

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀₋₉₆) DEL
GLIFOSATO ROUNDUP^R 747_{SG}, POR MEDIO DE BIOENSAYOS UTILIZANDO
ALEVINOS DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**CARMEN PATRICIA BARROS SANTIAGO
VILMAR ENRIQUE GAMEZ ROJAS**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C
2008**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀₋₉₆) DEL
GLIFOSATO ROUNDUP^R 747_{SG}, POR MEDIO DE BIOENSAYOS UTILIZANDO
ALEVINOS DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**CARMEN PATRICIA BARROS SANTIAGO
VILMAR ENRIQUE GAMEZ ROJAS**

**Tesis de Grado para Optar el Título de
Ingenieros Ambientales y Sanitarios**

**Director
PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
QUIMICO INDUSTRIAL
LIC. QUÍMICA Y BIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C
2008**

Nota de aceptación

Director

Jurado 1

Jurado 2

*A Dios, nuestro mayor guía, que con sus bendiciones
nos trajo hasta este punto convirtiéndonos cada día
en mejores personas dispuestas a seguir
aprendiendo y luchando por lo que queremos.
A nuestras familias por su apoyo incondicional, comprensión
y cariño a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.
A esas personas que con su amor hicieron posible este sueño
de culminar nuestra carrera y convertirnos en lo que hoy somos.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A nuestro director Pedro Miguel Escobar Malaver por sus sabios consejos, excelentes aportes y valiosas sugerencias a lo largo de la realización del proyecto. Por su dedicación, paciencia, tolerancia y acompañamiento durante esta etapa.

A Oscar Fernando Contenido por su ayuda, apoyo, colaboración, alegría y calidez en todo momento durante las pruebas necesarias para la realización de este proyecto. Por estar siempre ahí brindándonos una sonrisa y un gesto de amabilidad.

Al Ingeniero Camilo Guáqueta por ser una persona que siempre estaba ahí para ayudarnos a resolver cualquier problema por muy pequeño que fuera. Por sus valiosos consejos, entusiasmo, tolerancia y su acompañamiento durante toda la carrera.

A la Universidad de la Salle donde cursamos una carrera tan valiosa sin dejar a un lado las enseñanzas y valores y donde crecimos siendo mejores personas cada día. A todos los grandes profesores con los cuales tuvimos la fortuna de compartir nuestras inquietudes, metas, logros y fracasos. A todos ellos que nos guiaron cada día dándonos consejos a lo largo del camino.

Finalmente, a todos nuestros amigos y aquellas personas que de una u otra forma influenciaron nuestras vidas y creyeron siempre en nosotros.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	3
1.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. MARCO TEORICO	4
2.1. ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	4
2.1.1. Clasificación de los Ecosistemas de agua dulce	5
2.1.2. Clasificación de los organismos de los Ecosistemas acuáticos	6
2.1.3. Contaminación de los ecosistemas acuáticos	12
2.2. TRUCHA ARCOIRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	13
2.2.1. Anatomo-fisiología del <i>Oncorhynchus mykiss</i>	18
2.2.2. Morfología Interna	21
2.2.3. Calidad del agua	22
2.2.4. Temperatura del agua	23
2.2.5. El oxígeno	24
2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ROUNDUP ^R 747 _{SG} (GLIFOSATO)	24
2.3.1. Mecanismo De Acción	28
2.3.2. Biotransformación o metabolismo	29
2.3.3. Toxicidad y efectos indeseables	29
2.3.4. Tratamiento para la intoxicación con Glifosato Roundup 747	44
2.3.5. Destino ambiental	45

2.3.6. Impacto Faunístico	46
2.3.7. Vías de exposición en el suelo, el aire, el agua y otros medios	47
2.3.8. Distribución del herbicida	50
2.4. BIOENSAYOS	53
2.4.1. Bioindicadores (indicadores biológicos)	57
2.4.2. Tipos de bioensayos	59
2.4.3. Selección de Especies	62
2.4.4. Ensayos preliminares	64
2.4.5. Ensayo definitivo	65
2.4.6. Componentes de los ensayos de toxicidad	66
3. METODOLOGIA	72
3.1. FASE I. DISEÑO Y ACLIMATACIÓN	72
3.1.1. Diseño Experimental	72
3.1.2. Aclimatación y Mantenimiento	74
3.1.3. Alimentación	76
3.2. FASE II. PRUEBAS DE TOXICIDAD	79
3.2.1. Pruebas preliminares y definitivas	79
3.2.2. Pruebas preliminares de toxicidad con Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)	80
3.2.3. Pruebas definitivas de toxicidad con Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)	81
3.2.4. Pruebas preliminares de toxicidad con glifosato Roundup^R 747_{SG}	82
3.2.5. Pruebas definitivas de toxicidad con glifosato Roundup^R 747_{SG}	82
3.2.6. Obtención de Resultados	83

3.2.7. Análisis de Varianza para las Pruebas Toxicológicas	84
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	87
4.1. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO (K₂CR₂O₇)	87
4.2. ANÁLISIS DE VARIANZA	94
4.2.1. Análisis de varianza de las pruebas definitivas de sensibilidad dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)	94
4.3. ENSAYOS CON EL HERBICIDA AGRICOLA GLIFOSATO ROUNDUP^R 747_{SG}	95
4.3.1. Comparación de los Resultados	102
4.4. ANALISIS DE VARIANZA	103
4.4.1. Análisis de Varianza de las Pruebas Definitivas de Glifosato Roundup^R 747_{SG}	103
5. ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO TÉCNICO-AMBIENTAL ADECUADO DEL GLIFOSATO ROUNDUP^R747_{SG}	105
5.1. SUBESTIMACIÓN DEL IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A AGROTÓXICOS SOBRE LA SALUD HUMANA	105
5.2. MUCHOS RIESGOS SANITARIOS TODAVÍA SON DESCONOCIDOS	108
5.3. EFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA DE LA DERIVA DE AGROQUÍMICOS POR ASPERSIÓN AÉREA	109
5.4. LA LEGISLACIÓN VIGENTE NO REGULA LA MAYORÍA DE LA DISPERSIÓN EN EL AIRE QUE OCURRE POSTERIORMENTE A LAS APLICACIONES	110
5.5. EL PROGRESIVO EFECTO DEL GLIFOSATO	110
5.6. LOS CONTROLES DE LA DISPERSIÓN SON INEFICACES	112
5.7. REGULACIONES INTERNACIONALES DEL GLIFOSATO	113
5.8. PRÁCTICAS FRAUDULENTAS EN LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE PESTICIDAS POR PARTE DE LABORATORIOS CONTRATADOS POR LOS GOBIERNOS	120

