ( $< 1$  mg/l, a 25 °C) pero soluble en la

mayoría de los solventes orgánicos. Posee una moderada presión de vapor ( $2,03 \times 10^{-5}$  mm Hg a  $25^{\circ}\text{C}$ ), un  $\log K_{ow}$  de 4,96 y un  $\log K_{oc}$  de 3,7 (USEPA, 2002).



**Figura I.5.** Estructura del clorpirifos

Las formulaciones de clorpirifos son utilizadas como insecticida y acaricida que actúa por contacto, ingestión y/o inhalación sobre los organismos. El principal modo de acción es la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, una enzima implicada en las sinapsis nerviosas y en la neurotransmisión muscular, produciendo efectos neurotóxicos (Barron & Woodburn, 1995; Krieger, 2010). La acetilcolina, al no ser degradada, se acumula en exceso en la sinapsis causando hiperactividad, lo cual provoca espasmos musculares incontrolables, y dependiendo de la dosis, resulta en parálisis, insuficiencia respiratoria y muerte (Barron & Woodburn, 1995). Existen distintos formulados comerciales con sustancias coadyudantes que acompañan el ingrediente activo, aumentando su solubilidad y la penetración a la cutícula de artrópodos. Se utiliza antes de la floración del cultivo o cuando se empiezan a ver los daños, la aplicación puede ser terrestre o aérea. Para el caso del formulado PirfoGlex<sup>®</sup> (=Clorfox)<sup>®</sup> de Gleba S.A., las dosis recomendadas varían entre 0,4 y 1 l/ha, que para su aplicación se diluyen en 100 l de agua. Dado que el formulado contiene 48 % de principio activo, entonces en una aplicación de 0,8 l/ha la concentración resultante es de 3840 mg de i.a. clorpirifos/l. En nuestro país la comercialización de este insecticida pasó de 1.575.238 l en el año 1999 a 9.121.959 l en el año 2010, siendo en la actualidad el insecticida que lidera el mercado según el volumen de ventas (CASAFE, 2011).

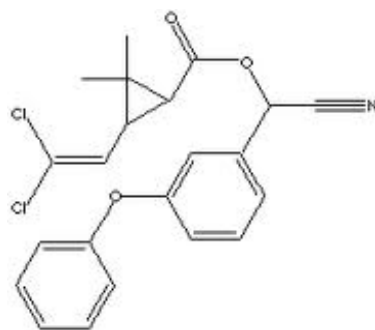
El comportamiento ambiental del insecticida indica una persistencia moderada en suelos y bajos valores de vidas medias en aguas. Este comportamiento es resultante de su tendencia a volatilizarse, debido a una presión de vapor moderada con baja solubilidad en agua, y a asociarse con el sedimento. El principal proceso de

transformación en agua sería por hidrólisis y la misma aumenta considerablemente a pH alcalinos. Estudios muestran concentraciones de clorpirifos en un rango de 73 a 700  $\mu\text{g/l}$  en cuerpos de agua adyacentes a cultivos de América del Norte (Moore *et al.*, 2002; USEPA, 2002; Mazanti *et al.*, 2003). En nuestro país se detectaron concentraciones de clorpirifos en arroyos adyacentes a cultivos de soja pampeanos con un promedio de  $1,7 \times 10^{-3}$  mg/l posterior a eventos de lluvia (Marino & Ronco, 2005). La mayor concentración medida es en la misma zona durante un período de escorrentía posterior a lluvias (Jergentz *et al.*, 2005), detectando  $0,45 \times 10^{-3}$  mg/L y para el mismo evento el máximo de 225,8 mg/kg en material particulado.

En referencia a la toxicidad de mamíferos se lo ubica en el grupo de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, siendo clasificado por su toxicidad aguda oral ( $DL_{50} > 130$  mg/kg) y dérmica ( $DL_{50} > 200$  mg/kg) como moderadamente tóxico. Es altamente tóxico ( $LC_{50} < 10$  mg/L) para peces y anfibios; en estos últimos hay registros también del efecto de su principal producto de degradación (clorpirifos-oxon). Para los invertebrados acuáticos se considera altamente tóxico o muy altamente tóxico con concentraciones letales en algunos casos menores a  $0,1 \mu\text{g/L}$  (PAN, 2011).

### ***Cipermetrina***

La cipermetrina ((R,S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-carboxilato/ CAS 52315-07-8) es un plaguicida sintético de la familia de los piretroides, por tener como base estructural el piretro extraída de flores de crisantemo; clasificado como Clase II (moderadamente tóxico) por la USEPA. Presenta ocho isómeros, tiene un peso molecular de 416,31 y una fórmula empírica  $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ . Su estructura se observa en la Figura I.6. La cipermetrina grado técnico es un líquido viscoso de color amarillo-marrón, con muy baja solubilidad en agua ( $<0,01$  mg/l, a  $20^\circ\text{C}$ ) pero soluble en solventes orgánicos. Posee una presión de vapor ( $1,9 \times 10^{-7}$  Pa), un  $\log K_{ow}$  de 6,94 y  $\log K_{oc}$  de 5 (WHO, 1989).



**Figura I.6.** Estructura de la cipermetrina

Las formulaciones de cipermetrina, que incluyen generalmente una mezcla de isómeros, son utilizadas como insecticidas de amplio espectro. El modo de acción de los piretroides se debe a que causan una prolongación de la apertura de los canales de sodio neuronales dependientes de voltaje, lo que resulta en una transmisión continua del impulso nervioso (Stenersen, 2004; Krieger, 2010) por no existir una despolarización significativa. Las características de los distintos isómeros determinan el lugar de unión al canal de sodio y según el estereoisómero del que se trate la afinidad que tendrá con el mismo. La cipermetrina pertenece al grupo II dentro de los piretroides, por poseer un grupo CN en posición alfa, teniendo al cloro como halógeno sustituyente y afecta principalmente al sistema nervioso central (Krieger, 2010). Como en el caso del clorpirifos se formulan con coadyudantes que disminuyen la tensión superficial, aumentando su solubilidad y permitiendo una mayor penetración a la cutícula de los artrópodos. Se aplica en el cultivo generalmente antes de la floración de la soja o ante la aparición de plagas puntuales. Las dosis recomendadas para la aplicación de cipermetrina varían con las plagas objetivo y las formulaciones utilizadas. Para el caso del formulado Glextrin<sup>®</sup> (Gleba S.A.), las dosis varían entre 100 y 200 mL/ha. Para su aplicación se diluyen con 100 L de agua. El formulado contiene 25 % de principio activo, por lo tanto la concentración de aplicación resultante es del orden de 250 mg de principio activo cipermetrina/L. En nuestro país la comercialización de este insecticida pasó de 973.396 l en 1999 a 3.534.477 en 2010 (CASAFE, 2011).



Con referencia al destino ambiental, la cipermetrina tiene persistencia moderada en suelos y se degrada más rápidamente en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica. Se hidroliza en medio acuoso, con mayor tasa de hidrólisis a pH superiores a 8. La bibliografía indica una vida media, que varía de 8 a 16 días, siendo susceptible a la fotodegradación. La baja solubilidad en agua puede explicar la tendencia a la adsorción en partículas de suelo. Al contar con una muy baja solubilidad y baja presión de vapor, se adsorbe, y se asocia a material particulado en ambientes acuosos. Esto limita su movimiento particularmente en los suelos. En nuestro país se detectaron concentraciones de cipermetrina en arroyos adyacentes a cultivos de soja pampeanos con un promedio de  $18,78 \times 10^{-3}$  mg/l posterior a eventos de lluvia (Marino & Ronco, 2005). La mayor concentración medida es en la misma zona durante un período de escorrentía posterior a lluvias (Jergentz *et al.*, 2005) detectando  $0,71 \times 10^{-3}$  mg/l y para el mismo evento el máximo de 13,2 mg/kg para el clorpirifos en material particulado.

Referido a la toxicidad en mamíferos se lo ubica en el grupo de los neurotóxicos, siendo clasificado por su toxicidad aguda oral ( $DL_{50} > 300$  mg/kg) y dérmica ( $DL_{50} > 1600$  mg/kg) como moderadamente tóxico. Es muy altamente tóxico ( $LC_{50} < 10$  mg/l) para peces y anfibios, adjudicándolo a una baja tasa de metabolización a diferencia de las aves, siendo prácticamente no tóxica para las mismas. Para el caso de invertebrados acuáticos se considera altamente tóxico o muy altamente tóxico con concentraciones letales en algunos casos menores a 0,1 ug/l (PAN, 2011).

### ***La Evaluación de Riesgo Ambiental***

La Ecotoxicología tiene dentro de sus objetivos, proporcionar conocimiento básico para la identificación y valoración de la peligrosidad de diferentes compuestos, incluidos los plaguicidas (Bro-Rasmussen, 1997). Esta información puede incorporarse en un esquema conocido como Evaluación de Riesgo, considerándolo una valiosa herramienta para evaluar el riesgo de una sustancia sobre la salud humana y el medio ambiente; adoptándolo de manera amplia en distintas legislaciones nacionales e internacionales (Thornton, 2000).

La Evaluación del Riesgo Ecológico es el proceso por el que se define la probabilidad de un determinado estrés para producir efectos ecológicamente adversos; en la bibliografía se utiliza la sigla ERA (Ecological Risk Assessment) para hacer referencia a este proceso. Se referirá de esa manera debido a su aceptación y uso en nuestro idioma. El proceso ERA constituye una herramienta para la gestión de actividades humanas potencialmente generadoras de efectos no deseables sobre el medio, pudiéndose ser tanto de carácter prospectivo como retrospectivo (USEPA, 1998).

Según la USEPA (1998), el proceso del ERA se constituye a través de la caracterización de efectos y la caracterización de la exposición. Ambos componentes forman parte de tres fases: la formulación del problema, el análisis del riesgo y la caracterización del riesgo.

En la **Formulación del Problema** se generan y evalúan las hipótesis sobre los posibles efectos que podrán ocasionar las actividades humanas sobre el medio. Es importante en este punto desarrollar modelos conceptuales de la relación entre el agente causal y los parámetros a determinar. Los parámetros seleccionados deberán poder representar valores cuantificables de valores ecológicos definidos sobre unidades específicas (cuerpo de agua en nuestro caso). Los modelos conceptuales representan de manera visual las relaciones entre los receptores biológicos y la exposición de estos a un estrés determinado.

En el **Análisis del Riesgo** se realiza la Caracterización de Exposición y la Caracterización de Efectos a partir de los parámetros seleccionados y los modelos conceptuales desarrollados previamente. Durante la fase de análisis se evaluarán los datos existentes para determinar cómo el receptor es expuesto al estrés (caracterización de la exposición) y qué tipo de efectos ecológicos producirá o está produciendo (caracterización de efectos). Durante la caracterización de la exposición se analizan las fuentes generadoras de la exposición, ruta y la simultaneidad espacial y temporal con el receptor. Existen métodos de estimación para el cálculo de las PECs (*PECs: Predicted Effect Concentrations*) o concentraciones esperables en los distintos

compartimentos ambientales, considerando las propiedades físico-químicas del contaminante.

En la caracterización de efectos se describen los efectos producidos por el factor de estrés contaminante a través de los parámetros seleccionados. La relación para el caso de sustancias químicas suele analizarse mediante curvas dosis-respuesta de una especie particular para cierta unidad de tiempo de exposición al compuesto. En la mayoría de los casos se obtiene una concentración que no produce efecto (PNEC: *Predicted No-Effect Concentration*) y se obtiene, en general, a partir de datos obtenidos de ensayos en laboratorio con unas pocas especies, implicando la extrapolación de estos resultados a efectos en el ecosistema (Crossland & La Point, 1992). Existen una variedad de métodos basados en el uso de factores de seguridad o modelos estadísticos (Bro-Rasmussen, 1997; Punja 1997, Roman *et al.*, 1999).

En la **Caracterización del Riesgo** se integran los resultados de la caracterización de exposición y efectos de la fase previa, se determina si los efectos adversos son o no aceptables considerando la incertidumbre asociada a los datos. Los criterios por los que se define el límite entre aceptable o no aceptable son actualmente objeto de un amplio debate científico. Existen no obstante diferentes técnicas para la estimación del riesgo, estando su utilización condicionada a los datos obtenidos sobre exposición y efectos durante la fase anterior.

La caracterización de riesgo más sencilla se realiza en función de cocientes entre una medida puntual de cada uno de los escenarios: las Relaciones Toxicidad/Exposición, (TER: *Toxicity Exposure Ratios*) y los Cocientes de Peligro (HQ: *Hazard Quotients*). El número de datos utilizados es insuficiente generalmente, por lo que se asocia un grado de incertidumbre en las estimaciones de este tipo (escasez de parámetros y de especies ensayadas, datos no fidedignos, valores genéricos de los modelos y variabilidad natural). Algunos autores adoptan el peor escenario posible para contrarrestar esta incertidumbre, basándose en el “principio precautorio”. Desde el punto de vista científico es aconsejable un análisis probabilístico de los escenarios de exposición y efecto, dado que disminuye la incertidumbre respecto a los cocientes mencionados. Existen documentos guía para su aplicación (USEPA, 1997), aunque en

la mayoría de los casos los datos son insuficientes para poder hacerlo, lo que limita su uso en la gestión y la industria.

### ***Impacto en los ambientes regionales***

La planicie pampeana está compuesta de sedimentos cuaternarios de origen andino con bajas pendientes que nunca superan 1 m/km con excepción de los sistemas serranos de origen terciario (Andrade, 1986). Sus suelos se componen principalmente de loess, caracterizados por un alto contenido de nutrientes y una alta de capacidad de intercambio catiónico, resultando en una muy buena fertilidad (Papadakis, 1980). La temperatura promedio anual varía entre 18°C a 21°C y las precipitaciones promedio varían de 600 a 1000 mm al año; el déficit hidrológico puede presentarse en el verano, particularmente en la región más occidental. La fisonomía dominante es el pastizal, que se establece porque las gramíneas compiten eficientemente por el agua, inhibiendo el establecimiento de árboles de madera dura (Parodi, 1942). Actualmente tiene un paisaje muy modificado, siendo la introducción de especies de animales y plantas por parte de los europeos la causa del mayor cambio (Brailovsky & Foguelman, 1991). Los principales cuerpos de agua de la región son lagunas de poca profundidad y charcas, aunque dada su baja pendiente tiene una densidad de ríos y arroyos considerable, del orden de los 0,16 km/km<sup>2</sup>. El flujo de los arroyos es bajo, siendo menor a 0,4 m/s en promedio (Sala *et al*, 1998). Desde el punto de vista hidroquímico, son aguas alcalinas con una alta conductividad, oxígeno disuelto y concentraciones de nutrientes; resultando en un régimen eutrofico con valores promedio de SRP (Soluble Reactive Phosphorus) y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, de 0,17 mg/l y 1,50 mg/l, respectivamente (Feijoó & Lombardo, 2007). El nivel de nutrientes en los cursos de aguas varía estacionalmente y aumenta con las lluvias (Mugni, 2009).

En Ronco *et al*. (2008) se evaluaron los impactos de plaguicidas asociados a soja transgénica en arroyos de bajo orden de la región pampeana, para esto se estudiaron tributarios del arroyo Arrecifes y del arroyo El Pescado; ambos pertenecientes a la cuenca hidrográfica del sistema bajo Paraná-Río de La Plata, en la provincia de Buenos Aires. Se observaron efectos de grado variable en la biota debido a la

aplicación de plaguicidas, considerando flora, peces, anfibios e invertebrados; con efectos más drásticos en estos últimos, determinando la alta sensibilidad de los invertebrados no blanco. Los resultados de ensayos de laboratorio y campo son consistentes, asociando los efectos de los invertebrados no-blanco a pulsos tóxicos producto de la escorrentía proveniente de los cultivos. La persistencia de la toxicidad es baja, pero variable según el plaguicida aplicado y el organismo en que se evalúa el efecto. La escorrentía es más importante como vía de entrada a los sistemas acuáticos superficiales que la deriva asociadas según las prácticas de manejo; disminuyendo el impacto la flora acuática y riparia asociada al cuerpo de agua.

En nuestro medio existen aportes recientes vinculados al impacto de la actividad agrícola sobre el ambiente, con énfasis en la toxicidad de plaguicidas sobre distintos organismos no-blancos (Natale & Ronco, 2003; Jergentz *et al*, 2004a,b; Martin & Ronco, 2006; Carriquiriborde *et al*, 2007; Sobrero *et al.*, 2007a; Ronco *et al*, 2008; Agostini *et al*, 2010; Di Marzio *et al.*, 2010; Mugni *et al*, 2010, 2011b; Vera *et al.*, 2010), sin embargo es aún incipiente el conocimiento del impacto integral del conjunto de xenobióticos sobre la enorme biodiversidad que representan los ecosistemas. En la actualidad, se ha evaluado la toxicidad individual de parte de los plaguicidas mencionados y se está tratando de ponderar el efecto de los ingredientes activos *per se* del de los formulados comerciales (Sobrero *et al*, 2007b). Con el objeto de disminuir costos en relación al uso de combustible, en las aplicaciones de plaguicidas los productores raramente aplican un solo producto, sino por lo contrario, aplican mezclas de insecticidas, o insecticidas y herbicidas (Ronco *et al.*, 2008).

El efecto de una mezcla puede ser aditivo, antagónico o sinérgico (Newman & Unger, 2002), modificando de esta manera el impacto, ponderar las mezclas sería una forma de evaluar a la práctica agrícola de manera más integral. Si bien la evidencia presentada registra la ocurrencia de impacto en distintos componentes de la biota, resulta insuficiente para una evaluación integral del impacto sobre el ecosistema. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es contribuir a la evaluación integral del impacto sobre los sistemas acuáticos asociados.

## ***Hipótesis y Objetivos***

### ***Hipótesis General***

La producción de soja RR recurre al control químico de plagas, introduciendo plaguicidas en los agroecosistemas pampeanos, los que son transportados a las aguas superficiales que los atraviesan y determinan un riesgo para la biota acuática.

### ***Hipótesis Particulares***

Existen diferencias entre la toxicidad de las formulaciones de plaguicidas utilizadas en el cultivo de soja RR y sus correspondientes ingredientes activos.

Las mezclas binarias y ternarias de las formulaciones de plaguicidas utilizadas en el cultivo de soja RR exhiben efectos sinérgicos.

Los eventos pulsátiles de ingreso de los plaguicidas a los cuerpos de agua asociados a las aplicaciones y/o lluvias posteriores favorecen escenarios de exposición aguda.

Las condiciones ambientales y de manejo de cultivos al momento de la aplicación de plaguicidas modifican la persistencia de la toxicidad en el agua de escorrentía.

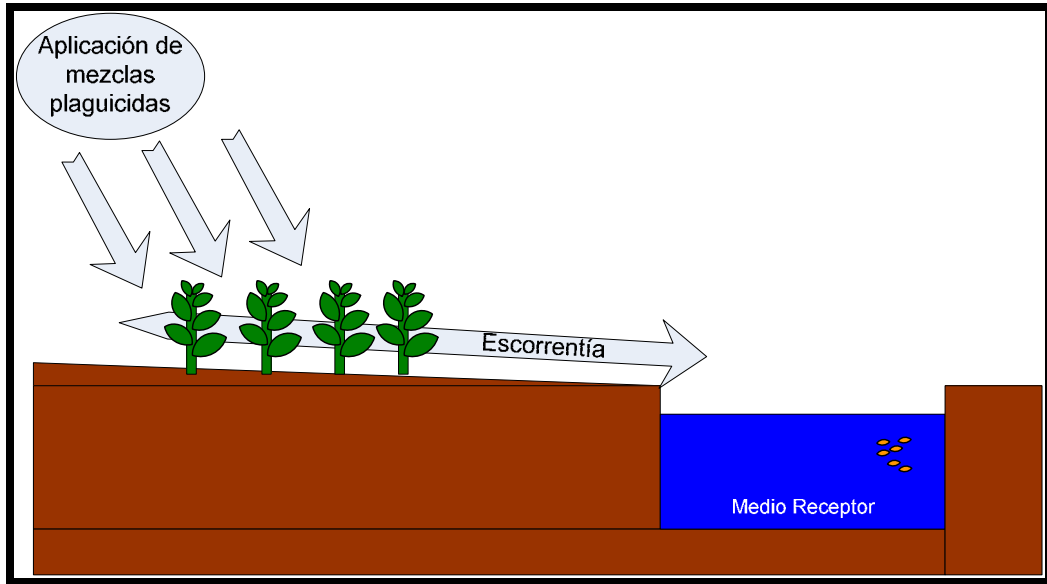
Existe riesgo toxicológico para los invertebrados de los cuerpos de agua asociados a cultivo de soja RR en la región.

El riesgo de las mezclas de plaguicidas es mayor que el asociado a las aplicaciones individuales.

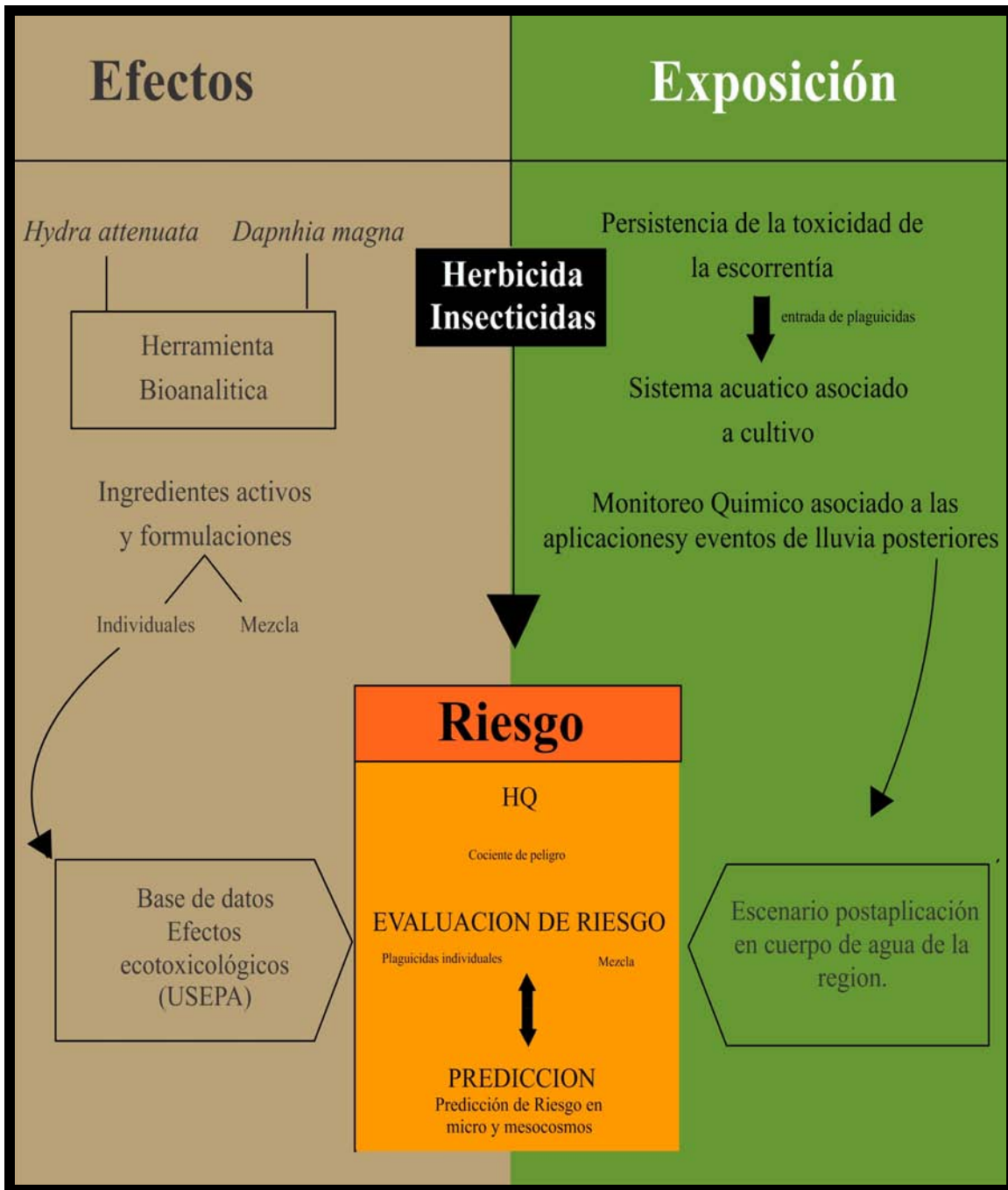
### ***Objetivo General***

El objetivo del presente trabajo es la valoración ecotoxicológica de plaguicidas utilizados en el manejo de la soja RR en agroecosistemas pampeanos, determinar sus concentraciones en el ambiente y realizar una evaluación de riesgo sobre los sistemas acuáticos asociados.

El modelo conceptual y la estrategia de abordaje del presente estudio se observan en la Figura I.7 y I.8, respectivamente.



**Figura I.7.** Modelo conceptual utilizado



**Figura I.8.** Esquema de la estrategia utilizada en la presente tesis



### ***Objetivos particulares***

- 1) Evaluar la toxicidad diferencial de ingredientes activos y formulaciones comerciales, y las mezclas de los plaguicidas seleccionados utilizando como herramienta diagnóstico bioensayos de toxicidad estandarizados con *H. attenuata* y *D. magna*.
- 2) Determinar concentraciones de los plaguicidas estudiados en muestras ambientales de agroecosistemas pampeanos en relación a escenarios de aplicación.
- 3) Evaluar el riesgo ambiental asociado al uso de los plaguicidas seleccionados en estudios de sitio específicos.

## **Capítulo II:**

### **Evaluación de Efectos**

## ***Introducción***

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas; y más allá de sus limitaciones sigue siendo la mayor fuente de información para la evaluación de efectos ecológicos (Castillo Morales, 2004). Los bioensayos de toxicidad son potentes herramientas al evaluar la calidad del agua, debido a las ventajas que poseen sobre las pruebas químicas y físicas convencionales que en la mayoría de los casos no son suficientes para evaluar los efectos potenciales sobre la biota acuática (USEPA, 1998). Una de esas ventajas es evaluar los efectos tóxicos de las mezclas de sustancias, pudiendo ser aditivos, antagónicos o sinérgicos (Newman & Unger, 2002); teniendo estos últimos gran relevancia en la evaluación del riesgo dado que puede existir una subestimación de los efectos.

Cuando se llevan a cabo ensayos de toxicidad como una herramienta bioanalítica es importante utilizar procedimientos estandarizados; estos incluyen metodologías con especies validadas por comparación entre resultados obtenidos intra e interlaboratorios. Estas metodologías incluyen la evaluación de tóxicos de referencia sobre especies de prueba estandarizadas, tendiendo a maximizar la reproducibilidad y confiabilidad de los datos obtenidos (Buikema *et al.*, 1982). Este es el caso de las especies de los invertebrados seleccionados, *Hydra attenuata* Pallas y *Daphnia magna* Strauss, los cuales han sido intercalibrados en el ejercicio WaterTox (Forget *et al.* 2000, Ronco *et al.* 2002) con la participación de nuestro laboratorio entre seis de distintos países. En la conclusión de este trabajo se determina, por un lado, el alto grado de certeza de ambos procedimientos para asignar toxicidad en distintos tipos de muestras y por el otro, el de una alta sensibilidad de ambos procedimientos (Ronco *et al.* 2000, 2002). Ambas especies tiene las ventajas de la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción asexual en condiciones óptimas (disminuyendo la heterogeneidad debida a la variabilidad genética) y el corto ciclo de vida con una alta tasa de reproducción.

Considerando que las diferentes especies de invertebrados acuáticos no son igualmente susceptibles a las sustancias tóxicas (USEPA, 1998), es importante destacar la distancia filogenética entre los organismos seleccionados, lo que se refleja en diferencias morfológicas y fisiológicas extremas dentro de los invertebrados acuáticos lo que está asociado a los mecanismos que determinan desde el punto de vista biológico la toxicidad; y en última instancia la sensibilidad de este frente a un tóxico determinado. *H. attenuata* se encuentra dentro del Phylum Cnidaria: Clase Hydrozoa. Es un organismo diplobástico, de simetría radial, con una estructura histológica sencilla: una epidermis externa, una endodermis interna y mesoglea entre ambas. No posee verdaderos órganos. Son pólipos solitarios cilíndricos con un extremo oral y una aboral que termina en un disco basal por el cual se fija al sustrato. Son consumidores secundarios de zooplacton principalmente. *D. magna* se encuentra dentro del Phylum Arthropoda: Subphylum Crustacea: Clase Branchipododa: Orden Cladocera. Es un organismo triplobástico, de simetría bilateral, celomado y protostomado. Posee verdaderos órganos. Posee antenas bien desarrolladas que las utiliza para la natación, teniendo una existencia planctónica. Son consumidores primarios a través de la filtración de microalgas (Ruppert & Barnes, 1995).

El estudio de los efectos de interacción de las sustancias químicas, específicamente plaguicidas, no es nuevo, existiendo investigaciones desde hace más de 50 años (Gowing, 1960; Tammes, 1964; Colby, 1967; Sprague & Ramsay, 1965, Kungolos *et al.*, 1997). Aunque el número de este tipo de publicaciones fue aumentando con el tiempo, la mayor parte de los estudios publicados son sobre efectos de sustancias particulares y no como parte de mezclas (Cox & Sorgan, 2006). Existen varios modelos para obtener una predicción de la interacción y así poder contrastar con lo observado en la experimentación. Ejemplos de los citados en la literatura científica actual son el modelo de los isobogramas (Tammes, 1964), el modelo de las unidades tóxicas (Sprague & Ramsay, 1965) y modelos matemáticos basados en la teoría de probabilidades (Kungolos *et al.*, 1997, 1999b).

En el caso de la evaluación de efectos de formulaciones de plaguicidas hay que considerar, por un lado, que éste ya es una mezcla en sí, entonces el primer paso

debería ser poder evaluar y comparar la toxicidad de los i.a. y sus formulaciones. La investigación de los efectos diferenciales sobre organismos no-blanco indica en algunos casos una mayor toxicidad de las formulaciones de plaguicidas respecto a su correspondiente i.a. (Giesy *et al.*, 2000; Tsui & Chu, 2003,2004; Martin & Ronco, 2006; Sobrero *et al.*, 2007b; Pereira *et al.*, 2009).

Los objetivos del presente capítulo son:

-Determinar y comparar los efectos letales para exposiciones agudas sobre *H. attenuata* y *D. magna* a los i.a. y formulaciones comerciales de glifosato, cipermetrina y clorpirifos. (Diseño Experimental I)

-Determinar si las mezclas binarias y ternarias de las formulaciones comerciales tiene efectos aditivos, antagónicos o sinérgicos sobre la letalidad de *H. attenuata* y *D. magna* en exposiciones agudas (Diseño Experimental II)

## ***Materiales y Métodos***

### ***Bioensayos de toxicidad***

Son comunes para ambos diseños experimentales; se siguieron los lineamientos que figuran en *Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (Castillo Morales, 2004).

### ***Bioensayo de toxicidad aguda con Hydra attenuata***

#### ***Obtención de los organismos de ensayo***

*H. attenuata* se obtuvo del Programa Watertox del Centro de Investigaciones para el Desarrollo Internacional de Canadá (véase Forget *et al.* 2000).

#### ***Medio de cultivo***

Para el proceso de mantenimiento del cultivo, la limpieza y la alimentación se utilizó el medio de hydra que se preparaba en bidones de 20 L, para ello se agregaba 2,94 g

Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,196 g de Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 0,080 g de Ácido Etilén-Diamino-Tetraacético (EDTA). Se ajustaba el pH a  $7,0 \pm 0,1$  con HCl o NaOH si así se requería. Las hidras antes de llevar a cabo las pruebas de toxicidad eran transferidas a un medio de cultivo sin EDTA, y en estas mismas condiciones se realizaba el ensayo.

### ***Cultivo y mantenimiento***

Se utilizaron recipientes circulares de vidrio, tipo Petri, de aproximadamente 20 cm de diámetro con medio (véase Medio de cultivo) hasta 3 cm del borde del recipiente. Los mismos se mantuvieron a  $20 \pm 2$  °C, bajo una intensidad luminosa aproximada de 800 lux y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Los cultivos se alimentaron con nauplios de *Artemia sp.*, por lo menos cuatro días a la semana, y la limpieza se realizaba alrededor de cuatro a cinco horas posterior a proveer el alimento.

### ***Alimentación y limpieza***

Para hacer eclosionar los quistes de *Artemia*, se colocaban en 500 mL de una solución salina (10 g NaCl/l) dentro de un recipiente casero. El mismo estaba construido con una botella plástica transparente e invertida, con aireación constante desde la base e iluminación continua con una lámpara de 100 watts sobre el recipiente a una distancia conveniente para conseguir una temperatura de  $28 \pm 2$  °C. Una vez que los quistes eclosionaban, se detenía el burbujeo de aire. Después de cinco minutos, los quistes no eclosionados sedimentaban y los nauplios formaban una nube que flotaba cerca del fondo del recipiente. Estos nauplios, eran filtrados y se transferían a otro recipiente con las mismas dimensiones, con medio de cultivo de *Hydra* (véase Medio de cultivo). Se dejaban reposar, se tomaban los nauplios de *Artemia* con una pipeta Pasteur y se procedía a alimentar a las hidras. Una vez alimentado el cultivo, se esperaba cuatro a cinco horas y se limpiaba el cultivo para eliminar los residuos de la digestión y los nauplios excedentes. La limpieza se efectuaba reemplazando todo el medio de cultivo con medio fresco. Durante el cambio, las hidras se recuperaban al filtrar el medio de desecho con un tamiz. Terminada la limpieza, se colocaban los

organismos en un recipiente limpio con medio de cultivo fresco y se cubrían permitiendo la entrada de aire.

### ***Control del cultivo***

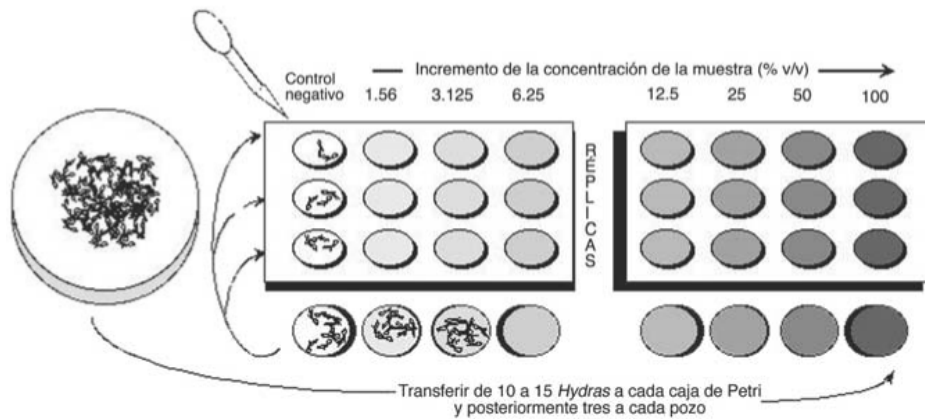
Se evaluó periódicamente la tasa de crecimiento del cultivo para verificar el estado de salud de las hidras y considerar si el cultivo se encontraba en condiciones óptimas. Para esto se separaban cinco organismos adultos con una gema y se seguía diariamente su número, con las mismas condiciones de limpieza y alimentación mencionadas para los cultivos. Para el cálculo de la tasa de crecimiento ( $k$ ) se utilizaba la siguiente ecuación:

$$k = (\ln 2) / T = 0,693 / T$$

siendo  $T$  el tiempo expresado en días requerido para que la población se duplique. Solo se procedía a realizar ensayos de toxicidad si la tasa de crecimiento ( $k$ ) era mayor de 0,3. De no ser así se realizaban acciones correctivas hasta conseguir la tasa de crecimiento deseada (Trottier *et al.* 1997). En la Tabla II.1, al final de la sección, se resumen las condiciones de cría y mantenimiento de los organismos.

### ***Procedimiento de la prueba***

Se realizaban las diluciones de la muestra problema, un control positivo con  $K_2Cr_2O_7$  como tóxico de referencia y un control negativo. En las pruebas preliminares se empleaba una serie de diluciones logarítmicas para identificar el intervalo de concentraciones definitivas de ensayo. Las pruebas de toxicidad se llevaron a cabo en microplacas (=multipocillos) de cultivo (Figura II.1). En ellas se preparaban al menos tres réplicas por cada concentración de la muestra o del control positivo y tres más para el control negativo. El llenado de los pocillos se efectuaba adicionando un volumen de 3 mL, iniciando con el control negativo y se continuaba con las diluciones de la muestra, comenzando con la de menor concentración.

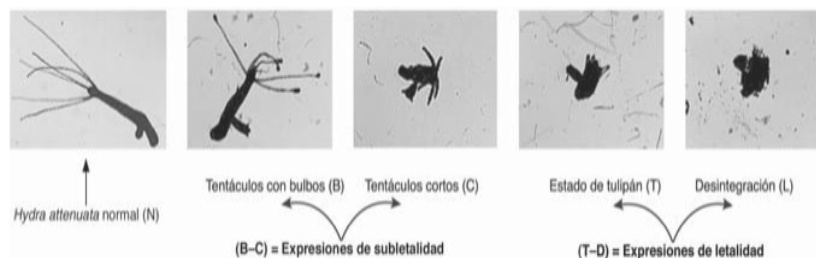


**Figura II.1.** Disposición de las concentraciones de prueba en el ensayo (tomado de Castillo Morales, 2004).

Para la transferencia de hidras se seleccionaban organismos con 24 hs de ayuno, eliminándose el medio utilizado y agregando medio fresco sin EDTA. Se suspendían los organismos y se concentraban, pero sin el uso del tamiz para evitar daño de la epidermis. Se colocaban entre 10 a 15 hidras en una cápsula de Petri con la dilución de ensayo correspondiente, para reducir el efecto de dilución del medio de cultivo sobre la concentración de la muestra. Posteriormente se colocaban tres hidras sin gemas en cada pozo.

### ***Expresión de los resultados***

La prueba se desarrollaba por un periodo de exposición de 96 h. Cada 24 h se realiza la observación de los organismos con la ayuda de una lupa para registrar los cambios morfológicos ocurridos, según los criterios de Trotter *et al.* (1997), (ver Figura II.2).



**Figura II.2.** Microfotografías de *Hydra attenuata*, mostrando los diferentes cambios morfológicos (tomado de Castillo Morales, 2004).



Al terminar la revisión diaria se contabilizaban el número total de hidras que presentaban el mismo estado morfológico en los tres pocillos correspondientes a cada dilución. Los organismos que presentaban efectos letales (morfología tulipán + desintegradas) y subletales (morfología de tentáculos con bulbos + tentáculos cortos) eran registrados. A partir de los resultados, se obtenía para cada concentración ensayada el porcentaje de efecto letal ( $(N^{\circ} \text{ letales} / N^{\circ} \text{ expuestos}) * 100$ ).

### ***Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna****

#### ***Obtención de los organismos de ensayo***

Los ejemplares de *D. magna* se obtuvieron del Programa Watertox del Centro de Investigaciones para el Desarrollo Internacional de Canadá (véase Forget *et al.* 2000).