5.9. SITUACIÓN ACTUAL DE COLOMBIA	123
5.9.1 La fórmula química utilizada	123
5.10. IMPACTO AMBIENTAL	124
5.11. EL IMPACTO NEGATIVO DE LAS FUMIGACIONES AÉREAS CON GLIFOSATO AL MEDIO AMBIENTE VULNERA LA CALIDAD DE VIDA Y DE SALUD DE LOS POBLADORES	126
5.12. ALTERNATIVAS	129
6. CONCLUSIONES	136
7. RECOMENDACIONES	139
BIBLIOGRAFIA	141
ANEXOS	146

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ventajas y Desventajas de las macrófitas	11
Tabla 2. Generalidades de la Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	14
Tabla 3. Anatomo-fisiología del <i>Oncorhynchus mykiss</i>	19
Tabla 4. Órganos fundamentales de la Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	20
Tabla 5. Características de las aguas apropiadas para <i>Oncorhynchus mykiss</i>	23
Tabla 6. Saturación de Oxígeno del agua dulce a varias temperaturas	24
Tabla 7. Plaguicidas utilizados en la erradicación de cultivos ilícitos	26
Tabla 8. Clasificación de la toxicidad aguda del glifosato y del Roundup según las vías de exposición	32
Tabla 9. NOEC de los estudios de toxicidad subcrónica del Glifosato y los efectos tóxicos correspondiente	34
Tabla 10. Estudio de toxicidad crónica realizados en ratas y ratones por diferentes instituciones	35
Tabla 11. NOEC de los estudios de toxicidad crónica de Glifosato y los efectos tóxicos correspondientes	36
Tabla 12. NOEC de los Estudios del desarrollo y la reproducción y los efectos tóxicos correspondientes para el Glifosato	39
Tabla 13. Clasificación de los bioensayos	60
Tabla 14. Comparación de las ventajas y desventajas que presentan las pruebas de toxicidad realizadas en el laboratorio y en el medio natural	62
Tabla 15. Grupos de organismos utilizados en bioensayos y su adaptabilidad al laboratorio según Henry (1988)	64
Tabla 16. Composición del alimento de los alevinos	77

Tabla 17. Carta de Control de Sensibilidad con Dicromato de Potasio y sus límites de confianza	88
Tabla 18. Comparación de los resultados de sensibilidad con Dicromato de potasio con otras investigaciones	90
Tabla 19. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de sensibilidad Dicromato de Potasio	95
Tabla 20. Carta de Control de Prueba de toxicidad para el Glifosato Roundup^R 747_{SG} y sus límites de confianza	97
Tabla 21. Registro fotográfico del comportamiento de los alevinos de trucha arcoíris en un rango de 1 p.p.m. y 10 p.p.m. de glifosato Roundup^R 747_{SG}	100
Tabla 22. Comparación de resultados	102
Tabla 23. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Glifosato Roundup^R 747_{SG}.	104
Tabla 24. Normatividad de varios países sobre el uso del Glifosato	113
Tabla 25. Comparación de resultados de los límites permisibles en diferentes países	116
Tabla 26. Comparación de las aseveraciones de Monsanto, con los hallazgos de las investigaciones independientes	122

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Grafica 1. Distribución de los valores de toxicidad para el Glifosato Roundup	43
Grafica 2. CL₅₀₋₉₆ del Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇)	92
Gráfica 3. Carta de Control de Prueba de toxicidad para el Glifosato Roundup^R 747_{SG}	98

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Clasificación de los organismos del ecosistema acuático	12
Figura 2. Morfología interna del <i>Oncorhynchus mykiss</i> con una división abdominal dorsal	22
Figura 3. Fórmula química del Glifosato	28
Figura 4. Modelo de bolas y enlaces	28
Figura 5. Modelo 3D del Glifosato	28

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	pág.
Fotografía 1. Boca de estuario con playas costeras, ecosistema acuático	13
Fotografía 2. <i>Oncorhynchus mykiss</i>	14
Fotografía 3. Alevino de Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) de 5 cm comiéndose otro alevino de 4 cm	16
Fotografía 4. Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	18
Fotografía 5. Presunto daño en animales domésticos.	47
Fotografía 6. Montaje de las pruebas de toxicidad	73
Fotografía 7. Adecuación previa de los acuarios	75
Fotografía 8. Traslado de los alevinos de Trucha Arcoíris en bolsas de polietileno.	76
Fotografía 9. Aclimatación de los alevinos antes de introducirlos a los acuarios	76
Fotografía 10. Introducción de los peces a los acuarios.	76
Fotografía 11. Mantenimiento de los acuarios.	78
Fotografía 12. Preparación de agua de dilución.	79

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Distribución de Herbicidas en el medio ambiente.	52
Diagrama 2. Capacidad que tienen los peces de concentrar los herbicidas.	53
Diagrama 4. Metodología para la determinación de la Concentración Letal Media CL_{50-96} del Glifosato Roundup^R 747_{SG} por medio de bioensayos utilizando alevinos de Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	86

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Cartas de control para las pruebas de sensibilidad con Dicromato de Potasio K₂Cr₂O₇

Anexo B. Cartas de control para las pruebas de Toxicidad Aguda con Glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Anexo C. Protocolo CETESB

Anexo D. Protocolo pruebas de toxicidad

Anexo E. Protocolo del Método Probit

Anexo F. Protocolo Análisis de Varianza - ANOVA

Anexo G. Registro de datos de la Prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) y Análisis Probit para el Dicromato de Potasio.

Anexo H. Graficas de los registros de datos de la prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) para el Dicromato de Potasio – Sensibilidad

Anexo I. Registro de datos de la prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) y Análisis Probit para el Glifosato Agrícola Roundup^R 747_{SG}.

Anexo J. Graficas de los registros de datos de la prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) para el Glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Anexo K. Registro de datos de la prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) y Análisis de Varianza para el Dicromato de Potasio.

Anexo L. Registro de datos de la prueba de Toxicidad Aguda con alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) y Análisis de Varianza para el Glifosato Agrícola Roundup^R 747_{SG}.

Anexo M. Sustancias tóxicas no combustibles

Anexo N. Datos de seguridad para el manejo del glifosato Roundup^R 747_{SG}.

GLOSARIO

ACLIMATACIÓN: es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. Se suele usar este término para referirse a procesos que ocurren durante un período de tiempo corto, como la vida de un organismo individual o grupo.

ADYUVANTE: ingrediente que se añade a una formulación en particular para aumentar la disponibilidad y eficacia del ingrediente activo. A menudo actúan aumentando la distribución, absorción e incorporación de los ingredientes activos.

AMPA: ácido aminoetilfosfónico.

ANOVA: En estadística, análisis de varianza (ANOVA). El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

BIOACUMULACIÓN: la acumulación de un compuesto en particular en ciertos tejidos corporales. Esto sucede cuando la tasa de incorporación excede la del metabolismo, o la de excreción, o ambas. Con el tiempo, esto origina una mayor concentración de la sustancia en el organismo que en su ambiente. Los factores importantes que controlan la magnitud de este proceso incluyen la solubilidad del compuesto en los lípidos y la facilidad con la que sea metabolizado.

BIOENSAYOS DE TOXICIDAD: permiten evaluar el grado de afectación que una sustancia química tiene en organismos vivos y éstos pueden ser agudos o crónicos.

CADENA TRÓFICA: también llamada cadena alimentaria, es la corriente de energía y nutrientes que se establece entre las distintas especies de un ecosistema en relación con su alimentación.

CARCINOGENICO: cualquier compuesto químico que puede originar la formación de lesiones cancerosas. Con frecuencia esto se logra por la formación de mutaciones genéticas de una o varias células lo cual resulta en la pérdida de la habilidad de regular su proliferación.

CONCENTRACIÓN EFECTIVA (CE_{50}): concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos.

CONCENTRACIÓN LETAL (CL_{50-96}): la concentración que es letal para el 50% de los organismos de prueba. Este valor generalmente se usa cuando se hace referencia a la toxicidad de una sustancia para los organismos expuestos a través de una matriz como el agua.

CONTAMINACIÓN AMBIENTAL: presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos. La contaminación ambiental es también la incorporación a los cuerpos receptores de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, o mezclas de ellas, siempre que alteren desfavorablemente las condiciones naturales del mismo, o que puedan afectar la salud, la higiene o el bienestar del público.

DESTINO AMBIENTAL: el movimiento, acumulación y desaparición de los compuestos químicos en el ambiente después de su liberación.

DOSIS LETAL 50 (DL_{50}): la dosis que es letal para el 50% de los animales de prueba. Este valor se usa cuando se hace referencia a la toxicidad de una sustancia para los organismos expuestos a una cantidad específica de una sustancia tal como la vía oral o por inyección.

ECOSISTEMAS ACUÁTICOS: son sistemas termodinámicamente abiertos que reciben del exterior (sol, materia orgánica) y las transmiten a los ecosistemas vecinos a través de los flujos de materias o los movimientos de individuos (migraciones).

ENSAYO DEFINITIVO: prueba diseñada para establecer la concentración a la cual se presenta el efecto final establecido. Los periodos de exposición son mayores que las pruebas preliminares y las de intervalo, se utilizan múltiples concentraciones a estrechos intervalos y múltiples réplicas.

ENSAYO PRELIMINAR: (Screrning): prueba para determinarse si se produce un impacto. Estas pruebas se diseñan utilizando una concentración, múltiples replicas y una exposición de 24 a 96 horas.

ENSAYOS DE TOXICIDAD: son bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico.

EPA: Environmental Protection Agency, Agencia de Protección del Ambiente (en los Estados Unidos, U.S. EPA).

GENOTÓXICO: describe a cualquier sustancia capaz de dañar el ADN originando mutaciones o el desarrollo de cáncer.

GLIFOSATO: es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo (N- fosfometilglicina). La fórmula empírica es C₃H₈NO₅P. Este es un polvo cristalino blanco e inodoro con un peso específico de 1,704, una presión de vapor muy baja y una solubilidad en agua alta. El glifosato es anfótero y se puede encontrar formando compuestos iónicos diversos, en función del pH del medio. Es un herbicida que actúa después del brote de manera sistémica y no selectiva, es de amplio espectro.

INGREDIENTE ACTIVO: el componente de una mezcla/formulación que es, en últimas, el responsable de los efectos fisiológicos.

LOEC: concentración experimental más baja de la sustancia en la que se observan efectos significativos respecto al grupo de control (LOEC, por sus siglas en inglés).

MUTÁGENO: cualquier sustancia o agente capaz de producir cambios en el ADN que subsecuentemente se transmiten a las células de futuras generaciones. Estos cambios pueden, a veces, llevar al desarrollo de cáncer o a cambios en las características del organismo.

NOEC: (Non Observed Adverse Effects Level) es el nivel de exposición experimental que representa el máximo nivel probado al cual no se observan efectos tóxicos o nocivos. Para el propósito de evaluación de riesgos éste es el dato clave que se obtiene de los estudios de Dosis-Respuesta. Si las exposiciones experimentales fueron intermitentes, se corrige el valor del NOAEL para que representen exposiciones continuas.

POEA: (polioxietileno amino) es un agente tensoactivo aniónico utilizado en la formulación de Visión^{MD} y de Roundup 747 en una proporción aproximada de 15%. Es un derivado de grasa animal conocido químicamente como un aminado graso polioxietileno.

p.p.m. (partes por millón): una medida de la concentración en la cual la proporción es tal que hay una parte del soluto por un millón de partes del solvente o de matriz.

PROBIT: modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.

PRUEBA DE TOXICIDAD: la determinación del potencial tóxico de una sustancia en particular, bajo condiciones específicas, en un grupo de organismos seleccionados.

SUBCRÓNICO: se refiere a un período de exposición repetida que usualmente es cercano al 10% de la expectativa de vida de un organismo.

TERATOGENESIS: es el desarrollo de un descendiente con malformaciones después de la exposición del feto a una determinada sustancia química nociva. Según la etapa de desarrollo en que suceda la exposición, se presentarán las diferentes anomalías del feto o el embrión.

TOXICIDAD AGUDA: el potencial de un compuesto para causar lesiones o enfermedades cuando se administra en dosis únicas o en dosis múltiples en un periodo corto (por ejemplo, 24 horas). Estos efectos se basan en los mecanismos de la acción química en la cual se pueden apreciar alteraciones fisiológicas poco después de su administración (por ejemplo, la muerte).

TOXICIDAD CRÓNICA: la naturaleza de los efectos adversos durante un tiempo prolongado de exposición química. Tales mediciones de los efectos pueden incluir la presentación de un cáncer o el retardo en el crecimiento.

TOXICIDAD SUBCRÓNICA: se refiere a efectos tóxicos que ocurren después de exposiciones repetidas (por semanas o meses). Usualmente este término se refiere a una exposición moderada en un período de tiempo moderado.

TOXICOCINÉTICA: La Toxicocinetica, es el estudio de los procesos que experimenta un tóxico en el organismo en función del tiempo, y comprende el seguimiento del tóxico a través del organismo hasta que es eliminado.

Los tóxicos a veces no se distribuyen de forma homogénea sino que se acumulan en determinadas zonas donde se metabolizan, para ser expulsados posteriormente en forma de metabolito.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL: Rama que estudia los efectos tóxicos producidos por los contaminantes ambientales sobre la atmósfera, sobre el agua, y el suelo, y también el efecto de los residuos tóxicos de los alimentos.