#### ***Cultivo y mantenimiento***

Los cultivos de *D. magna* se mantuvieron en recipientes de dos litros con una densidad máxima de 10 individuos por litro. Los organismos se mantuvieron en agua declorinada con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO<sub>3</sub>/L. Se mantuvieron a una temperatura de  $21 \pm 2$  °C, un fotoperiodo aproximado de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux. El pH del mantuvo en  $7,8 \pm 0,2$ , y se dejaba aireando un mínimo de 48 hs llegando a superar en todos los casos los 6 mg/L de O<sub>2</sub> disuelto. Si el agua no tenía los valores de los parámetros citados, se desechaba. Una vez que los parámetros estaban en los valores necesarios, se comprobaba que el agua no afectaba la supervivencia de las dafnias. Si después de exponer 48 h diez neonatos por triplicado a 20 ml de agua la supervivencia era menor al 90%, el agua se desechaba. Para el mantenimiento del cultivo se aplicaba un ciclo de renovación de adultos de aproximadamente cinco semanas para mantener un cultivo de organismos en etapas óptimas de reproducción

#### ***Alimentación y limpieza***

Para la alimentación de los cultivos se empleaban suspensiones de diferentes especies de algas verdes unicelulares (*Pseudokirchneriella sp*, *Chlorella sp.*) mantenidas en

laboratorio. La alimentación se realizaba conjuntamente con el cambio de medio, y su frecuencia era diaria y en el caso de no necesitar neonatos para ensayos, se realizaba cada tres días. Se agregaba 1/3 del medio con algas, con una concentración aproximada de  $10^6$  células/ml. Si era necesario diariamente se retiraban los neonatos, los cuales eran destinados al desarrollo de pruebas o eliminados. Para la limpieza, se removían las mudas y los restos de alimento. Al finalizar, se recuperaba el volumen de agua en cada recipiente haciendo el recambio de 1/3 del volumen con agua fresca. El último día de cada ciclo se separan las hembras de mayor tamaño y se pasaban al recipiente de la semana correspondiente. Los organismos mayores a cuatro semanas se descartaban y eran reemplazados por nuevas hembras de menor edad. El día previo a realizar ensayos se extraían los neonatos presentes en el cultivo, para de esa forma, garantizar que los neonatos encontrados al día siguiente tenían menos de 24 h.

### ***Control del cultivo***

Se construyó una carta control para evaluar la sensibilidad de los organismos a partir de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como tóxico de referencia. Se calculaba su  $LC_{50}$  mensualmente y se incorporaba a la carta control. A partir de estos resultados, se determinaba la  $LC_{50}$  promedio, así como la desviación estándar ( $\sigma$ ) de la  $LC_{50}$ . Los límites  $LC_{50} \pm 2\sigma$ , corresponderán al intervalo de concentración aceptable para aceptar los resultados de los ensayos (Castillo Morales, 2004).

### ***Procedimiento de la prueba***

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplearon neonatos (<24 h) expuestos a diferentes concentraciones de la muestra o tóxico durante un periodo de 48 h. Para la preparación de las diluciones de las muestras se utilizó como medio de dilución el agua para el mantenimiento y cría.

Las pruebas preliminares para establecer el rango de efecto se hicieron sobre una escala logarítmica de concentraciones. Las pruebas definitivas se llevaban a cabo por lo menos con cinco diluciones. Los recipientes utilizados fueron tubos de ensayo con 20 ml de solución de ensayo. Además de las diferentes concentraciones de la muestra

y sus réplicas (tres como mínimo), se preparaban un control negativo sin tóxico y un control positivo con una solución de  $K_2Cr_2O_7$  en la concentración aproximada a la  $LC_{50}$ . Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transferían diez neonatos de menos de 24 h a cada uno de los tubos de ensayo. Se colocaban bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura por un periodo de 48 horas, posteriormente se registraba el número de organismos muertos (considerada como inmovilidad). Se aceptaban los resultados con la mortalidad en los controles negativos menores al 10% y en el control positivo entre 33 y 57%.

A continuación se muestra en la Tabla II.1, un resumen de las condiciones en que se desarrollaron los bioensayos de *H. attenuata* y *D. magna*.

**Tabla II.1.** Resumen de condiciones utilizadas en los bioensayos de toxicidad

<b>Organismo de ensayo</b>	<b><i>Hydra attenuata</i></b>	<b><i>Daphnia magna</i></b>
<b>Tipo de ensayo</b>	Estático	Estático
<b>Temperatura</b>	21± 2 °C	21± 2 °C
<b>Calidad de luz</b>	Iluminación natural o blanco-frío	Iluminación natural o blanco-frío
<b>Intensidad</b>	800 lux	800 lux
<b>Fotoperiodo</b>	16 h luz/8 h de oscuridad	16 h luz/8 h de oscuridad
<b>Volumen del recipiente</b>	4 mL en placas estériles de 12 pozos	25 mL en tubos de ensayo
<b>Volumen de la solución de prueba</b>	3 mL	20 mL
<b>Características de los organismos</b>	Pólipos (hidras) sin gemas, en ayuno de 24 h	Neonatos de < 24 h
<b>Densidad de organismos</b>	3 hidras por pocillo	10 dafnias por tubo
<b>Número de réplicas</b>	3 mínimo	3 mínimo
<b>Agua de dilución</b>	Medio de cultivo	Agua declorinada
<b>Duración de la prueba</b>	96 h	48 h
<b>Efecto medido</b>	Cambios morfológicos	Inmovilidad
<b>Resultado final</b>	Letalidad	Letalidad
<b>Aceptabilidad de los resultados</b>	Morfología normal en el 100% del control negativo	Mortalidad control negativo < 10%
<b>Control positivo</b>	Cr (VI) [Solución $K_2Cr_2O_7$ ]	Cr (VI) [Solución $K_2Cr_2O_7$ ]

### ***Reactivos y plaguicidas (ingredientes activos y formulados)***

Todos los reactivos utilizados tuvieron una calidad ACS o, por lo menos, un 99% de pureza y siempre para la preparación de las soluciones se utilizó agua destilada. Las pruebas con i.a. de insecticidas se realizaron mediante la adición de etanol (0,5% v/v) al medio de ensayo debido a la baja solubilidad de esta sustancia. En ese caso se realizaba controles negativos con y sin solvente.

Las formulaciones (F) de insecticidas Glextrin® (250 mg/L de cipermetrina mezcla cis 40-50% de isómeros cis-trans) y PirfosGlex® (480 mg/L de clorpirifos), los ingredientes activos (i.a.) y el glifosato (grado técnico) se obtuvieron de Gleba SA (Buenos Aires, Argentina), y el herbicida Roundup® Max (74,4% glifosato) y su surfactante POEA (polioxietilamina) se obtuvo de Monsanto SA (St. Louis, Missouri, EE.UU.).

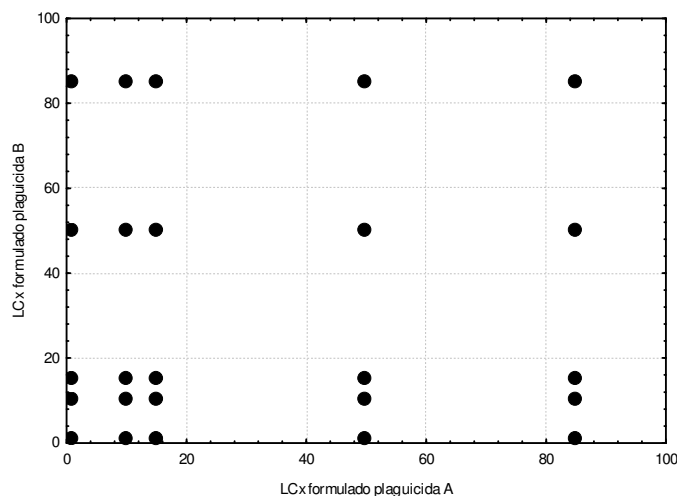
### ***Diseño Experimental***

#### ***Diseño experimental I: Ingredientes activos (i.a.) y formulados (F)***

Se realizaron bioensayos con *H. attenuata* y *D. magna* según los protocolos previos para los i.a. y F de los tres plaguicidas y el surfactante POEA. Se ajustaron los resultados de mortalidad a un modelo log-probit (Finney, 1971) usando el software Probit (USEPA, versión 1.5). Se realizaron comparaciones de las pendientes y ordenadas al origen de estas rectas de regresión (Zar, 1998) para evaluar diferencias en la toxicidad entre los i.a. y los F para los tres plaguicidas, como así también entre el glifosato F y el surfactante POEA.

#### ***Diseño experimental II: Mezclas de formulados***

Se utilizaron de referencia los valores obtenidos ( $LC_x$ : concentración a la cual se observa el x% de letalidad) en los experimento previo para cada formulado. A partir de estos se realizaron 25 combinaciones (expresados como i.a.) para cada mezcla binaria (Figura II.3) y 22 ternarias (Figura II.4), para evaluar los efectos con *H. attenuata* y *D. magna* con los protocolos ya considerados.



**Figura II.3.** Diseño general de las combinaciones de mezclas binarias ensayadas de los formulados de los plaguicidas.

### ***Modelo teórico***

El efecto teórico esperado de las mezclas binarias de los organismos de ensayo se evaluó mediante un modelo matemático simple basado en la teoría de probabilidades (Kungolos *et al.*, 1997; Hadjispyrou *et al.*, 2001; Kungolos *et al.*, 2009). De acuerdo con este modelo, si  $P_1$  es la inhibición causada por una cierta concentración de sustancia  $A_1$ , y  $P_2$  la inhibición causada por una cierta concentración de sustancia  $A_2$ , entonces la teoría de probabilidades espera la inhibición aditiva  $P(E)$ , cuando las concentraciones de los dos productos químicos son aplicadas en forma conjunta, dado por la siguiente ecuación:

$$P(E) = P_1 + P_2 - P_1 * P_2/100 \quad (1)$$

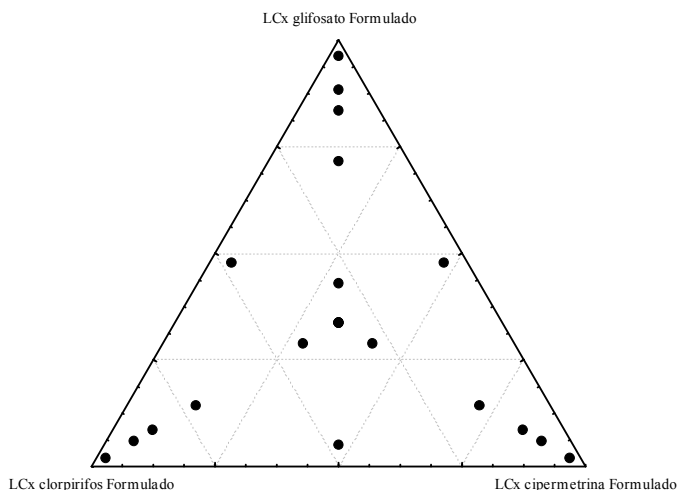
Este modelo ha sido utilizado en el pasado por Bliss (1939). La ecuación. (1) es esencialmente la misma utilizada por Colby (1967) y Stratton (1983), basada en el primer modelo desarrollado por Gowing (1960). La diferencia entre los modelos de Gowing (1960) y Kungolos *et al.* (1997) se basa en la suposición de que las sustancias

químicos actuaron de forma consecutiva en la primera, y en la segunda actúan de forma simultánea.

Para las mezclas ternarias, una generalización de la ecuación (1) fue aplicada (Kungolos *et al.* 2000), por la cual el efecto esperado teóricamente P(E) para el modo de aditivo de la interacción, para cualquier número de sustancias químicas aplicadas en forma conjunta está dado por:

$$P(E) = 100 - ((100 - P_1) \times (100 - P_2) \dots (100 - P_n)) / 10^{2(n-1)} \quad (2)$$

Se comparó la toxicidad observada de la mezcla de plaguicidas P(O), experimentalmente evaluada, y la mezcla de la toxicidad esperada P(E), que se calcula de acuerdo a la ecuación (1) o (2). Si la diferencia entre P(O) y P(E) no fue significativa, el modo de interacción se caracterizó como aditivo, siendo aceptada la hipótesis nula que P(O)=P(E). Con el fin de comparar P(E) y P(O) se realizó una prueba de *t* entre cada par observado y esperado (Zar, 1998). El resultado fue considerado como antagónico o sinérgico sólo si el efecto observado fue significativamente más bajo o más alto, respectivamente, que el valor predicho teóricamente con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .



**Figura 4.** Diseño general de las combinaciones de mezclas ternarias ensayadas de los formulados de los plaguicidas.

## ***Determinación de las concentraciones de los bioensayos con los i.a. y formulados***

### ***Diseño experimental I***

Se verificó analíticamente el i.a de clorpirifos, cipermetrina y glifosato, no el POEA. Las soluciones stock de plaguicidas se prepararon en agua destilada y se utilizaron inmediatamente para preparar las diluciones de ensayo en cada prueba. Las concentraciones stock se verificaron por métodos cromatográficos (HPLC-MS para el herbicida, y GC-ECD para los insecticidas).

Las concentraciones en las soluciones stock fueron medidas por HPLC-MS (Agilent Technologies Inc., EE.UU), equipado con una bomba binaria y un detector de diodo array, acoplado con un MSD VL cuadrupolo con una interfase de ionización por electrospray. Las separaciones cromatográficas (fases móviles, acetonitrilo/agua con acetato de amonio 20 mM, 50:50) se realizaron en una columna C-18 de fase reversa (4 mm x 150 mm, 3 µm de tamaño de poro). Los análisis por GC-ECD se realizaron en un equipo Carlo Erba Company, con una columna HP5 (Agilent) de 15 m, 0,53 mm x 30 µm, con un tamaño de partícula de 1,5 micras, utilizando N<sub>2</sub> como carrier, de acuerdo con Marino & Ronco (2005). La verificación de las concentraciones máximas y mínimas en las diluciones de prueba (4 por tratamiento) de cada plaguicida también se realizó al inicio y al final de la exposición. El método utilizado para la medición de los insecticidas en las diluciones de prueba fue el mismo que los utilizados para analizar las soluciones stock. El análisis de las concentraciones de glifosato en las diluciones de ensayo se llevaron a cabo por cromatografía líquida previa derivatización con FMOC (9-fluoroenylmethyl chloroformate chloride) según Peruzzo *et al.* (2008) utilizando un equipo HPLC (Beckman, System Gold 126) y una columna Supelco RP 18 (4 mm x 250 mm) con 5 µm de tamaño de partícula y con detección UV (206 nm).

### ***Diseño experimental II***

Se verificó analíticamente los i.a. de los formulados de clorpirifos, cipermetrina y glifosato. Se utilizó la misma metodología citada previamente para los insecticidas y en el caso del herbicida todas las determinaciones fueron realizadas por la segunda metodología. Se verificaba el stock, la mínima y máxima concentración.

### ***Reactivos y estándares***

Para todas las mediciones descritas previamente los solventes utilizados fueron J.T. Baker para análisis de pesticidas. Los estándares de glifosato, cipermetrina, clorpirifos utilizados para el análisis químico fueron obtenidos de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal). Los métodos estaban sujetos a procedimientos de control y garantía de calidad. Para cada conjunto de muestras se realizaba un blanco de procedimiento y de matriz para determinar la precisión. La recuperación en todos los casos fue mayor al 75% para todos los compuestos ensayados.

## ***Resultados***

### ***Diseño Experimental I***

#### ***Bioensayo de toxicidad con *Hydra attenuata****

Las concentraciones medidas (mg/L) en las soluciones stock de cada formulación (F) e ingrediente activo (i.a.) fueron, respectivamente:  $98,3 \pm 1,0$  y  $97,8 \pm 1,1$  de glifosato,  $24,0 \pm 1,0$  y  $22,7 \pm 1,4$  de la cipermetrina,  $25,6 \pm 0,8$  y  $25,3 \pm 0,9$  de clorpirifos. Las pruebas fueron realizadas dentro de los siguientes rangos de concentración medidas: 13,7-36,1 y 15,8-22,2 mg/ L para el glifosato, 7,4-14,2 y 7,5-19,7 mg/L para cipermetrina, 0,3-1,8 y 0,6-5,5 mg/L para el clorpirifos, para cada F o i.a., respectivamente. En el caso del POEA, el rango de ensayo fue de 0,7-3,4 mg/L. En ninguno de los casos el decaimiento de los plaguicidas supero al 20% entre el comienzo y la finalización de los bioensayos. Las concentraciones de POEA no fueron determinadas analíticamente, tratándose por tal motivo, de concentraciones nominales.



Los resultados de las pruebas de toxicidad con *Hydra attenuata* se muestran en la Tabla II.2 y II-3. En la Tabla II.2 se observan los resultados asociados al herbicida, el glifosato F (expresado como i.a.), el glifosato i.a. y el surfactante POEA.

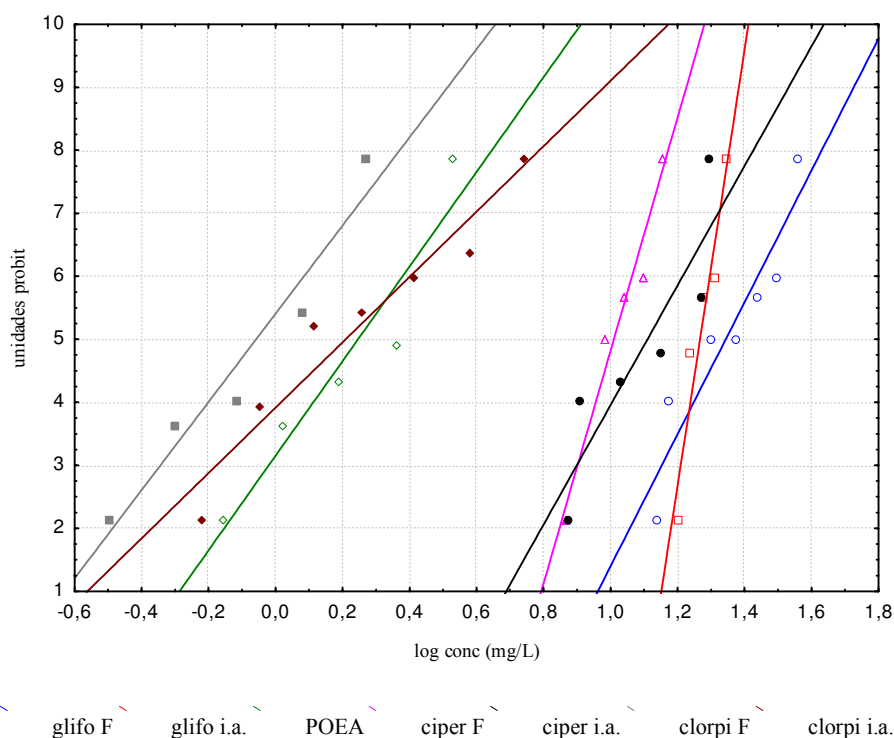
**Tabla II.2.** LC<sub>x</sub> 96h e intervalos de confianza al 95% (mg/L) para *Hydra attenuata* para el herbicida F, su i.a. y el surfactante POEA obtenidos con log-probit. Se informan los valores de  $\chi^2$  calculados y tabulados ( $\alpha=0,05$ ).

LC <sub>x</sub>	glifosato F	glifosato i.a.	POEA
1	10,77 (7,11-13,29)	14,79 (12,59-15,88)	0,84 (0,42-1,12)
5	13,25 (9,71-15,61)	15,71 (13,92-16,62)	1,08 (0,65-1,36)
10	14,80 (11,44-17,03)	16,23 (14,67-17,05)	1,25 (0,83-1,52)
15	15,94 (12,75-18,09)	16,59 (15,20-17,35)	1,37 (0,97-1,64)
50	21,84 (19,53-24,20)	18,19 (17,41-18,92)	2,03 (1,70-2,45)
85	29,92 (26,66-36,28)	19,95 (19,15-21,48)	3,01 (2,48-4,46)
90	32,23 (28,38-40,39)	20,39 (19,50-22,24)	3,30 (2,68-5,21)
95	35,99 (31,02-47,49)	21,06 (20,01-23,43)	3,80 (2,98-6,59)
99	44,27 (36,45-64,74)	22,38 (20,96-25,89)	4,92 (3,60-10,31)
$\chi^2_{calc}$	3,40	2,85	3,16
$\chi^2_{0,05 tab}$	11,07	7,81	7,81

En la Tabla II.3 se observan los resultados para el caso de los insecticidas, tanto sus formulaciones (expresadas como i.a.) como los i.a..

**Tabla 3.** LC<sub>x</sub> 96h e intervalos de confianza al 95% (mg/L) para *Hydra attenuata* para los insecticidas F y sus i.a. obtenidos con log-probit. Se informan los valores de  $\chi^2$  calculados y tabulados ( $\alpha=0,05$ ).

LC <sub>x</sub>	cipermetrina F	cipermetrina i.a.	clorpirifos F	clorpirifos i.a.
1	6,78 (4,81-7,82)	6,04 (3,71-7,66)	0,42 (0,21-0,56)	0,42 (0,21-0,61)
5	7,59 (5,84-8,502)	7,65 (5,35-9,19)	0,54 (0,33-0,68)	0,61 (0,35-0,81)
10	8,06 (6,47-8,90)	8,68 (6,48-10,16)	0,61 (0,41-0,76)	0,74 (0,47-0,95)
15	8,39 (6,93-9,17)	9,45 (7,36-10,91)	0,67 (0,47-0,82)	0,85(0,57-1,06)
50	9,96 (9,07-10,98)	13,55 (11,89-15,53)	0,98 (0,82-1,19)	1,47 (1,19-1,78)
85	11,82 (10,98-13,47)	19,41 (16,70-25,48)	1,43 (1,18-2,08)	2,55 (2,06-3,68)
90	12,34 (11,36-14,38)	21,14 ( 17,90-28,97)	1,57 (1,27-2,41)	2,91 (2,29 - 4,45)
95	13,07 (11,93-15,90)	23,98 (19,77-35,14)	1,79 (1,41-3,01)	3,53 (2,69-5,93)
99	14,62 (12,99-19,26)	30,37 (23,70-50,73)	2,29 (1,70-4,60)	5,08 (3,58-10,25)
$\chi^2_{calc}$	2,10	5,60	2,15	3,07
$\chi^2_{0,05 tab}$	7,81	9,48	7,81	11,07



**Figura II.5.** Rectas de regresión para el modelo log-probit sobre *Hydra attenuata* 96h para cada uno de los compuestos ensayados.

Los análisis de regresión del modelo log-probit para cada compuesto se muestran en la Tabla II.4 y sus gráficas en la Figura II.5. Se compararon pendientes y ordenadas al origen de cada recta obtenida del ajuste log-probit (Tabla II.5); se realizaron comparaciones pareadas para cada uno de los i.a. y su respectivo F, más la comparación del glifosato F y el POEA. Sólo el glifosato y su formulado, el Roundup® Max, mostraron diferencias significativas entre las pendientes.

**Tabla II.4.** Parámetros de la regresión para las rectas log-probit con *Hydra attenuata* 96h para los ingredientes activos, formulaciones y el surfactante POEA.

	glifosato		cipermetrina		clorpirifos		POEA
	F	i.a.	F	i.a.	F	i.a.	
<i>b</i>	7,58	25,86	13,96	6,63	6,35	4,32	6,05
<i>a</i>	-5,16	-27,59	-8,92	-2,51	5,05	8,6	3,13
<i>n</i>	7	5	5	6	5	7	5
<i>r</i>	0,89	0,95	0,97	0,93	0,96	0,94	0,94
<i>r</i> <sup>2</sup>	0,80	0,91	0,94	0,87	0,92	0,88	0,86

**Tabla II.5.** Resultados del análisis estadístico para la comparación de a pares de las regresiones log-probit obtenidas con *Hydra attenuata* 96h de la Tabla II.2 (**A**:Aceptada, **R**:Rechazada)

	glifosato F	cipermetrina F	clorpirifos F	glifosato F
	glifosato a.i.	cipermetrina i.a.	clorpirifos i.a.	POEA
Diferencia entre pendientes	3,94	2,17	1,61	1,32
Valor crítico ( $\alpha=0,05$ )	2,31	2,36	2,31	2,31
Hipótesis nula: $b_1=b_2$	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Diferencia entre ordenadas al origen	1,99	2,11	2,57	2,48
Valor crítico ( $\alpha=0,05$ )	2,26	2,31	2,26	2,26
Hipótesis nula: $a_1=a_2$	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>R</b>

### ***Bioensayo de toxicidad con Daphnia magna***

Las concentraciones medidas (en mg/L en el caso del herbicida y en  $\mu\text{g/L}$  en el caso de los insecticidas) en las soluciones stock de cada formulación e i.a.. fueron, respectivamente:  $49,2 \pm 0,1$  y  $999,2 \pm 0,1$  de glifosato,  $51,0 \pm 0,2$  y  $49,0 \pm 1,1$  de la cipermetrina,  $48,6 \pm 0,8$  y  $51,2 \pm 0,3$  de clorpirifos. Las pruebas fueron realizadas dentro de los siguientes rangos de concentraciones medidas: 5,1-15,2 y 49,8 – 981,8 mg/L para el glifosato, 1,1- 8,8 y 0,9-11,5  $\mu\text{g/L}$  para la cipermetrina, 0,9 – 2,2 y 1,0-5,5  $\mu\text{g/L}$  para el clorpirifos, para cada F o i.a., respectivamente. En el caso del POEA el rango de ensayo fue de 0,7-3,5 mg/L. En ninguno de los casos el decaimiento de los plaguicidas supero al 25% entre el comienzo y la finalización de los bioensayos. Las concentraciones de POEA no fueron verificadas analíticamente.

Los resultados de las pruebas de toxicidad con *D.magna* se muestran en la Tabla II.6 y II.7. En la Tabla II.6 se observan los resultados asociados al herbicida, el glifosato F (expresado como i.a.), el glifosato i.a. y el surfactante POEA. En la Tabla II.7 se observan los resultados para el caso de los insecticidas, tanto sus formulaciones (expresadas como i.a.) como los i.a.

**Tabla II.6.** LC<sub>x</sub> 48h e intervalos de confianza al 95% (mg/L) para *Daphnia magna* para el herbicida F, su i.a. y el surfactante POEA obtenidos con log-probit. Se informan los valores de  $\chi^2$  calculados y tabulados ( $\alpha=0,05$ ).

LC <sub>x</sub>	glifosato F	glifosato i.a.	POEA
1	4,88 (3,89-5,64)	31,19 (18,56-44,02)	0,74 (0,56-0,88)
5	5,90 (4,97-6,61)	53,72 (36,74-69,65)	0,95 (0,78-1,09)
10	6,53 (5,65-7,20)	71,87 (52,63-89,37)	1,09 (0,93-1,22)
15	6,99 (6,16 - 7,63)	87,30 (66,85-106,10)	1,20 (1,04-1,32)
50	9,34 (8,71-9,95)	199,61 (170,42-236,25)	1,80 (1,62-1,95)
85	12,47 (11,58-13,79)	456,40 (365,91-624,63)	2,61 (2,31-3,11)
90	13,35 (12,30-15,01)	555,04 (433,09-795,84)	2,86 (2,51-3,49)
95	14,78 (13,43-17,04)	741,69 (554,13-1143,23)	3,28 (2,81-4,15)
99	17,88 (15,75-21,72)	1277,52 (874,56-2268,53)	4,24 (3,28-5,77)
$\chi^2$ calc	5,76	5,89	5,53
$\chi^2_{0,05}$ tab	7,81	9,49	7,81

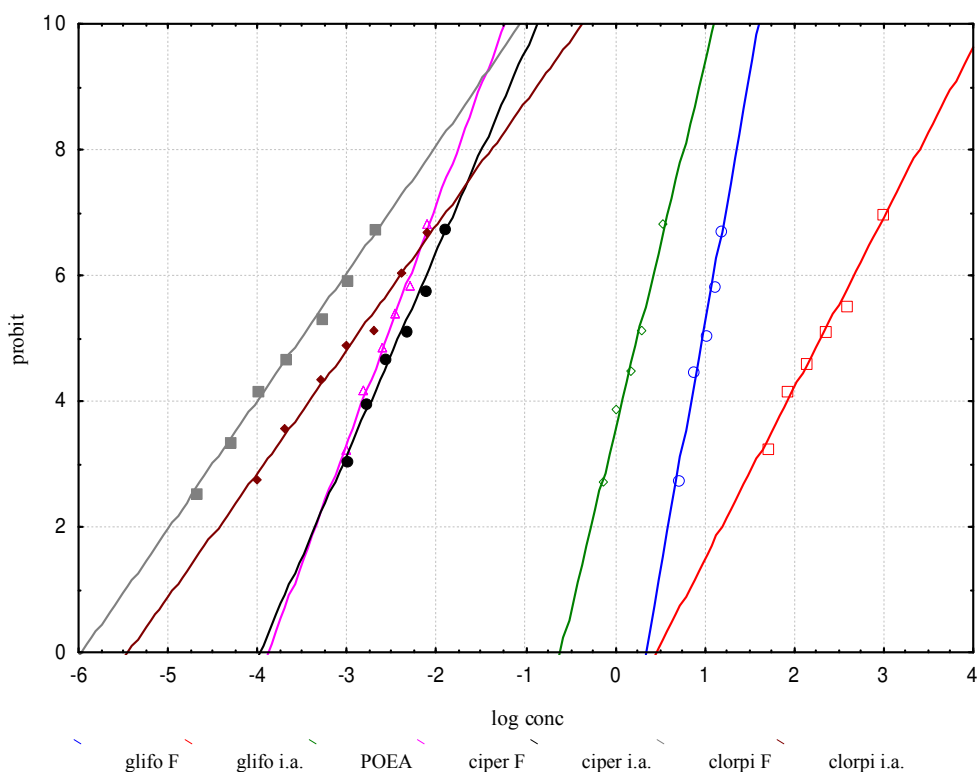
**Tabla II.7.** LC<sub>x</sub> 48h e intervalos de confianza al 95% ( $\mu\text{g/L}$ ) para *Daphnia magna* para los insecticidas F y sus i.a. obtenidos con log-probit. Se informan los valores de  $\chi^2$  calculados y tabulados ( $\alpha=0,05$ ).

LC <sub>x</sub>	cipermetrina F	cipermetrina i.a.	clorpirifos F	clorpirifos i.a.
1	0,73 (0,50-0,94)	0,78 (0,51-1,05)	0,02 (0,01-0,04)	0,09 (0,05-0,14)
5	1,08 (0,82-1,32)	1,24 (0,90-1,55)	0,05 (0,03-0,07)	0,19 (0,12-0,28)
10	1,34 (1,06-1,58)	1,57 (1,21-1,91)	0,07 (0,05-0,10)	0,29 (0,19-0,40)
15	1,54 (1,26-1,79)	1,86 (1,48-2,21)	0,10 (0,07-0,12)	0,38 (0,27-0,50)
50	2,81 (2,49-3,16)	3,73 (3,25-4,29)	0,30 (0,24-0,37)	1,22 (0,98-1,51)
85	5,12 (4,43-6,23)	7,48 (6,28-9,49)	0,93 (0,70-1,33)	3,86 (2,94-5,54)
90	5,90 (5,02-7,40)	8,83 (7,26-11,59)	1,21(0,89-1,83)	5,07 (3,74-7,67)
95	7,28 (6,02-9,56)	11,29 (8,97-15,62)	1,80 (1,26-2,95)	7,59 (5,32-12,50)
99	10,80 (8,42-15,57)	17,81 (13,24-27,50)	3,80(2,40-7,28)	16,21 (10,19-31,51)
$\chi^2$ calc	6,51	5,74	3,69	5,96
$\chi^2_{0,05}$ tab	9,49	9,49	11,07	11,07

Los análisis de regresión del modelo log-probit para cada compuesto se muestran en la Tabla II.8 y sus gráficas en la Figura II.6. Con esos datos se compararon pendientes y ordenadas al origen de cada recta obtenida de ajuste log-probit (Tabla II.9); se realizaron comparaciones pareadas para cada uno de los i.a. y su respectivo F, más la comparación del glifosato F y el POEA.

**Tabla II.8.** Parámetros de la regresión para las rectas log-probit con *Daphnia magna* 48h para los ingredientes activos, formulaciones y el surfactante POEA.

	glifosato		cipermetrina		clorpirifos		POEA
	F	i.a.	F	i.a.	F	i.a.	
<i>b</i>	10,79	3,91	5,54	4,58	2,53	2,57	7,89
<i>a</i>	-5,39	-0,08	19,15	16,21	14,06	12,64	-0,08
<i>n</i>	5	6	6	6	7	7	5
<i>r</i>	0,97	0,97	0,98	0,99	0,97	0,97	0,98
<i>r</i> <sup>2</sup>	0,94	0,94	0,94	0,99	0,95	0,94	0,95



**Figura II.6.** Rectas de regresión para el modelo log-probit sobre *Daphnia magna* 48h para cada uno de los compuestos ensayados

**Tabla II.9.** Resultados del análisis estadístico para la comparación de a pares de las regresiones log-probit obtenidas con *Daphnia magna* 48h de la Tabla 2 (A: Aceptada, R: Rechazada)

	glifosato F	cipermetrina F	clorpirifos F	glifosato F
	glifosato a.i.	cipermetrina i.a.	clorpirifos i.a.	POEA
Diferencia entre pendientes	4,47	1,04	0,12	1,64
Valor crítico ( $\alpha=0,05$ )	2,36	2,31	2,23	2,45
Hipótesis nula: $b_1=b_2$	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Diferencia entre ordenadas al origen	1,15	2,76	8,89	2,63
Valor crítico ( $\alpha=0,05$ )	2,31	2,26	2,20	2,36
Hipótesis nula: $b_1=b_2$	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>

### *Diseño Experimental II*

#### *Bioensayos de toxicidad con Hydra attenuata*

Utilizando los resultados del experimento previo de los plaguicidas formulados se realizaron combinaciones binarias según el diseño de la Figura II.3, constituyendo 25 combinaciones diferentes para cada par de plaguicidas. Con los valores determinados (Tabla II.10) y utilizando la Ecuación 1 se obtuvieron las mortalidades esperadas en las mezclas binarias. Estos valores esperados y los observados experimentalmente se muestran para cada par. En la Figura II.7 se observan los valores para la cipermetrina F: clorpirifos F, en la Figura II.8 para cipermetrina F: glifosato F y en la Figura II.9 para clorpirifos F: glifosato F. Se verificaron las concentraciones stock y las  $LC_1:LC_1:LC_1$  en las mezclas binarias y  $LC_1:LC_1:LC_1$  en la ternarias.

**Tabla 10.** Concentraciones utilizadas para los experimentos de mezclas binarias con *Hydra attenuata* y % de mortalidad de los plaguicidas en forma individual.

LC <sub>x</sub>	clorpirifos F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)	cipermetrina F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)	glifosato F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)
1	0,42	0	6,78	0	10,77	0
10	0,61	13	8,06	8	14,80	13
15	0,67	17	8,39	19	15,94	15
50	0,98	46	9,96	53	21,48	57
85	1,43	85	11,82	86	29,92	80

Se realizaron 22 mezclas ternarias, según el diseño de la Figura II.4. Se utilizaron las concentraciones de la Tabla II.10, donde se detallan los valores de las mortalidades de cada formulado ensayado individualmente. Con estos valores y la Ecuación 2 se

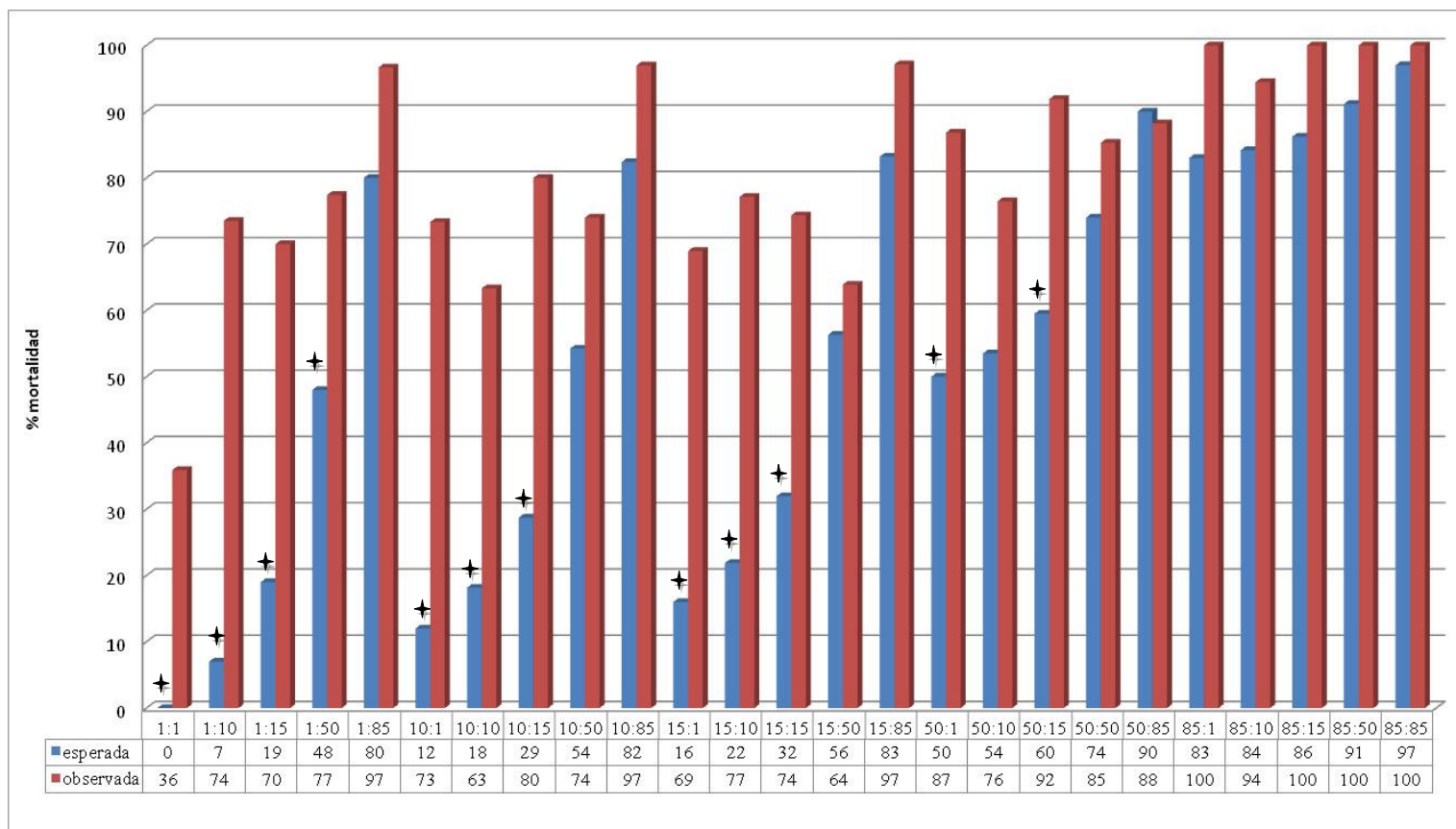
obtuvieron las mortalidades esperadas. Estas mortalidades, conjuntamente con las observadas experimentalmente, se muestran en la Figura II.10. Se construyeron los intervalos de confianza para las proporción de efecto (Newcombe & Merino Soto, 1995; Newcombe, 1998) y se utilizó una prueba a dos colas (Kungolos *et al.*, 2009). La hipótesis nula es que los valores P(E) y P(O) son los mismos. El resultado fue considerado como antagónico o sinérgico sólo si P(E) era significativamente mayor o menor, respectivamente, que el valor predicho teóricamente con un  $\alpha=0,05$  (\* indicado en las figuras).