TOXICOLOGÍA: La toxicología es la ciencia que estudia el origen, naturaleza y propiedades de los tóxicos, su comportamiento cinético y sus efectos sobre los organismos vivos, las manifestaciones clínicas de la intoxicación la detección y cuantificación del TOXÓN, los procedimientos adecuados de prevención y tratamiento y las implicaciones médico-legales.

TRUCHA ARCOIRIS: salmónido que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande, puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas, que les permite aprisionar las presas capturadas.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la concentración letal media (CL_{50-96}) del Glifosato Roundup 747 por medio de bioensayos, exponiendo alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por un periodo de 96 horas. Estos organismos son excelentes bioindicadores ya que son organismos representativos de la cadena trófica y presentan alta sensibilidad a numerosos compuestos químicos que son introducidos al ecosistema acuático.

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioensayos de la Universidad de la Salle donde se realizaron las diferentes pruebas de toxicidad para la determinación de la CL_{50-96} .

El procedimiento utilizado para realizar dicha investigación contó con los siguientes pasos: compra de alevinos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (4 cm de largo y 35 días de nacidos), aclimatación del agua de los acuarios (10 días), aclimatación de los alevinos por un periodo de 15 días (alcanzar condiciones óptimas), preparación de las soluciones de prueba ó agua de dilución, obtención de la sensibilidad de la trucha empleando dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia (ensayos preliminares para determinar el rango aproximado en el que se encuentra la CL_{50-96} y definitivos para el dato exacto), preparación del montaje para pruebas de toxicidad, obtención de la CL_{50-96} del Glifosato Roundup^R 747_{SG}, aceptabilidad de los resultados y estimación de la concentración letal media.

Se utilizó el procedimiento que estableció CETESB (Compañía de Tecnología y Saneamiento ambiental de Sao Paulo, Brasil) para garantizar resultados confiables y se trabajó con programas estadísticos como el Probit y análisis de varianza para calcular los valores de CL_{50-96} y su intervalo de confianza. Al finalizar la investigación se pudo establecer que el valor de la CL_{50-96} del Glifosato Roundup^R 747_{SG}, con sus respectivos límites de confianza, osciló entre 0.6251 mg/L y 1.3881 mg/L presentando un valor promedio de 1.0066 mg/L.

Esta investigación se realizó con el fin de incluir los datos obtenidos de CL_{50-96} del Glifosato en el Decreto 1594 de 1984 y además de ello, plantear alternativas para el

manejo técnico-ambiental adecuado del Glifosato Roundup^R 747_{SG}, cuando sea empleado en las fumigaciones.

Palabras Claves: Concentración letal media, Alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Glifosato Roundup^R 747_{SG}, pruebas de Toxicidad (Bioensayos).

ABSTRACT

In this research was determined the lethal concentration average (LC₅₀₋₉₆) of Glyphosate Roundup^R 747_{SG} through bioassays, exposing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for a period of 96 hours. These organisms are excellent biological indicators because they are representative bodies of the food chain and show high sensitivity to numerous chemical compounds that are introduced to the aquatic ecosystem.

The investigation took place in the bioassays Laboratory of La Universidad de la Salle where the different toxicity tests were made in order to find the LC₅₀₋₉₆ of the Glyphosate.

The procedure to execute such research was the following: purchase of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (4 cm long and 60 days old), acclimatization of the water before introducing the fish (10 days), acclimatization of fish for a period of 15 days (to reach optimal conditions), preparation of test solutions or water dilution, obtaining the sensitivity of trout using potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) as toxic reference (preliminary and final tests), mounting of the toxicity testing, obtaining the LC₅₀₋₉₆ of Glyphosate Roundup^R 747_{SG}, acceptability of the results and estimation of the lethal concentration average.

We used the procedure established by CETESB (Company Technology and Environmental Sanitation of Sao Paulo, Brazil) to ensure reliable results, and worked with programs such as statistical analysis of variance and Probit to calculate the values of LC₅₀₋₉₆ and its confidence interval. At the end of the investigation we could establish that the value of the LC₅₀₋₉₆ of the Glyphosate Roundup^R 747_{SG} with its confidence interval oscillated between 0.6251 mg/L and 1.3881 mg/L, with an average value of 1.0066 mg/L.

This research was made in order to include data of LC₅₀₋₉₆ of Glyphosate in Decree 1594 of 1984 and in addition, raise alternatives for managing environmental and technical adequacy of Glyphosate Roundup^R 747_{SG}, when used in the spraying of coca plantations. Key words: Lethal concentration average, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Glyphosate Roundup 747, Toxicity tests (Bioassays).

INTRODUCCIÓN

Toda obra o actividad desarrollada por el hombre, independientemente de su finalidad, impacta en mayor o menor grado los componentes y sus interacciones en los ecosistemas que sean intervenidos. Es por esto, que para este proyecto de investigación se estudió el grado de afectación que tiene el Glifosato Roundup® 747_{SG} sobre alevinos de Trucha Arcoíris o Cabeza de Acero (*Oncorhynchus mykiss*), los cuales son actualmente tomados como indicadores biológicos de los ecosistemas acuáticos.

Uno de los principales problemas del recurso hídrico se debe a los resultados de las actividades humanas las cuales descargan contaminantes al agua sobre regiones extensas. Una vez utilizados los herbicidas éstos son arrastrados hasta los ríos por la lluvia y la erosión del suelo afectando considerablemente la vida acuática entre ella la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Con la presente investigación y el seguimiento realizado se evaluó la toxicidad del Glifosato Roundup® 747_{SG} determinando la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) del mismo con dicha especie con el fin de estudiar el comportamiento, los efectos y problemas específicos causados por este herbicida sobre el agua para idear métodos de preservación.

Los ensayos de toxicidad son los bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia contaminante sobre los mismos como lo fue en este caso la exposición de la Trucha Arcoíris o Cabeza de Acero (*Oncorhynchus mykiss*) a diferentes concentraciones de Glifosato Roundup® 747_{SG} debido a que esta especie es bioindicadora por ser sensible a cambios que se realizan en el medio donde se encuentran. Con dicha exposición, se busca determinar la Concentración Letal (CL₅₀₋₉₆) del Glifosato que produzca la muerte en el 50% de la población expuesta en ese lapso de tiempo (96 horas).

Este tipo de peces son muy buenos para detectar condiciones ambientales complejas, considerándolos como sensores de los cambios que operan en el medio. Se debe

considerar además que este tipo de pez es una fuente importante de proteínas y es una especie de gran valor económico y deportivo.

Esta investigación es de gran importancia ya que pretende crear pautas para agregar y tomar en cuenta en el Decreto 1594 de 1984, el valor de CL₅₀₋₉₆ del Glifosato Roundup® 747_{SG}. Este decreto establece la ejecución de pruebas de toxicidad de sustancias de interés sanitario incluyendo parámetros establecidos para la calidad del agua a nivel nacional y las entidades encargadas de realizar las pruebas de toxicidad para establecer valores de concentración letal media (CL₅₀₋₉₆). Esto reafirma la necesidad del uso de técnicas como esta para prever el impacto de agentes químicos sobre los organismos acuáticos.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) del Glifosato Roundup[®] 747_{SG}, por medio de bioensayos utilizando alevinos de Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la sensibilidad de los alevinos de Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestos al Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇).
- Determinar la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) del Glifosato Roundup[®] 747_{SG}, por medio de bioensayos exponiendo alevinos de Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Plantear alternativas para el manejo técnico-ambiental adecuado del Glifosato Roundup[®] 747_{SG}, cuando sea empleado en las fumigaciones de las plantaciones de coca.

2. MARCO TEORICO

2.1. ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Los ecosistemas acuáticos son el centro de interacción de un gran número de factores bióticos y abióticos que pueden ser modificados drásticamente. Estos ecosistemas incluyen las aguas de los océanos (ecosistemas marinos) y las aguas continentales dulces (ríos, lagos, pantanos y demás fuentes acuáticas) o saladas.

Los ecosistemas de agua pueden considerarse entre los más importantes de la naturaleza y su existencia depende totalmente del régimen que tengan.

Así, genéricamente, el montante, variaciones y regularidad de las aguas de un río son de gran importancia para las plantas, animales y personas que viven a lo largo de su curso. La fauna de los ríos es de anfibios como: canutillos, gusarapos, caracodillos, negrillos, mejillones, y truchas.

Los ríos y sus zonas de inundación sostienen diversos y valiosos ecosistemas, no sólo por la cualidad del agua dulce para permitir la vida, sino también por las numerosas plantas e insectos que mantiene y que forman la base de las cadenas tróficas. En el lecho de los ríos, los peces se alimentan de plantas y los insectos son comidos por las aves, anfibios, reptiles y mamíferos.

Acerca del agua dulce de los ríos, es preciso tener en cuenta que presenta una enorme variedad de composición. Como esta composición química depende, en primer lugar, de lo que el agua pueda disolver del suelo por el que discurre, o de los lugares a donde se dirige, es el suelo lo que determina la composición química del agua.

Si el suelo es pobre en sales y minerales solubles, también el agua será pobre en sales y minerales. Y, a la inversa, si el suelo es rico en materias químicas solubles, gran parte de su riqueza la cederá al agua, con lo cual ésta contendrá muchas más sales minerales.

Eso es determinante para los tipos de vida animal y vegetal que allí se pueda desarrollar.¹

Así, las principales adaptaciones de los animales y vegetales estarán directamente relacionadas con las características físicas del agua, ya que está permanentemente en contacto con los organismos que viven en este medio acuático.

En el caso de los ríos, se sabe que se producen diferencias a lo largo de su curso (alto, medio y bajo), ya que cada tramo presenta caudales, temperaturas y profundidades distintas. Sin embargo, también se ha determinado la existencia de dos comunidades superpuestas, las del fondo y la de las aguas libres. Aunque estas pueden cambiar a lo largo del curso del río¹.

El agua es mucho más densa que el aire, por tanto las dificultades estructurales de mantener un organismo grande en ella es mucho menor. En el agua se encuentran las ballenas y tiburones que son mucho más grandes que cualquier organismo terrestre. Esto es en gran parte la característica mas importante del agua que ha permitido la evolución de un estilo de vida como el plancton que no tiene ningún análogo en el aire. El agua, sin embargo, coloca limitaciones sobre sus habitantes lo que no ocurre en ecosistemas terrestres. Debido a la alta densidad y viscosidad que tiene el agua, es más difícil para un organismo moverse ya que debe intentar viajar rápidamente o mover las grandes cantidades del agua sobre sus agallas¹.

2.1.1. Clasificación de los Ecosistemas de agua dulce

Partiendo del movimiento del agua, se acuerda una división de los ecosistemas de agua dulce. Esta división tiene relevancia tanto para estudiar la naturaleza como para la explotación y gestión de las aguas interiores. Los ecosistemas de agua dulce se

¹ GRIMALDO V., Wilson Yesid. Determinación de la integridad ecológica de un ecosistema acuático con base en monitoreos biológicos. Vol. 2; pág. 25 – 33. Colombia 1998

pueden clasificar en tres: lenticos (lago, estanque, pantano, charcas), aguas corrientes o loticos (manantial, riachuelo (arroyo), río) y humedales.²

- **Ecosistema léntico:** es de agua quieta o de escaso caudal como en los lagos, estanques, pantanos y embalses.
- **Ecosistema lótico** (latín *lotus*: participio de *lavere*, lavar): sistema de agua corriente como en los ríos, arroyos y manantiales.
- **Ecosistema de humedal:** áreas donde el suelo está saturado de agua o inundado por una parte del año.

2.1.2. Clasificación de los organismos de los Ecosistemas acuáticos³

Los ecosistemas acuáticos son aquellos en los que los animales y plantas viven o se relacionan con seres vivos en el agua (ver figura 1). Las condiciones físicas y químicas dominantes en los medios acuáticos determinan el tipo de organismos que viven en ese medio. Se han propuesto varias clasificaciones ecológicas de los organismos acuáticos; la más aceptada hoy día es la que presentamos a continuación:

➤ **El Plancton**

Pertenecen al plancton los organismos que flotan o viven suspendidos a merced de los movimientos de las aguas, sin locomoción propia suficientemente fuerte para dirigir sus movimientos. El plancton compuesto por vegetales recibe el nombre de fitoplancton y el que está formado por animales se denomina zooplancton³.

El fitoplancton representa el primer eslabón de la cadena alimenticia; junto con las plantas superiores que habitan las aguas dulces, constituyen los organismos productores. Entre los grupos más importantes pertenecientes al fitoplancton citaremos las diatomeas, los dinoflagelados, las clorofíceas, las cianofíceas y las euglenofíceas. Muchas de las especies pertenecientes a las cianofíceas y clorofíceas son

² NARANJO, Luis Germán. Humedales de Colombia, bases técnicas para su conservación y uso sostenible. Instituto Von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Primera edición. Colombia 1999.

³ Elementos de Ecología. Ecología de las Aguas Dulces. <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh3.html>

filamentosas y en ciertas épocas del año proliferan de tal manera en las lagunas que la superficie adquiere una coloración verdosa, que es conocida como "espuma verde". Desde el punto de vista de producción y debido a que se distribuyen por toda la capa fótica, las diatomeas y dinoflagelados son los productores más importantes ya que producen la mayor cantidad de materia orgánica y son realmente los pilares fundamentales del ecosistema³.