**Tabla II.11.** Concentraciones utilizadas para los experimentos de mezclas ternarias con *Hydra attenuata* y % de mortalidad de los plaguicidas en forma individual

LC <sub>x</sub>	clorpirifos F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)	cipermetrina F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)	glifosato F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)
1	0,42	0	6,78	0	10,77	0
10	0,61	12	8,06	10	14,8	13
15	0,67	15	8,39	19	15,94	18
50	0,98	52	9,96	54	21,48	51
85	1,43	83	11,82	86	29,92	80

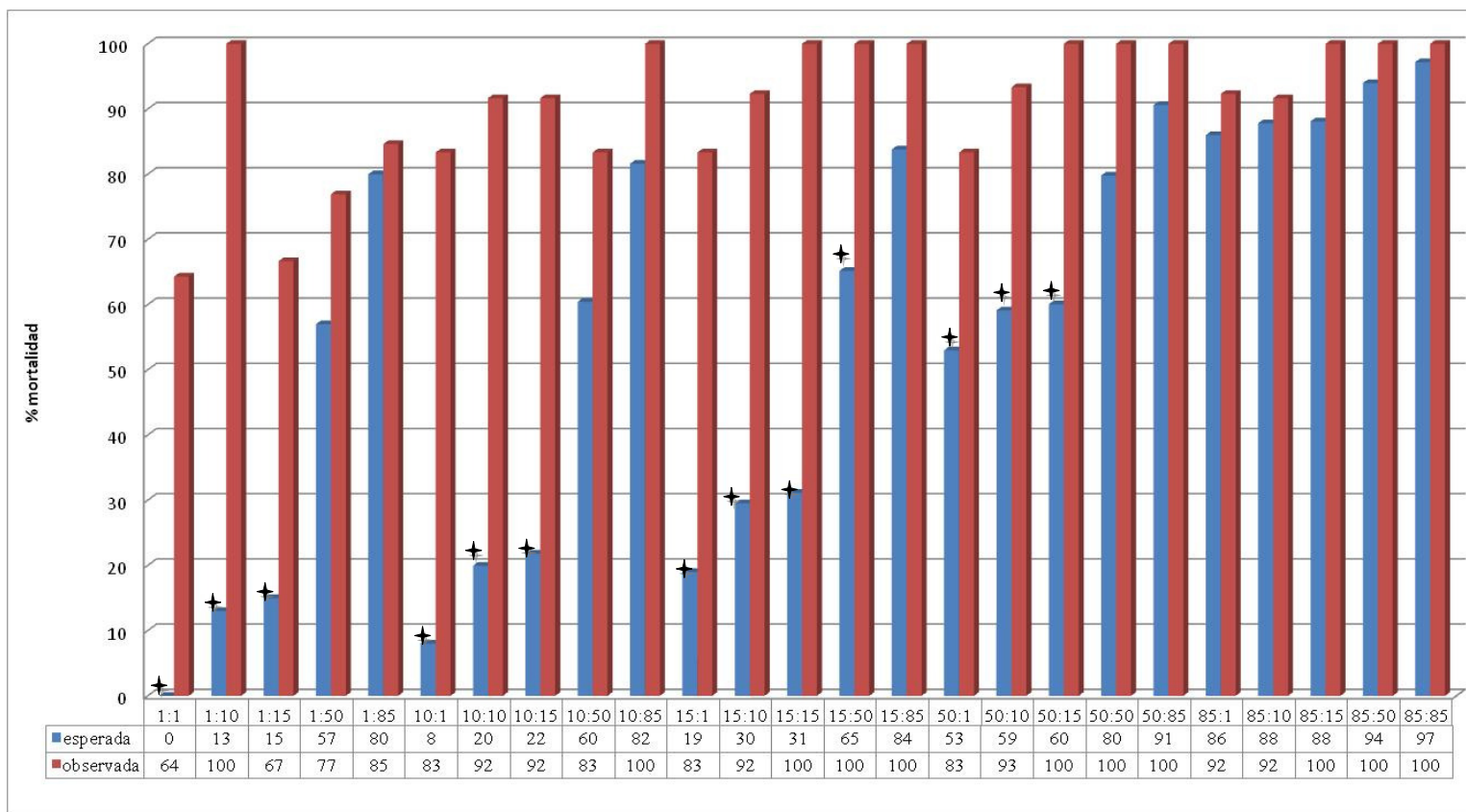
### ***Bioensayos de toxicidad con Daphnia magna***

Utilizando los resultados del experimento previo de los plaguicidas formulados se realizaron combinaciones binarias según el diseño de la Figura II.3, constituyendo 25 combinaciones diferentes para cada par de plaguicidas. Con los valores observados de la Tabla II.10 y utilizando la Ecuación 1 se obtuvieron las mortalidades esperadas en las mezclas binarias. Estos valores esperados y los observados experimentalmente se muestran para cada par. En la Figura II.11 se observan los valores para la cipermetrina F: clorpirifos F, en la Figura II.12 para cipermetrina F: glifosato F y en la Figura II.13 para clorpirifos F:glifosato F. Se verificaron analíticamente las concentraciones stock y las LC<sub>1</sub>:LC<sub>1</sub> en las mezclas binarias y LC<sub>1</sub>:LC<sub>1</sub>:LC<sub>1</sub> en la ternarias.

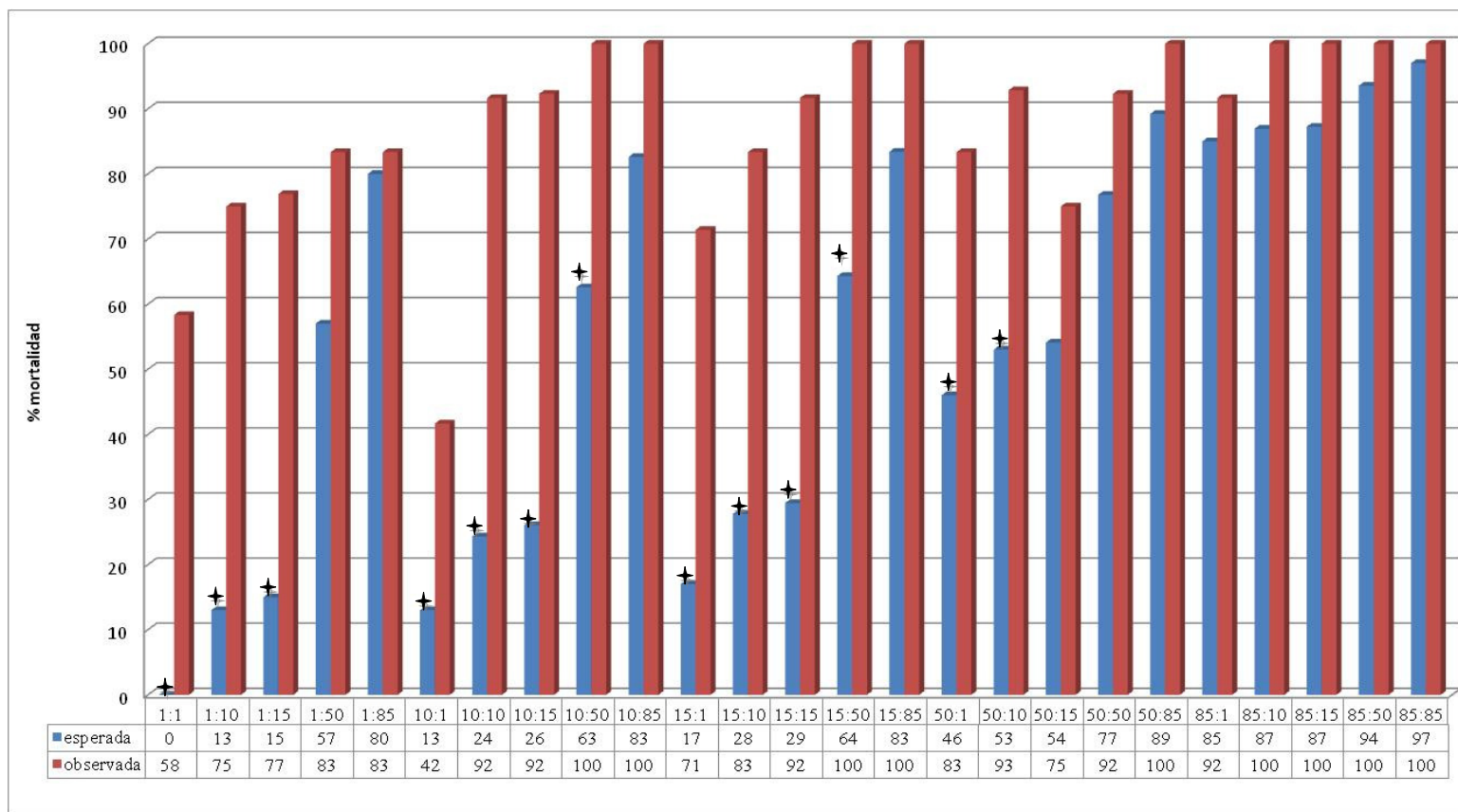


**Figura II.7.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Hydra attenuata* a las 96 h para las distintas mezclas binarias de cipermetrina F: clorpirifos. (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ ).

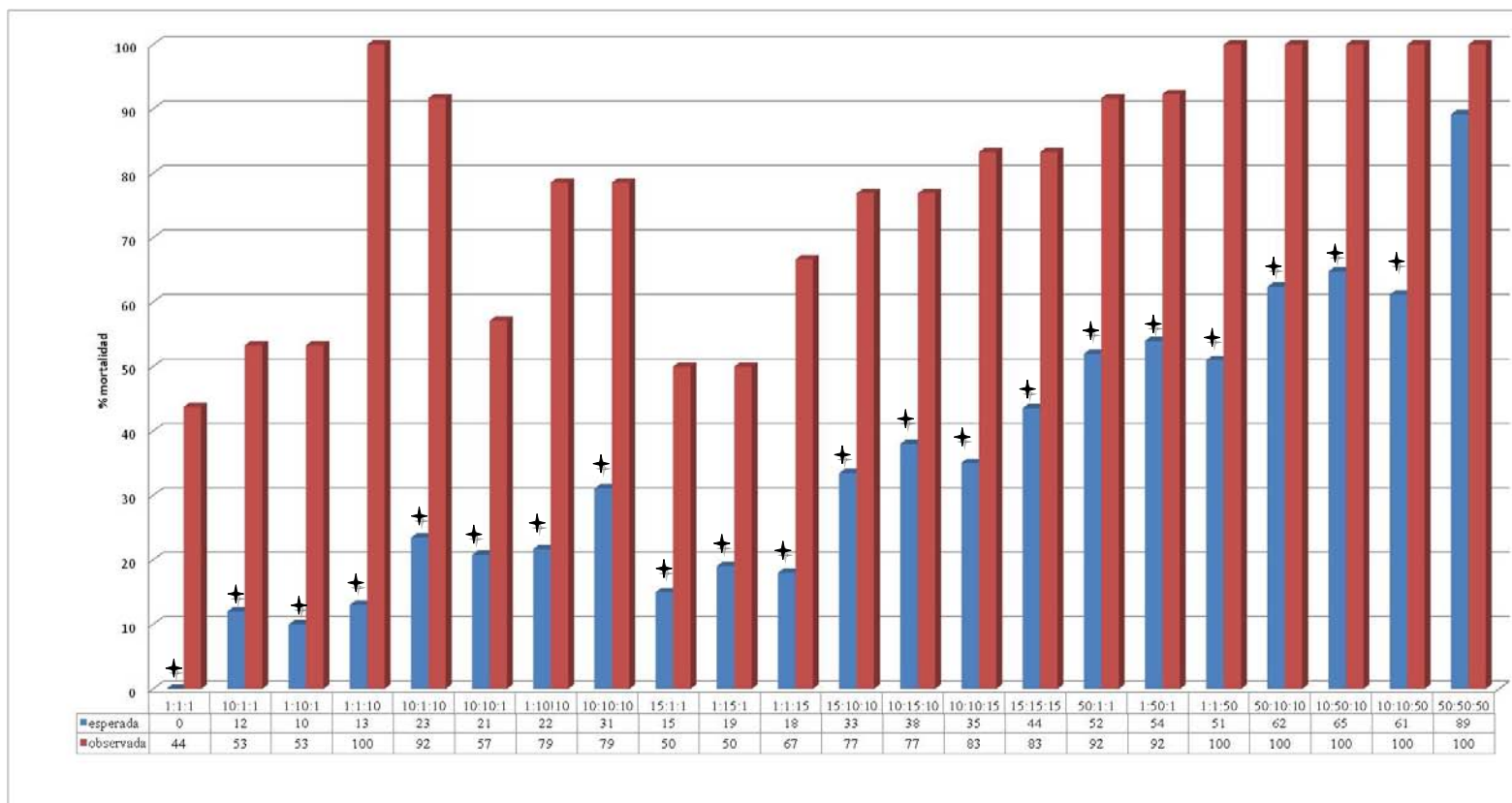




**Figura II.8.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Hydra attenuata* a las 96 h para las distintas mezclas binarias de cipermetrina F: glifosato F (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )



**Figura II.9.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Hydra attenuata* a las 96 h para las distintas mezclas binarias de clorpirifos F: glifosato F (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )



**Figura II.10.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *H. attenuata* a las 96 h para las distintas mezclas ternarias de clorpirifos F:cipermetrina F:glifosato F (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )

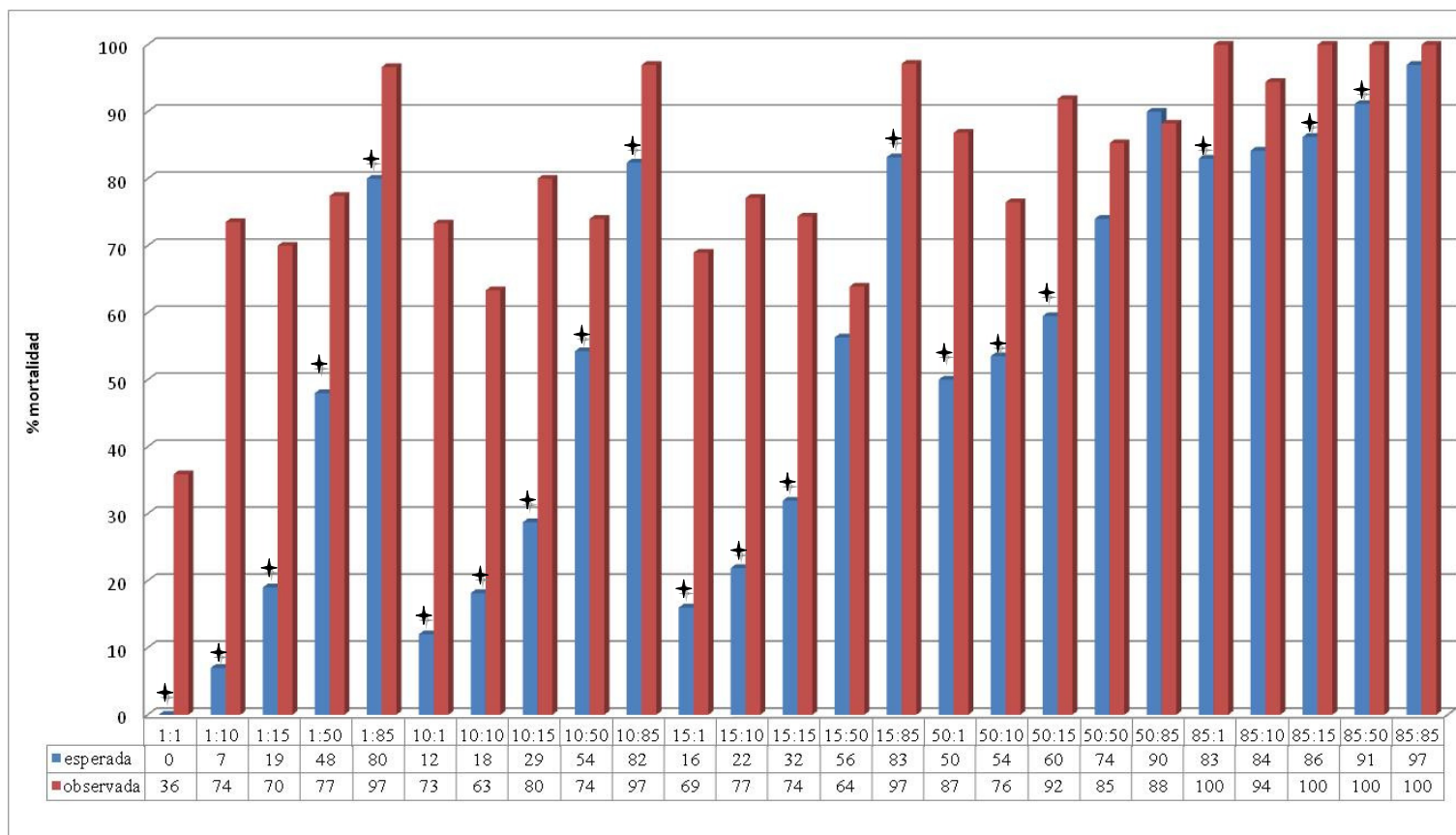
**Tabla 12.** Concentraciones utilizadas para los experimentos de mezclas binarias con *Daphnia magna* y % de mortalidad de los plaguicidas en forma individual

LC <sub>x</sub>	clorpirifos F (µg/L i.a.)	mortalidad (%)	cipermetrina F (µg/L i.a.)	mortalidad (%)	glifosato F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)
1	0,02	0	0,70	0	4,80	0
10	0,07	12	1,30	7	6,50	13
15	0,10	16	1,50	19	6,90	20
50	0,30	50	2,80	48	9,30	54
85	0,93	83	5,10	80	12,50	80

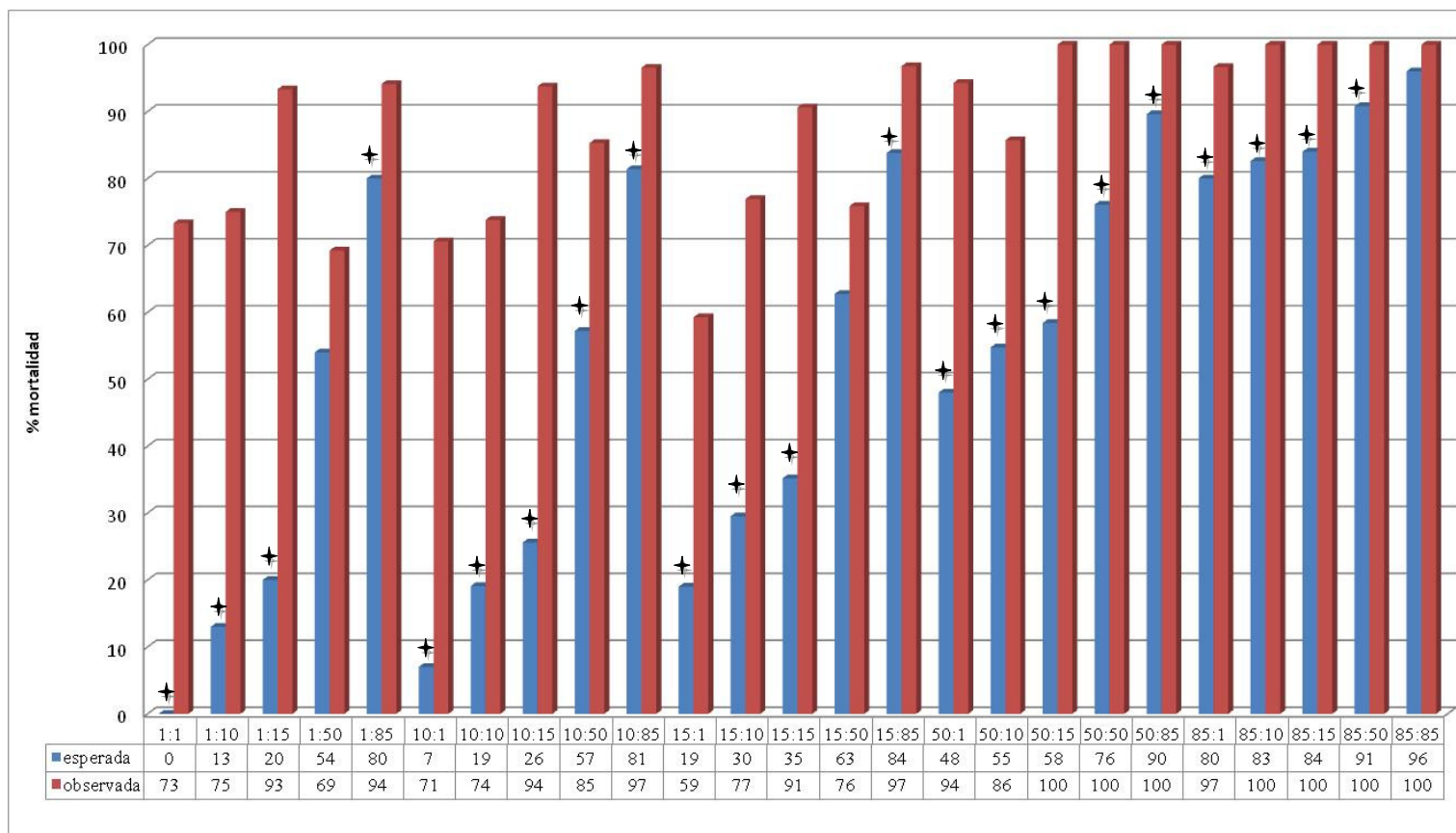
Se realizaron 22 mezclas ternarias, según el diseño de la Figura II.4. Se utilizaron las concentraciones de la Tabla II.13, donde se detallan los valores de las mortalidades de cada formulado ensayado individualmente. Con estos valores y la Ecuación 2 se obtuvieron las mortalidades esperadas. Estas mortalidades, conjuntamente con las observadas experimentalmente, se muestran en la Figura II.14. Se construyeron los intervalos de confianza para las proporción de efecto (Newcombe & Merino Soto, 1995; Newcombe, 1998) y se utilizó una prueba a dos colas (Kungolos *et al.*, 2009). La hipótesis nula es que los valores P(E) y P(O) son los mismos. El resultado fue considerado como antagónico o sinérgico sólo si P (E) era significativamente (\*en los gráficos) mayor o menor, respectivamente, que el valor predicho teóricamente con un  $\alpha=0,05$ .

**Tabla 13.** Concentraciones utilizadas para los experimentos de mezclas ternarias con *Daphnia magna* y % de mortalidad de los plaguicidas en forma individual

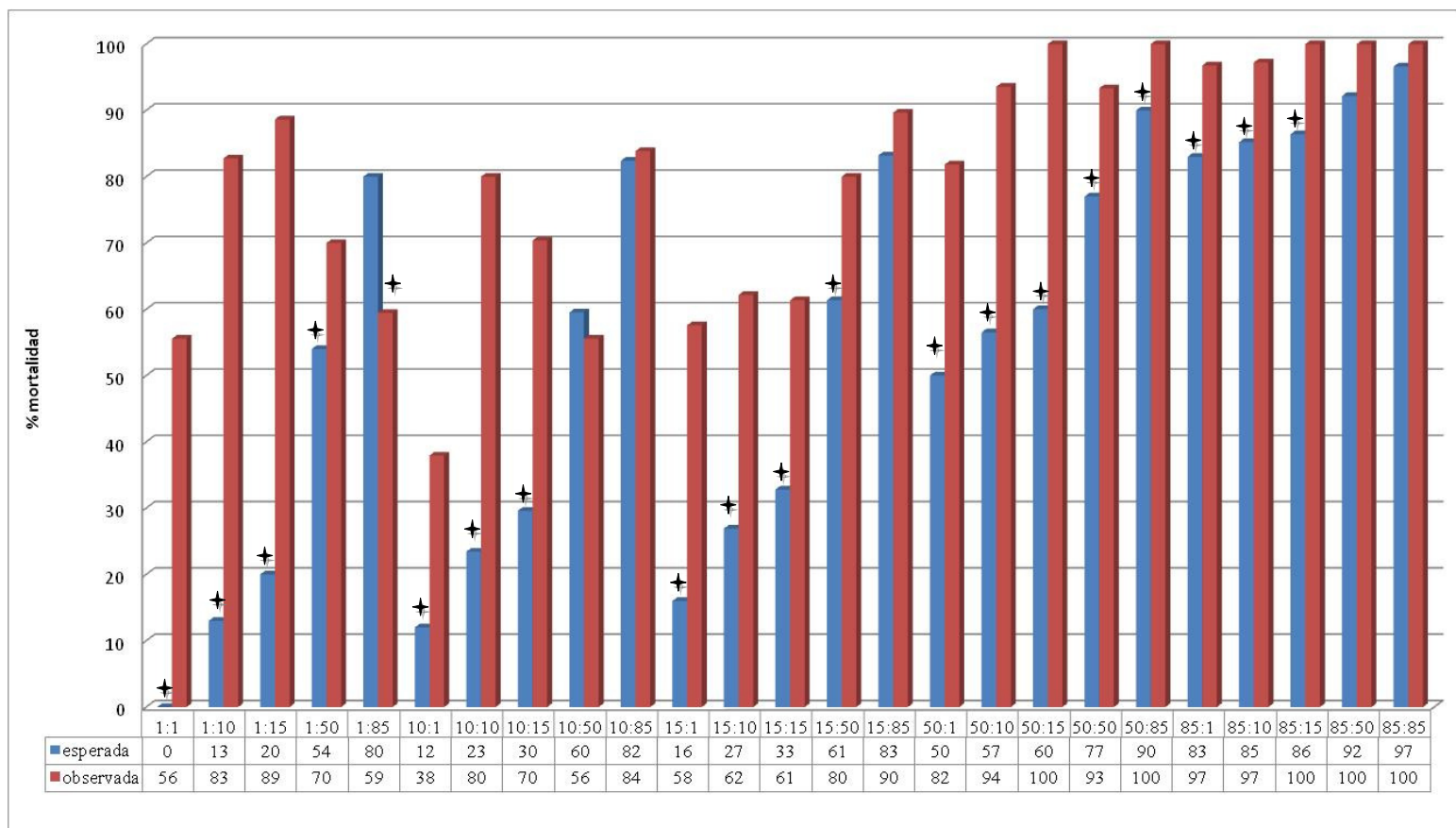
LC <sub>x</sub>	clorpirifos F (µg/L i.a.)	mortalidad (%)	cipermetrina F (µg/L i.a.)	mortalidad (%)	glifosato F (mg/L i.a.)	mortalidad (%)
1	0,02	0	0,70	0	4,80	0
10	0,07	8	1,30	9	6,50	7
15	0,10	14	1,50	15	6,90	18
50	0,30	52	2,80	45	9,30	53
85	0,93	80	5,10	80	12,50	84



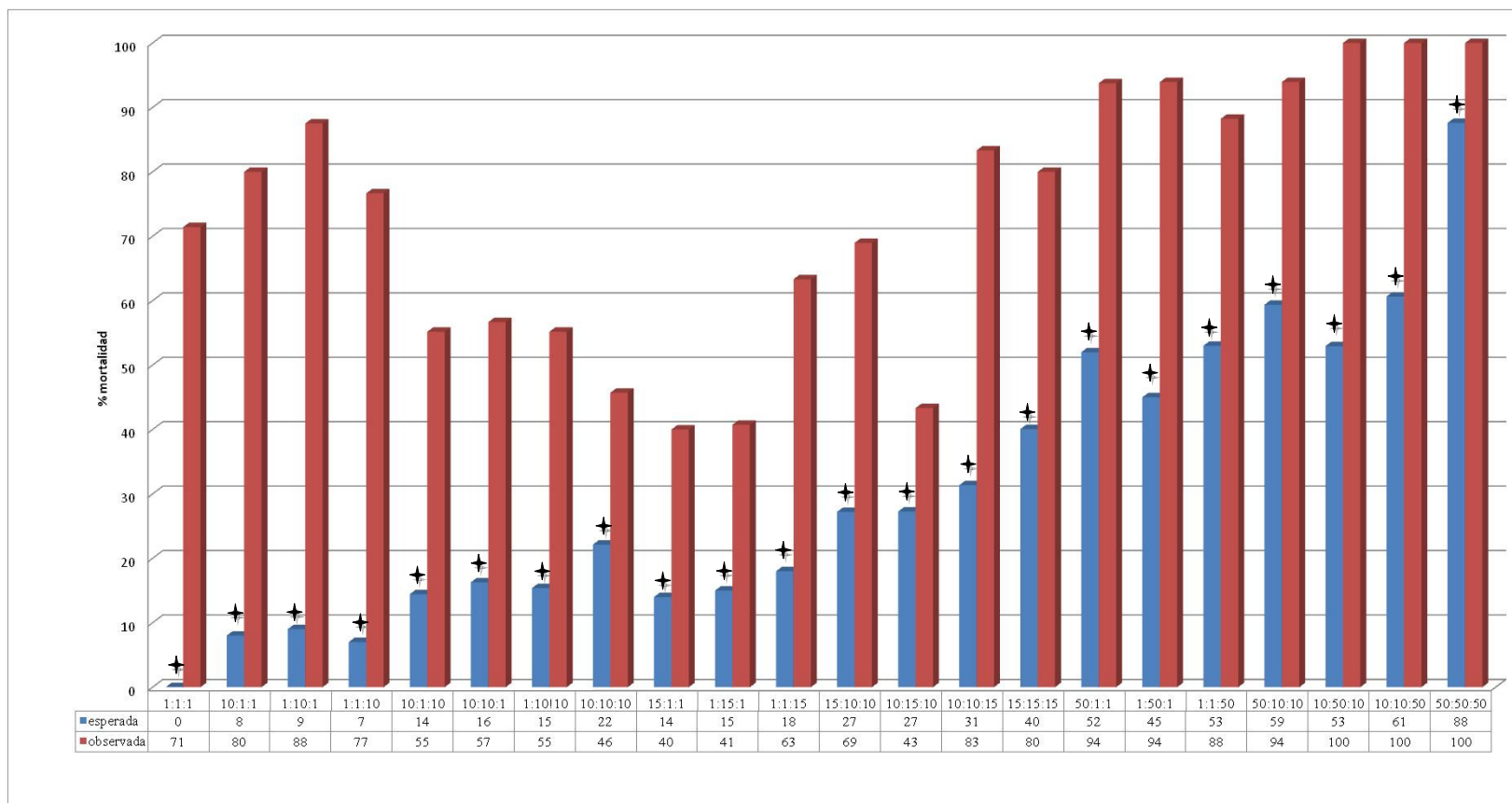
1  
 2 **Figura II.11.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Daphnia magna* a las 48 h para las distintas mezclas binarias de cipermetrina F: clorpirifos F  
 3 (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )



4  
 5 **Figura II.12.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados con *Daphnia magna* a las 48 h para las distintas mezclas binarias de cipermetrina F: glifosato F  
 6 (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )



7  
 8 **Figura II.13.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Daphnia magna* a las 48 h para las distintas mezclas binarias de clorpirifos F: glifosato F (\*:  
 9 diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )

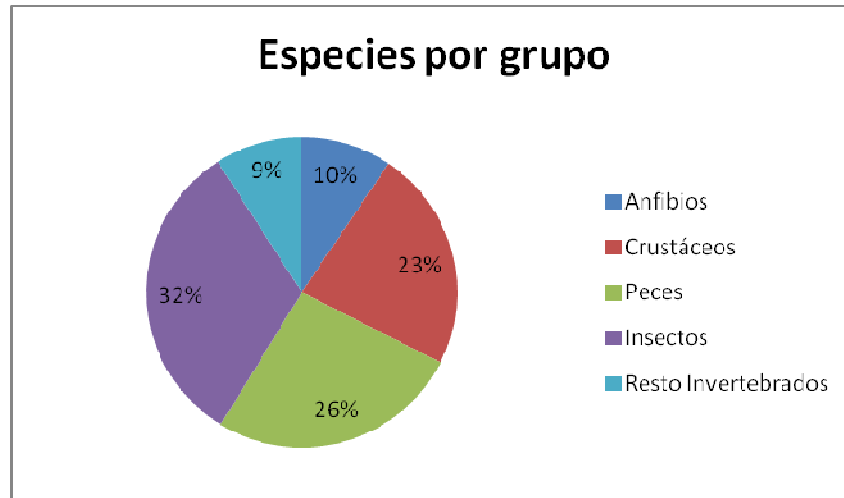


10  
 11 **Figura II.14.** Porcentajes de mortalidad esperados y observados de *Daphnia magna* 48 h para las distintas mezclas ternarias de clorpirifos F:cipermetrina  
 12 F:glifosato (\*: diferencia significativa  $\alpha=0,05$ )



## Discusión

Hasta donde llega nuestro conocimiento no existiría información de valores de estos plaguicidas sobre *Hydra attenuata* ni ningún integrante del Phylum Cnidaria; no así para *Daphnia magna* y en general para el grupo de los crustáceos. Este grupo de artrópodos acuáticos, aporta más de 20% de las especies de agua dulce sobre las cuales se posee registro de LC<sub>50</sub> de los plaguicidas en estudio (Figura II.15).



**Figura II.15.** Porcentaje de especies de agua dulce por grupo taxonómico con valores de LC<sub>50</sub> reportadas para alguno/s de los plaguicidas evaluados en el presente trabajo según USEPA (2007).

Los resultados de LC<sub>50</sub>-48h obtenidos con *D. magna* para el glifosato F y el POEA están en el rango de los observados por otros autores.

Al-Omar *et al.* (2000), informaron valores de LC<sub>50</sub>-48h para una formulación de glifosato (48% i.a.) de 9,6 y 10,50 mg/L i.a. obtenidos por el método directo y probit, respectivamente. Hartman & Martin (1984) informaron una LC<sub>50</sub>-48h para *D. pulex* de 7,9 mg/L i.a. En un trabajo de Alberdi *et al.* (1996) se comparan valores de una formulación de glifosato (48% i.a.) sobre *D. magna* y una especie autóctona de cladóceros de nuestra región, *D. spinulata*. Los valores informados de LC<sub>50</sub>-48h fueron 31,77 y 29,62 mg/L i.a. para *D. magna* y *D. spinulata* respectivamente; no se observaron diferencias significativas entre ambas especies entre sus LC<sub>50</sub> ni a las 24 ni a las 48 h.

En referencia al POEA, existen valores de  $LC_{50}$  informados para cladóceros. Mayer *et al.* (1986) determinaron una  $LC_{50-48}$  h de 5,2 mg/L con *D. magna* y Servizi *et al.* (1987) informaron una  $LC_{50-96}$  h con *D. pulex* de 2 mg/L. En el caso de los resultados del glifosato i.a. se obtuvieron valores de  $LC_{50-48}$  por debajo de los compilados por Giesy *et al.* (2000) en referencia a estudios inéditos, limitando la comparación metodológica.

Dentro de los insecticidas, los resultados obtenidos para cipermetrina están en el rango de los informados para piretroides sintéticos por Day & Kaushik (1987); los autores informan valores entre 0,12 y 5  $\mu\text{g/L}$  para cladóceros en ensayos agudos de laboratorio y remarcan la alta sensibilidad de este grupo frente a los piretroides. Stephenson (1984) informa la  $LC_{50-24\text{h}}$  de *D. magna* para cipermetrina i.a. en 2  $\mu\text{g/L}$  y la USEPA (2007) reporta valores entre 1-1,56  $\mu\text{g/L}$  para la cipermetrina F en ensayos agudos.

En el caso del clorpirifos i.a. para *D. magna* existen valores informados de  $LC_{50-48\text{h}}$ : 1,7  $\mu\text{g/L}$  (USEPA, 2007), 1  $\mu\text{g/L}$  (Kersting & van Wijngaarden, 1992), 0,6  $\mu\text{g/L}$  (Moore *et al.*, 1998) y, la más baja, de 0,19  $\mu\text{g/L}$  (Kikuchi *et al.*, 2000). En este último trabajo realizan ensayos con 11 insecticidas organofosforados diferentes siendo el clorpirifos el que presenta la menor  $LC_{50-48\text{h}}$  para *D. magna*, poniendo en evidencia su alta sensibilidad a este plaguicida.

Para el clorpirifos F, sobre *D. magna*, Foster *et al.* (1998) informan  $LC_{50-48\text{h}}$  de 0,25  $\mu\text{g/L}$  y Diamantino *et al.* (1998) de 0,325 y 0,344  $\mu\text{g/L}$ . Existen valores para otros cladóceros, van Wijngaarden *et al.* (1993), informan un valor de 0,8 para las  $LC_{50-48\text{h}}$  de *D. longispina* y *Simnocephalus vetulus*.

Hay que tener en consideración que la variabilidad en los resultados puede deberse en parte distintos tipos de formulaciones del mismo ingrediente activo.

### ***Sensibilidad relativa***

Para determinar la sensibilidad de *H. attenuata* y *D. magna* a los plaguicidas estudiados respecto a otras especies de agua dulce, se comparó con valores informados por la base de datos ECOTOX (USEPA, 2007). Para tal fin se obtuvieron los registros de los efectos biológicos informados para los tres plaguicidas en estudio (clorpirifos n=4753, cipermetrina n=1592 y glifosato n=1771), como figura en la Tabla II.14, seleccionando

solo los que informaban valores de LC<sub>50</sub> sobre organismo acuáticos de agua dulce en exposiciones agudas (considerando valores ≤ 96 h). Los valores reportados que superaron los criterios de selección (n=180 valores para el clorpirifos, n=83 para la cipermetrina y n=49 para el glifosato) se organizaron por especies. Los grupos taxónomicos representados y sus abundancias relativas en función de la cantidad de especies se observan en el gráfico II.15; si alguna especie poseía más de un registro se computaba la media geométrica de los valores informados para la misma.

**Tabla II.14.** Números de registros obtenidos de ECOTOX (USEPA, 2007)

números de registros	clorpirifos	cipermetrina	glifosato
efectos biológicos	4753	1592	1771
LC <sub>50</sub>	1071	442	728
LC <sub>50</sub> sobre especies de agua dulce	883	335	717
spp de agua dulce con LC <sub>50</sub> ≤ 96 h	180	83	49
spp invertebrados de agua dulce con LC <sub>50</sub> ≤ 96h	133	61	20

Los percentiles asociados a la distribución de las LC<sub>50</sub> para cada plaguicida se muestran en la Tabla II.15, todos los organismos acuáticos de agua dulce y, por otro lado, solo los invertebrados.

**Tabla II.15.** Percentiles de la distribución de las LC<sub>50</sub> para los tres plaguicidas considerando todos los organismos acuáticos de agua dulce informados (COMPLETO) y solo los invertebrados (INVER).

Percentiles	Clorpirifos (µg/L)		Cipermetrina (µg/L)		Glifosato (µg/L)	
	COMPLETO	INVER	COMPLETO	INVER	COMPLETO	INVER
75%	82,00	19,79	5,22	1,70	64106	242000
50%	6,00	2,53	1,21	0,39	28440	42541
25%	1,03	0,81	0,13	0,08	7195	25000
Nº spp	180	135	83	61	49	20

Los valores obtenidos de LC<sub>50</sub> con *H.attenuata* para el herbicida (F e i.a.) la ubican en el primer cuartil respecto a los invertebrados y en el segundo respecto a los organismos acuáticos. Respecto a los insecticidas, en ambos casos tanto para sus i.a. como F, se encuentran en el último cuartil, encima del percentil 90. Los valores para *D. magna* respecto al herbicida (F e i.a.) la ubican en la primera mitad de los percentiles con un patrón similar a *H. attenuata*, pero en este caso la LC<sub>50</sub> del formulado (expresada como i.a.) es un orden de magnitud menor que la del i.a. ensayado por separado, poniendo en evidencia que en *D. magna*, parte de la toxicidad observada por la formulación de

glifosato no puede atribuirse al i.a. Para la cipermetrina (F e i.a.) manifiesta una sensibilidad asociada al tercer cuartil en relación para organismos acuáticos, pero en relación a otros invertebrados, su sensibilidad es baja. Para el clorpirifos (F e i.a.) *D. magna* se ubica dentro del primer cuartil (debajo del percentil 10 para el F) en el grupo de los organismos acuáticos, indicando su muy alta sensibilidad respecto a este plaguicida.

En referencia al POEA, tomando en cuenta lo informado para 13 especies (2 dáfnidos, 2 insectos y 9 peces) por la USEPA (2007); se puede estimar que los valores 6196, 2640 y 2286  $\mu\text{g/L}$  representan los percentiles 75, 50 y 25 de las  $\text{LC}_{50}$  reportadas. Bajo esta consideración, los valores para *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* se encuentran en el cuartil menor indicando una alta sensibilidad al surfactante respecto a los organismos acuáticos informados con  $\text{LC}_{50}$ .