El zooplancton está representado por especies de varios phila: protozoarios, celenterados, rotíferos, briozoarios y, sobre todo, por algunos grupos de crustáceos como los cladoceros, los copépodos y los ostracodos. Cabe citar también las larvas de muchos insectos, los huevos y larvas de peces. La mayoría de los organismos que pertenecen al zooplancton se alimentan de otros animales más pequeños. El zooplancton está compuesto, desde el punto de vista trófico, por consumidores primarios o herbívoros y consumidores secundarios.³

Se acepta generalmente con base a investigaciones bien fundadas, que las aguas tanto continentales como marinas de las regiones tropicales son menos productivas que las de regiones templadas o frías. Las razones que se aducen para explicar este hecho son las siguientes:

- a. Las temperaturas bajas retardan la acción desnitrificante de las bacterias y por esta razón los nitratos no son destruidos tan rápidamente y, al permanecer en el agua, son aprovechados por el fitoplancton para la producción de alimentos.
- b. Las temperaturas bajas retardan el metabolismo de los organismos ya que por la reducción de las actividades, el calor no se desperdicia por completo conservando la temperatura del cuerpo e induciendo reacciones lentas del metabolismo. Por lo tanto, éstos viven más tiempo, lo cual produce una acumulación de generaciones. En los trópicos, el metabolismo de los organismos es alto y, por tanto, su desgaste es mayor y como consecuencia viven menos tiempo.
- c. Se ha comprobado también que las aguas frías tienen mayor capacidad de saturación para el oxígeno que las aguas cálidas, lo cual contribuiría a una

mayor producción del fitoplancton. Esto se debe a que los organismos de aguas frías necesitan menos cantidad de oxígeno disuelto para realizar sus actividades por el bajo índice metabólico a temperaturas bajas.³

Con respecto a las especies que habitan las aguas dulces, se ha observado una característica muy peculiar es que la mayoría son cosmopolitas; por tanto, es frecuente encontrar algunas especies en latitudes y climas muy diferentes. Muchas especies de aguas dulces templadas se encuentran en aguas dulces tropicales. Los grupos de seres vivos que presentan especies con mayor grado de cosmopolitismo son: las diatomeas, los dinoflagelados, las clorofíceas, los protozoarios y los copépodos³.

➤ El Bentos

Los organismos del bentos viven en el fondo de los ecosistemas acuáticos. Las comunidades del bentos se caracterizan por ser muy ricas en especies y formas; prácticamente están representados casi todos los phylla.³

Allí donde la luz alcanza el fondo, lo que depende de la profundidad y de la transparencia del medio, la comunidad incluye productores primarios fotosintetizadores (Ver figura 1). En el medio afótico (sin luz) de los fondos más profundos, todos los organismos son consumidores, dependiendo el conjunto de los restos orgánicos y microorganismos que la gravedad arrastra desde niveles más superficiales⁴.

Las comunidades bentónicas más productivas y de mayor biodiversidad, también probablemente las más amenazadas, son los arrecifes de coral. La desorganización y empobrecimiento de las comunidades bentónicas por ciertas artes de pesca, como las redes de arrastre, están entre los mayores problemas ambientales.

Muchos taxones (grupos biológicos) notables están especializados para su residencia en el bentos. El filo entero de los equinodermos (estrellas y erizos de mar), por ejemplo, está constituido por formas bentónicas. También los pulpos o las sepias entre los cefalópodos, y la clase bivalvos entre los otros moluscos. Muchos organismos del

⁴ Relaciones entre el macrobentos y el sustrato. <http://www.biologiamarina.com/dev/projects/bentos.asp>.

bentos se desplazan muy poco, por ejemplo las almejas o las anémonas de mar, otros son directamente sésiles (fijos) como las ostras, los corales o las algas coralinas (un grupo de algas rojas).

➤ **El Necton**

Pertenecen al necton todos los organismos que nadan libremente en el agua por poseer un sistema de locomoción eficiente, que les permite trasladarse de un punto a otro. Pueden recorrer largas distancias y, en algunos casos, en contra de los movimientos del agua o de las corrientes (Ver figura 1).

La zona litoral es rica en especies nectónicas; frecuentemente esta diversidad de especies va acompañada de gran abundancia de individuos. Los peces abundan en esta zona aunque se trasladan también por la zona limnética y la profunda, si las condiciones de vida son favorables. Entre los vertebrados que frecuentan o habitan el litoral encontramos las ranas, salamandras, tortugas y serpientes de agua. Entre los invertebrados que forman el necton tenemos los insectos (larvas y adultos) y los crustáceos.⁴

➤ **El Neuston**

En la superficie de las aguas dulces, principalmente en aguas lénticas o estancadas, viven o se trasladan por la película superficial algunas especies, principalmente de especies, entre los cuales se encuentran los escarabajos (Coleópteros), arácnidos y algunos hemípteros de las familias Gerridae, Veliidae y Hebridae (Ver figura 1). Existen otros organismos que flotan contra la cara interna de la película superficial, constituyendo el infraneuston. A éste pertenecen la Hydra común, las planarias, larvas de insectos, algunos moluscos acuáticos, ostracodos y cladoceros.⁴

➤ **Plantas acuáticas (Macrófitas)**

Constituyen formas macroscópicas de vegetación acuática. Comprenden las macroalgas, las pteridofitas (musgos, helechos) adaptadas a la vida acuática y las angiospermas.

Presentan adaptaciones a este tipo de vida tales como: cutícula fina, estomas no funcionales, estructuras poco lignificadas.⁵

Teniendo en cuenta la morfología y fisiología, las macrófitas pueden clasificarse según la forma de fijación en:

Macrófitas fijas al sustrato⁵

- ✓ Macrófitas emergentes: en suelos anegados permanentes o temporalmente; en general son plantas perennes, con órganos reproductores aéreos.
- ✓ Macrófitas de hojas flotantes: principalmente angiospermas; sobre suelos anegados. Los órganos reproductores son flotantes o aéreos.
- ✓ Macrófitas sumergidas: comprenden algunos helechos, numerosos musgos y carófitas y muchas angiospermas. Se encuentran en toda la zona fótica (a la cual llega la luz solar).

Macrófitas flotantes libres: presentan formas muy diversas desde plantas de gran tamaño con roseta de hojas aéreas y/o flotantes y con raíces sumergidas bien desarrolladas a pequeñas plantas que flotan en la superficie, con muy pocas raíces o ninguna. Los órganos reproductores son flotantes o aéreos pero muy raramente están sumergidos⁵.

Las ventajas y desventajas que presenta la presencia de macrófitas se muestran a continuación en la Tabla 1:

⁵ MARGALEF, R. *Ecología*. Omega, Barcelona. Pág. 951, año 1991

Tabla 1. Ventajas y Desventajas de las macrófitas

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Pueden utilizarse para alimentación humana, del ganado, de peces y otros animales acuáticos.	Fuente de vectores propagadores de enfermedades y plagas.
Pueden ser utilizadas como fertilizantes.	Favorecen la ausencia de oxígeno en el cuerpo de agua.
Pueden usarse para purificación del agua.	Producen sombra a plantas sumergidas y algas que liberan oxígeno por fotosíntesis.
Uso medicinal y cosmetológico.	Acumulan materia orgánica en general en el sedimento, volviéndolo anóxico.
Fuente de producción de biogas.	Problemas en represas, en puentes y obras por acumulación ya que ejercen presión sobre estas obras pudiendo peligrar su infraestructura.

Fuente: MARGALEF, R. *Ecología. Omega*, Barcelona. Pág. 951, año 1991

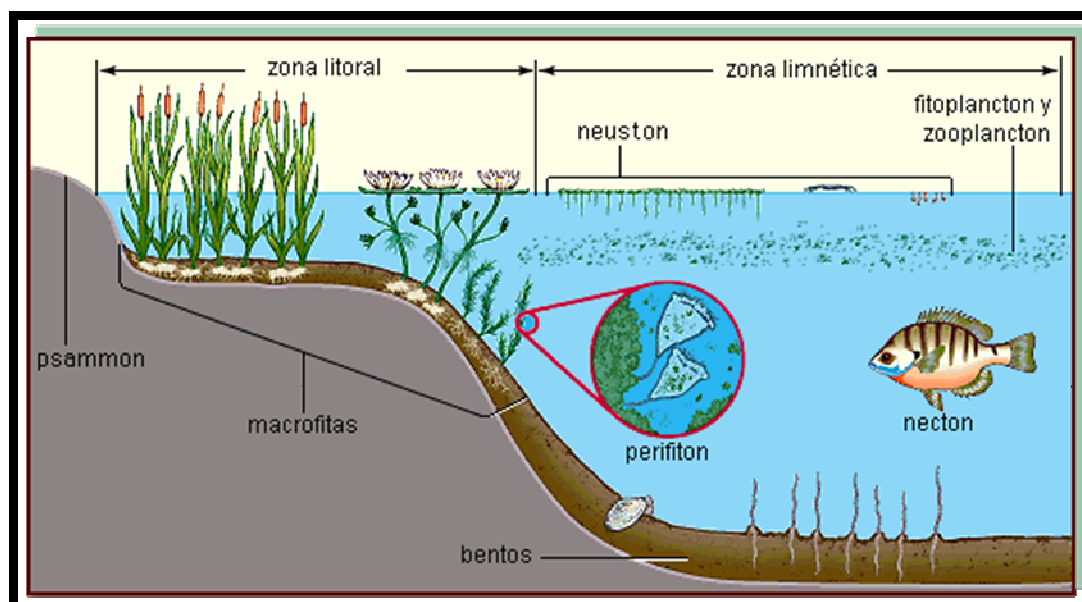
➤ Perifiton

Comunidad de microorganismos acuáticos que se adhieren a plantas enraizadas, objetos sumergidos anexados o a sustratos sólidos sumergidos (Ver figura 1). Forman una película incrustante creciente a medida que prosperan y suelen transformarse en un problema para los acuarios. Comprenden una gran variedad de especies: algas de todo tipo, bacterias, cianobacterias, protozoos, etc.⁶

El perifiton es reconocido como la biomasa flotante de los cuerpos de agua continentales, permanentes o temporales. Su composición biológica es muy compleja. Sin embargo, las algas son su principal componente y constituyen el sustrato de la comunidad bacteriana y un nicho ecológico para protozoarios y microcrustaceos, entre otros organismos⁶.

⁶ ANAYA, Ana Luisa. El Perifiton de la Reserva de "El Edén", Quintana Roo, México: Un Biomejorador Potencial en la Agricultura. UNAM, Instituto de Fisiología Celular. México 1997

Figura 1. Clasificación de los organismos del ecosistema acuático



Fuente: Elementos de Ecología. Ecología de las Aguas Dulces 2da. Parte
<http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>

2.1.3. Contaminación de los ecosistemas acuáticos

El crecimiento de la población a nivel mundial ha incrementado los niveles de contaminación. Esta contaminación está relacionada con el vertido de agua de desecho de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua, incorporación de microorganismos y productos químicos. Estas materias deterioran la calidad del agua y la hacen inútil para los usos pretendidos. Como alternativa a estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se puedan identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos.⁷

El diagnóstico y posterior recuperación de las fuentes de agua naturales contaminadas, debe hacerse además, teniendo en cuenta las implicaciones que en términos ecológicos y sanitarios representa la degradación del recurso.⁸ En este trabajo de

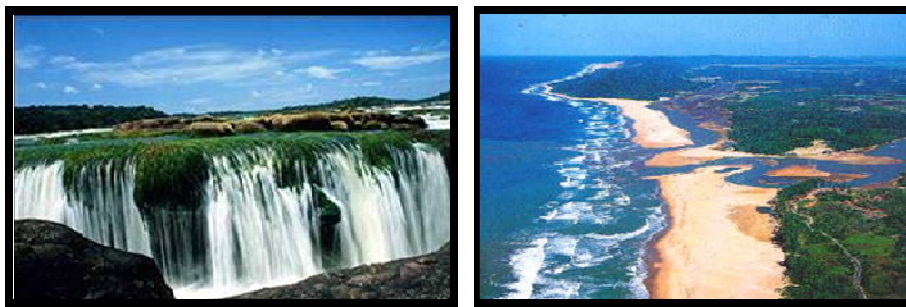
⁷ CURTIS, Helena. Biología 6ª Edición en español. Editorial Panamericana, Buenos Aires - Argentina. Pág.1405. Año 2001.

⁸ ARCOS PULIDO, Mireya del Pilar, ÁVILA DE NAVIA, Sara Lilia. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. División de Investigaciones, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca pág. 69 y71 año 2005.

investigación se utilizó los principales bioindicadores de contaminación y su significado en la evaluación de la calidad del agua.

La determinación de la calidad del agua se fundamentó principalmente en análisis fisicoquímicos y bacteriológicos. Hoy en día, en los países desarrollados se han venido implementando sistemas de evaluación de la calidad del agua con base en la investigación biológica de los macroinvertebrados en el agua, los cuales han demostrado su utilidad para establecer los niveles de contaminación de las fuentes acuáticas y planear, entonces, estrategias para la recuperación de las mismas.⁹

Fotografía 1. Boca de estuario con playas costeras, parte de un ecosistema acuático.