Según Klaassen *et al.* (2001), considerando la curva de Concentración-Efecto (C-E), la potencia relativa de un tóxico está dada según su posición a lo largo del eje de la concentración, haciendo referencia al rango de concentraciones donde el tóxico produce un incremento en la respuesta. Considerando esto de manera conjunta con las comparaciones de a pares de las rectas de regresión log-probit, podemos determinar para nuestros resultados, el siguiente orden de toxicidad: en el caso de *H. attenuata* clorpirifos F e i.a > POEA > cipermetrina F e i.a. > glifosato F e i.a. En el caso de *D. magna* el orden es clorpirifos F e i.a > cipermetrina F e i.a. >> POEA > glifosato F e i.a, existiendo en este caso una diferencia de potencia de tres órdenes de magnitud ( $\mu\text{g/L}$  a  $\text{mg/L}$ ) entre los valores de los insecticidas y sus formulaciones con el herbicida (F e i.a.) como con el POEA. Solo en el caso del glifosato F y su i.a., tanto para *D. magna* como para *H. attenuata* hay significación estadística para rechazar la hipótesis de la igualdad en las pendientes de las rectas log-probit, evidenciando que el glifosato según se encuentre solo o formulado manifiesta una relación de C-E (Concentración-Efecto) diferente. Se suma a esta línea de evidencia, la toxicidad observada del POEA, componente presente en la formulación ensayada para ambas especies y que mostró una mayor toxicidad que el i.a. sobre ambas especies. En el caso de los insecticidas, no podemos rechazar la hipótesis de la igualdad de las pendientes y en los casos donde se rechaza la igualdad de la ordenada al origen, las  $\text{LC}_{50}$  de los formulados (expresados

como i.a.) son menores que los de la formulación, pudiendo indicar el aumento de la potencia al desplazar por el eje de las abcisas la relación de C-E.

Aquellas sustancias de las formulaciones comerciales de plaguicidas que no son i.a. se consideran *a priori* inertes (Cox & Sorgan, 2006). Tienen una variedad de funciones en las formulaciones de plaguicidas, pudiendo actuar como disolventes, surfactantes o conservantes, entre otras. A menudo existen numerosas formulaciones comerciales para cada i.a. y se conoce que la disponibilidad y la toxicidad del i.a. es modificada por ingredientes inertes (Schmuck *et al.*, 1994). Existen distintos estudios sobre la condición en la cual los supuestos compuestos inertes modifican la ecotoxicidad de los plaguicidas (Mayer *et al.*, 1986; Schmuck *op. cit.*; Cox and Sorgan, 2006). Mayer *et al.* (1986) compararon la toxicidad de 48 i.a. y sus formulaciones comerciales mediante 161 pares de comparaciones de  $LC_{50}$  o  $EC_{50}$ , entre el i.a. y la formulación mediante su cociente ( $LC_{50ia}/LC_{50F}$ ) considerando que si era mayor a 1 existía un incremento de la toxicidad. Con este criterio, resultó que la toxicidad de las formulaciones respecto al i.a. fue mayor en el 32% de los casos, menor en el 11% de los mismos y sin diferencias en el resto. Dentro de los que aumentaron la toxicidad en más de un orden de magnitud, se reportaba el Roundup con el glifosato como sal de isopropilamina. Servizi *et al.* (1987) informaron el efecto de RondoUp y el POEA sobre *Daphnia pulex*. Obtuvieron una  $LC_{50-96h}$  de 25,5 mg/L (como glifosato i.a.) para la formulación y 3,8 mg/L de surfactante, lo que demuestra la mayor toxicidad de la última, en consonancia con los presentes resultados.

Schmuck *et al.* (*op.cit.*), se cuestionaron si parte de los resultados del trabajo de Mayer *et al.* (*op. cit.*) podría deberse a la comparación de datos bajo condiciones diferentes y, por esta razón, buscan establecer resultados bajo una estandarización de los ensayos considerados. A partir de 95, 69 y 273 estudios para algas, dafnias y peces respectivamente, evaluaron la relación de efecto ( $LC_{50ia}/LC_{50F}$ ) al igual que Mayer *et al.* de los i.a. y las formulaciones. Solo si el cociente era mayor que 2 (suponían una variabilidad natural en la respuesta de 0,5 a 2) se consideraba que la toxicidad del formulado era mayor que la del i.a.; obtuvieron este resultado en el 25% de los casos para algas y peces y en el 35% de los casos para dafnia.

Si reformulamos los resultados como los citados autores y seguimos su criterio obtenemos los resultados de la Tabla II.16. Según Mayer *et al.* (*op. cit.*) a excepción del glifosato sobre *Hydra attenuata*, en todos los casos de los plaguicidas ensayados en este trabajo, la formulación incrementó la toxicidad del i.a.; según Schmuck *et al.* (*op. cit.*) esto solo se daría para *Daphnia magna* en el caso del glifosato y el clorpirifos. Este análisis relaciona solo un punto de cada una de las curvas de C-E de cada F e i.a. y solo en el caso que las rectas log-probit sean paralelas serían válidas para toda la relación; en función de nuestros resultados discutidos previamente no podemos descartar este comportamiento para cada par de los i.a. y formulaciones de insecticidas en ambas especies.

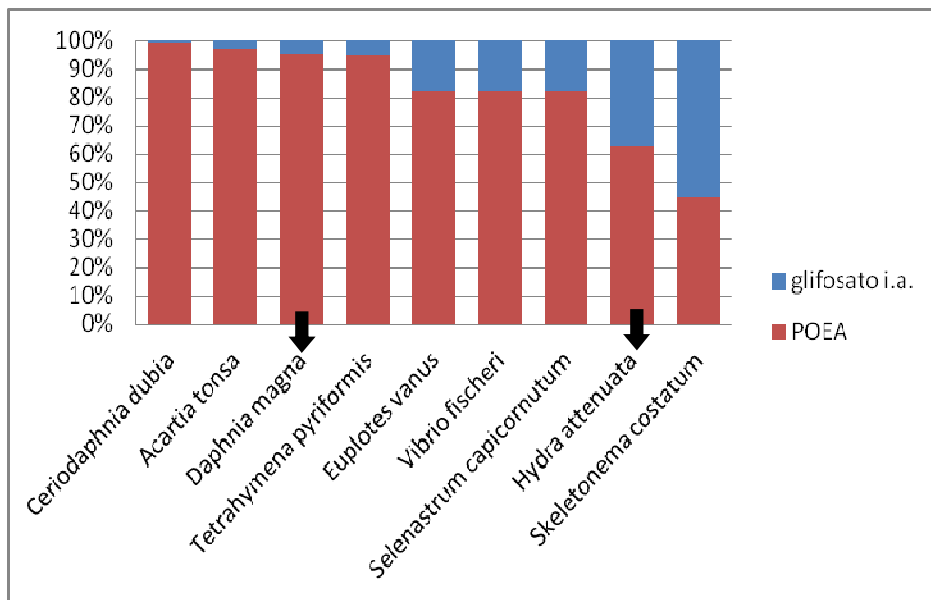
**Tabla II.16.** Relación de efecto para cada par de Formulado e ingrediente activo para *Hydra attenuata* y *Daphnia magna*  
LC<sub>50</sub>ia/LC<sub>50</sub>F

Plaguicida	<i>Hydra attenuata</i>	<i>Daphnia magna</i>
glifosato	0,8	21,4
cipermetrina	1,4	1,3
clorpirifos	1,5	4,1

En el caso del herbicida, podemos sumar al análisis los resultados obtenidos para el POEA, coadyuvante encontrado en la formulación, de la misma manera que la realizada por otros autores, como es el caso de Tsui & Chu (2003). Estos autores tomando el concepto de unidad tóxica de Sprague (1970), calculan la contribución relativa del POEA y el glifosato i.a. en la formulación del herbicida. El trabajo presenta resultados para dos invertebrados (*Ceriodaphnia dubia* y *Acartia tonsa*), dos protozoos (*Tetrahymena pyriformis* y *Euplotes vanus*), microalgas verdes (*Selenastrum capricornotum* y *Skeletonema costatum*) y una bacteria (*Vibrio fischerii*). La contribución de POEA y glifosato a.i. mostraron ser especie dependiente; siendo la contribución del POEA según sus resultados invertebrados>protozoos> bacteria> algas verdes obteniendo una contribución del POEA en todos los casos mayor al 46%. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se ajustan a los observado con *D. magna*, no así en el caso de *H. attenuata* donde la contribución relativa del glifosato i.a. esta cercana a los valores de las algas verdes (Figura II.16).

El análisis de los datos de toxicidad de los i.a. y formulaciones de insecticidas, tanto para *D. magna* como para *H. attenuata*, sugiere que no hay interacciones entre los i.a. y

sus respectivos coadyuvantes. Si existiría un aumento de la toxicidad de las formulaciones respecto a los efectos de los i.a. en distinto grado, siendo más de 4x en el caso de *D. magna* con la formulación de clorpirifos considerando las relaciones entre las LC<sub>50</sub>. Los insecticidas estudiados ejercen su mecanismo de acción sobre la transmisión del impulso nervioso, ya sea por inhibición de la acetilcolinesterasa o por la interrupción del impulso a través del axón (Stenersen, 2004). La baja sensibilidad de *H. attenuata* respecto a los insecticidas podría deberse a que son organismos más sencillos con un sistema neuronal (Miljkovic-Licina *et al*, 2004), difuso y no centralizado, con la mayoría de las neuronas sin una polaridad definida (Brusca & Brusca, 2002); representando las neuronas en el caso de *Hydra* solo el 3% del número total de células de todo el organismo (David, 1973). Al carecer de un sistema nervioso desarrollado para centralizar funciones vitales es de esperar un menor impacto en comparación con los organismos que tienen sistema nervioso muy especializado como es el caso de los crustáceos (Brusca & Brusca, 2002).



**Figura 16.** Contribución relativa de la toxicidad del coadyuvante POEA y el glifosato i.a. de las siete especies estudiadas por Tsui and Chu (2003) más los valores obtenidos para *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* en el presente trabajo (indicados por flechas).

Los datos de toxicidad del i.a. y la formulación del herbicida, sugieren que el coadyuvante POEA aporta a la toxicidad y lo hace por una vía distinta a la del glifosato i.a., tanto para *D. magna* como para *H. attenuata*, no siendo constantes las relaciones

C-E entre formulación e i.a. En el caso de *D. magna* se observa el patrón de otros invertebrados acuáticos en cuanto a valores de toxicidad como aporte del i.a. y el POEA; pero en el caso de *H. attenuata*, se pone de manifiesto un aumento de la contribución relativa de la toxicidad debido al i.a., con un patrón más cercano al de algas unicelulares que poseen la vía del ácido shikímico, blanco de acción del glifosato i.a. Si bien esta vía metabólica se suponía ausente en animales, Starcevic *et al.* (2008), informaron recientemente la presencia de genes asociados a las enzimas de la vía del ácido shikímico en miembros de este phylum, asociada a transferencia horizontal de genes de organismo simbióticos, lo que sugiere una posible explicación a la toxicidad observada de glifosato sobre hidra (Demetrio *et al.*, 2011).

La modificación de la toxicidad entre i.a. y las formulaciones correspondientes no siguen un patrón común, observando que varía en función de la especie ensayada, el i.a. y su mecanismo de acción correspondiente, la formulación considerada y la relación entre las curvas de C-E de ambas. Debido a estas diferencias se remarca la importancia, ya puesta en evidencia por otros autores (García-Ortega *et al.*, 2006) del uso de formulaciones comerciales de plaguicidas en la realización de las pruebas ecotoxicológicas, sobre todo considerando que muchos umbrales de efecto a nivel normativo se calculan mediante la  $LC_{50}$  del i.a. de la formulación comercial (Cox & Sorgan, 2006).

### ***Efectos combinados de las formulaciones***

El efecto combinado esperable de sustancias químicas puede calcularse teóricamente por dos modelos distintos: el modelo de aditividad de Löewe o de Concentración Adición (CA) aplicable a sustancias con el mismo modo de acción toxicológico, y por el modelo de aditividad de Bliss o de Acción Independiente (AI) aplicable para sustancias con distintos mecanismos de acción (Greco *et al.*, 1995; Vighi *et al.*, 2003; Finizio, 2005). Distintos estudios han aplicado ambos modelos para evaluar la predicción de efectos combinados sobre distintos organismos (Backhaus *et al.*, 2000,2003; Faust *et al.*, 1994, 2001, 2003; Junghans *et al.*, 2003; Arrhenius *et al.*, 2004; Syberg, 2008). Hay que considerar que el modo de acción de los plaguicidas es conocido generalmente para los organismos blanco, no así para los organismos no-blanco, implicados en las evaluaciones de riesgo ecológico.



En el presente trabajo se utilizaron ecuaciones en consonancia con el concepto de aditividad según Bliss (1939) para obtener las respuestas esperadas, tanto para las mezclas binarias como las ternarias; siendo el modelo conceptual elegido para sustancias con distintos mecanismo de acción. Distintos autores indican que la AI produce predicciones precisas de efectos para mezclas de sustancias que tienen distintos mecanismos de acción y en estas condiciones se ha encontrado que CA generalmente sobreestima los efectos (Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2003). Aunque se puede criticar que mayoritariamente estos trabajos se han realizado con organismos unicelulares o evaluando respuestas de tipo bioquímico (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000, 2004; Faust *et al.*, 2001, 2003; Scholze *et al.*, 2001; Brian *et al.*, 2005), y dada la simplicidad fisiológica de estos sistemas, podrían no estar reflejando las respuestas de sistemas más complejos como es el caso de organismos pluricelulares (Barata *et al.*, 2007). Estudios sobre *D. magna* demuestran que el mejor ajuste en la predicción estaría asociado al punto final evaluado más que al mecanismo de acción de los compuestos en estudio. Barata *et al.* (2006), compararon los modelos de CA e AI, para sustancias con el mismo y distinto mecanismo de acción para respuestas letales y subletales. Sus resultados indican que la capacidad del concepto de CA e AI para predecir los efectos de toxicidad varía entre los puntos finales letales y subletales, independientemente de su principal modo de acción; el modelo de AI obtiene las mejores predicciones para letalidad. Los autores sugirieron que al examinar las respuestas complejas, el concepto clásico de modo de acción debe ampliarse para abarcar un modo ecotoxicológico de acción considerando los distintos puntos finales y su relevancia ecológica (Barata *et al.* 2007).

La Tabla II.17 resume los resultados obtenidos en el presente trabajo según el modelo utilizado por Kungolos *et al.* (2009). Se encuentra un alto número de respuestas más que aditivas (=sinergismo) tanto para *Hydra attenuata* como para *Daphnia magna*, aunque la diferencia entre los dos ensayos puede deberse a una menor potencia para detectar diferencias en el test con *H. attenuata*, dado que la cantidad de organismos expuestos es menor. Los resultados observados son consistentes con lo establecido por Warne & Hawker (1995) en la “Funnel Hypothesis”. Esta hipótesis establece que el desvío de la aditividad se incrementa cuando el número de sustancias en la mezcla es menor, y que además, en los puntos finales de letalidad la observación de este comportamiento sería

más frecuente que en la evaluación de puntos finales subletales. En nuestro caso se trabajó con mezclas binarias y ternarias evaluando mortalidad, y considerando que los autores hablan de mezclas de más de diez sustancias para considerar comportamientos próximos a la aditividad; los resultados serían coherentes con este planteo.

**Tabla 17.** Resumen del tipo de respuesta de los ensayos realizados en el presente trabajo para *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* (+: más que aditivo/sinergismo; -: menos que aditivo/antagonismo)

Mezclas de formulaciones	<i>Hydra attenuata</i>			<i>Daphnia magna</i>			n
	Aditivo	+	-	Aditivo	+	-	
cipermetrina F :clorpirifos F	13	12	0	5	20	0	<b>50</b>
cipermetrina F :glifosato F	12	13	0	3	22	0	<b>50</b>
clorpirifos F:glifosato F	12	13	0	6	18	1	<b>50</b>
cipermetrina F : clorpirifos F : glifosato F	1	21	0	0	22	0	<b>44</b>

Hay resultados publicados evaluando efectos uni-específicos de mezclas con los mismos compuestos o de la familia de los mismos en condiciones controladas. Martin & Ronco (2006) evaluaron en laboratorio las mismas mezclas (tres binarias y una ternaria), con formulaciones comerciales con idénticos i.a. que el presente estudio. El efecto medido fue la inhibición de la elongación de la radícula de *Lactuca sativa*, que si bien es un organismo fotosintetizador, es relevante ya que representa el único caso publicado con la misma combinación de plaguicidas. En todas las mezclas se observó un mayor efecto que las formulaciones por separado excepto para el caso de clorpirifos F: glifosato F; existiendo informes de antagonismo de mezclas de insecticidas organofosforados y herbicidas para otros organismos fotosintéticos (Munkegaard *et al*, 2008). Coincidentemente el único resultado en el presente estudio donde se observa un efecto menor que el aditivo (=antagonismo) es para una de las combinaciones de esta mezcla binaria.

En referencia a mezclas binarias de insecticidas sobre invertebrados, Zhou *et al* (2011) evaluaron los efectos en laboratorio sobre *Eiseina fetida* para cipermetrina y clorpirifos, tanto en mezcla como individualmente para efectos agudos (incluyendo la mortalidad) y crónicos; en todos los casos los efectos de la mezcla fueron más que aditivos. Deneer (2000), en un trabajo de revisión que abarca publicaciones desde el año 1978 al 1998, llegó a la conclusión de que ciertas mezclas binarias de insecticidas son las que se alejan mayoritariamente de lo esperado por aditividad, citando el caso de mezclas de

organofosforados y piretroides sintéticos, familias del clorpirifos y la cipermetrina, respectivamente. Existen referencias de sinergismo también para mezclas binarias de herbicidas e insecticidas. Anderson & Lydy (2002), demostraron el efecto sinérgico del herbicida atrazina sobre *Hyalella azteca* de tres insecticidas organofosforados. Entre estos últimos se encontraba el clorpirifos, evidenciando que la LC<sub>50</sub> del insecticida va disminuyendo significativamente al aumentar la concentración del herbicida en el medio.

Referido al efecto de mezclas ternarias, el estudio más cercano encontrado en cuanto a los plaguicidas involucrados, sin considerar el de Martin & Ronco (2006) comentado previamente, es el estudio de Poletta *et al* (2011) en condiciones controladas al aire libre. Los autores simularon exposiciones a dosis de aplicación de glifosato por un lado y de una mezcla ternaria de glifosato, cipermetrina y endosulfán sobre huevos de *Caiman latirostris* por otro; los autores informaron efectos subletales (efectos genotóxicos y metabólicos) mayores para la mezcla del herbicida junto con los dos insecticidas que para el herbicida individualmente.

Algo para destacar es que mayoritariamente en los trabajos citados, el número de combinaciones ensayadas de cada mezcla fue bajo. En muchos trabajos se comparan sólo una combinación de una mezcla dada con el efecto por separado de cada plaguicida. En contraposición, en el presente estudio, las combinaciones fueron 22 (ternaria) y 25 (binarias) tanto para *Hydra attenuata* como para *Daphnia magna*; resultando que en las menores relaciones de concentraciones ensayadas el sinergismo observado fue mayor, siendo esto muy relevante en el momento de evaluar el riesgo de las mezclas en consideración.

Existen trabajos que informan la evaluación de efectos en condiciones controladas de mezclas de insecticidas (Cuppen *et al*, 2002; George *et al.*, 2003; Relyea, 2009; Sibley *et al.*, 2000; van Den Brink *et al*, 2002) y de insecticidas con herbicidas (Fairchild *et al.*, 1994; Grünwald, 2003; Hoagland *et al.*, 1993; Relyea, 2009; van Den Brink *et al*, 2009) a niveles de organización superiores, principalmente mediante micro y mesocosmos. En estos casos, la relación causal de los efectos es más difícil de establecer, pero la evidencia sugeriría que si la mezcla tiene compuestos que actúen sobre grupos funcionales distintos (herbicida e insecticidas) el efecto será mayor. En estos casos

multiespecíficos no estaría asociado al sinergismo como lo consideramos en los ensayos uniespecíficos, sino a efectos indirectos debido a las relaciones dentro de la comunidad.

**Capítulo III:**  
**Escenarios de Exposición**

## ***Introducción***

Para evaluar el riesgo es necesario conocer el escenario de exposición donde pueden ocurrir los efectos. Los estudios sobre niveles de insecticidas y herbicidas en cuerpos de agua asociados a la soja RR son escasos en la región pampásica; y los que existen se concentran en la región norte, dentro de la zona núcleo de producción (Marino *et al.* 2005; Peruzzo *et al.* 2008, Jergentz 2004a, b, 2005, Di Marzio *et al.* 2010). Dado que el cultivo de la soja RR expandió claramente su frontera es necesario evaluar en ambientes de la zona, las concentraciones de los plaguicidas asociados a los cultivos para conocer de manera más integral su potencial impacto.

Estudios realizados en la región, como los de Jergentz *et al.* (2004a, b), informaron pulsos de toxicidad asociados a los insecticidas en los arroyos que drenan las zonas de cultivo intensivo. Mugni *et al.* (2011b) estudiaron un arroyo de primer orden que atravesaba un campo bajo prácticas de manejo convencional. Pulsos de toxicidad fueron registrados y relacionados con las aplicaciones de los pesticidas en los cultivos adyacentes. Se destacó la importancia de los eventos de escorrentía; los pulsos de toxicidad producidos por la escorrentía fueron más fuertes que la contaminación relacionada con la deriva, en consonancia con conclusiones de lo informado por Ronco *et al.* (2008) para la región. Algunas aplicaciones fueron seguidas por varios pulsos de toxicidad en relación con las lluvias posteriores. Por el contrario, no se observó toxicidad después de dos aplicaciones; estas aplicaciones se llevaron a cabo durante los períodos secos en el que el evento de lluvia siguiente ocurrió un mes después de la aplicación. Por tanto, parece que hay un período crítico para la toxicidad de escorrentía y que el mismo podría ser diferente para los distintos plaguicidas aplicados.

Los objetivos del presente capítulo son:

-Determinar concentraciones de plaguicidas asociados a la soja RR en distintos puntos de un arroyo típico de la región durante la temporada del cultivo.

-Determinar el período en el que la toxicidad de los insecticidas cipermetrina, clorpirifos y endosulfán es transferida desde el cultivo a la escorrentía en un cultivo experimental de soja RR.

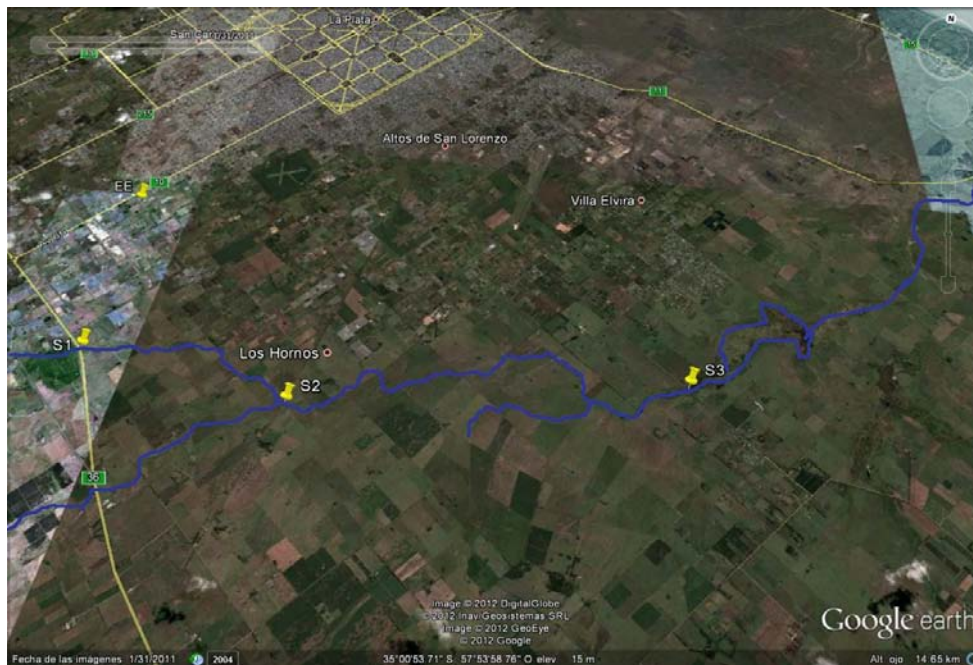
## ***Materiales y Métodos***

### ***Monitoreo de un tributario de la zona interior del Arroyo El Pescado***

El monitoreo de plaguicidas se realizó sobre distintos puntos de la cuenca del arroyo El Pescado en las campañas de siembra de soja comprendiendo las campañas 2007/2008, 2008/2009 y 2009/2010. El arroyo considerado es un arroyo típico de la región, atravesando dos regiones geomorfológicas diferenciadas: la zona interior y la planicie costera. Tiene un pendiente regional aproximada de 0,2%. Constituye uno de los cauces principales en la región noreste de la provincia de Buenos Aires y posee 10 cauces menores (EASNE, 1970), entre los que se encuentra el Arroyo El Sauce. La superficie total de su cuenca es de 356 km<sup>2</sup> y el valle de inundación alcanza en algunas partes los 500 m de ancho. La mayor parte de su recorrido se desarrolla sobre la llanura alta, donde el curso es alimentado por agua de lluvia y subterránea, bien definido en la zona interior. A mitad de recorrido forma una laguna y una zona de bañados muy extensa (334 Ha). Luego alcanza la planicie de tierras bajas e inundables de la margen costera (Camilión *et al.*, 2003), para desembocar finalmente en el Río de la Plata.

Los puntos de toma de muestras están en la región interior del arroyo, a saber: S1 (35° 01' 32'' S, 57° 59' 41'' O), S2 (35° 02' 01'' S, 57° 56' 39'' O) y S3 (35° 1' 21'' S 57° 51' 20'' O) los cuales se visualizan en la Figura III.1 y de manera detallada en la Figura III.2, III.3 y III.4, respectivamente. El orden de los sitios de muestreo va de Oeste a Este siguiendo el curso aguas abajo, con aumento del orden del arroyo. Se tomaron muestras en momentos del año previos, durante y posteriores a la temporada de soja en la región. El lugar S1 (Figura III.2) se encuentra sobre el arroyo El Sauce (35° 01' 32'' S, 57° 59' 41'' W), el cual es un arroyo de primer orden ubicado a 15 km de la ciudad de La Plata; el mismo atraviesa un campo privado de 110 ha que entre los meses de Noviembre a Marzo, y dedica sus lotes parcial o totalmente al cultivo de soja RR. Las dos primeras temporadas, 2007/8 y 2008/2009, fueron muy secas en la región, con déficit significativo de precipitaciones en relación a la serie de acumulados mensuales

históricos (Figura III.6), lo que llevo en la temporada 2007/08 a que sólo queden pequeñas charcas, algunas sin continuidad aparente, hasta no tener agua durante el período estival 2008/09. La temporada de 2009/2010 contó con precipitaciones similares o superiores al promedio histórico. En condiciones estacionarias el arroyo tiene un ancho de entre 2-3 m y un profundidad de 10-20 cm; presenta áreas de franja riparia, variando de uno a seis metros según el sector, teniendo el arroyo una descarga aproximada de 10 a 20 l/s. La cuenca con más de 1800 ha, mayoritariamente bajo cultivo, contiene suelos tipo Argiudol. Los mismos poseen un horizonte superficial A de 30 cm de profundidad con granulometría del tipo arcilla limosa (58-64% de arcilla y 26-34% de limo) con 4,5% de materia orgánica, seguido de un horizonte B, 80-100 cm de profundidad, con el 50-60% de arcilla (Mugni, 2009). El punto S2 (Figura III.3) está localizado 200 metros río abajo de la confluencia del arroyo El Sauce con El Pescado, cerca del puente de Poblet, a 4,5 km lineales de S1. El punto S3 (Figura III.4) está sobre El Pescado cercano al puente de Ignacio Correas a 8 km lineales de S2 . Los usos del suelo siguen un gradiente NO-SE en el área de estudio, desde un extremo agro-hortícola a ganadero; con un incremento de los últimos años del cultivo soja en el período estival como parte del avance de la frontera de este cultivo en la región.

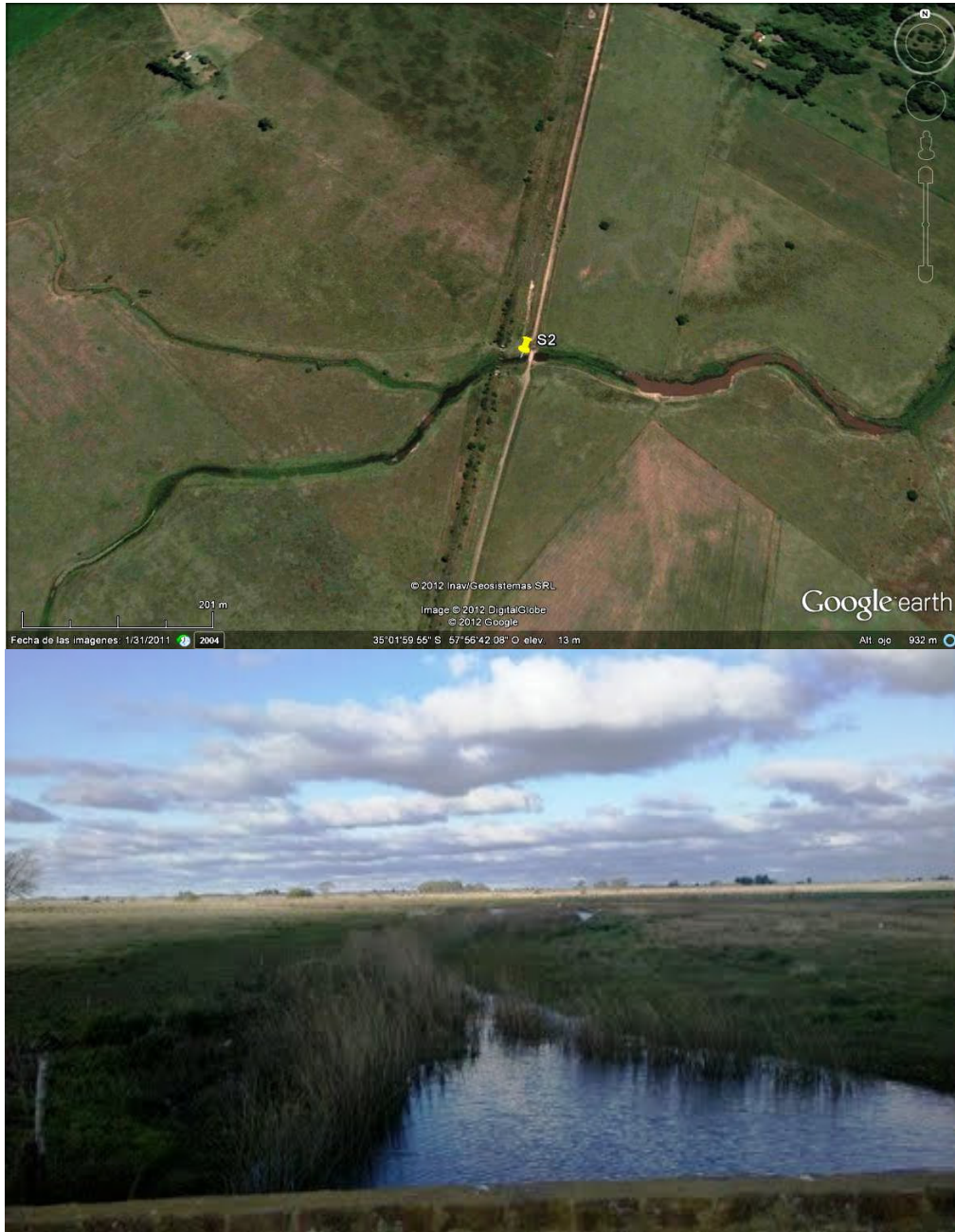


**Figura III.1.** Foto satelital de la zona de estudio con la ubicación de los sitios de muestreo (S1, S2 y S3) y de la Estación Experimental (EE) “Julio Hirschhorn” (Facultad de Agronomía, UNLP)

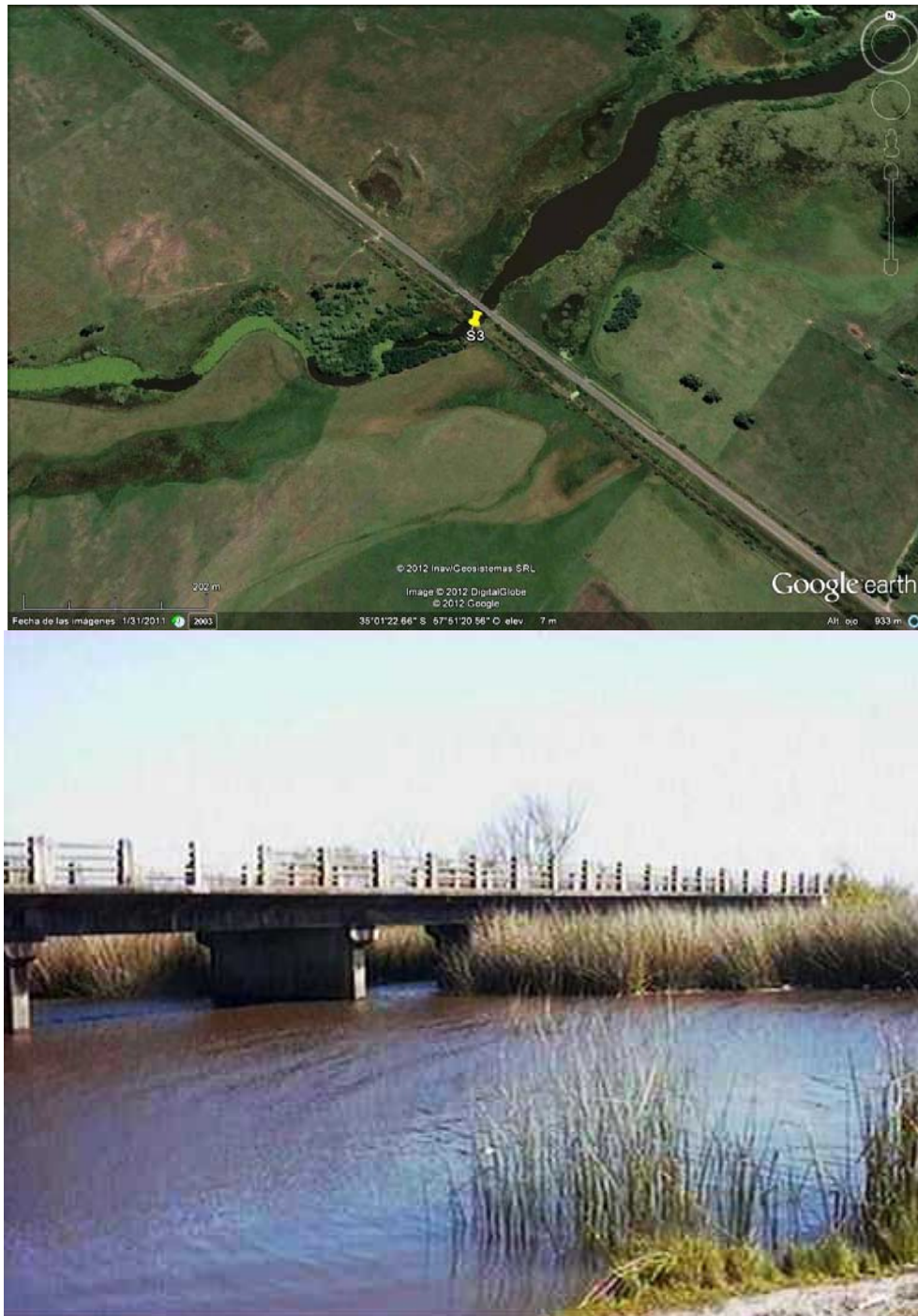




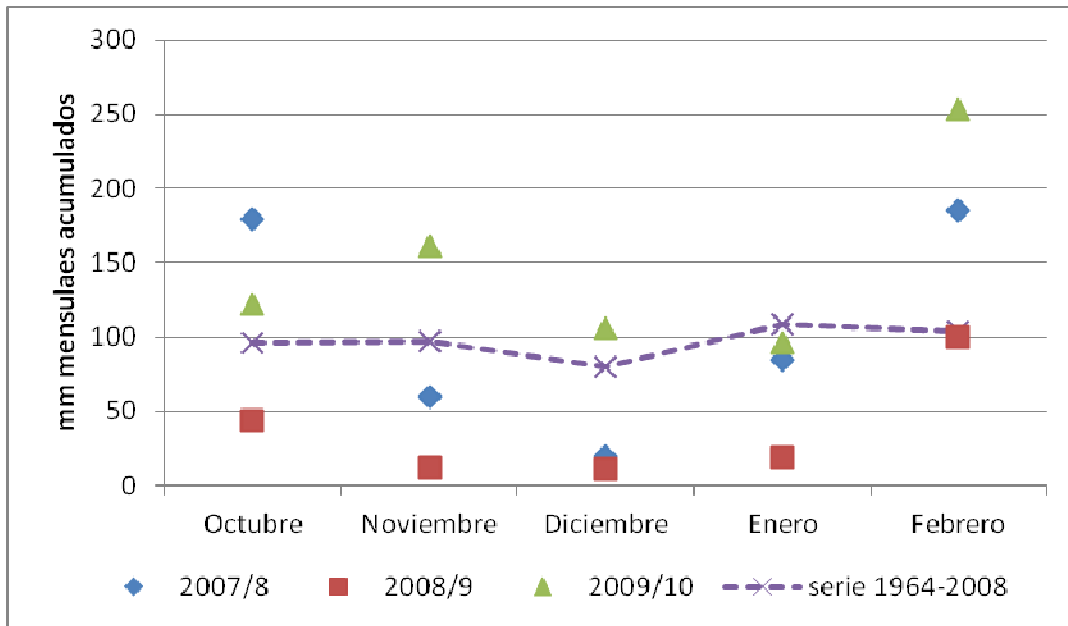
**Figura III.2.** Imagen satelital y fotografía de S1



**Figura III.3.** Imagen satelital y fotografía de S2



**Figura III.4.** Imagen satelital y fotografía de S3



**Figura III.5.** Milímetros mensuales de precipitaciones acumulada para las tres campañas de soja consideradas respecto al promedio de la serie 1964-2008 (Datos: Estación Experimental “Julio Hirschhorn” (Facultad de Agronomía, UNLP).

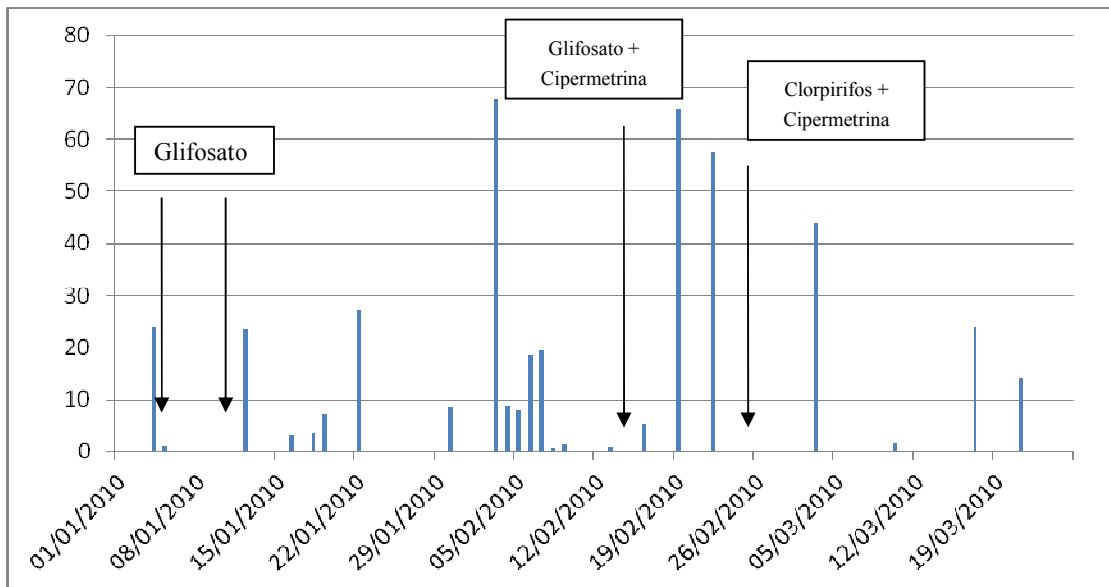
### *Toma de muestras*

Se tomaron las muestras de agua superficial en botellas de vidrio ámbar de 1 litro. Las muestras de sedimento fueron extraídas mediante un corer considerando sólo los 15 cm superiores y posteriormente se ubicaron en recipientes de vidrio. Todas las muestras fueron transportadas refrigeradas y en oscuridad hasta el laboratorio y almacenadas a -20 °C para su posterior análisis. Se realizaron muestreos anteriores al calendario de aplicación en la zona (preaplicación) y posteriores al mismo (postaplicación), para monitorear la presencia de plaguicidas durante las tres temporadas en S1, S2 y S3. En todos los casos se tomaron tres muestras de agua, en el caso de no estar seco el cauce (situación común en S1 en la primera y segunda temporada) y tres de sedimentos. En la temporada 2007/2008, los días de muestreo fueron 6/10/07 (luego de una lluvia de 48,6 mm), 28/02/08 (luego de una lluvia de 117,8 mm) y 21/03/08 (posterior a 40,4 mm); llamados a partir de ahora T07/08\_t1; T07/08\_t2 y T07/08\_t3, respectivamente. En la temporada 2008/2009, los días de muestreo fueron 21/10/08 (posteriormente a lluvias de 26 mm); 11/02/09 (posterior a 46,9 mm de lluvia) y 11/03/09 (posterior a un lluvia de 20,8 mm); llamados a partir de ahora T08/09\_t1, T08/09\_t2 y T08/09\_t3, respectivamente. En la temporada 2009/2010, las fechas de muestreo fueron 2/11/09

(posterior a una lluvia de 13,8 mm), 03/03/10 (posterior a 44 mm de lluvias) y el 16/04/10 (posterior a un evento de 3 días de lluvia de 96,2 mm totales), siendo llamados a partir de ahora T09/10\_t1, T09/10\_t2 y T09/10\_t3; respectivamente. En esa temporada en S1, se aumentó el esfuerzo de muestreo monitoreando un cultivo de soja de segunda, sembrado el 3/01/10; realizando muestreos durante las aplicaciones de los plaguicidas y en los eventos de eventos de lluvia posteriores a los mismos (ver Tabla III.1 y Figura III.6). La temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto se midieron *in situ* durante los muestreos.

**Tabla III.1.** Fecha de siembra y de los eventos de aplicaciones en S1 en 2009/2010

Fecha	Evento
03/01/2010	Siembra
06/01/2010	Aplicación 2 l/ha glifosato (tractor)
13/01/2010	Aplicación 1,5 l/ha glifosato (tractor)
15/02/2010	Aplicación cipermetrina 150 ml/ha y glifosato 2 l/ha (aérea)
26/02/2010	Aplicación cipermetrina 100 ml/ha y clorpirifos 1 l/ha (aérea)



**Figura III.6.** Precipitaciones (mm) y eventos de aplicación durante el muestreo de S1 de la campaña 2009/10

## ***Determinación de plaguicidas***

### ***Herbicida***

El método fue adaptado a partir de Peruzzo *et al.* (2008). Posterior al filtrado de las muestras de agua se realizó la derivatización con FMOC-Cl (cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato). Se tomaron 0,5 ml de la muestra, agregando 0,25 ml de solución de buffer borato (0,025 M) y 0,5 ml de reactivo FMOC-Cl, se agitó y dejó reposar por 30 minutos, luego de esto se agregó 2 ml de acetato de etilo. La determinación analítica de glifosato y AMPA se realizó por cromatografía líquida (HPLC Agilent Technologies 1100) con detección UV (262 nm), con columna Phenomenex (Nucleosil 4 NH<sub>2</sub>), 250 x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil fue acetonitrilo: buffer fosfato 0,05 M (50:50) a pH=6, con velocidad de flujo de 1,3 ml/min y 25°C de temperatura de columna. El límite de detección fue 0,25 mg/L. Se utilizaron reactivos grado HPLC y estándar de glifosato y AMPA grado analítico (Sigma-Aldrich). La recuperación de la técnica fue evaluada mediante sobreagregado.

### ***Insecticidas***

Las muestras de agua tuvieron un pretratamiento mediante extracción líquido-líquido con cloruro de metileno con tres contactos (muestra de agua saturada en NaCl a pH <4); seguido de roto-evaporación (vacío: 600 mm Hg, temperatura del baño de 40°C), llevados a sequedad con flujo de nitrógeno y cambio de solvente a n-hexano (USEPA 1986, Método 3500). Las muestras de sedimento siguieron una extracción sólido-líquido con cloruro de metileno mediante sonicación (50 g: 50 ml de cloruro de metileno, 1 h de agitación, seguido de dos contactos con 25 ml del mismo disolvente), filtración y rotoevaporación (vacío: 600 mm Hg, temperatura del baño de 40°C), llevándose a sequedad con un flujo de nitrógeno y resuspendido en n-hexano (USEPA, 1986 Método 3550). Posteriormente se realizó un procedimiento de clean-up con 10 g de Florisil (60-100 Mesh, activado a 675 ° C) mediante la elución secuencial de 100 ml de n-hexano: éter etílico en relaciones v/v de 94:6, 85:15 y 50:50, respectivamente (Método 3620, USEPA 1986), en muestras ambientales que lo requirieran. Las fracciones se reconstituyeron con n-hexano con un volumen final de 1 ml para el análisis

cromatográfico. La determinación analítica de cipermetrina, clorpirifos y endosulfan se realizó por cromatografía gaseosa con detección de captura electrónica (Carlo Erba, serie 6000), con columna HP-5, 15m x 0,53 mm DI, nitrógeno como gas transportador, detector a 320 °C y rampa de temperatura en el intervalo de 190-250 °C, según Marino & Ronco (2005). La recuperación de las técnicas se verificó por medio del sobreagregado del analito en todas las matrices ambientales (Marino & Ronco, 2005). La cuantificación se realizó con patrones de alta pureza provistos por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Los solventes utilizados fueron todos de calidad para análisis de pesticidas. Los límites de detección en agua fueron de 0,025 µg/l para cipermetrina y 0,01 µg/l para endosulfan ( $\alpha$  y  $\beta$  considerados en conjunto) y clorpirifos. El límite de detección para sedimentos fue 1 µg/kg peso seco para endosulfan, clorpirifos y cipermetrina.

### ***Monitoreo en un cultivo experimental de soja***

#### ***Sitio de estudio***

Se utilizó un predio perteneciente a la Estación Experimental (EE, Figura III.1) de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de La Plata, ubicada a 8 km al suroeste de La Plata, Buenos Aires (35 °57' S, ° 59' 01 W).

El campo de experimentación de 80 × 45 m se dividió en diez parcelas más pequeñas de 8 × 30 m para el cultivo experimental (Figura III.7). Se instaló un sistema de riego, que constaba de un tubo perimetral de 3 cm de diámetro, alrededor de cada par de parcelas, con 15 cabezas de aspersores montados a una distancia de 15 m uno del otro (Figura III.8). Cada aspersor de impacto era modelo Senninger 7025 de 9,5 mm de diámetro, proporcionando una lluvia simulada de 16 mm/h, con gotas de 0.7-1 mm de diámetro. Todo el sistema era suministrado con agua de pozo (65 m de profundidad) impulsado por una bomba de 60.000 l/h. La pendiente del terreno era del 1%. En el extremo inferior de cada parcela se realizó una pequeña zanja en el suelo y un recipiente de plástico de 5 litros era ubicado en el mismo con fin de captar el agua de escorrentía.

El suelo era tipo Argiudol caracterizado por un horizonte superficial A, arcillo-limoso (52-64% de limo y 26-34% de arcilla) con 4,5% de materia orgánica, de aproximadamente 30 cm de profundidad; seguido de un horizonte B, con el 50-60% de

arcilla y 80 a 100 cm de profundidad (Mugni, 2009). Una muestra compuesta de 10 núcleos de mezcla superficial tomadas en las parcelas experimentales tenían una composición granulométrica de 54% de limo, 26% arcilla y 20% de arena, con un contenido de materia orgánica de 4,3% y un pH de 7,8.

### ***Diseño experimental***

Dos cultivos de soja sucesivos fueron estudiados durante los períodos de crecimiento de la campaña 2008/2009 y 2009/2010. La preparación del suelo para la cama de siembra se llevó a cabo con la labranza convencional, dos gradas de discos y una rastra de dientes pico fueron pasados antes del arado de vertedera. En el período de crecimiento 2008/2009, la soja se sembró el 28 de noviembre 2008 con 45 semillas/m<sup>2</sup>, con surcos de 35 cm entre ellas. Poco después de la emergencia, el 17 de diciembre de 2008, la aplicación temprana de plaguicidas se llevó a cabo sobre el suelo casi desnudo (Figura III.9). La aplicación tardía fue cercana a la cosecha, el 7 de abril de 2009, poco antes de que la soja perdiera sus hojas. En el período de crecimiento 2009/2010, la soja se sembró el 8 de noviembre de 2009, utilizando el mismo método que el año anterior. Dos aplicaciones de cipermetrina, clorpirifos y endosulfán se hicieron al principio y al final del período de crecimiento 2008/2009, denominado en lo sucesivo las aplicaciones tempranas y tardías. Una aplicación de clorpirifos sólo se realizó en el período de crecimiento 2009/2010, cuando el cultivo alcanzó cobertura del suelo, denominada en lo sucesivo la aplicación de mitad de temporada. En la aplicación temprana 3 parcelas fueron utilizados como controles, otras 3 parcelas recibieron una dosis de cipermetrina y endosulfán y una sola parcela recibió una dosis de clorpirifos. Para la aplicación tardía, 3 parcelas se utilizaron como controles y 2 parcelas se utilizaron para cada plaguicida (cipermetrina, clorpirifos y endosulfán). En la aplicación de mitad de temporada, 2 controles y 3 parcelas con clorpirifos fueron utilizados. Dos controles fueron colocados siempre en los extremos opuestos del campo. La posición de los otros tratamientos fue asignada al azar. Sin embargo, si la selección al azar daba lugar a dos repeticiones de un tratamiento que se colocaran juntos, era rechazada. Se repitió el procedimiento con el fin de asegurar que las unidades experimentales se intercalaran de forma adecuada. Este enfoque fue seleccionado para eliminar el sesgo en el análisis de la varianza para el diseño de estudios de campo que tienen un pequeño número de repeticiones (Farmer *et al.*, 1995). Una aplicación de clorpirifos a mitad de temporada se llevó a cabo el 28 de



diciembre de 2009, cuando la soja tenía cobertura del suelo. Los plaguicidas fueron aplicados mediante tractor acoplado con pulverizador a las dosis recomendadas por los fabricantes, 300 ml/ha de Glextrin (cipermetrina 25 g por ml), 3000 ml/ha de Master (35 g de endosulfán por ml) y 2000 ml/ha de Terfos (48 g clorpirifos por ml).



**Figura III.7.** Foto satelital del campo utilizado en la Estación Experimental “Julio Hirschhorn” (P.E.: Parcela experimental; T.M.: lugar de toma de muestra del agua de escorrentía; EE: referencia Figura III.1)



**Figura III.8.** Campo utilizado en la Estación Experimental “Julio Hirschhorn” EE con el sistema de riego en funcionamiento (T.P: tubo perimetral; A: Apersores).



**Figura III.9.** Campo utilizado en la Estación Experimental “Julio Hirschhorn” con y sin cobertura de la soja. Con el suelo desnudo y sin las cabezas de aspersión instaladas (izquierda). Con cobertura de la soja y las cabezas de aspersión instaladas (derecha).

### ***Bioensayos de toxicidad***

El primer episodio de lluvia simulada se produjo inmediatamente después de la aplicación de plaguicidas y se repitió sucesivamente hasta que la toxicidad hubiera cesado. Cada evento de lluvia simulada se prolongó hasta alcanzar la escorrentía superficial, recogiendo este escurrimiento en recipientes enterrados al ras del suelo. Los recipientes fueron transportados inmediatamente al laboratorio dentro de cajas con baja temperatura y sin la entrada de luz. Las pruebas de toxicidad con *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* fueron llevadas a cabo mediante los protocolos detallados en el capítulo (véase *Materiales y Métodos* del Capítulo II), considerando el agua de escorrentía y cinco diluciones sucesivas con un factor de 0,5 (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3,12%) para cada plaguicida y cada organismo de ensayo.

### ***Análisis físico y químico***

Las condiciones climáticas (radiación solar, humedad y temperatura) se registraron con una estación meteorológica automática (Davis Instruments, modelo Groweather Industrial), situado a unos 300 metros de las parcelas experimentales. La temperatura y humedad del suelo se midieron con sensores Decagon ETC y Echo20/ec5, respectivamente, a 10 cm de profundidad en el suelo y registrando con un dispositivo data logger Decagon Em5b cada 60 minutos. La temperatura, conductividad (Hanna 8733) y pH (Orion 250 A) se midieron *in situ* tanto en el agua de riego como en el agua de escorrentía durante todo el experimento.

Las muestras de agua de escorrentía se pasaron a través de columnas C18 (Agilent, extracción en fase sólida) y fueron congeladas hasta el análisis de plaguicidas. Los extractos se eluyeron de la columna de C<sub>18</sub> con 5 ml de hexano seguido de 5 ml de diclorometano. Posteriormente fueron analizadas por GC-ECD según la metodología de insecticidas del monitoreo de campo previamente detallada.

### ***Análisis estadístico***

Se calculó la LC<sub>50</sub> o EC<sub>50</sub> expresada como porcentaje de la dilución y sus intervalos de confianza a 95%, según correspondiera, mediante el método Probit. Si el mismo no podía realizarse se calculaba mediante TSK (Trimmed Spearman Karber). Se estimó la vida media de cada plaguicida en los sucesivos eventos de escorrentía. Las concentraciones en diferentes momentos se ajustaron a una función exponencial mediante una estimación no lineal. Las diferencias entre la vida media de los plaguicidas ensayados fueron evaluados comparando las pendientes de las transformaciones logarítmicas lineales ajustadas mediante una prueba de *t*.

### ***Resultados***

#### ***Monitoreo de un tributario y de la zona interior del Arroyo El Pescado***

La Tabla III.2 muestra las mediciones de parámetros de calidad en el Arroyo El Sauce en los sitios S1, S2 y S3. Durante las campañas 2007/2008 se analizaron 27 muestras de sedimentos y 24 de agua, en todos los casos se obtuvieron valores por debajo del límite de detección, a excepción de tres muestras de sedimentos que presentaban 3,18; 4,97 y 5,23 µg/kg de endosulfán en S1 y dos muestras con 4,87 y 3,24 µg/kg también con endosulfán en S2 para el último muestreo (T07/08\_t3) en ambos casos. En la campaña 2008/2009, se analizaron 27 muestras de sedimentos y 18 de agua, obteniendo valores detectables en cuatro de las muestras de sedimentos; clorpirifos (7,8 µg/kg) y endosulfan (5,27 y 8,21 µg/kg) en el sitio S1 y endosulfan (3,25 µg/kg) para el sitio S2 en el tercer muestreo de la campaña correspondiente a T08/09\_t3.

**Tabla 2.** Valores promedios y desvíos estándar de los parámetros medidos *in situ* en el arroyo en los sitios S1, S2 y S3 durante las temporadas de muestreo

	S1(n=12)	S2 (n=9)	S3(n=9)
pH	7,8 ± 0,5	7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,5
Oxígeno disuelto (mg/l)	12,0 ± 3,6	12,2 ± 3,5	12,6 ± 2,9
Conductividad (μS/cm)	505 ± 75	443 ± 121	444 ± 173
Temperatura (°C)	24 ± 6	23 ± 4	23 ± 3

La Tabla III.3 muestra las concentraciones obtenidas para el seguimiento intensivo del cultivo de la temporada 2009/10 en el sitio S1, a partir de la siembra de la soja el 3/01/2010. Durante esta temporada además de los tres insecticidas monitoreados en la campaña anterior se incluyó el monitoreo del herbicida glifosato en agua. En esa misma temporada en S2 se encontró endosulfán (9,24 μg/kg) y clorpirifos (4,15 μg/kg) en dos muestras de sedimento; en S3 tanto en agua como en sedimento no se encontraron ninguno de los plaguicidas monitoreados.

En ninguna de las tres campañas se encontraron plaguicidas en el sitio S3, en S2 se encontraron sólo en menos del 5 % de las muestras y en S1 al menos 30 % de las muestras detectan a alguno de los plaguicidas. La primera y segunda temporada monitoreada no presentaron muestras donde se hubieran detectado insecticidas en el agua, si en el caso de los sedimentos donde más del 11 % presentaron insecticidas; siendo siempre endosulfan y encontrándose sólo en el último muestreo de la campaña (T07/08\_t3). En el caso de la segunda campaña 15 % de las muestras presentaron insecticidas en sedimentos, siendo endosulfán en todos los casos a excepción de una de las muestras que contenía clorpirifos (T08/09\_t3). En la tercera campaña se detectaron los tres insecticidas y el herbicida glifosato en distintos momentos dependiendo el evento asociado, aunque el esfuerzo de muestreo fue mayor constando de 8 muestreos posteriores a la siembra del 3 de Enero del 2010. Las dos primeras aplicaciones posteriores a la siembra fueron de glifosato mediante tractor (6 y 13 de Enero), y en ninguno de los casos se detectó el herbicida en el agua del arroyo. Las dos aplicaciones posteriores fueron aéreas, la primera fue de una mezcla de glifosato y cipermetrina, siendo la cipermetrina detectada en el día de la aplicación. Tres días después llovieron 65,6 mm y en el muestreo posterior se detectó cipermetrina en agua y sedimentos; no así glifosato. Este patrón se repitió, en el muestreo de la lluvia posterior (54,4 mm) encontrándose sólo cipermetrina en el arroyo. El último evento de aplicación fue la

**Tabla III.3.** Concentraciones de plaguicidas en S1 durante la temporada de muestreo 2009/10 y evento asociado anterior a la muestreo, (unidades:  $\mu\text{g/l}$  en agua  $\mu\text{g/kg}$  en sedimentos; n.d.: no detectable; -: no analizada)

Fecha (evento asociado)		Cipermetrina		Clorpirifos		Endosulfán		Glifosato
		Sedimentos	Agua	Sedimentos	Agua	Sedimentos	Agua	Agua
A 06/01/2010 glifosato tractor	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,72	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,46	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B 13/01/2010 glifosato tractor	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,27	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
C 16/02/2010 cipermetrina + glifosato aérea	1	2,51	0,85	n.d.	n.d.	3,26	n.d.	756
	2	4,63	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	678
	3	3,72	0,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D 19/02/2010 lluvia 65,6 mm	1	2,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	1,59	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E 22/02/2010 lluvia 57,4 mm	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F 26/02/2010 cipermetrina + clorpirifos aérea	1	n.d.	1,24	12,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	5,26	0,81	8,81	0,95	n.d.	n.d.	n.d.
	3	4,27	n.d.	15,73	1,74	n.d.	n.d.	n.d.
G 03/03/2010 lluvia 44 mm	1	n.d.	n.d.	4,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
H 17/03/2010 lluvia 24,2 mm	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-

mezcla de cipermetrina y clorpirifos, también aérea. Ambos insecticidas se detectaron en agua y sedimentos el día de la aplicación, posteriormente 8 días después, hubo un evento de lluvia (44 mm), luego del cual se detectó solo clorpirifos en sedimento. El último muestreo fue 23 días pasada la aplicación, posterior a una lluvia de 24,2 mm y no fue detectable ninguno de los insecticidas ni el herbicida.

#### ***Monitoreo en un cultivo experimental de soja***

Los valores medios de radiación solar durante el mes siguiente a cada aplicación fueron similares tanto en las aplicaciones temprana y de mitad de temporada, siendo ambas

más altas que en la aplicación tardía (Tabla III.4). La temperatura media del suelo fue similar en la primera aplicación y la de mitad de temporada, siendo ambas mayores que la de aplicación tardía. El agua de riego tenía un pH alcalino (pH: 8,0-8,8) y su conductividad osciló de 578 hasta 780  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

**Tabla III.4.** Valores medios de irradiancia y temperatura del suelo durante el mes siguiente a cada aplicación (datos registrados cada 1 hora)

Aplicación	Fecha Aplicación	Irradiancia ( $\text{Wat}/\text{m}^2$ )	Temp suelo ( $^{\circ}\text{C}$ )
Temprana	17 Dic 2008	6033	24,5
Media estación	28 Dic 2009	5926	22,1
Tardía	7 Abril 2009	3570	14,4

La concentración de cada plaguicida en la primera escorrentía después de la primera aplicación, tiene el mismo orden que las dosis aplicadas: endosulfán > clorpirifos > cipermetrina (Tabla III.5). Las concentraciones de plaguicidas en los siguientes eventos de escorrentía disminuyeron desde el tiempo de la aplicación. Las concentraciones a lo largo de los sucesivos eventos se ajustaron a funciones exponenciales de decaimiento en función del tiempo desde el momento de la aplicación ( $r = 0,99, 0,96$  y  $0,97$  para la cipermetrina, endosulfán y clorpirifos, respectivamente). La comparación de a pares de las pendientes de la linealización logarítmica de cada función, mostraron diferencias significativas (cipermetrina y endosulfán,  $p < 0,025$ , cipermetrina y clorpirifos,  $p < 0,012$ , endosulfán y clorpirifos  $p < 0,033$ , prueba  $t$ ). Se correlacionaron las vidas medias estimadas con los valores de  $K_{ow}$ , ajustando una función exponencial ( $r = 0,98$ ). La vida media estimada sigue el mismo orden que el  $K_{ow}$  de los plaguicidas, es decir, cipermetrina > endosulfán > clorpirifos (Tabla III.5).

**Tabla III.5.** Concentración de plaguicidas ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) en el agua de escorrentía desde la primera aplicación.

Evento de escorrentía	Días post-aplicación	Cipermetrina ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Endosulfan ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Clorpirifos ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )
17 Dic. 2008	0	0,10 ( $\pm 0,01$ )	0,66 ( $\pm 0,34$ )	0,35
23 Dic. 2008	6	0,09 ( $\pm 0,04$ )	0,62 ( $\pm 0,24$ )	0,12
30 Dic. 2008	13	0,08 ( $\pm 0,02$ )	0,41 ( $\pm 0,13$ )	0,09
05 Ene. 2009	19	0,04 ( $\pm 0,03$ )	0,35 ( $\pm 0,07$ )	0,06

Los eventos de escorrentía después de la aplicación temprana (Tabla III.6) causaron mortalidad en *Daphnia magna* hasta el segundo evento en el caso de la cipermetrina, el tercero en el caso del endosulfán y el cuarto en el caso del clorpirifos; correspondiendo 5, 12 y 19 días post-aplicación, respectivamente. Las LC<sub>50</sub> como porcentaje del agua de la escorrentía muestran al clorpirifos como el plaguicida con la mayor toxicidad en todos los casos, nunca superando el valor de 10% para los efectos letales sobre *D. magna*. Se puede establecer significativamente ( $\alpha=0,05$ ) que el clorpirifos es más tóxico que los otros dos insecticidas, tanto al día 0 y 5 postaplicación. El orden de persistencia de la toxicidad observado es clorpirifos (19 d) > endosulfán (12 d) > cipermetrina (5 d) en el primer evento de escorrentía.

Los efectos subletales sobre *Hydra attenuata* (Tabla III.6) se presentaron hasta el segundo evento de escorrentía para endosulfán y cipermetrina, observándose hasta el tercero en el caso del clorpirifos. En el primer evento de escorrentía se puede establecer un orden de toxicidad clorpirifos > endosulfán > cipermetrina ( $\alpha=0,05$ ). La persistencia de la toxicidad para *Hydra attenuata* es mayor para el caso del clorpirifos (12 d) que los otros dos insecticidas (5 d).

**Tabla III.6.** LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> expresado como % de dilución del agua de escorrentía y sus intervalos de confianza para los eventos de escorrentía de la aplicación temprana (-: sin efecto/mortalidad, n.c.: intervalos de confianza no calculables)

		Día postaplicación				
<i>Daphnia magna</i>		0	5	12	19	28
Endosulfan	LC <sub>50</sub>	21,76 (17,64 - 26,86)	40,97 (31,6 - 56,00)	75,09 (56,5 - 119,00)	-	-
Cipermetrina	LC <sub>50</sub>	16,00 (12,56 - 22,69)	22,71 (15,74 - 32,76)	-	-	-
Clorpirifos	LC <sub>50</sub>	0,24 (0,17 - 0,35)	5,74 (4,93 - 6,66)	8,84 (n.c.)	8,89 (7,46 - 10,60)	-
<i>Hydra attenuata</i>						
Endosulfan	EC <sub>50</sub>	16,14 (11,18 - 23,26)	84,09 (n.c.)	-	-	-
Cipermetrina	EC <sub>50</sub>	56,12 (45,14 - 69,78)	73,84 (n.c.)	-	-	-
Clorpirifos	EC <sub>50</sub>	3,04 (0,29 - 4,62)	77,96 (47,70 - 271,77)	84,11 (n.c.)	-	-

La aplicación tardía (Tabla III.7), se realizó al final del período de crecimiento, cerca de la cosecha. Las plantas de soja perdieron sus hojas poco después de la aplicación, resultando en una capa de hojarasca que cubrió la superficie del suelo. *Daphnia magna* presentó mortalidad para los tres insecticidas hasta 72 días postaplicación, siendo significativamente ( $\alpha=0,05$ ) más tóxico el clorpirifos, que los otros dos insecticidas. Siguiendo el día de cese de la toxicidad, el orden de persistencia de la misma es clorpirifos (98 d) > endosulfán (84 d) > cipermetrina (72 d). *Hydra attenuata* mostró efectos subletales (Tabla III.4) hasta la tercera aplicación (12 d) para los tres insecticidas, mostrando mayor toxicidad el clorpirifos ( $\alpha=0,05$ ) que los otros dos insecticidas, que no mostraron diferencias al mismo nivel de significancia. Siguiendo el orden del cese de toxicidad se observa que clorpirifos (28 d) > endosulfan (19 d) > cipermetrina (12 d) para *H. attenuata*.

Durante la siguiente temporada (2009/10), el clorpirifos se aplicó cuando las plantas de soja habían crecido lo suficiente para proporcionar una cobertura total del suelo, el día 28 de diciembre. La concentración de clorpirifos fue alta en la primera escorrentía, siendo 3,6  $\mu\text{g/l}$  (día 0), disminuyendo a 0,5  $\mu\text{g/l}$  siete días después de la aplicación (día 7) y debajo del nivel de detección en la tercera escorrentía (día 14). Se ajustaron las concentraciones en función del tiempo a una función exponencial ( $r=0,99$ ), la vida media estimada fue de tres días. La pendiente de la transformación logarítmica no fue diferente de la observada en la aplicación temprana ( $p<0,14$  prueba de t). Para la escorrentía de clorpirifos de la segunda temporada (Tabla III.8), se observó letalidad sobre *D. magna* en todos los eventos de aplicación (hasta 23 d) siendo siempre menor a 15% de dilución a excepción del último día de aplicación, que si bien hubo letalidad observada su  $LC_{50}$  calculada sería mayor al 100 % y los efectos subletales sobre *H. attenuata* hasta el día 14 inclusive. En todos los eventos de escorrentía las  $LC_{50}$  para *D. magna* son menores que las  $EC_{50}$  para *H. attenuata* ( $\alpha=0,05$ ).



**Tabla III.7.** LC<sub>50</sub> o EC<sub>50</sub> expresada como % de dilución de la escorrentía y sus intervalos de confianza para los eventos de escorrentía de la aplicación tardía (-: sin efecto/mortalidad, n.c.: intervalos de confianza no calculables, LI y LS: límite inferior y superior)

		Día postaplicación										
<i>Daphnia magna</i>		0	5	12	19	28	42	56	72	84	98	140
Endosulfan	LC <sub>50</sub>	11,36	14,09	16,05	17,34	24,75	39,02	53,57	79,09	144,40		
	LI95%	9,48	11,50	13,12	13,23	19,80	30,38	41,17	63,56	94,39	-	-
	LS 95%	13,6	14,16	19,62	22,72	31,22	52,45	75,65	109,30	395,20		
Cipermetrina	LC <sub>50</sub>	5,43	11,96	11,12	18,79	21,92	31,79	34,36	84,47			
	LI95%	3,81	9,67	8,66	15,02	17,09	23,69	26,22	67,08	-	-	-
	LS 95%	7,07	14,69	14,03	23,52	28,41	45,11	47,24	121,44			
Clorpirifos	LC <sub>50</sub>	<3,12	1,55	1,84	3,12	3,76	7,42	9,13	18,73	38,14	86,27	
	LI95%	n.c.	0,13	0,51	1,70	2,77	2,44	5,87	10,61	28,95	59,94	
	LS 95%	n.c.	2,60	3,11	4,38	4,60	13,38	14,19	33,07	53,33	163,48	-
<i>Hydra attenuata</i>												
Endosulfan	EC <sub>50</sub>	12,06	22,47	26,17	28,60							
	LI95%	8,20	15,23	18,28	20,43	-	-	-	-	-	-	-
	LS 95%	17,59	33,45	37,66	40,08							
Cipermetrina	EC <sub>50</sub>	10,33	15,23	22,62								
	LI95%	7,02	11,16	14,55	-	-	-	-	-	-	-	-
	LS 95%	14,96	20,74	33,06								
Clorpirifos	EC <sub>50</sub>	3,34	4,65	9,00	19,49	33,81						
	LI95%	n.c.	2,53	6,16	13,73	23,04	-	-	-	-	-	-
	LS 95%	n.c.	6,71	12,93	27,68	51,39						

**Tabla III.8.** LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> expresado como % de dilución de la escorrentía y sus intervalos de confianza para los eventos de escorrentía de la aplicación temprana. (-: sin efecto/mortalidad, n.c.: intervalos de confianza no calculables)

		Día postaplicación			
		0	7	14	23
<b><i>Daphnia magna</i></b>					
Clorpirifos	LC <sub>50</sub>	< 3,12	6,79	13,89	>100
		(n.c.)	(5,59 - 13,89)	(11,98 - 16,09)	(n.c.)
<b><i>Hydra attenuata</i></b>					
Clorpirifos	EC <sub>50</sub>	6,17	30,02	78,33	-
		(4,42 - 8,52)	(20,38 - 45,44)	(55,98 - 146,00)	

## Discusión

### *Monitoreo de un tributario y de la zona interior del Arroyo El Pescado*

Existe información sobre el nivel de concentraciones de los plaguicidas en cursos de agua superficiales de la región, siendo publicados por Marino & Ronco (2005), Peruzzo *et al.* (2008), Ronco *et al.* (2008) y Di Marzio *et al.* (2010). A excepción de algunas concentraciones informadas en Ronco *et al.* (2010), el resto de los valores están asociados a la región núcleo de producción de soja, a más de 200 km al N-NO de la cuenca del arroyo El Pescado.

Marino & Ronco (2005) monitorearon las concentraciones de cipermetrina y clorpirifos a en un curso de agua de primer orden del sistema Pergamino-Arrecifes; siguiendo los eventos de aplicaciones y escorrentías posterior a precipitaciones, observando una asociación entre los eventos de aplicación y la detección de los insecticidas, en consistencia con lo observado en el presente trabajo. En el caso de la cipermetrina de 41 muestras se cuantificaron 12 para agua (media: 17,25 µg/l máx: 194 µg/l mín: 0,12 µg/l), con todos los valores menores a 3,5 µg/l a excepción del máximo, y 32 para sedimentos (media: 146,17 µg/l máx: 1075 µg/l mín: 1,3 µg/l). En el caso del clorpirifos de 26 muestras se cuantificaron 10 para agua (media: 4,05 µg/l máx: 10,8 µg/l mín: 0,4 µg/l) y 10 para sedimentos (media: 9,73 µg/l máx: 19,00 µg/l mín: 15,70 µg/l). Si bien el trabajo de Marino *et al.* (2005) tiene una tasa de detección mayor en agua y sedimentos, a excepción de la concentración de cipermetrina en sedimentos que es significativamente menor ( $\alpha=0,05$ ) a la encontrada por los autores, las concentraciones

de cipermetrina en agua y las concentraciones de clorpirifos en agua y sedimentos no difieren significativamente ( $\alpha=0,05$ ) de las informadas por su trabajo.

Peruzzo *et al.* (2008) monitorearon el glifosato también en la misma región que Marino *et al.* (2005) informando valores en agua entre 0,10 y 0,70 mg/l; los valores encontrados posterior a una aplicación aérea de glifosato en S1, se encuentran dentro de estos valores. Di Marzio *et al.* (2011) muestrearon distintos sitios de la zona núcleo de producción de la soja RR posteriormente a aplicaciones aéreas; siete del norte de la provincia de Buenos Aires, dos de la provincia de Santa Fe y cuatro de la provincia de Córdoba. Los autores determinaron endosulfán tanto en agua (media: 5,69  $\mu\text{g/l}$  máx: 20  $\mu\text{g/l}$  mín: 0,8  $\mu\text{g/l}$ ) como en sedimentos (media: 170,05  $\mu\text{g/l}$  máx: 553,33  $\mu\text{g/l}$  mín: 12  $\mu\text{g/l}$ ). Los valores informados de endosulfán en sedimentos son significativamente ( $\alpha=0,05$ ) mayores que los encontrados en el presente trabajo en la cuenca del Pescado. La cipermetrina y el clorpirifos no fueron detectables (Límite de detección: 5  $\mu\text{g/kg}$  clorpirifos y 10  $\mu\text{g/kg}$   $\alpha$ -cipermetrina). Cabe destacar que los citados autores, tomaron las muestras 24 h postaplicación y en nuestro caso la presencia de endosulfán no estaba asociada a una aplicación dentro del lote considerado.

Ronco *et al.* (2008) informaron para un arroyo tributario del Pescado concentraciones de cipermetrina dentro del intervalo de 0,3 y 94  $\mu\text{g/l}$  en el agua, y por debajo de 1  $\mu\text{g/kg}$  en los sedimentos. Las concentraciones de clorpirifos monitoreando post-aplicación, estuvieron entre 2,0 y 12,8  $\mu\text{g/kg}$  en los sedimentos y de no detectable a 0,15  $\mu\text{g/l}$  en el agua. Concentraciones mayores a 1,8 mg/l de glifosato son informados para eventos posteriores a aplicaciones. Los valores de cipermetrina y clorpirifos encontrados estuvieron dentro del intervalo informado por Ronco *et al.* (2008), a excepción de algunos valores determinados de cipermetrina en sedimentos y de clorpirifos en agua. Los valores determinados de glifosato en evento postaplicación aérea son menores que los informados por los citados autores. Igualmente son consistentes con otros resultados informados para otras regiones; como el de Giesy *et al.* (2000) que recopilan las concentraciones medidas de glifosato para distintos tipos de aguas superficiales posteriores a eventos de aplicaciones aéreas. Los autores informan un intervalo que abarca a todos ellos entre 0,01 y 1,7 mg/l; uno de los trabajos incluidos informa valores entre 0,035 y 1,237 mg/l para el caso de un arroyo.

Brodeur *et al.* (en prensa) informaron valores para cuerpos de agua de la región, principalmente pequeñas charcas, que se encuentran al margen o dentro de seis campos de soja distintos, durante la primavera y el verano de los años 2006 y 2007; todos los muestreos los realizan tres semanas después de las aplicaciones. Las concentraciones en agua de endosulfán, cipermetrina y glifosato estuvieron siempre debajo del límite de detección (endosulfán 0,01 µg/l, cipermetrina 0,5 µg/l y glifosato 50 µg/l) en todos los cuerpos de agua, a excepción de tres de ellos con niveles de 0,53, 0,3 y 0,39 µg/l de clorpirifos (Límite de detección: 0,01 µg/l).

Se tiene conocimiento de antecedentes en el mismo arroyo de mediciones de los insecticidas en agua y sedimentos para S1, no así aguas abajo (S2 y S3). Mugni *et al.* (2010) simularon aplicaciones de clorpirifos y cipermetrina en aplicaciones aéreas para evaluar la persistencia de la toxicidad para *Hyalella curvispina* aguas arriba en el mismo arroyo del presente estudio. Las concentraciones de plaguicidas en el agua fueron 0,55 µg/l de cipermetrina y 0,12 µg/l de clorpirifos media hora después de la aplicación. Las concentraciones de plaguicidas en los sedimentos del fondo fueron 4,30 µg/kg de cipermetrina y 2,51 µg/kg de clorpirifos 4 h después de la aplicación. Después de 24 h, 0,92 µg/kg de cipermetrina se midió en muestras de sedimentos, mientras que el clorpirifos disminuyó por debajo de los niveles de detección. Los días posteriores, los autores no detectaron insecticidas ni en agua ni sedimentos. Mugni *et al.* (2011b) informan mediciones sobre distintos puntos sobre el arroyo en estudio (verano del 2006), siguiendo aplicaciones de los tres insecticidas en la misma zona de cultivo considerada en el presente. Antes de iniciar las aplicaciones en el campo encontraron clorpirifos (17µg/l) y endosulfán (38 µg/l) aguas arriba y cuatro días después 0,014-0,044 µg/l en el agua el arroyo, indicando la entrada al arroyo de insecticidas no asociados a las aplicaciones del cultivo monitoreado. Los autores determinan 12 µg/kg de clorpirifos en sedimentos dos meses después de la aplicación de ese insecticida, por lo que se asume que fue transportado desde aguas arriba, en consistencia con los resultados de las mediciones previas de este insecticida en las aplicaciones en el lugar. De existir transporte desde aguas arriba, podría explicar lo encontrado en el muestreo A, B y C (véase Tabla III.3) de la campaña 2009/10, donde se determinó endosulfán en sedimentos aunque no se haya aplicado el mismo en el lote en esa temporada.

Por lo presentado, los datos son consistentes con los antecedentes de la región. Hay que tener en cuenta que los trabajos de monitoreo de Marino & Ronco (2005), Peruzzo *et al.* (2008) y Di Marzio *et al.* (2011) tienen su área de muestreo asociada a la zona núcleo del cultivo de la soja RR, siendo el área con mayor productividad por hectárea de todo el país. Esto conlleva una historia en el uso del suelo vinculado a los plaguicidas monitoreados mucho más extensa e intensiva; lo cual podría explicar las diferencias en la mayor tasa de detección de los mismos y los valores promedios más altos de cipermetrina y endosulfán encontrados en los sedimentos en relación a la cuenca del arroyo El Pescado. En Ronco *et al.* (2008), comunicaron un comportamiento diferente de la cipermetrina en un arroyo tributario del Pescado y uno tributario del Arrecifes, en el primero estaría más asociado a las partículas suspendidas y en el segundo a los sedimentos; el ser significativamente menor la concentración promedio de cipermetrina en los sedimentos de S1, es consistente con lo planteado por los autores.

Hay que considerar que las temporadas de cultivo 2007/08 y 2008/09 fueron muy secas, sobretodo la segunda y, dado que los cultivos ya no eran económicamente rentables algunos productores de la región redujeron algunas de las aplicaciones esperables con un manejo “típico”; la temporada 2009/10 en ese sentido está más cerca de esto. Teniendo en cuenta lo desarrollado y considerando los resultados positivos para al menos alguno de los plaguicidas en las tres campañas estudiadas observamos el orden  $S1 > S2 > S3$  en la tasa de detección, observando un gradiente Oeste-Este, coincidente con la disminución del uso del suelo para la actividad agro-hortícola en la zona considerada de la cuenca del Arroyo El Pescado.

### ***Monitoreo de un cultivo experimental de soja***

Las prácticas convencionales en el manejo del cultivo de soja determinan la ocurrencia de escorrentías a las que se asocian pulsos de toxicidad posteriores a la aplicación de plaguicidas. Tres condiciones diferentes se analizaron experimentalmente: una aplicación temprana sobre el suelo desnudo, una aplicación de mitad de temporada cuando la soja alcanza la cobertura del suelo, y una aplicación tardía, anterior a la cosecha. Las dos primeras aplicaciones son representativas de las condiciones que prevalecen en la mayoría del período de crecimiento y, esencialmente, proporcionan los mismos resultados: la toxicidad de la escorrentía para *Daphnia magna* cesó recién al día

28 para los tres insecticidas (aunque con diferencias entre ellos). Por el contrario, la persistencia de la toxicidad de la escorrenría se mantuvo más tiempo en la aplicación tardía (Figura III.4), cesando recién 140 días después de la aplicación (también con diferencia entre los tres insecticidas). En todos los casos la persistencia de la toxicidad fue clorpirifos > endosulfán > cipermetrina. *Hydra attenuata* siguió el mismo patrón de persistencia de toxicidad que *Daphnia magna* en las tres aplicaciones estudiadas, pero con una menor sensibilidad a los insecticidas. Esto era de esperarse por los resultados de laboratorio comentados en el capítulo de efectos y los resultados informados para *H. attenuata* por Demetrio *et al.* (2011). Los resultados son consistentes con los obtenidos por Mugni *et al.* (en prensa), realizados en paralelo en el mismo experimento. Los autores evalúan la toxicidad en suelo posterior a las tres aplicaciones, mediante *Hyallolella curvispina*, mostrando el mismo patrón de persistencia. En todos los casos la persistencia de la toxicidad fue mayor en suelos que en la escorrenría; las aplicaciones temprana y de media estación tuvieron el mismo comportamiento, con períodos más cortos de persistencia que la aplicación tardía (Tabla III.9).

**Tabla III.9.** Días postaplicación donde cesó la toxicidad en suelos para *Hyallolella curvispina* (Mugni *et al.*, en prensa)

Aplicación	cipermetrina	endosulfán	clorpirifos
Temprana	42	69	42
Tardía	119	>140	>140

Los resultados de este estudio son consistentes con las observaciones de campo realizadas por Mugni *et al.* (2011b). Los autores estudiaron un campo que era atravesado por el arroyo El Sauce (S1), teniendo condiciones ambientales similares a la Estación Experimental (EE) donde se desarrolló el presente trabajo. Mugni *et al.* (2011b) evaluaron cuatro aplicaciones. En dos ocasiones, la primera lluvia se produjo 4 y 10 días después de la fumigación, y las pruebas de toxicidad en ambos casos resultaron en 100% de mortalidad. En el primer caso, se había aplicado una mezcla de cipermetrina y clorpirifos, y en el segundo una mezcla de cipermetrina y endosulfán. En las otras dos aplicaciones las primeras lluvias fueron 30 y 33 días después y no se observó mortalidad en ninguna. Una mezcla de cipermetrina y endosulfán fue aplicada en el primer evento, y cipermetrina en conjunto con herbicidas, en el segundo. Tres de las cuatro aplicaciones estudiadas fueron equivalentes a la primera, o la de mitad de

temporada (Noviembre-Enero). Sólo una de ellas se produjo más tarde en el período de crecimiento (Marzo).

Las mezclas de plaguicidas sobre cultivos de soja se aplican normalmente de dos a tres veces por período de crecimiento. Se necesitan lluvias superiores a 20 mm aproximadamente para producir eventos de escorrentía en el área estudiada. En los últimos diez años, la frecuencia media de los eventos de lluvia superior a 20 mm fue de 1,3 por mes a través de noviembre y abril (inédito). Por lo tanto, los cuerpos de agua adyacentes a los cultivos son susceptibles de recibir varios impulsos de la toxicidad de escorrentía por temporada.

En este estudio la concentración de insecticidas en la primera escorrentía inmediatamente posterior a la aplicación fue determinada por la dosis de aplicación, mientras que la disipación en las siguientes escorrentías fue determinada por la hidrofobicidad de cada compuesto; la vida media de cada compuesto siguió el orden de su  $K_{ow}$ : cipermetrina > endosulfán > clorpirifos.

Kennedy *et al.* (2001) estudiaron el endosulfán en las plantaciones bajo riego de algodón en Australia. El endosulfán se aplicó varias veces (3-4) por temporada. El endosulfán se encontró en todas las muestras de agua de escorrentía en el campo a lo largo de toda la temporada de cultivo de algodón. Las muestras de escorrentía contenían 5-10  $\mu\text{g/l}$  después de cada aplicación, disminuyendo hasta alrededor de 2  $\mu\text{g/l}$  un mes después. Las cantidades de plaguicida removida del campo por riego o aguas de lluvia parece ser dependiente de la cantidad de residuos presentes en el suelo al inicio de un evento dado.

La persistencia de la toxicidad a lo largo del presente estudio mostró una amplia variabilidad en función de la época del año que se realizó la aplicación, resaltando la importancia de las condiciones ambientales en la persistencia observada. La media de la radiación solar fue entre 66-68% más alta y la media de la temperatura del suelo fue 8-10 grados mayor en los meses siguientes a la aplicación temprana y de la de mitad de temporada (verano), respecto al mes posterior de la aplicación tardía (otoño).

Múltiples estudios indican que las altas temperaturas y la radiación solar pueden aumentar la pérdida de los plaguicidas en el ambiente. Volatilización y fotodegradación, junto a la degradación química y microbiana representan las principales rutas de la

disipación de plaguicidas (Laabs *et al.*, 2000). Meikle *et al.* (1983) determinaron las tasas de disipación de clorpirifos por fotodescomposición y de volatilización, sobre una superficie inerte a 25 °C. Los valores de vida media informados fueron de 3,2 y 0,3 días, respectivamente. Los autores especularon que en las ocasiones que el clorpirifos muestra una menor eficiencia en el campo, la pérdida debida a la volatilización podría ser la causa principal. La vida media informada en la literatura es de un intervalo amplio. Racke *et al.* (1990) realizaron una revisión de vidas medias estimadas en suelo para el clorpirifos, observando una gran variación, informando desde menos de 10 a más de 120 días. El patrón de persistencia de la toxicidad evaluada para el clorpirifos y endosulfán en la primera aplicación y la de mitad de la temporada del presente estudio son consistentes con los TD<sub>50</sub> estimados en las determinaciones de campo en el Brasil tropical y más cortos que la mayoría de los valores informados para regiones templadas (Laabs *et al.*, 2000; Racke *et al.*, 1990).

Laabs *et al.* (2000) informaron que la disipación en el suelo del endosulfán y clorpirifos se describe mejor por modelos biexponenciales (cinética de segundo orden). La degradación más rápida de todos los plaguicidas estudiados en las regiones tropicales en comparación con los climas templados se atribuyó a la mayor volatilización, así como a la degradación química y microbiana resultante de las altas temperaturas de esos suelos (Laabs *et al.*, 2000). La rápida disipación de endosulfán en el suelo se informó también en la India subtropical, interpretándose como una consecuencia del aumento de las tasas de volatilización en respuesta a las altas temperaturas (Kathpal *et al.*, 1997). Kennedy *et al.* (2001) también informaron que las tasas de disipación del endosulfán en suelos australianos con cultivos de algodón eran mayores que la mayoría de los valores publicados para las regiones templadas. La disipación del endosulfán en suelo, estudiada por los autores, siguió una función biexponencial (cinética de segundo orden). En la primera fase, la vida media del endosulfán total fue de 7 días. La disipación inicial fue rápida y se supone que depende de la volatilización, fotólisis y pérdida física; seguida por una segunda fase más lenta en relación a una estabilidad en la degradación química y microbiana (Kennedy *et al.*, 2001).

El pH del suelo y el agua también influyen en las tasas de degradación. Se informó que el pH elevado aumentó la degradación de clorpirifos (Racke *et al.*, 1990), cipermetrina (Laskowski, 2002) y endosulfán (Kathpal *et al.*, 1997). La vidas medias del endosulfán



en el agua fueron 28, 5,7 y 0,7 días con un pH 5; 7 y 9, respectivamente (Kennedy *et al.*, 2001). En el presente estudio, el alto pH del agua de riego (8,0 a 8,8) favorece la rápida disminución de la toxicidad en el agua de escorrentía en la aplicación temprana y de mitad de temporada.

La toxicidad de los plaguicidas persistió más tiempo en la aplicación tardía. La menor radiación solar junto a las bajas temperaturas posteriores a esta aplicación tardía, contribuyeron a la persistencia, probablemente al disminuir las pérdidas por volatilización y/o fotólisis. En este caso la aplicación no se realizó directamente sobre el suelo, sino sobre la hojarasca y posteriormente, con el mantillo del cultivo de soja. Las hojas de soja cayeron poco después de la aplicación, resultando en una capa sobre la superficie del suelo. Parece probable que la fracción orgánica residual haya colaborado con el aumento observado en la persistencia de los insecticidas considerando su hidrofobicidad.

Vandervoort *et al.* (1997) detectaron residuos de clorpirifos hasta 128 días después de la aplicación en compostajes, similar a la persistencia de la toxicidad determinada en la escorrentía de la aplicación tardía del presente estudio (*D. magna* presenta mortalidad hasta 98 días, desapareciendo el efecto a los 140 días). Crossan & Kennedy (2008) estudiaron la descomposición de plaguicidas en el residuo de una desmotadora de algodón. Tanto los plaguicidas como el sustrato orgánico se descomponen en forma simultánea a diferentes velocidades, observando que las concentraciones de clorpirifos aumentaron con el tiempo por más de 250 días, siendo aun detectables luego de casi 400 días. Los autores informaron que un período de sequía retrasa las tasas de descomposición. Los valores resultantes de la vida media en este caso fueron entre 2 y 10 veces mayores que los valores en el suelo. Kennedy *et al.* (2001) informaron que la vida media del endosulfán en mantillo y en la hojarasca del algodón en varias parcelas de cultivos comerciales fue de 61 días, un orden de magnitud mayor que en los suelos (7 días). La evidencia existente sugiere que la elevada sorción de plaguicidas en el sustrato orgánico disminuyó la tasa de mineralización en la aplicación tardía del presente estudio. Maund *et al.* (2002) demostraron que la toxicidad del suelo disminuye a medida que el contenido de materia orgánica del suelo aumenta. En este estudio se resalta que la persistencia de la toxicidad también se incrementa cuando el contenido de materia orgánica aumenta.

En la aplicación de mitad de temporada, cuando la soja alcanza la cobertura del suelo, los plaguicidas aplicados se asentaron en el dosel de la soja. La escorrentía primero contenía una concentración alta de plaguicidas debido a la gran lixiviación; la persistencia de la toxicidad en el escurrimiento fue más corta cuando el aerosol de la aplicación fue interceptada por el cultivo que en las aplicaciones realizadas cerca de la cosecha.

Kennedy *et al.* (2001) encontraron que la disipación del endosulfán de las hojas era muy rápida, disminuyendo al 10% en un par de días. La mayor parte de la disipación, que asciende a 60 % a 21° C y a 90% a 31° C, fue debida a la volatilización. Una relación cinética de segundo orden fue observada, en la primera fase la vida media del endosulfán total fue de 1,6 días, una quinta parte de la observada en el suelo (7,1 d). Rudel (1997) determinó las tasas de volatilización de cinco plaguicidas desde la superficie de las plantas y desde el suelo. Para todos los compuestos estudiados, la volatilización desde las plantas (*Phaseolus vulgaris*) fue mayor en comparación con la de la superficie del suelo. La volatilización correspondiente a metil-paratión, endosulfan y fenpropimorf desde la plantas fueron 5 a 13 veces mayor que la volatilización desde el suelo. Juraske *et al.* (2008) examinaron las vidas medias reportadas de 41 plaguicidas, concluyendo que en el suelo la vida media es cuatro veces mayor que en la superficie de la planta. Battu *et al.* (2009) informaron la rápida disipación de cipermetrina de las hojas de algodón después de la aplicación. La cipermetrina en las hojas decayó entre el 50-52% en el primer día. El valor de la vida media en las hojas de algodón fue de 0,7 días. Los residuos de cipermetrina decayeron por debajo de niveles detectables en 21 días, similar a la disipación de toxicidad observados en la aplicación de mitad de temporada en el presente estudio. La evidencia existente sugiere que la persistencia de la toxicidad en la escorrentía es más breve si la aplicación es recibida por las hojas, debido a que la disipación de los plaguicidas es más rápida en el dosel del cultivo.

Las aplicaciones convencionales de plaguicidas en la soja causan pulsos de toxicidad en eventos de escorrentía después de la aplicación. La persistencia de la toxicidad varía considerablemente dependiendo de las condiciones ambientales existentes en el momento de la aplicación. Durante la mayor parte del período de crecimiento, la toxicidad para *Daphnia magna* duró casi un mes para los tres plaguicidas estudiados. Sin embargo, una aplicación tardía al final del período de crecimiento dio lugar a una

persistencia mucho mayor, sobrepasando los tres meses después de la aplicación. La toxicidad para *Hydra attenuata* siguió el mismo patrón pero con una sensibilidad notablemente menor. La alta radiación solar y las temperaturas que prevalecen en verano probablemente hayan contribuido a la rápida disipación de la toxicidad debido a la volatilización, aumento de fotodegradación y la degradación microbiana. El pH alto del agua puede a su vez haber contribuido al aumento de las pérdidas por aumentar la hidrólisis. La defoliación de la soja se produjo al final del período de crecimiento, antes de la cosecha, lo que resulta en la formación de una capa de hojarasca. Bajo esta condición, la toxicidad persiste más tiempo que en las aplicaciones anteriores. Esto puede haber sido el resultado de la absorción de pesticidas a los restos orgánicos recién formados, junto con las bajas temperaturas y la radiación solar imperante en el otoño.

La evidencia hasta el momento parece indicar que en los arroyos de pequeño orden de la región, tanto por su entrada en pulsos, asociada a las aplicaciones o los eventos de escorrentía posteriores al mismo, como por las condiciones ambientales que favorecen su rápida disipación, serían frecuentes escenarios de exposición agudos para la biota del arroyo asociados a los plaguicidas estudiados. El efecto total de las aplicaciones en el cultivo de soja para los cuerpos de agua adyacentes depende de la frecuencia de lluvia y las prácticas de gestión tales como la elección de los pesticidas, las dosis aplicadas y el tiempo de aplicación. El cuidado en las prácticas de gestión puede reducir el riesgo ambiental en gran medida.

Los resultados del monitoro en el arroyo, donde la detección en la columna de agua está asociada preponderantemente a un evento particular de entrada al mismo, sea la aplicación, deriva asociada o un evento de escorrentía, sugiere que la persistencia en la columna de agua no es alta para estos compuestos. Las condiciones ambientales del cuerpo de agua, favorecerían este comportamiento. El pH medio está cercano a 8, favoreciendo la hidrólisis de los plaguicidas. Los procesos de degradación química y microbiológica, se incrementan con el aumento de la temperatura del cuerpo de agua. Los bajos caudales, a veces interrumpidos totalmente, y la baja profundidad de los arroyos de primer orden, aumentan la probabilidad de altos picos de temperatura en el agua durante los días de primavera-verano, favoreciendo los procesos de degradación del plaguicida. A esto se suma que los picos en las densidades de microorganismos descomponedores en cuerpos de agua de la región son registrados al aumentar las

temperaturas (Rodríguez Capítulo *et al.*, 2010), favoreciendo los procesos de mineralización. La presencia de macrófitas (ie: Fam. Lemnaceae) en estos cuerpos de agua es común, demostrándose en laboratorio que su presencia disminuía la concentración de cipermetrina y la toxicidad del agua, sugiriendo una rápida adsorción de plaguicidas hidrofóbicos a las macrófitas (Mugni *et al.*, 2011a). Las macrófitas no sólo proporcionan superficies donde los compuestos hidrofóbicos se adsorben, sino también permite la acumulación de sedimentos, contribuyendo con sitios adicionales de unión para los compuestos insolubles. Todos estos procesos en conjunto podrían favorecer la rápida disipación de los plaguicidas de la columna de agua en el arroyo, consistente con la mayoría de las detecciones sólo en momentos de aplicación o posterior a eventos de lluvias, que como se informa para la región (Jerguentz *et al.*, 2004ab, 2005), pueden transportar los plaguicidas mediante la escorrentía generada.

**Capítulo IV:**  
**Evaluación de Riesgo**

## ***Introducción***

La Evaluación de Riesgo Ecológico (ERA) es un proceso que evalúa la probabilidad de que efectos ecológicos adversos puedan ocurrir como resultado de la exposición a uno o más agentes (USEPA, 1998). En todos los casos es necesario relacionar los escenarios de exposición y efectos considerados en la evaluación. Generalmente se realiza de manera escalonada, en distintos niveles. En cada nivel el grado de complejidad y los datos necesarios aumentan, con la tendencia de incrementar el realismo ecológico en la evaluación.

La caracterización de riesgo más sencilla se realiza en función de cocientes entre una medida puntal de cada uno de los escenarios: las Relaciones Toxicidad/Exposición (TER: *Toxicity/ Exposure Ratios*) y los Cocientes de Peligro (HQ: *Hazard Quotients*). Siguiendo el criterio “del peor caso o escenario”, se utiliza la concentración de efecto de la especie más sensible y la mayor concentración esperada en el ambiente. Su valor sirve como herramienta de aproximación al riesgo, aunque *sensu stricto* representa un peligro, dado que no se asocia con una probabilidad de ocurrencia. Su uso asume que las condiciones de exposición y efecto evaluadas, se dan en todo momento y en todo lugar (Solomon & Sibley, 2002).

Los métodos Probabilísticos para la Evaluación de Riesgo Ecológico (PERA) se han recomendado para niveles posteriores en el proceso de la ERA (ECOFRAM, 1999). Estos métodos utilizan Distribuciones de la Sensibilidad de Especies (DSE) de manera conjunta con la Distribución de las Concentraciones de Exposición (DCE) para describir el riesgo de efectos adversos. Las evaluaciones de riesgos ecológicos utilizan las distribuciones de las concentraciones de exposición y la distribución de la sensibilidad de especies para calcular una medida de riesgo ecológico (Suter II, 1999) y se conocen como Curvas de Probabilidad Conjunta.

La ventaja del PERA es que utiliza toda la información pertinente de los datos de toxicidad sobre distintas especies y, cuando se combina con distribuciones de la exposición, permite estimaciones cuantitativas de los riesgos (Solomon & Sibley, 2002). Una DSE es una distribución estadística que describe la variación de la toxicidad entre un conjunto de especies para un determinado compuesto o mezcla (van Straalen, 2002).

Dado que no sabemos la verdadera distribución de toxicidad, la DSE se estima a partir de una muestra y se visualiza como una función de distribución acumulativa de proporciones. El modelo de la DSE se ha utilizado tradicionalmente en la evaluación de los riesgos prospectivos para el cálculo de concentraciones peligrosas (HC: *Hazardous Concentrations*), concentración de la sustancia en el agua que afecta a una proporción (p) de las especies (HCp). El valor de corte de 5% de especies de la cola izquierda de la distribución (HC<sub>5</sub>), se ha utilizado tradicionalmente para obtener concentraciones ambientales seguras, bajo el supuesto de que los ecosistemas pueden tolerar un cierto grado de estrés químico (Posthuma *et al.*, 2002). El eje y es una medida de la fracción de especies en una comunidad en riesgo. Las unidades del eje y se han definido como la Potencial Fracción Afectada (PAF). Se utiliza a la PAF como una medida del riesgo ecológico, siendo la fracción de especies que se espera que (potencialmente) sea afectada por encima de su nivel de no-efecto a una concentración ambiental determinada (Aldenberg *et al.*, 2002). El ensamble taxonómico (vertebrados, invertebrados, organismos fotosintetizadores) utilizado para construir la DSE tiene una influencia significativa en la evaluación, no así la distribución geográficas de las especies utilizadas (Maltby *et al.*, 2005). El uso de las DSE se ha utilizado ampliamente para la evaluación de riesgos de plaguicidas (Campbell *et al.*, 2000; Giesy *et al.*, 1999; Giddings *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 1996, 2000, 2002).

En los niveles superiores del ERA se aumenta el nivel de realismo de la evaluación con experimentos de micro y/o mesocosmos para la evaluación de los efectos de plaguicidas. Brock *et al.* (2000a,b) realizaron una revisión de trabajos publicados sobre efectos de los herbicidas e insecticidas en experimentos de micro y mesocosmos, para poder establecer los valores de umbral ecológicos de plaguicidas en la superficie de aguas continentales. El modelo PERPEST (Predictive Ecological Risk of PESTicides) permite utilizar esa base de datos para predecir mediante Razonamiento-Basado-en-Casos (RBC) los efectos de una determinada concentración de plaguicida en un ecosistema acuático (van den Brink *et al.*, 2002).

Los objetivos del presente capítulo son:

-Calcular los Cocientes de Peligro (HQ) para los plaguicidas en estudio

-Estimar el riesgo asociado para invertebrados para cada plaguicida en un escenario “típico” postaplicación

-En el mismo escenario estimar el riesgo asociado para las mezclas binarias y la mezcla ternaria de los plaguicidas

-Calcular mediante el modelo PERSPET 3.0 las estimaciones de efecto en micro/mesocosmos y comparar los resultados obtenidos con la PERA

## ***Materiales y Métodos***

### ***Cociente de Peligro***

Se calcularon los cocientes de peligro (HQ), entre la máxima concentración de exposición aguda y el valor de referencia de toxicidad para el grupo de invertebrados; este último fue elegido como el menor valor de LC<sub>50</sub> informado para el grupo. Paralelamente también se calculó el HQ con la menor LC<sub>50</sub> publicada para una especie local y con el valor de la especie más sensible (*Daphnia. magna*) de las evaluadas en el presente trabajo.

### ***Evaluación de Riesgo***

El escenario de exposición considerado está dado por las concentraciones medidas en la región en momentos post-aplicación (Marino *et al.*, 2005; Peruzzo *et al.*, 2008; Mugni *et al.*, 2011b), además de las determinadas en el presente trabajo; todas ellas corresponden a cuerpos de agua asociados a cultivo (soja RR) en escenarios postaplicación o asociadas a escorrentías posteriores al mismo. Por lo concluido en capítulos precedentes, la persistencia de los plaguicidas en los cuerpos de agua de la región es baja. Por tal razón, se considera un escenario de exposición aguda que serían los asociadas a pulsos de entrada de los plaguicidas al cuerpo de agua, debido a la aplicación o escorrentías posteriores provocadas por precipitaciones. Se construyó una Distribución de Concentraciones de Exposición (DCE) de los plaguicidas con los valores informados (Tabla IV.1), considerándolo como un escenario de exposición “promedio/típico” para esos pulsos en el cuerpo de agua.



**Tabla IV.1.** Valores utilizados para la construcción de la DCE de cada plaguicida ( $\mu\text{g/l}$ )

<i>Plaguicida</i>	<i>n</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>1° Cuartil</i>	<i>Mediana</i>	<i>3° Cuartil</i>	<i>Media</i>
<b>cipermetrina</b>	20	0,12	17,00	0,49	0,73	1,06	1,79
<b>clorpirifos</b>	19	0,01	10,80	0,39	0,95	2,00	2,37
<b>glifosato</b>	29	70,0	660,0	150,0	240,0	390,0	288,8

El escenario de efecto es establecido mediante la Distribución de la Sensibilidad de Especies (DSE). Se siguieron los lineamientos de Aldenberg *et al.* (2002) para su construcción. Se utilizaron datos de las  $LC_{50}$  ( $\leq 96$  h) de laboratorio para especies de invertebrados de agua dulce obtenidos de la USEPA (2007) para cada plaguicida (véase Capítulo II). Cuando más de un valor de toxicidad se informó para la misma especie o valores diferentes se proporcionaron para un género que no tiene nombre específico de la especie, se calculó la media geométrica. Se consideraron los criterios de Maltby *et al.* (2005) y si existían registros de especies de invertebrados no artrópodos, sólo se incluyeron si su valor no difería en 2 órdenes de magnitud de la media de la distribución (USEPA, 2007).

La DSE puede ser definida como una función de distribución acumulativa de la toxicidad de un compuesto para un conjunto de especies que tienen una característica común, tal como un grupo taxonómico, hábitat o región geográfica (Posthuma *et al.*, 2002). En el presente estudio, los análisis de DSE para los invertebrados de agua dulce se llevaron a cabo de acuerdo con el método de Aldenberg & Jaworska (2000) y se realizaron mediante el software ETX 2.0 (van Vlaardingen *et al.*, 2004). La DCE la definimos como la función de distribución acumulativa de la concentración de cada uno de los plaguicidas en un cuerpo de agua “típico” posterior a eventos de aplicaciones, o escorrentías posteriores a la misma en un área dada. El modelo asume una distribución log-normal de las  $LC_{50}$  y las CE (=Concentración Ambiental) introducidas, según la Fórmula IV.1:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} * \exp\left(\frac{-0.5 * (x - \mu)^2}{\sigma^2}\right)$$

siendo  $x = \log(\text{LC}_{50} \text{ o CE})$ ,  $\mu$  es la mediana del  $\log(\text{LC}_{50} \text{ o CE})$ , y  $\sigma$  es la desviación estándar de  $\log(\text{LC}_{50} \text{ o CE})$ . La DSE y la DCE se definieron como la distribución de frecuencia acumulada de los datos de toxicidad y de las concentraciones ambientales, respectivamente. A ambas distribuciones se le realizaron la prueba de bondad de ajuste de Anderson-Darling. La normalidad de los datos de toxicidad y concentración se asumieron si  $p > 0,05$  (Posthuma *et al.*, 2002).

El resultado se presenta gráficamente como una Curva de Probabilidad Conjunta (CPC) de ambas distribuciones. El Riesgo Ecológico Esperado (REE) promedio se calculó como la Potencialmente Fracción Afectada (PAF) de las especies consideradas, correspondiendo al área bajo la curva en la CPC.

### ***Riesgo de las mezclas***

Partiendo de la Potencial Fracción Afectada ( $\text{PAF}_i$ ) para cada compuesto y considerando un modelo de Respuesta Aditiva (=Acción Independiente *sensu* Bliss), se calculó la Potencial Fracción Afectada de la mezclas ( $\text{PAF}_{\text{RA}}$ ). Es una medida del riesgo bajo los mismos escenarios de exposición utilizados para los compuestos individualmente (Traas *et al.*, 2002), según la Fórmula IV.2:

$$\text{PAF}_{\text{RA}} = 1 - \prod_i (1 - \text{PAF}_i)$$

### ***Predicción de efectos en micro/mesocosmos***

Se utilizó el modelo PERPEST 3.0 (van den Brink *et al.*, 2002) para predecir probables efectos en micro/mesocosmos. Para realizar estimaciones de efectos se usaron la mínima y máxima de las concentraciones utilizadas para construir las DCE del análisis anterior, para cada uno de los plaguicidas. También se estimó de la misma manera la mezcla de cipermetrina y clorpirifos.

## Resultados

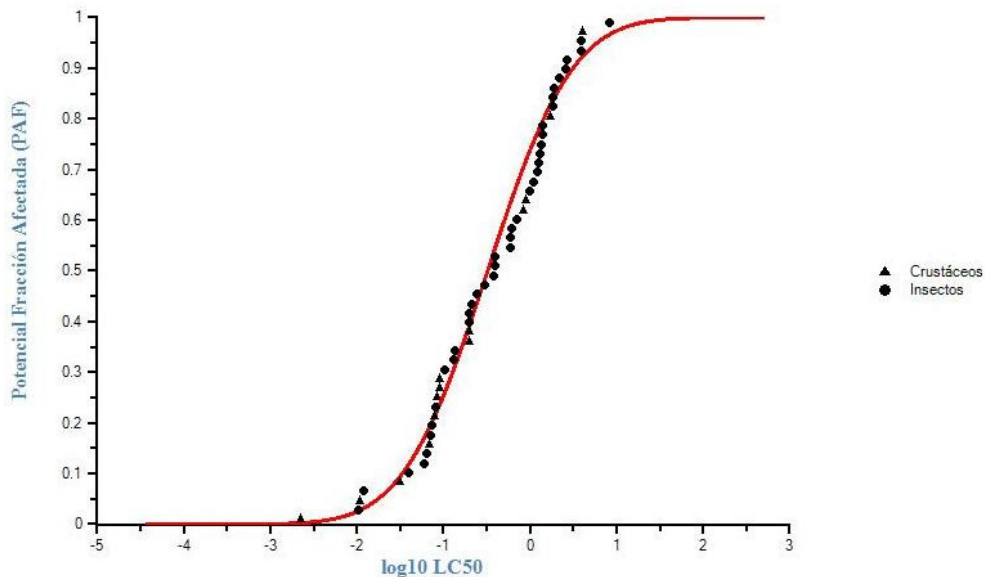
### Cocientes de Peligro (HQ)

En la Tabla IV.1 figuran los resultados para los cocientes de peligro para los plaguicidas considerados. En todos los casos se utilizó el menor valor de  $LC_{50}$  para los datos de toxicidad aguda de la especie que se encontró como más sensible; el mismo criterio se utilizó para los datos de especies autóctonas. Además se consideró el cálculo del cociente con los valores de  $LC_{50}$  para *Daphnia magna*, que fue la especie más sensible de las evaluadas en el presente trabajo. Para los insecticidas el valor fue siempre claramente mayor a la unidad (el menor fue 22). En el caso del glifosato, el cociente fue al menos un orden de magnitud inferior a la unidad para las especies de cladóceros informadas.

### Evaluación de Riesgo

#### Cipermetrina

La DSE log-normal acumulada (Figura IV.1) se estimó mediante 54 valores de  $LC_{50}$ , teniendo una media de -0,491 y un desvío estándar de 0,769. La  $HC_5$  estimada es 0,017  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%}$ = 0,009  $\mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%}$ = 0,030  $\mu\text{g/l}$ ) y la  $HC_{50}$  estimada es 0,323  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%}$ = 0,216  $\mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%}$ = 0,484  $\mu\text{g/l}$ ).

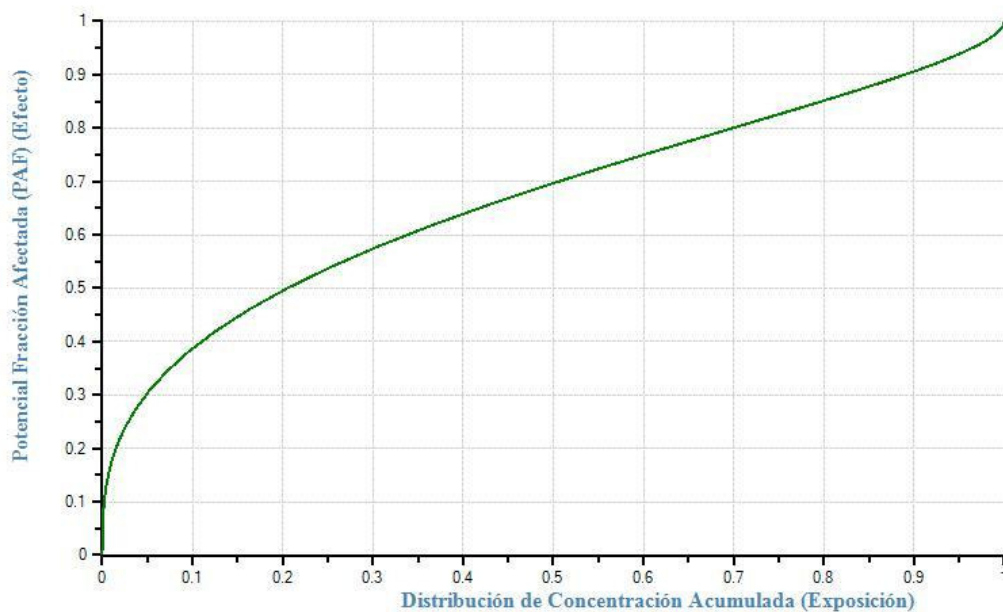


**Figura IV.1.** Distribución de Sensibilidad de Especies (DSE) de Invertebrados de agua dulce según valores de  $LC_{50}$  para la cipermetrina

**Tabla IV.1.** Cocientes de Peligro (HQ) considerando el menor valor de LC<sub>50</sub> y la mayor concentración medida en cuerpos de agua dulce de la región. (\*: especie más sensible encontrada; A: especie autóctona)

	Toxicidad bioensayo laboratorio			Concentración medida en ambientes acuáticos		HQ	
		LC <sub>50</sub> (µg/l)	Tiempo (h)	Referencia	µg/l	Referencia	Exposición/Toxicidad
<b>Cipermetrina</b>							
<i>Palaemonetes argentinus</i> *	A	0,002	24	Collins <i>et al.</i> (2006)	194	Marino & Ronco (2005)	97000
<i>Hyallolella curvispina</i>	A	0,009	48	Mugni <i>et al.</i> (2009)	194	Marino & Ronco (2005)	21555
<i>Daphnia magna</i>		1,54	48	Presente estudio	194	Marino & Ronco (2005)	126
<b>Clorpirifos</b>							
<i>Daphnia ambigua</i> *		0,035	48	Harmon <i>et al.</i> (2003)	10,8	Marino & Ronco (2005)	309
<i>Palaemonetes argentinus</i>	A	0,49	24	Montagna <i>et al.</i> (2007)	10,8	Marino & Ronco (2005)	22
<i>Hyallolella curvispina</i>	A	0,06	48	Mugni <i>et al.</i> (2009)	10,8	Marino & Ronco (2005)	180
<i>Daphnia magna</i>		0,1	48	Presente estudio	10,8	Marino & Ronco (2005)	108
<b>Glifosato</b>							
<i>Hyallolella curvispina</i> *	A	3400	48	Mugni <i>et al.</i> (2009)	660	Peruzzo <i>et al.</i> (2008)	0,19
<i>Daphnia spinulata</i>	A	66180	48	Alberdi <i>et al.</i> (1997)	660	Peruzzo <i>et al.</i> (2008)	0,01
<i>Daphnia magna</i>		9340	48	Presente estudio	660	Peruzzo <i>et al.</i> (2008)	0,07

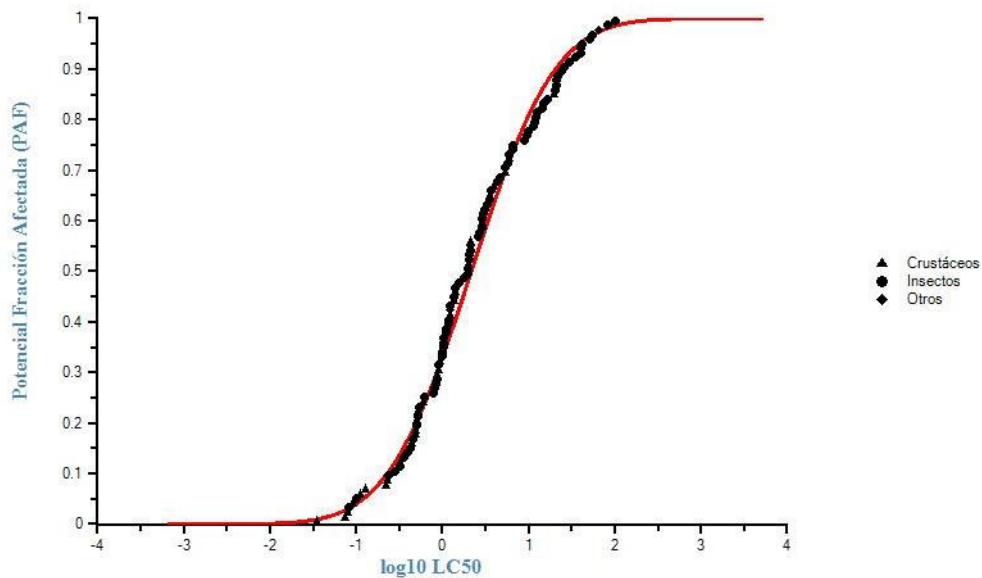
La DCE log-normal se estimó mediante 20 datos de concentraciones medidas en cuerpos de agua de la región, teniendo una media de -0,227 y una desviación estándar de 1,108. Se calculó el Riesgo Ecológico Esperado promedio como el área bajo la Curva de Probabilidad Conjunta (CPC, Figura IV.2) siendo 0,669 (66,98%).



**Figura IV.2.** Curva de Probabilidad Conjunta entre la Probable Fracción de Especies Afectadas y la Distribución de Concentración Acumulada para la cipermetrina

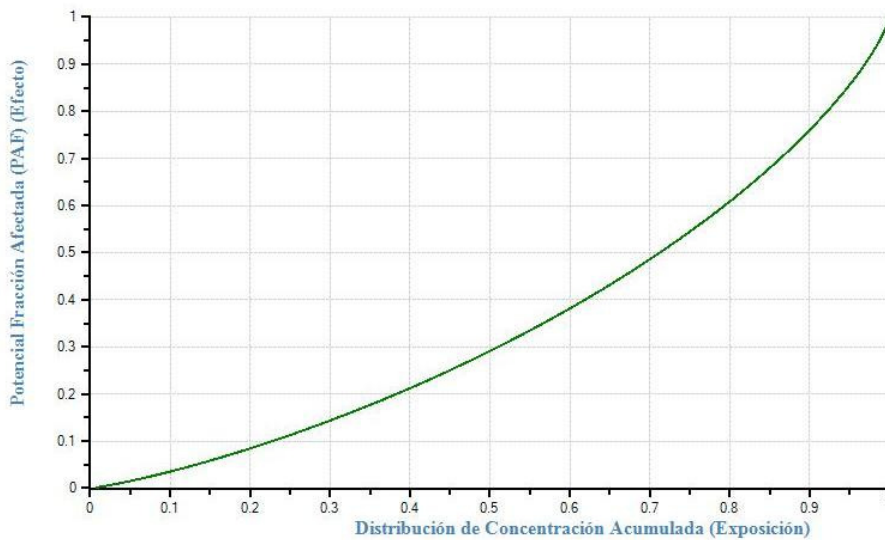
### ***Clorpirifos***

La DSE log-normal acumulada (Figura IV.3) se estimó mediante 110 valores de  $LC_{50}$ , teniendo una media de 0,336 y un desvío estándar de 0,762. La  $HC_5$  estimada es 0,119  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%} = 0,075 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%} = 0,178 \mu\text{g/l}$ ) y la  $HC_{50}$  estimada es 1,642  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%} = 2,168 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%} = 2,862 \mu\text{g/l}$ ).



**Figura IV.3.** Distribución de Sensibilidad de Especies (DSE) de Invertebrados de agua dulce según valores de  $LC_{50}$  para el clorpirifos

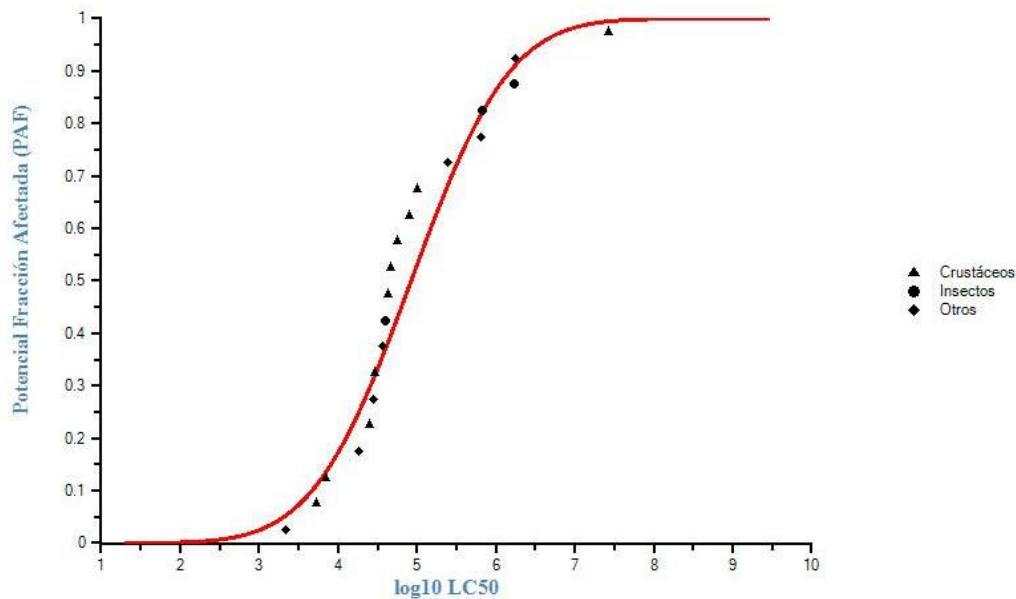
La DCE log-normal se estimó mediante 19 datos de concentraciones medidas en cuerpos de agua de la región, teniendo una media de -0,192 y un desvío estándar de 1,721. Se calculó el Riesgo Ecológico Esperado promedio como el área bajo la Curva de Probabilidad Conjunta (CPC, Figura IV.4) siendo 0,347 (34,72%).



**Figura IV.4.** Curva de Probabilidad Conjunta entre la Fracción de Especies Afectadas y la Distribución de Concentración Acumulada para el clorpirifos

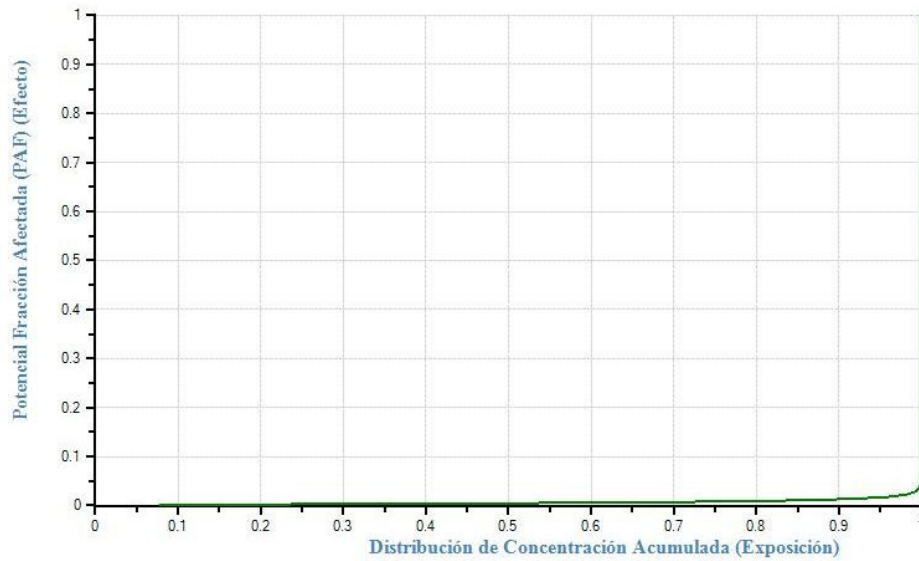
### ***Glifosato***

La DSE log-normal acumulada (Figura IV.5) se estimó mediante 20 valores de  $LC_{50}$ , teniendo una media de 4,925 y un desvío estándar de 0,979. La  $HC_5$  estimada es 1942,56  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%}= 378,60 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%}= 5955,54 \mu\text{g/l}$ ) y la  $HC_{50}$  estimada es 84287,99  $\mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%}= 35231,72 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%}= 201649,71 \mu\text{g/l}$ ).



**Figura IV.5.** Distribución de Sensibilidad de Especies (DSE) de invertebrados de agua dulce según valores de  $LC_{50}$  para el glifosato

La DCE log-normal se estimó mediante 29 datos de concentraciones medidas en cuerpos de agua de la región, teniendo una media de 5,483 y una desviación estándar de 0,638. Se calculó el Riesgo Ecológico Esperado promedio como el área bajo la Curva de Probabilidad Conjunta (CPC, Figura IV.6) siendo 0,0062 (0,62%).



**Figura IV.6.** Curva de Probabilidad Conjunta entre la Fracción de Especies Afectadas y la Distribución de Concentración Acumulada para el glifosato

***Riesgo de las mezclas***

En función de las probabilidades calculadas previamente, se estimaron los riesgos asociados a las aplicaciones de mezclas (Tabla 2), según la F´rmula IV. 2:

**Tabla 2.** Valores del Riesgo Ecológico Esperado para las mezclas de plaguicidas

Mezcla			Riesgo Ecológico Esperado	
Cipermetrina	Clorpirifos	Glifosato	Probabilidad	%
X	X		0,784	78,39
X		X	0,671	67,11
	X	X	0,351	35,10
X	X	X	0,785	78,52

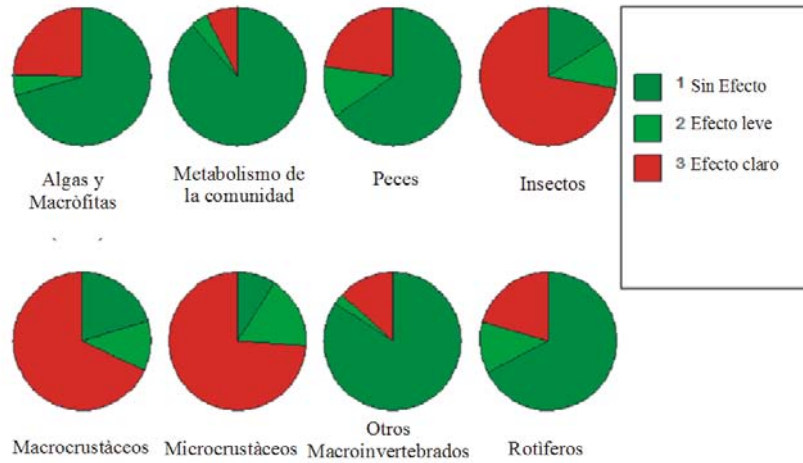
***Predicciones de efectos en mesocosmos***

Según la optimización por defecto que tiene el programa PERPEST para el Razonamiento-Basado-en-Casos se ingresaron sólo las concentraciones máximas y mínimas para los dos insecticidas. En el caso del herbicida se agregaron las propiedades físico-químicas dado que el mismo no se encuentra en su base de datos. Hay que

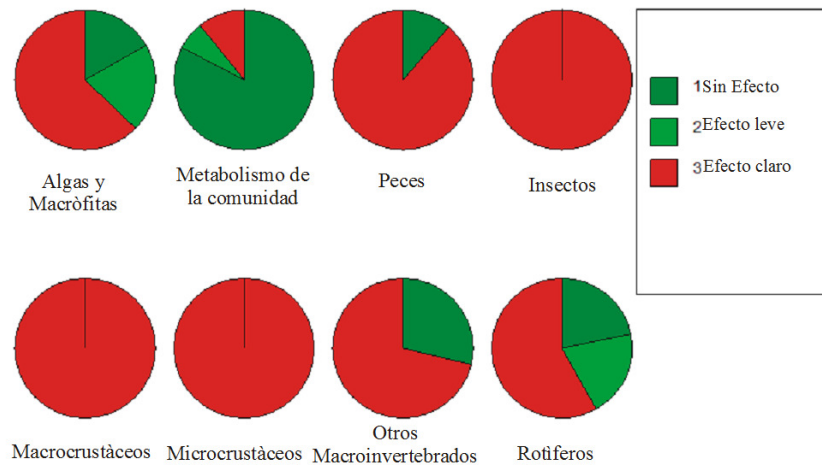


considerar que los potenciales efectos para los insecticidas y el herbicida se evaluaron en distintos comportamientos según el grupo de plagucida considerado. Soló la mezcla de insecticidas es posible evaluar mediante el programa, razón por la cual solo se realizó para la mezcla correspondiente a cipermetrina y clorpirifos.

**Cipermetrina**

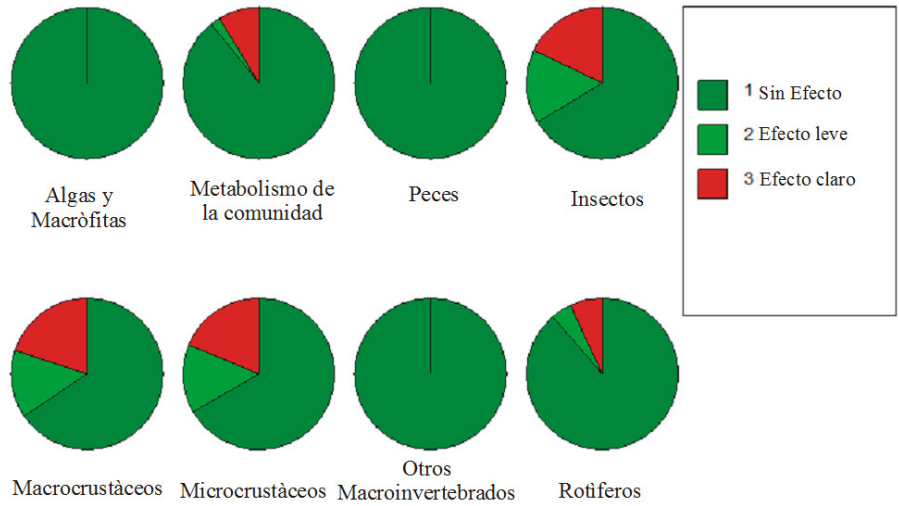


**Figura 7.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la mínima concentración de cipermetrina medida en aguas de la región

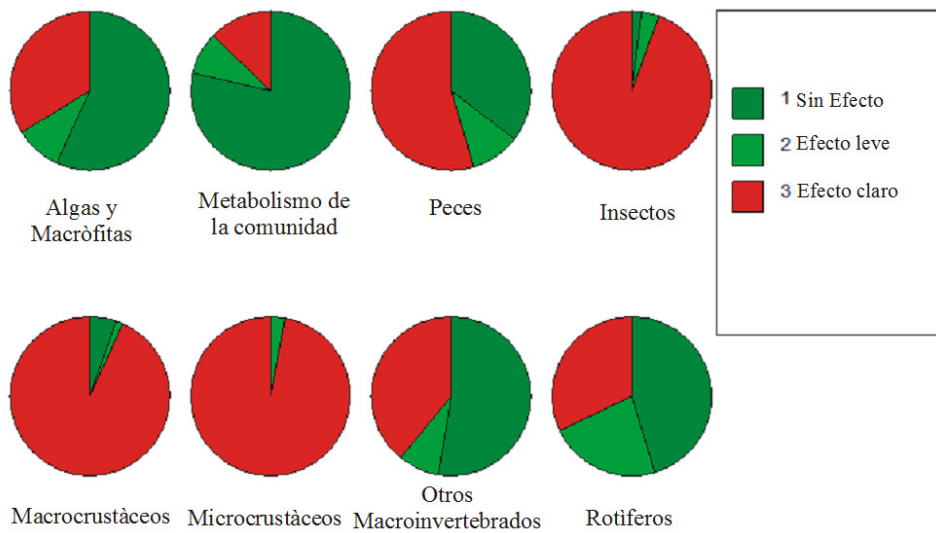


**Figura 8.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la máxima concentración de cipermetrina medida en aguas de la región

**Clorpirifos**

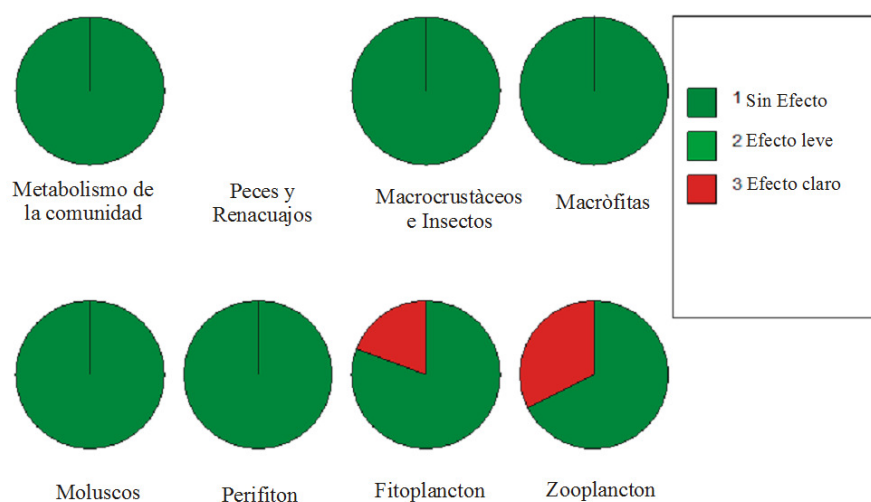


**Figura 9.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la mínima concentración de clorpirifos medida en aguas de la región

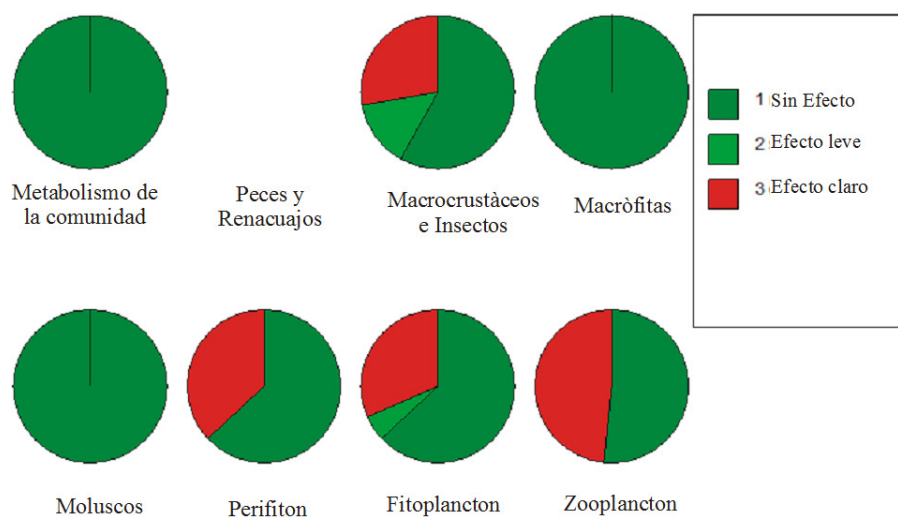


**Figura 10.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la máxima concentración de clorpirifos medida en aguas de la región

**Glifosato**

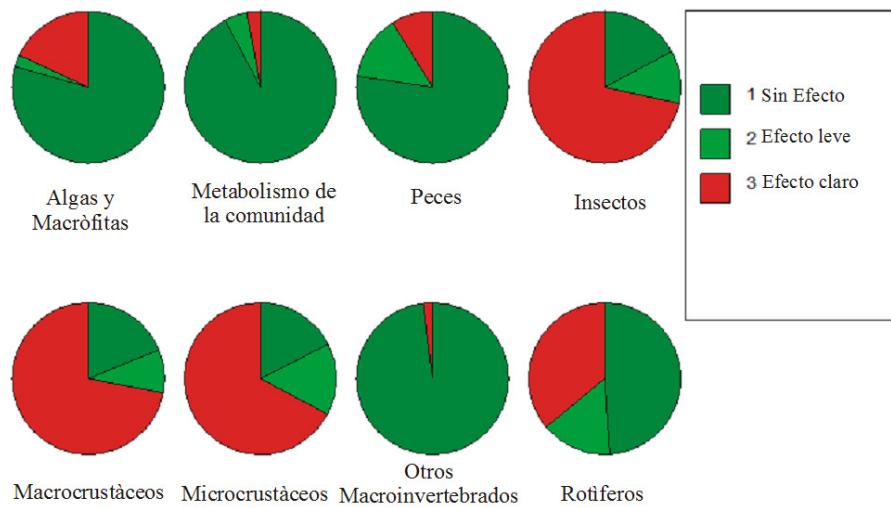


**Figura 11.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la mínima concentración de glifosato medida en aguas de la región (Peces y Renacuajos: sin datos)

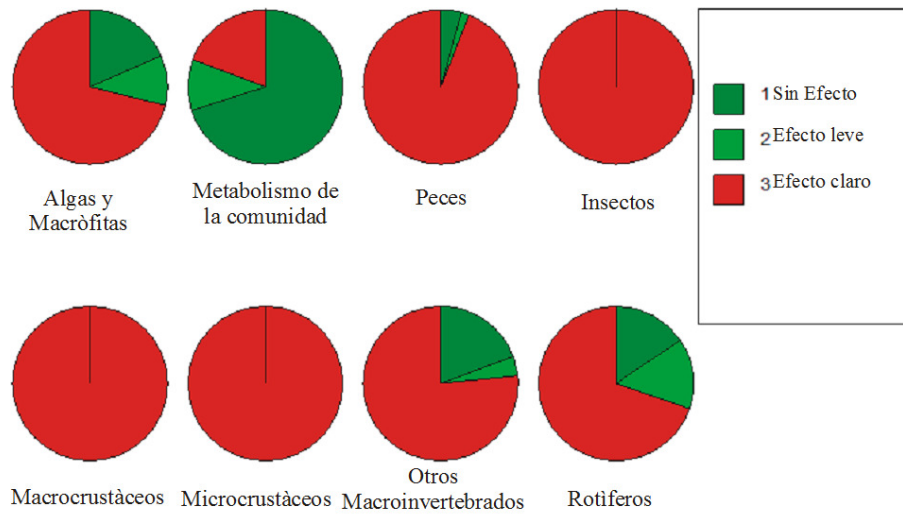


**Figura 12.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la máxima concentración de glifosato medida en aguas de la región (Peces y Renacuajos: sin datos)

**Cipermetrina-Clorpirifos**



**Figura 13.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la mezcla con las mínimas concentraciones de cipermetrina y clorpirifos medidas en aguas de la región



**Figura 14.** Efectos estimados por el modelo PERSPET para la mezcla con las máximas concentraciones de cipermetrina y clorpirifos medidas en aguas de la región

Para los insecticidas los efectos siguen el mismo patrón, los mayores efectos esperados están sobre los invertebrados, principalmente los artrópodos (categorías Insectos, Microcrustáceos y Macrocrustáceos); los efectos son mayores en el caso de la cipermetrina que el clorpirifos, tanto en las situaciones de mínima y máxima concentración considerada. En el caso del herbicida, los mayores efectos se esperan sobre las categorías Zooplacton seguido por el Fitoplacton. Recién a la máxima concentración se esperan efectos sobre el Perifiton y artrópodos (categoría Macrocrustáceos e Insectos).

En el caso de la aplicación conjunta de cipermetrina y clorpirifos, en las mínimas concentraciones ya se esperan efectos entre el 50% y el 75% en todas las categorías de artrópodos consideradas (Insectos, Microcrustáceos y Macrocrustáceos). En el peor escenario, con las máximas concentraciones de ambas, los efectos esperados serían sobre el 100% de los artrópodos y superiores al 50% en Peces y organismos productores (Categoría Algas y Macrófitas)

### ***Discusión***

Los cocientes de peligro indican que en el caso del “peor escenario”, los invertebrados acuáticos tendrían efectos adversos debido a la exposición a insecticidas en los cuerpos de agua; no así el herbicida que está un orden de magnitud debajo de la unidad. Era de esperarse este comportamiento dado el mecanismo de acción de las moléculas analizadas y la fisiología de los crustáceos; que en todos los casos representó el grupo con la especie más sensible de la que se tenía información de su  $LC_{50}$ . El patrón se manifiesta independientemente si la especie es o no autóctona, dado que la condición del cociente HQ (mayor o menor a la unidad) fue la misma en todos los casos. Si bien cambió su valor numérico, hay que recordar que un aumento de su valor absoluto no es proporcional al riesgo y que en realidad se está analizando el peligro asociado a un escenario particular (Solomon & Sibley, 2002). Hay que destacar el valor del HQ como una primera aproximación al riesgo, siendo de gran utilidad paso para el monitoreo y valoración inicial de sustancias en el marco de una Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA); dado que con solo un dato de exposición y toxicidad permite tener una ponderación del peligro asociado a la sustancia.

Para la Evaluación de Riesgo Probabilística (PERA por sus sigla en inglés), se obtuvieron las DSE (Distribución de Sensibilidad de Especies) y las DCE (Distribución de Concentraciones de Exposición Ambientales). Respecto a la DSE, hay que destacar los escasos datos de toxicidad de estos plaguicidas para especies de invertebrados autóctonas (Tabla IV.1). Considerando que el intervalo óptimo para las estimaciones fiables de las  $HC_5$  a partir de la DSE comienza con un  $n$  de 15 especies (Newman *et al.*, 2000), es que se hace necesario utilizar datos de  $LC_{50}$  de especies que no se encuentren en la región. Maltby *et al.* (2005) calcularon valores de  $HC_5$  utilizando distintos agrupamientos de DSE para comparar distintos ensambles de especies (vertebrados, artrópodos e invertebrados no artrópodos), hábitat (lótico, léntico, agua dulce, marino) y distribución geográfica (Paleártica, Neártica, templado, tropical) y evaluar así el efecto sobre la DSE y la  $HC_5$  calculada; sólo la composición taxonómica de los ensambles de especies utilizados tuvieron una influencia significativa en el resultado, no así el hábitat ni la región geográfica de las especies utilizadas. Van den Brink *et al.* (2006), observaron la misma tendencia en las DSE de organismos de agua dulce para 9 herbicidas. Rico *et al.* (2010) compararon la DSE construida a partir de las  $LC_{50}$  de especies endémicas del Amazonas, región Neotropical, con la DSE de especies templadas del Hemisferio Norte; demostrando que no existía diferencias de sensibilidad entre las especies de ambas regiones para el insecticida evaluado (metil-paratión). La evidencia sugiere que el ensamble de especies es, luego de tener el número necesario de las mismas, la condición a priorizar para construir la DSE fiable para la estimación.

Las DSE obtenidas a partir de las  $LC_{50}$  de los tres plaguicidas son consistentes con los valores de  $HC_x$  obtenidos por otros autores. Vale aclarar cuestiones terminológicas para poder establecer comparaciones con trabajos precedentes. Además del concepto de DSE, visto como la frecuencia acumulada de las  $LC_{50}$  y el concepto de  $HC_x$  asociado, muchos autores trabajaban con los percentiles de la regresión de todos los valores de  $LC_{50}$  como escenario de efecto en las ERA's, generalmente el 10° percentil correspondiente al grupo de especies más sensible. Si bien pueden existir diferencias de tipos conceptuales en la elección de los modelos elegidos, en todos los casos se desea establecer un punto de corte a partir del cual se establece que el efecto ya no es admisible ( $HC_x$  o  $X^\circ$  percentil; por ejemplo:  $HC_{10}=10^\circ$  centil).

Solomon *et al.* (2001) dentro del marco de la ERA para piretroides del algodón, obtuvieron un  $DSE_{\text{artrópodos}}$  y una  $DSE_{\text{vertebrados}}$  a partir de datos de toxicidad de laboratorio. Los artrópodos mostraron una sensibilidad 60 veces mayor respecto a los vertebrados basándose en la comparación de su  $HC_{10}$ . La  $DSE_{\text{artrópodos}}$  para cipermetrina la construyeron a partir de 42 datos considerando tiempos de exposición  $\leq 96$  horas. Los autores informan el valor de  $HC_{10}$  de  $0,006 \mu\text{g/l}$  mientras que la  $HC_5$  estimada a partir de la DSE en el presente trabajo fue de  $0,017 \mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%} = 0,009 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%} = 0,030 \mu\text{g/l}$ ). A diferencia del presente estudio, en Solomon *et al.* (2001), incluyeron especies de agua dulce y salada para la  $DSE_{\text{artrópodos}}$ ; esto podría explicar la mayor sensibilidad de su DSE. En el mismo trabajo los autores, separan para otros piretroides (permetrina y fenvalerato), las especies de agua dulce y agua salada, demostrando la mayor sensibilidad relativa en el caso de los organismos de aguas salobres.

Giesy *et al.* (1999) en el contexto de una ERA del clorpirifos en ambientes acuáticos de Norteamérica realizó tres DSE para especies de agua dulce; considerando, todos los organismos evaluados, los vertebrados y los artrópodos, respectivamente. Se observó al igual que en el caso de la cipermetrina, la mayor sensibilidad de los artrópodos respecto al resto de los organismos evaluados; siendo 97 veces más sensible que los vertebrados comparando sus  $HC_{10}$ . Para los artrópodos los autores obtuvieron un valor de  $HC_{10}$  de  $0,055 \mu\text{g/l}$ . En este estudio se obtuvo un  $HC_5$  de  $0,119 \mu\text{g/l}$  ( $LI_{90\%} = 0,075 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%} = 0,178 \mu\text{g/l}$ ), siendo un valor mayor, que podría explicarse por la incorporación de especies de invertebrados no artrópodos, que mayormente están asociados a bajas sensibilidades (Figura IV.3).

Solomon & Thompson (2003), en el contexto de un ERA para el uso del glifosato para control de pantas en cuerpos de agua, estiman el  $HC_{10}$  para los organismos acuáticos en  $3215 \mu\text{g/l}$ . El resultado obtenido a partir de la DSE para la  $HC_5$  fue de  $1942,56 \mu\text{g/l}$  i.a. ( $LI_{90\%} = 378,60 \mu\text{g/l}$  -  $LS_{90\%} = 5955,54 \mu\text{g/l}$ ) en este estudio. El sesgo hacia valores mayores puede deberse a la inclusión de peces y anfibios, que como se observa de los datos presentados por los autores en el mismo trabajo son menos sensibles al efecto del herbicida. Giesy *et al.* (2000) realizaron un ERA del herbicida Roundup®, no probabilístico, sino a través de un HQ. En el mismo utilizando para el caso de invertebrados acuáticos de agua dulce un VTR (Valor Tóxico de Referencia) para el cálculo del HQ de  $1900 \mu\text{g/l}$  de Roundup®. En este caso consideraron la formulación y

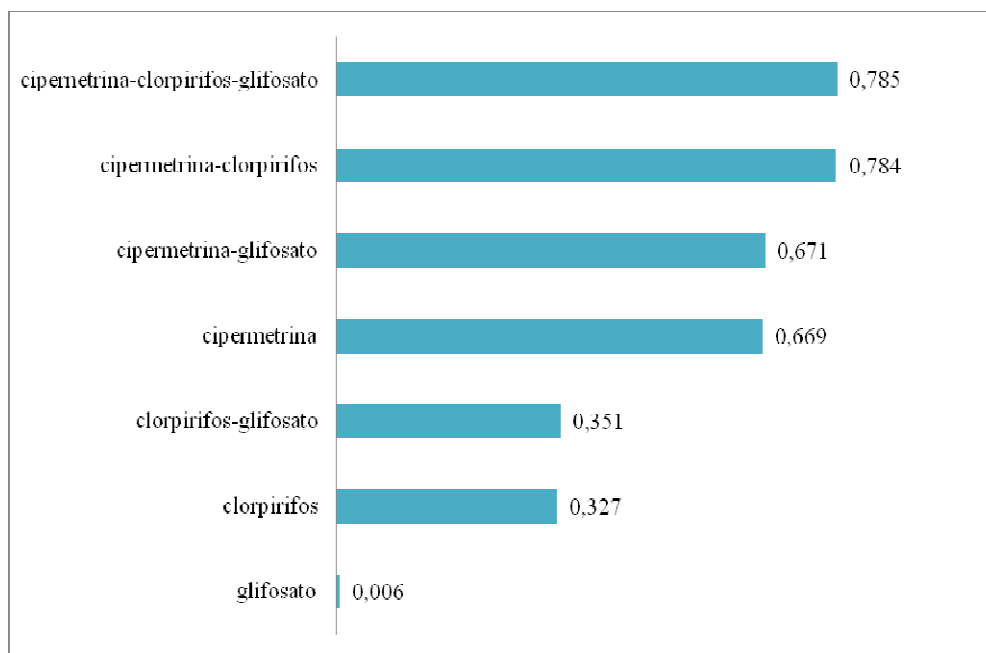
no solo i.a. para escenarios agudos, con base en la mayor toxicidad del primero, criterio que se siguió en la presente tesis. Este valor fue el de la menor NOEC informado para *Daphnia magna*, y no es el obtenido a partir de una DSE. Su resultado en ese caso es más conservador, como era de esperarse, dado que para la construcción de la DSE sólo se utilizaron valores de LC<sub>50</sub>.

Las consideraciones previas permiten suponer que las DSE obtenidas en el presente trabajo para los tres plaguicidas son consistentes, según sus estimaciones de HC<sub>5</sub>, con las obtenidas para otras DSE para esos compuestos por otros autores.

Respecto a la DCE, el escenario propuesto de exposición es un evento postaplicación (aérea o terrestre con deriva), o de una lluvia posterior al mismo que produce escorrentía (> 20 mm en la región). Cualquiera de estos eventos determina la entrada de plaguicidas al sistema acuático. Los datos utilizados para construir la DCE son concentraciones en los cuerpos de agua, no necesitando los supuestos utilizados en los modelos predictivos para estimar la exposición. El aumento del número de datos para la construcción de las DCE de cada plaguicida se priorizó sobre la consideración sitio-específica, considerando un escenario promedio, resultando en un aumento de la fiabilidad en la estimación del riesgo.

Con el escenario considerado, el riesgo estimado para los invertebrados acuáticos es cipermetrina > clorpirifos >>> glifosato. Este resultado es consistente con lo obtenido a través de los HQ en todos los casos. Para el caso de las mezclas, el riesgo estimado considerando la Acción Independiente (AI) es ciper-clorpi-glifo > ciper-clorpi > ciper-glifo > clorpi-glifo. Si uno considera en función del escenario planteado, el riesgo asociado para los invertebrados acuáticos obtiene el orden de la Figura IV.15.





**Figura IV.15.** Riesgo, expresado como probabilidad, para invertebrados acuáticos asociado al escenario considerado (postaplicación o escorrentías) para cada evento según el tipo de plaguicida/s aplicado/s.

#### ***Resultados de probable efecto en micro/mesocosmos***

Los resultados obtenidos por el modelo PERSPET son consistentes con los obtenidos con la PERA de cada plaguicida. En todos los casos los invertebrados, y dentro de ellos los artrópodos, serían los más afectados; dentro de los insecticidas el efecto probable es cipermetrina > clorpirifos. En el caso del herbicida, los puntos finales considerados son otros, siendo el zooplacton y fitoplacton los más probablemente afectados; al aumentar la concentración serían afectados los insectos, macrocústáceos y el perifiton. Era de esperarse el mayor efecto en los productores dado que es un herbicida, sin embargo en ambas concentraciones los artrópodos serían claramente afectados, según la estimación del modelo. En el caso de la mezcla cipermetrina-clorpirifos, los resultados de la estimación son coherentes con los obtenidos por la PERA, considerando un modelo de Respuesta Aditiva.

Hay estudios de ecosistemas controlados, utilizando micro/mesocosmos, de los tres plaguicidas estudiados. Hill *et al.* (1985), Farmer *et al.* (1995), Friberg-Jensen *et al.* (2003) y Wendt-Rasch *et al.* (2003) estudian efectos de la cipermetrina sobre ecosistemas acuáticos; en todos los casos los crustáceos fueron el grupo donde se

observó el mayor efecto. Friberg-Jensen *et al.* (2003) demuestran que la cipermetrina es altamente tóxica para los crustáceos que reciben concentraciones mayores a 0,13 µg/l. En ese mismo experimento, Wendt-Rasch *et al.* (2003), demuestran que la cipermetrina, provoca efectos indirectos, relacionado con cambios significativos en la composición de especies de las comunidades.

El clorpirifos fue evaluado mediante micro/mesocosmos por diversos autores, Brazner *et al.* (1989), Stay *et al.* (1989), van den Brink *et al.* (1995), Kersting & van Den Brink (1997), Biever *et al.* (1994), Siefert *et al.* (1989) y van Wijngaarden *et al.* (2005). En todos ellos el efecto sobre los crustáceos fue el más marcado, comportamiento que era acompañado por los insectos si eran evaluados en el experimento en cuestión. Van Wijngaarden *et al.* (2005) demuestran que los cladóceros, juntos con los rotíferos, se encontraban entre los organismos más sensibles al clorpirifos dentro de los evaluados.

Estudios de mesocosmos para el glifosato fueron llevados adelante por diversos autores. Relyea (2005), evaluó el herbicida glifosato en mesocosmos y no encontró efectos sobre invertebrados (zooplankton, insectos y gasterópodos), si sobre vertebrados (anfibios). Perez *et al.* (2007) observaron efectos sobre el fitoplankton y el perifiton, cambiando las relaciones de abundancia y la productividad en los mesocosmos tratados con formulación de glifosato. Vera *et al.* (2010), encuentran más evidencia en consonancia con el trabajo anterior, informando la alteración de la dinámica del perifiton, mostrando la disminución de las diatomeas y el aumento de las cianobacterias, entre otros resultados de los mesocosmos tratados con el herbicida.

Considerando estos resultados en micro/mesocosmos para los plaguicidas estudiados, se observa una clara consistencia con los estimados por el modelo PERPEST, sobretudo en el caso de los insecticidas. En el caso del herbicida, pareciera existir una pequeña sobreestimación del efecto para los invertebrados; la misma podría justificarse a que la estimación para los efectos del glifosato fue realizada por extrapolación de los efectos de otros herbicidas, dado que el mismo no se encuentra en su base de datos.

Existen diversos estudios que evaluaron el efecto de mezclas de plaguicidas en micro/mesocosmos; en nuestro caso las mezclas consideradas son insecticida/insecticida e insecticida/herbicida. Cuppen *et al.*, 2002; George *et al.*, 2003; Relyea, 2009; Sibley *et al.*, 2000 y van Den Brink *et al.*, 2002 evaluaron mezclas de

insecticidas en micro/mesocosmos. Cuppen *et al.* (2002) y van den Brink *et al.* (2002) estudiaron los efectos de la exposición a diferentes concentraciones de mezclas equitoxicas de los insecticidas clorpirifos y lindano en invertebrados. Los efectos observados podrían ser explicados desde la toxicidad individual de los insecticidas para los invertebrados y no indicarían efectos de tipo sinérgicos. George *et al.* (2003) llevaron a cabo dos experimentos en microcosmos; una evaluación de los efectos de insecticidas sobre el zooplancton con un modo de acción similar por un lado y, por el otro, con insecticidas con diferente modo de acción. Las mezclas binarias de los organofosforados clorpirifos y diazinón siguieron el patrón de concentración adición (CA). La respuesta observada de zooplancton expuesto a la mezcla de plaguicidas con diferentes modos de acción (clorpirifos, endosulfan y trifluralina) no siguió este patrón y fue un resultado de la susceptibilidad de los taxones individual al plaguicida dominante en cada mezcla. Relyea (2009) evaluó los efectos de una mezcla de cinco insecticidas (malatión, carbaril, clorpirifos, diazinon y endosulfan), así como sus efectos individuales en plancton y anfibios de las comunidades acuáticas utilizando mesocosmos. En todos los casos, la mezcla de insecticidas causó un efecto sobre el zooplancton en un grado similar a los efectos individuales de uno o más de los insecticidas por separado. Sibley *et al.* (2000) utilizó un diseño de regresión para evaluar efectos directos e indirectos a nivel de poblacional sobre el zooplancton y fitoplancton expuestos a una mezcla binaria de diazinón y clorpirifos. Los autores llegaron a la conclusión que no hay efectos sinérgicos, poniendo de relieve la complejidad que a menudo acompaña a la interpretación ecológica de los impactos a nivel ecosistémico.

Fairchild *et al.* (1994), Grünwald (2003), Hoagland *et al.* (1993), Relyea (2009) y van Den Brink *et al.* (2009) estudiaron efectos de las mezclas de herbicidas e insecticidas en micro/mesocosmos. Fairchild *et al.* (1994) investigaron los efectos de la mezcla de atrazina y esfenvalerato en mesocosmos, la cual tenía un fuerte efecto sobre la composición de la comunidad de macrófitos pero no tuvo ningún efecto sobre su biomasa. Los sinergismos ecológicos hipotéticos, no se producen debido a la rápida disipación del insecticida piretroide. Grunwald (2003) realizó experimentos en mesocosmos con isoproturón, alfa-cipermetrina y la mezcla de ambos. Observó que los taxones sensibles a cualquiera de los ingredientes activos no mostraron diferencia

respecto a la mezcla, mientras que los taxones moderadamente susceptibles vieron alteradas sus respuestas a través de las interacciones de la red trófica. El nivel de los efectos indirectos evaluados fue mayor para la mezcla en comparación con los estudios con los compuestos individuales.

Los efectos individuales y combinados de la atrazina y bifentrina fueron investigados por Hoagland *et al.* (1993). Los efectos de interacción observados indican que cuando cualquiera de los compuestos se introdujo en niveles ecológicamente realistas, sus efectos fueron enmascarados si el otro plaguicida estaba presente en altas concentraciones; no se observó sinergismo. Relyea (2009) estudió los efectos combinados en mesocosmos de cinco herbicidas (entre ellos el glifosato) y cinco insecticidas (entre ellos el clorpirifos) en plancton y anfibios. Los efectos de la mezcla en anfibios, fitoplancton y zooplancton se explican en gran medida por los efectos de los plaguicidas individuales y las interacciones sinérgicas estaban ausentes. Van den Brink *et al.* (2009) estudiaron los efectos de la aplicación de una mezcla del herbicida atrazina y el insecticida lindano en un microcosmos dominado por plancton. Para el insecticida los efectos fueron los esperados por la bibliografía, mientras para el herbicida fueron menores, probablemente a un efecto indirecto debido a una menor presión de los organismos herbívoros; los macroinvertebrados fueron el grupo más sensible.

Recapitulando sobre los efectos de mezclas de plaguicidas en micro/mesocosmos, la mayoría de los estudios parecen indicar que cuando los plaguicidas afectan a los mismos grupos biológicos (insecticidas/insecticidas) los efectos sinérgicos no son de esperar; en cambio cuando las mezclas afectan a distintos puntos finales (insecticidas/herbicidas), se observa un aumento de los efectos indirectos debido a interacciones ecológicas, como es el caso de las relaciones tróficas. Los resultados obtenidos por el modelo PERSPEST para clorpirifos-cipermetrina son consistentes con este punto; sin embargo bajo la luz de estas observaciones hay que considerar que el riesgo estimado mediante la PERA para las mezclas de insecticida/herbicida podría estar ligeramente subestimada en el contexto de la comunidad; dado que solo se evaluó sobre el grupo de los invertebrados.

El abordaje a través de los Cocientes de Peligro (HQ), la Evaluación de Riesgo Probabilística (PERA) y la estimación de riesgos en ecosistemas controlados (micro/mesocosmos), es consistente con los distintos resultados obtenidos. No solo entre ellos, sino también con los resultados de las investigaciones de otros autores. Los valores obtenidos a partir de datos de laboratorio, como es el caso de DSE (Distribución de Sensibilidad de Especies) son coherentes por los obtenidos en micro/mesocosmos. Cabe aclarar que se hizo hincapié en la discusión sobre la DSE, dado que la misma reviste una generalidad que permite comparaciones con otros autores, a diferencia de la DCE que es local y es generada para este escenario particular.

En nuestro país existen Niveles Guía de Calidad para la Protección de la Biota Acuática (Tabla IV.13) para los tres plaguicidas estudiados; en los escenarios de exposición planteados en todos los casos se exceden los valores agudos y crónicos de los mismos.

**Figura IV.13.** Niveles Guía para la Protección de la Biota Acuática (Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación)

Plaguicida	Valor Agudo Final (VAF)	Valor Crónico Final (VAF)
Cipermetrina	0,006 µg/l	0,0006 µg/l
Clorpirifos	0,06 µg/l	0,006 µg/l
Glifosato	2400 µg/l	240 µg/l

La ponderación del riesgo en este trabajo corresponde a eventos puntuales de aplicaciones. Utilizando el peor escenario posible y considerando que para cada plaguicida el mismo se reitera para cada uno de los eventos de entrada al sistema acuático; sea por aplicación, su deriva asociada o, posteriormente, por escorrentías generada por las precipitaciones. La aplicación es un evento programado, y en general siguen el calendario agronómico aunque con cierto margen, en función del estado del cultivo; por otra parte las precipitaciones que generan escorrentías (>20 mm aproximadamente para la región) van a decidir el riesgo total para el o los plaguicida/s evaluado/s.

Comparando el valor de riesgo para cada uno de los plaguicidas y mezclas evaluadas (Figura IV.12), se observa lo determinante que es la cipermetrina, ya sea cuando se encuentra solo o en alguna mezcla. Si en la aplicación se encuentra la cipermetrina el riesgo siempre es mayor al 50%. Claramente el riesgo total para los invertebrados no-

blanco, en el escenario considerado, disminuirá sustancialmente si la cantidad de aplicaciones donde esté presente este piretroide disminuyen. En el caso del clorpirifos el riesgo asociado es menor que el de la cipermetrina, pero hay que recordar que fue el insecticida con mayor persistencia de la toxicidad en la escorrentía; serían escenarios menos riesgosos pero podrían presentarse una mayor cantidad de veces.

Las condiciones en el momento de la aplicación, el/los plaguicida/s aplicado/s, las dosis utilizadas y las precipitaciones que generan eventos de escorrentías posterior a la aplicación, determinan el riesgo para los invertebrados en el cuerpo de agua. Las tres primeras están asociadas al manejo del cultivo y podrían ser consideradas para establecer medidas de manejo en vista de disminuir el impacto a cuerpos de agua asociados a los mismos. Sin duda que esto está supeditado a consideraciones de tipo productivas; pero si es posible modificar el manejo del cultivo para evitar el uso, disminuir la cantidad de aplicaciones o, en su defecto, disminuir la dosis del insecticida más riesgoso, esto puede ser ecológicamente relevante.

## **Conclusiones**

La utilización de invertebrados para la evaluación de efectos biológicos con ensayos de toxicidad en laboratorio es una herramienta que ha sido explorada y utilizada ampliamente en el contexto de la ecotoxicología. La importancia de los invertebrados dentro del ecosistema, expresada en la cantidad de especies y nichos ecológicos que abarca, encuentra en los sistemas acuáticos de agua dulce una clara demostración de su relevancia. Mediante bioensayos estandarizados y considerando la letalidad como punto final, se evaluaron los ingredientes activos (i.a.) y formulaciones (F) de los plaguicidas mayoritarios asociados al cultivo de la soja RR. Los estudios mediante el cnidario *Hydra attenuata* y el crustáceo *Daphnia magna* manifiestan respuestas biológicas correspondientes a dos fisiologías disímiles, probable reflejo de la distancia filogenética entre ambas.

La modificación de la toxicidad entre i.a. y las formulaciones correspondientes no siguen un patrón común, observando que varía en función de la especie ensayada, el i.a. con su mecanismo de acción correspondiente, la formulación considerada y la relación entre las curvas de Concentración-Efecto de ambas. Considerando las curvas Concentración-Efecto de cada par de F e i.a., no se observó ningún caso en el cual la F tenga una toxicidad menor que su correspondiente i.a., desprendiéndose que es recomendable la valoración ecotoxicológica de la formulación sobre la del i.a. para evitar subestimar efectos.

Respecto a los insecticidas, en ambas especies se observó el orden de toxicidad clorpirifos F e i.a. > cipermetrina F e i.a., sin embargo *D. magna* mostró una alta sensibilidad para los insecticidas, caso contrario al de *H. attenuata*. Considerando los modos de acción de la cipermetrina y el clorpirifos, se vincula el tipo y grado de organización del sistema nervioso de cada especie como posible explicación de la diferencia entre las sensibilidades hacia los insecticidas.

En el caso del herbicida, se destaca que la presencia del coadyuvante POEA aporta toxicidad por sí mismo a la formulación estudiada del herbicida glifosato para ambos organismos, contribuyendo en ambas especies con más del 50 %. Respecto al glifosato i.a. la sensibilidad de *D. magna* fue baja, por el contrario se observó una alta sensibilidad de *H. attenuata* al mismo. La contribución del i.a. a la toxicidad para *H.*



*attenuata* es similar a la de organismos fotosintetizadores que poseen la vía metabólica donde ejerce su acción el glifosato.

Las mezclas de las formulaciones, en muchos casos, mostraron efectos mayores de los que corresponden a un comportamiento aditivo; evidenciando efectos letales a concentraciones donde cada formulación por separado no los presenta. Con un alto número de combinaciones de mezclas binarias (150) y ternarias (44) evaluadas para dos bioensayos estandarizados se observó sinergismo en más del 67% de los casos. En todos los tipos de mezclas binarias, con los tres F utilizados, se observó sinergismo en más de una combinación de concentraciones. Solo el caso de la mezcla binaria de clorpirifos F: glifosato F resultó antagónica en una combinación para *D. magna*. Considerando que el efecto sinérgico es el más observado en la evaluación de efectos de las mezclas de las formulaciones, y que las aplicaciones de plaguicidas en los cultivos de soja RR frecuentemente son de este tipo, se estarían subestimando los efectos en escenarios reales al evaluar cada formulación por separado.

El presente estudio demuestra la presencia de plaguicidas asociados al cultivo de soja RR en los cuerpos de agua vinculados a un agroecosistema; el monitoreo de un arroyo de la región establece una asociación entre eventos de aplicación y/o escorrentías posteriores, con la detección de los plaguicidas en la columna de agua y los sedimentos.

Los eventos de escorrentía transportan a los plaguicidas del cultivo y suelo hacia los sistemas acuáticos aledaños; ingresando de manera pulsátil al cuerpo de agua. La toxicidad del agua de escorrentía evidenció el mismo patrón de toxicidad para ambas especies, siendo el mismo clorpirifos > endosulfán > cipermetrina. Los valores de vida media estimados en el agua de escorrentía para cada uno de los insecticidas es distinto y se correlacionan con sus  $K_{ow}$ , siguiendo el orden cipermetrina > endosulfán > clorpirifos.

Se determinó que la persistencia de la toxicidad en estos pulsos varía considerablemente dependiendo de las condiciones ambientales existentes en el momento de la aplicación y el plaguicida en cuestión, pudiendo modificarse de menos de un mes a más de tres meses en el caso de aplicaciones de clorpirifos.

Considerando el monitoreo realizado en un arroyo típico de la región y las aplicaciones en parcelas experimentales, los resultados evidencian que en los arroyos de pequeño orden de la región, debido a su carácter pulsátil, serían frecuentes escenarios de exposición agudos para la biota del arroyo en referencia a los plaguicidas en estudio.

Se realizó una estrategia secuencial para poder establecer el impacto de estos eventos pulsátiles que generan un escenario de exposición crítico para la biota del cuerpo de agua; un escenario de exposición basado en mediciones de cuerpos de agua de la región. La estrategia de valoración más sencilla se realizó por medio de Cocientes de Peligro, seguido por un Evaluación de Riesgo Ambiental de tipo probabilístico, estimando el riesgo sobre invertebrados acuáticos; estos resultados fueron evaluados a la luz de estimaciones de impacto para ecosistemas controlados. Las distintas valoraciones independientes demuestran el riesgo asociado en nuestra región a escenarios de aplicación de insecticidas, siendo bajo en relación al herbicida.

Entre los insecticidas, la presencia de cipermetrina, ya sea individualmente, o como parte de una mezcla, aumenta de manera considerable el riesgo asociado a esa aplicación. El clorpirifos mostró un riesgo menor que la cipermetrina en el escenario considerado, pero por otra parte es el plaguicida que mostró mayor persistencia en la toxicidad de la escorrentía. El riesgo asociado a la cipermetrina es mayor que el asociado la mezcla de clorpirifos-glifosato. La valoración del riesgo se llevó a cabo considerando el efecto letal sobre los invertebrados; los resultados demuestran la sensibilidad de este grupo como herramienta de evaluación de plaguicidas. Teniendo en cuenta el punto final evaluado y la importancia ecológica de este grupo de organismos en los ecosistemas acuáticos se concluye que existe un alto grado de impacto para los cuerpos de agua asociados a cultivos de soja RR para los escenarios considerados.

Es de destacar la valoración entre la relación de la toxicidad y el riesgo asociado a los escenarios de exposición considerados. En el caso de los insecticidas para ambos organismos evaluados la relación de toxicidad fue clorpirifos > cipermetrina, la cual se invierte al considerar el riesgo. En el caso del herbicida esto no sucede, siendo siempre el de menor toxicidad de los plaguicidas evaluados y siguiendo este patrón al considerar el riesgo asociado.

Las concentraciones de plaguicidas medidos en cuerpo de agua fueron en muchos casos órdenes de magnitud superiores a los niveles guía de nuestro país; y considerando que la evaluación de riesgo indica en algunos casos un impacto sustancial a la integridad del ecosistema acuático, es prioritario considerar una gestión integrada del uso de plaguicidas por la actividad agrícola para proteger los cuerpos de agua. Se resalta que los resultados del presente trabajo deberían ser tomados en consideración para integrarlos dentro un marco productivo con miras a minimizar el impacto sobre los cuerpos de agua de la región asociados a los cultivos de soja RR.

## Referencias

- Agostini, M.G., Natale, G.S. & Ronco, A.E., 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19(8), 1545-50.
- Aizen, M. A, Garibaldi, L. A & Dondo, M., 2009. Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral*, 19(1), 45-54.
- Alberdi, J.L., Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D. & Tortorelli, M.C., 1996. Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 229-35.
- Aldenberg, T. & Jaworska, J.S., 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(1), 1-18.
- Aldenberg, T., Jaworska, J.S. & Traas, .P.T. 2002. Normal species sensitivity distributions and probabilistic ecological risk assessment. En T. P. Posthuma L., Suter II G.W. . & Traas, ed. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, 49-102.
- Al-Omar, N. A. & Hassan, M., 2000. Simple and Rapid Method for the Detection of Early Signs of Toxicity in *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(5), 553-59.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., & Grimme, L., 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio Fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9), 2341-56.
- Anderson, T.D. & Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(7), 1507-14.
- Andrade, M. I., 1986. *Factores de deterioro ambiental en la cuenca del Río Lujan*. En: Contribución del Instituto de Geografía, Facultad de Filosofía y Letras (UBA), Buenos Aires, 224 pp.
- Arrhenius, A., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., & Blanck, H., 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology* , 68(4), 351-67.
- Backhaus, T., Scholze, M. & Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), 49-61.

- Backhaus, T., Altenburger, R., Arrhenius, A., Blanck, H., Faust, M., Finizio, A., Gramatica, P., Grote, M., Junghans, M., Meyer, W., Pavan, M., Porsbring, T., Scholze, M., Todeschini, R., Vighi, M., Walter, H. & Grimme, L.H., 2003. The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Continental Shelf Research*, 23(17-19), 1757-69.
- Backhaus, T., Arrhenius, A. & Blanck, H., 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environmental Science & Technology*, 38(23), 6363-70.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, J., Soares, M.V.M., & Riva, M C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology*, 78(1),1-14.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, Agra, A.J., Soares, A.R., & Amadeu, M.V.M., 2007. Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 439-49.
- Barron, M.G. & Woodburn, K.B., 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 144, 1-93.
- Battu, R.S., Sahoo, S.K. & Jyot, G., 2009. Persistence of acephate and cypermethrin on cotton leaves, cottonseed, lint and soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(1), 124-8.
- Biever, R.C., Giddings, J.M., Kiamos, M., Annunziato, M.F., Meyerhoff, R., Racke, K., 1994. Effects of chlorpyrifos on aquatic microcosms over a range of off-target spray drift exposure levels. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, Bracknell (United Kingdom), 3, 1367-72.
- Bisang, 2008. La transformación del campo argentino. *Ciencia Hoy*.18, 6-15.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26(3),585-615.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T. & Vale, J.A., 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3),159-67.
- Brailovsky, A.E. & Foguelman, D., 1991. *Memoria Verde: historia ecológica de la Argentina*. Editorial Sudamericana, Buenos Aires, 375 pp.
- Brazner, J.C., Heinis, L.J. & Jensen, D.A., 1989. A littoral enclosure for replicated field experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(12), 1209-16.
- Brian, J.V., Harris, C., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., & Sumpter, J.P., 2005.

- Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 113(6), 721-28.
- Brock, T.C.M., Lahr, J. & Brink, P.J. Van den, 2000a. *Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. Final Report 088*. Alterra Green World Research, Wageningen, The Netherlands, 128 pp.
- Brock, T.C.M., Wijngaarden, R.P.A. van & Geest, G.J. Van, 2000a. *Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems Part 2 : Insecticides. Final Report 089*. Alterra Green World Research, Wageningen, The Netherlands, 72 pp.
- Brodeur, J., Vera Candioti, J., Soloneski, S., Ronco, A. E., Larramendy, M. L., (en prensa) Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*
- Bro-Rasmussen, F., 1997. The environmental experience: ecosystem protection. *Archives of Toxicology Supplement*, 19, 155-66.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca, 2002. *Invertebrates*. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 936 pp.
- Buikema, A.L., Niederlehner B.R. & Cairns, J., 1982. Biological monitoring: Part IV. Toxicity testing. *Water Research*, 16, 239-262.
- Burkart, R., Bárbaro N., Sanchez R. & Gómez D., 1999. *Ecorregiones de la Argentina*. Administración de Parques Nacionales / Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Argentina. 43 pp.
- Camilión, M.C., Manassero, M.J., Hurtado, M.A. & Ronco, A.R. 2003. Copper, Lead and Zinc distribution in soils and sediments of the South Western coast of the Río de la Plata estuary. *Journal of Soils Sediments*, 3(3), 213-20.
- Campbell, K.R., Bartell, S.M. & Shaw, J.L., 2000. Characterizing aquatic ecological risks from pesticides using a diquat dibromide case study. II. Approaches using quotients and distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 760-74.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., & Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere*, 68(4), 613-21.
- CASAFE, 2011. Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. En línea: <http://www.casafe.com.ar>. [Consultado el 05/08/11].
- Castillo Morales, G. (Ed), 2004. *Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* IDRC/IMTA, México, 202 p.

- Cisneros, F. 1995. *Control de Plagas Agrícolas*. Editorial Full Print. Lima, Perú. 313 pp.
- Colby, S.R., 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds*, 15(1), 20-24.
- Collen, B., Loh, J., Whitmee, S., McRae, L., Amin, R., & Baillie, J.E.M., 2009. Monitoring change in vertebrate abundance: the living planet index. *Conservation Biology*, 23(2), 317-27.
- CONICET, 2009. *Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente*. Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Buenos Aires, 133 pp.
- Connor, D.J. & Loomis, R.S., 2002. *Ecología de Cultivos*, Mundi-Prensa Libros, Madrid, 591 pp.
- Cox, C. & Sorgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives*, 114(12), 1803-07.
- Crossan, A.N. & Kennedy, I.R., 2008. Calculation of pesticide degradation in decaying cotton gin trash. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(4), 355-9.
- Crossland, N.O. & La Point, T.W., 1992. The design of mesocosm experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(1), 1-4.
- Cuppen, J.G.M., Crum, S.J.H., Van den Heuvel, H.H., Smidt, R.A. & van den Brink, P.J., 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: I. Fate of chlorpyrifos and lindane and responses of macroinvertebrates. *Ecotoxicology*, 11(3), 165-80.
- David, C.N., 1973. A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Development Genes and Evolution*, 171(4), 259-68.
- Day, K. & Kaushik, N.K., 1987. Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16(4), 423-32.
- Demetrio, P.M., Bulus Rossini, G.D., Bonetto, C.A. & Ronco, A.E., 2011. Effects of pesticide formulations and active ingredients on the coelenterate *Hydra attenuata* (Pallas, 1766). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(1), 15-9.
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science*, 56(6), 516-20.

- Di Marzio, W.D. Sáenz, M.E., Alberdi, J.L., Fortunato, N., Cappello, V., Montivero, C., & Ambrini, G., 2010. Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(9), 1907-17.
- Diamantino, T.C., Ribeiro, R., Goncalves, F. & Soares, A.M.V.M., 1997. METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance) for difficult substances. 4. Test chamber for cladocerans in flow-through conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1234-38.
- EASNE, 1973. Contribución al estudio geohidrológico del noreste de la provincia de Buenos Aires. I. Consejo Federal de Inversiones, Serie Técnica n°24, 114pp.
- ECOFRAM-USEPA, 1999. *Probabilistic Risk Assessment Tools for Pesticides*. Available at: <http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/ecofram/update.htm> [Accessed 2011].
- ECOTOX (ECOTOXxicology) Release 4.0, USEPA. En línea: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> [Consultado 12/07/11].
- El Atlas del medio ambiente: amenazas y soluciones, 2008. *Le Monde diplomatique*, Capital Intelectual, Buenos Aires, 100 pp.
- Fairchild, J.F., Point, T.W. & Schwartz, T.R., 1994. Effects of an herbicide and insecticide mixture in aquatic mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(4), 527-33.
- FAO, 2004. *Irrigation and Drainage Papers: Control of water pollution from agriculture*, Roma. En línea: <http://www.fao.org/docrep/W2598E/> [Consultado el 18/10/11].
- FAO, 2011. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2010-11*, Roma. En línea <http://www.fao.org/publications/sofa/es/>. [Consultado el 16/10/11].
- Farmer, D., Hill, I.R. & Maund, S.J., 1995. A comparison of the fate and effects of two pyrethroid insecticides (lambda-cyhalothrin and cypermethrin) in pond mesocosms. *Ecotoxicology*, 4(4), 219-44.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., & Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56(1), 13-32.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., & Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63(1), 43-63.



- Faust, M., Altenburger, R., Boedeker, W. & Grimme, L.H., 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 53(1), 134-41.
- Feijoó, C.S. & Lombardo, R.J., 2007. Baseline water quality and macrophyte assemblages in Pampean streams: a regional approach. *Water Research*, 41(7), 1399-410.
- Finizio, A., Villa, S. & Vighi, M., 2005. Predicting pesticide mixtures load in surface waters from a given crop. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 111(1-4), 111-118.
- Finney, D.J., 1971. Statistical method in biological assay. Cambridge University Press. London Ltd. 3<sup>o</sup> ed
- Forget, G., Sánchez-Bain, A., Arkhipchuk, V., Beauregard, T., Blaise, C., Castillo, G., Castillo, L. E., Díaz-Baez, M. C., Pica-Granados, Y., Ronco, A., Srivastava, R. C., & Dutka, B. J., 2000. Preliminary data of a single-blind, multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. *Environmental Toxicology*, 15(5), 362-69.
- Foster, S., Thomas, M. & Korth, W. 1998. Laboratory-derived acute toxicity of selected pesticides to *Ceriodaphnia dubia*. *Australasian Journal of Ecotoxicology*. 4(1),53-9.
- Franz, J.E., Mao, M.K. & Sikorski, J.A., 1997. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*, American Chemical Society. Washington, 678 p
- Friberg-Jensen, U., Wendt-Rasch, L., Woin, P. & Christoffersen, K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 357-71.
- García-Ortega, S., Holliman, P.J. & Jones, D.L., 2006. Toxicology and fate of Pestanal and commercial propetamphos formulations in river and estuarine sediment. *The Science of the Total Environment*, 366(2-3), 826-36.
- George, T.K., Liber, K., Solomon, K.R. & Sibley, P.K., 2003. Assessment of the probabilistic ecological risk assessment-toxic equivalent combination approach for evaluating pesticide mixture toxicity to zooplankton in outdoor microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(4), 453-61.
- Giddings, J.M., Hall, L.W. & Solomon, K R, 2000. Ecological risks of diazinon from agricultural use in the Sacramento-San Joaquin River Basins, California. *Risk Analysis*, 20(5), 545-72.
- Giesy, J.P., Solomon, K R., Coats, J R., Dixon, K R., Giddings, J M., & Kenaga, E.E., 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 160, 1-129.

- Giesy, J.P., Dobson S., & Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35-120.
- Gowing, D.P., 1960. Comments on Tests of Herbicide Mixtures. *Weeds*, 8 379–91.
- Greco, W.R., Bravo, G. & Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological reviews*, 47(2), 331-85.
- Grünwald, H.M., 2003. *Effects of a pesticide mixture on plankton in freshwater mesocosms – from single substance studies to combination impacts*. Tesis Doctoral En línea: <http://oekotox.wzw.tum.de/index.php?id=13>. Technische Universität München, 231 pp.
- Hadjispyrou, S., Kungolos, A. & Anagnostopoulos, A., 2001. Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 179-86.
- Hartman, W. & Martin, D.B., 1984. Effect of suspended bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(3), 355-61.
- Hill, J. R. 1985. Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. En: The pyrethroid insecticides (ed. Leahey, J.P.), Taylor & Francis, Londres. 162-62
- Hoagland, K.D., Drenner, R.W., Smith, J.D. & Cross, D.R., 1993. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(4), 627-37.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C. & Schulz, R., 2004a. Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3), 345-352.
- Jergentz, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R., 2004b. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 133-41.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C. & Schulz, R., 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817-26.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L. H., 2003. Toxicity of sulfonylurea herbicides to the green alga *Scenedesmus vacuolatus*: predictability of combination effects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(3), 585-93.

- Juraske, R., Antón, A. & Castells, F., 2008. Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models. *Chemosphere*, 70(10), 1748-55.
- Kathpal, T.S., Singh, A., Dhankhar, J.S. & Singh, G., 1997. Fate of Endosulfan in Cotton Soil under Sub-tropical Conditions of Northern India. *Pesticide Science*, 50(1), 21-27.
- Kennedy, I.R., Sánchez-Bayo, F., Kimber, S.W., Hugo, L., & Ahmad, N., 2001. Off-site movement of endosulfan from irrigated cotton in New South Wales. *Journal of Environmental Quality*, 30(3), 683-96.
- Kersting, K. & van Den Brink, P.J. 1997. Effects of the insecticide Dursban®4e (active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: Responses of ecosystem metabolism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(2), 251-59.
- Kersting, K. & van Wijngaarden, R., 1992. Effects of chlorpyrifos on a microecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(3), 365-72.
- Kikuchi, M., Sasaki, Y. & Wakabayashi, M., 2000. Screening of organophosphate insecticide pollution in water by using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(3), 239-45.
- Klaasseeen, C.D. (Ed).1996. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, México. 1275 pp.
- Krieger, R., 2010. *Handbook of Pesticide Toxicology, Two-Volume Set: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press; México 3° ed. 2000 p.
- Kungolos, A., Samaras, P., & Sakellaropoulos, G. P., 1997. Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities. En: Brebbia C.A. (Ed), *Water Pollution IV, Modelling, Measuring and Prediction*, 1997, WIT Press, Southampton, UK, 107-13.
- Kungolos, A, Aoyama, I. & Muramoto, S., 1999a. Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(2), 149-55.
- Kungolos, A., Samaras, P., Kipopoulou, A.M., Zoumboulis, A., & Sakellaropoulos, G.P., 1999b. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Science and Technology*, 40(1), 357-64.
- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiroidis, V. & Tsiropoulos, N., 2009. Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *The Science of the Total Environment*, 407(16), 4610-5.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A., Altstaedt, A., Zech, W., 2000. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. *Chemosphere*, 41(9), 1441-49.

- Laskowski, D.A., 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 174, 49-170.
- Maltby, L., Blake, N., M Brock, T.C. & van Den Brink, P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(2), 379-38.
- Marino, D. & Ronco, A., 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(4), 820-26.
- Martin, M.L. & Ronco, A.E., 2006. Effect of mixtures of pesticides used in the direct seeding technique on nontarget plant seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(2), 228-36.
- Matthews, G.A., 1984. *Pest Management*, Longman, New York, 645 pp.
- Maund, S.J., Hamer, M.J., Lane, M.C.G., Farrelly, E., Rapley, J.H., Goggin, U.M., & Gentle, W.E., 2002. Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1), 9-15.
- Mayer, F.L., Ellersieck, Mark R & Ellersieck, M R, 1986. *Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals.*, US Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service. Resource Publication 160, 63 pp.
- Mazanti, L., Rice, C., Bialek, K., Sparling, D., Stevenson, C., Johnson, W E., Kangas, P., & Rheinstein, J., 2003. Aqueous-phase disappearance of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(1), 67-76.
- Meikle, R.W., Kurihara, N.H. & DeVries, D.H., 1983. Chlorpyrifos: The photodecomposition rates in dilute aqueous solution and on a surface, and the volatilization rate from a surface. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(2), 189-93.
- Miljkovic-Licina, M., Gauchat, D. & Galliot, B., 2004. Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *BioSystems*, 76(1-3), 75-87.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and human well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, 139 p.
- Moore, M.T., Huggett, D.B., Gillespie, W.B., Rodgers, J.H., & Cooper, C.M., 1998. Environmental contamination and toxicology comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Archives of Environmental Contamination an Toxicology*, 34(2), 152-57.

- Moore, M.T., Schulz, R., Cooper, C.M., Smith, S., & Rodgers, J.H., 2002. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. *Chemosphere*, 46(6), 827-35.
- Mugni, H., 2009. *Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en aguas superficiales de cuencas rurales*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 164 pp.
- Mugni, H., Demetrio, P., Marino, D., Ronco, A., & Bonetto, C., 2010. Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in Pampasic surface waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(5), 524-528.
- Mugni, H., Demetrio, P., Bulus, G., Ronco, A., & Bonetto, C., 2011a. Effect of aquatic vegetation on the persistence of cypermethrin toxicity in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(1), 23-27.
- Mugni, H., Ronco, A. & Bonetto, C., 2011b. Insecticide toxicity to *Hyaella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 350-54.
- Munkegaard, M., Abbaspoor, M. & Cedergreen, N., 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology*, 17(1), 29-35.
- Natale, G. & Ronco, A., 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco: Anuros autóctonos. En *Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Agua 2003*, Cartagena de Indias, 36–39.
- Newcombe, R.G., 1998. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in medicine*, 17(8), 857-72.
- Newcombe, R. G. & Merino Soto, C., 1995. Intervalos de confianza para las estimaciones de proporciones y las diferencias entre ellas. *Interdisciplinaria*, 23(2), 141-54.
- Newman, M.C. & Unger, M.A., 2002. *Fundamentals of Ecotoxicology*, CRC Press, Boca Raton, 458 pp.
- Newman, M.C., Ownby, Mézin D.R., Powell L.C.A., Christensen D.C., Lerberg T.R.L., S.B., & Anderson, B.A., 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(2), 508–15.
- Odum, E.P. & Barrett, G.W., 2006. *Fundamentos de Ecología*, Thomson Editores, México. 598 pp.
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01), 31-43.

- PAN, 2011. Pesticide Action Network North America. En línea: <http://www.pesticideinfo.org> [Consultado 17/08/11]
- Papadakis, J., 1980. El suelo, con especial referencia a los suelos de América Latina. Editorial Albatros, Buenos Aires. 364 pp.
- Parodi, L. R., 1942. ¿Por qué no existen bosques naturales en la llanura bonaerense? *Revista del Centro de Estudiantes de la Facultad de Agronomía* de la Universidad de Buenos Aires. 30, 387-90.
- Pengue, W. A., 2000. *Cultivos Transgénicos. ¿Hacia dónde vamos?* Editorial Lugar. 190 pp.
- Pengue, W. A., 2006. Agua virtual, agronegocio sojero y cuestiones económico ambientales futuras. *Fronteras*, 5(5),14-25.
- Pereira, J.L., Antunes S.A., Castro B.B, Marques C.R., Gonçalves A.M.M., Gonçalves F, & Pereira R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18(4),455-63.
- Pérez, G.L., Torremorell, A., Mugni, H.,Rodríguez, P.,Vera, M.S., do Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J.,Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I.,Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D.P., & Zagarese, H., 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 17(8), 2310-22.
- Peruzzo, P.J., Porta, A. & Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61-66.
- Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A., & Siroski, P.a., 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 852-59.
- Posthuma, L., Suter, G.W., & Traas, T. 2002. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 616 pp.
- Punja, N., 1997. Regulations and risk assessments on the ecotoxicological impact from the use of plant protection products in the European Union-an industry viewpoint. *Archives of Toxicology Supplement*, 19, 177-85.
- Racke, K.D., Laskowski, D.A. & Schultz, M.R., 1990. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), 1430-36.

- Relyea, R., 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), 351-57.
- Relyea, R., 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2), 363-76.
- Relyea, R. & Jones, D.K., 2009. The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-08.
- Rickert, D. 1993. Water quality assessment to determine the nature and extent of water pollution by agriculture and related activities. In: *Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities*. Proceedings of the FAO Expert Consultation, Santiago, Chile, 20-23 October, 1992. Water Report 1. FAO, Rome. 171-94.
- Rico, A., Geber-Corrêa, R., Campos, P.S., Garcia, M.V.B., Waichman, A.V., & van den Brink, P.J., 2010. Effect of parathion-methyl on Amazonian fish and freshwater invertebrates: a comparison of sensitivity with temperate data. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 765-71.
- Rodrigues Capítulo, A., Gómez, N., Giorgi, A. & Feijoó, C., 2010. Global changes in pampean lowland streams (Argentina): implications for biodiversity and functioning. *Hydrobiologia*, 657(1), 53-70.
- Roman, G., Isnard, P. & Jouany, J., 1999. Critical analysis of methods for assessment of predicted no-effect concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(2), 117-25.
- Ronco, A., Sobrero, C., Grassi, V., Kaminski, L., Massolo, L., Mina, L., 2000. WaterTox bioassay intercalibration network: Results from Argentina. *Environmental Toxicology*, 15(4), 287-296.
- Ronco, A., Gagnon, P., Diaz-Baez, M C., Arkhipchuk, V., Castillo, G., Castillo, L.E., Dutka, B J., Pica-Granados, Y., Ridal, J., Srivastava, R.C., & Sánchez, A., 2002. Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program: Part 1, statistical analysis of blind sample testing. *Environmental Toxicology*, 17(3), 232-40.
- Ronco, A., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martin, M.L., Mugni, H., & Bonetto, C., 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region en Chen, J. & Guô, C., 2008. *Ecosystem Ecology Research Trends*, Nova Publishers, 209-39.
- Rüdel, H., 1997. Volatilization of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere*, 35(1-2), 143-52.
- Ruppert, E.E. & Barnes, R.D., 1995. *Zoología de los Invertebrados*, Mc-Graw-Hill Inteamericana, México, 6º edition, 1114 p.

- SAGPyA, 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación. En línea: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/> [Consultado el 06/08/11].
- Sala, J. M., Kruse, E. E., Rojo, A., Laurencena, P. & Varela, L. 1998. Condiciones hidrológicas en la Provincia de Buenos Aires y su problemática. *Publicación Especial V Jornadas Geológicas y Geofísicas Bonaerenses*, Mar del Plata, 1998. 1, 1-17.
- Satorre, E. H. 2005. *Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual*. Ciencia Hoy 15, 8-15.
- Schmuck, R., Pflieger, W., Grau, R., Hollihn, U., Fischer, R., 1994. Comparison of short-term aquatic toxicity: Formulation vs active ingredients of pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(2), 240-250.
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., & Grimme, L H., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 448-57.
- SENASA, 2011. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución 511/2011. En línea: <http://www.senasa.gov.ar/contenido> [Consultado el 10/12/11].
- Servizi, J., Gordon, R.W. & Martens, D.W., 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1), 15-22.
- Sibley, P.K., Chappel, M.J., George, T.K., & Solomon, K.R., 2000. Integrating effects of stressors across levels of biological organization: examples using organophosphorus insecticide mixtures in field-level exposures. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 7(2), 117-30.
- Siefert, R.E., Lozano, S.J., Brazner, J.C. & Knuth, M.L., 1989. Littoral enclosures for aquatic field testing of pesticides: effects of chlorpyrifos on a natural system. *Miscellaneous Publication Series Entomological Society of America*, 75, 57-73.
- Sobrero, C., Martin, M.L. & Ronco, A., 2007a. Phytotoxicity of the Roundup® Max herbicide on the non-target species *Lemna gibba* in field and laboratory studies. *Hidrobiológica*, 17(1), 31-9.
- Sobrero, M.C., Rimoldi, F. & Ronco, A.E., 2007b. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(5), 537-43.
- Solomon, K., Giesy, J. & Jones, P., 2000. Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment. *Crop Protection*, 19(8-10), 649-655.



- Solomon, K., & Sibley, P., 2002. New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin*, 44(4), 279-85.
- Solomon, K., & Thompson, D.G., 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical reviews*, 6(3), 289-294.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R. P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W.M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(1), 31-76.
- Solomon, K.R., Giddings, J.M. & Maund, S.J., 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), 652-59.
- Sprague, J.B. & Ramsay, B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper–zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 22(2), 425-32.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*, 4(1), 3-32.
- Starcevic, A., Akthar, S., Dunlap, W.C., Shick, J.M., Hranueli, D., Cullum, J., & Long, P.F., 2008. Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2533-37.
- Stay, F., Flum T., Shannon, L. & Yount, J. 1989. Assessment of the precision and accuracy of SAM and MFC microcosms exposed to toxicants. *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington, EPA/600/D-89/178, 189-203.
- Stenersen, J., 2004. *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, 276 pp.
- Stephenson, R.R., Choi, S.Y. & Olmos-Jerez, A., 1984. Determining the toxicity and hazard to fish of a rice insecticide. *Crop Protection*, 3(2), 151-165.
- Stephenson, R.R., 1982. Aquatic Toxicology of Cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquatic Toxicology*, 2(3), 175-85.
- Stratton, G.W., 1983. Interaction effects of permethrin and atrazine combinations towards several nontarget microorganisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(3), 297-303.
- Sutter, G.W. II., 1999. Developing Conceptual Models for Complex Ecological Risk Assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 5(2), 375-96.

- Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., & Forbes, V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 428-36.
- Tammes, P.M.L., 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 70(3), 73-80.
- Thornton, J., 2000. Beyond risk: an ecological paradigm to prevent global chemical pollution. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 6(4), 318-330.
- Traas T.P., van de Meent D., Posthuma L., Hamers T., Kater B.J., de Zwart D., Aldenberg T., 2002 en: Leo Posthuma, II, G.W.Suter. & Traas, T.P., 2002. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*, Lewis Publishers , Boca Raton, 315-44.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T. & Johnson, E.M., 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12(3), 265-71.
- Tsui, M.T.K. & Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-97.
- Tsui, M.T.K. & Chu, L.M., 2004. Comparative Toxicity of Glyphosate-Based Herbicides: Aqueous and Sediment Porewater Exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3), 316-23.
- United Nations, 2011. *World Population Prospects: The 2010 Revision*. En línea: <http://esa.un.org/wpp/Other-Information/faq.htm>. [Consultado el 15/10/11].
- USEPA, 1986. *Test methods for evaluating solid waste*. Vol I, Sec. B, Method 3500 (Organic Extraction and Sample Preparation), Method 3550 (Sonication extraction procedure) y Method 3620 (Clean-up procedure), SW-846, United States Environmental Protection Agency, Washington DC
- USEPA, 1993. Reregistration Eligibility Decision: Glyphosate. EAP-738-F-93-011, September 1993, Environmental Protection Agency, Washington, DC. En línea: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/old\\_reds/glyphosate.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/old_reds/glyphosate.pdf) [Consultado el 5/8/11].
- USEPA, 1994. *National Water Quality Inventory. 1992 Report to Congress*. En línea: <http://water.epa.gov/lawsregs/guidance/cwa/305b/index.cfm> [Consultado el 07/09/11].
- USEPA, 1997. *Policy for use of probabilistic analysis in risk assessment: guiding principles for Monte Carlo analysis*. En línea: <http://www.epa.gov/raf/publications/guiding-monte-carlo-analysis.htm> [Consultado el 16/09/11].

- USEPA, 1998. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*, Washington. En línea: <http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ECOTXTBX.PDF> [Consultado el 23/9/11].
- USEPA, 2002. Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos, Environmental Protection Agency, Washington, DC. En línea: [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/chlorpyrifos\\_ired.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/chlorpyrifos_ired.pdf) [Consultado el 02/08/11].
- USEPA, 2007. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Database System. Environmental Protection Agency. Version 4.0. En línea: <http://www.epa.gov/ecotox/> [Consultado el 18/10/11].
- van den Brink, P.J., Vandonk, E., Gylstra, R., Crum, S. & Brock, T. 1995, Effects of chronic low concentrations of the pesticides chlorpyrifos and atrazine in indoor freshwater microcosms. *Chemosphere*, 31(5), 3181-200.
- van den Brink, P.J., Roelsma, J., Van Nes, E.H., Scheffer, M., & Brock, T.C.M., 2002. Perpest model, a case-based reasoning approach to predict ecological risks of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2500-06.
- van den Brink, P.J., Crum, S.J.H., Gylstra, R., Bransen, F., & Cuppen, J.G.M., Brock, T.C.M., 2009. Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms: risk assessment and ecological effect chain. *Environmental Pollution*, 157(1), 237-49.
- van Straalen, N., 2002. Threshold models for species sensitivity distributions applied to aquatic risk assessment for zinc. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3-4), 167-172.
- van Vlaardingen, P.L.A. & Traas T.P., & Aldenberg, T., 2003. *ETX 2.0 A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data*, RIVM, Expert Centre for Substances, The Netherlands, 68 pp.
- van Wijngaarden, R. Leeuwangh, P., Lucassen, W.G., Romijn, K., Ronday, R., van Der Velde, R., & Willigenburg, W., 1993. Acute toxicity of chlorpyrifos to fish, a newt, and aquatic invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(5), 716-23.
- van Wijngaarden, R.P.A., Brock, T.C.M. & Douglas, M. T., 2005. Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems: the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. *Pest Management Science*, 61(10) 923-35.
- Vandervoort, C., Zabik, M.J., Branham, B. & Lickfeldt, D.W., 1997. Fate of Selected Pesticides Applied to Turfgrass: Effect of Composting on Residues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1), 38-45.

- Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., & Pizarro, H., 2010. New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710-21.
- Vighi, M., Altenburger, R., Arrhenius, Å., Backhaus, T., Bødeker, W., Blanck, H., Consolaro, F., Faust, M., Finizio, A., Froehner, K., Gramatica, P., Grimme, L.H., Grönvall, F., Hamer, V., Scholze, M., & Walter, H., 2003. Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2),139-150.
- Ware, G.W., 2004. *Pesticide Book*, Meister Pub Co,Edición en CD, 482 pp.
- Warne, M.S. & Hawker, D.W., 1995. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: the funnel hypothesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(1), 23-8.
- Wendt-Rasch, L., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 373-89.
- WHO, 1989. Environmental Health Criteria 82: Cypermethrin. World Health Organization. Geneva, Switzerland. En línea: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm> [Consultado el 12/11/08]
- WHO, 1994. Environmental Health Criteria 159: Glyphosate. World Health Organization. Geneva, Switzerland. En línea: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm> [Consultado el 19/11/08]
- WWF, 2010. *Living Planet Report*, World Wildlife Fund. 117 pp.
- Zar, J.H., 1998. *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall; New Jersey, 4º edición, 785 pp.
- Zhou, S., Duan, C., Michelle, W.H.G., Yang, F., & Wang, X., 2011. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *Journal of Environmental Sciences*, 23(4), 676-80.