2.2. TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Trucha es el nombre común dado a varias especies de peces de agua dulce pertenecientes a la familia del salmón, *Salmonidae*. La trucha arcoíris o cabeza de Acero (*Oncorhynchus mykiss*) presenta cuerpo alargado, fusiforme y cabeza que termina en una boca grande puntiaguda hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas que le permiten aprisionar las presas (ver Fotografía 2). *Oncorhynchus* significa nariz ganchuda, característica que se manifiesta con mayor énfasis en los machos en la época de reproducción. A continuación en la Tabla 2 se dan a conocer las generalidades de la trucha arcoíris¹⁰:

⁹ ROLDÁN PÉREZ, Gabriel Alfonso. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia. Uso del método BMWP/Col. 2006

¹⁰ GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. SOTO RAMOS, Delfina. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. Año 2002. (http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/trucha_arcoiris/trucha_arco.htm)

Tabla 2. Generalidades de la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
FAMILIA	<i>Salmonidae/Salmoninae</i>
ORDEN	<i>Salmoniformes</i>
CLASE	<i>Actinopterígios</i> (peces con aletas radiadas)
PESO MÁX	10 kg
LONGITUD MÁX	70 cm
LONGEVIDAD	10 años

Fuente: Investigación de campo. Escuela José María Morelos. Michoacán, México. Año 2002.

Fotografía 2. *Oncorhynchus mykiss*



Todos los peces llamados propiamente trucha son miembros de la subfamilia *Salmoninae*, pero el nombre se usa específicamente para peces de tres géneros de dicha subfamilia: *Salmo*, que incluye las especies Atlánticas, *Oncorhynchus* que incluye las especies del Pacífico, y *Salvelinus*¹⁰.

Las truchas se encuentran normalmente en aguas frías y limpias de ríos y lagos y se encuentran distribuidas a lo largo de Norteamérica, el norte de Asia y Europa. Varias especies de trucha fueron introducidas en el siglo XIX en la Patagonia Chilena y en la Patagonia Argentina, Australia y Nueva Zelanda por pescadores aficionados, desplazando a los peces autóctonos¹⁰.

Las aletas de las truchas carecen de espinas, y todas las especies tienen una pequeña aleta adiposa en el lomo, cerca de la cola. Las poblaciones aisladas presentan diferencias morfológicas. Sin embargo muchos de estos grupos no muestran divergencias genéticas significativas, por lo que los ictiólogos los consideran como simples variedad de un número de especies mucho menor¹¹.

No se sabe exactamente la velocidad que pueden alcanzar estos salmónidos, existen referencias antiguas de que su velocidad podría alcanzar la velocidad del sonido (340 m/s), no obstante es un dato que supone un misterio por la dificultad para calcularlo en su hábitat natural.

La mayoría de las truchas sólo se encuentran en agua dulce, pero unas pocas, como la cabeza de acero (o steelhead) (*Oncorhynchus mykiss*), que es la misma especie que la trucha arcoíris, pasa su vida adulta en el océano y vuelve a desovar en el río donde nació. Este fenómeno recibe el nombre de reproducción anádroma y se observa también en el salmón. La trucha generalmente se alimenta de invertebrados blandos como las lombrices, o de insectos y crustáceos, aunque las especies más grandes de trucha marrón o café comen otros peces¹¹.

Es un animal que lucha tenazmente cuando se lo pesca con caña, por lo que son muy cotizadas para la pesca deportiva. Por su popularidad son criadas a menudo en piscifactorías y posteriormente reintroducidas en los ríos para su pesca. Los principales métodos de captura involucran el uso de mosca o cucharilla.

Entre las diferentes especies de truchas se encuentran: la trucha marrón (*Salmo trutta*), trucha marrón (*Salmo fario*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha dorada (*Oncorhynchus mykiss aguabonita*), trucha degollada Lahontan (*Oncorhynchus clarki henshawi*) y trucha degollada Bonneville¹¹.

¹¹GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. SOTO RAMOS, Delfina. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. Año 2002. (http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/trucha_arcoiris/trucha_arco.htm)

En granjas pueden llegar a alcanzar un tamaño promedio de 40 a 60 cm. Aunque algunas son un poco más grandes y su peso puede ser de 300 a 400 gr., las hay hasta de 2 kg. y tienen un promedio de vida 1 a 3 años.

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que vive en río o arroyo, puede llegar a medir de 50 a 90 cm. de largo, adquirir un peso hasta de 15 kg. y alcanzar un promedio de vida de 5 años.

Es un pez hábil, fuerte e inteligente, su carne tiene un alto valor nutritivo, es muy higiénica ya que no puede vivir en aguas contaminadas y con falta de oxígeno¹¹.

El *Oncorhynchus mykiss* que vive en los ríos, arroyos y lagunas que nacen de las montañas, se comen unos a otros, siendo las víctimas los más pequeños que existen en el medio como se puede comprobar en la Fotografía 3 tomada en el laboratorio de bioensayos de La Universidad de la Salle durante una de las pruebas.

Fotografía 3. Alevino de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de 5 cm comiéndose otro alevino de 4 cm



Fuente: Los Autores 2008

Para la reproducción de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se desovan las hembras las cuales pueden producir de 2500 a 5000 huevecillos, éstos se depositan en las incubadoras donde posteriormente son regados por el semen del macho. Permanecen en las incubadoras hasta que alcancen un mes de edad, durante el cual

crecen y se desarrollan a un tamaño aproximado de 2 a 3 cm. A estas pequeñas larvas se les llama alevines o alevinos¹¹.

La trucha de río se reproduce a finales del invierno e inicios de la primavera, durante los meses de enero a marzo, desovando en torrentes poco profundos, de fondo gravoso y aguas claras, en los que la hembra excava nidos característicos. El crecimiento es rápido y depende de la temperatura de las aguas y del alimento disponible.

La trucha que es criada en granja tiene un promedio de vida de 2 a 3 años. La trucha de arroyo puede llegar a vivir hasta 5 años¹¹.

Por naturaleza, es un animal que se encuentra en constante movimiento dentro del agua. Cuando el agua queda estancada y no corre o llega a estar sucia, se notan intranquilas y saltan constantemente, lo que les puede ocasionar rozaduras en el cuerpo y maltratar su carne¹¹.

En su medio natural las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se desarrollan en pequeños lagos cristalinos, y una vez llegada su edad reproductiva remontan los riachuelos en contracorriente hasta que logran arribar a pequeños remansos de paz propicios para colocar sus huevos, y después morir, aportando al río los nutrientes de su cuerpo.

El agua en que habitan llega a tener temperaturas de 5 a 18 °C. Estos seres tienen una gran capacidad de adaptación, de ahí que puedan soportar temperaturas frías o templadas¹¹.

Las truchas no pueden pasar mucho tiempo sin estar en agua limpia, oxigenada y corriente, y quizá esa sea una de las causas de su extraordinario poder alimenticio: es imposible encontrar en ellas toxinas o contaminantes, ya que se desarrollan sólo en aguas frescas de manantial; inclusive cuando alguna sustancia extraña se agrega al agua, por ejemplo pesticidas, simplemente la trucha muere.

Es una especie que tiene un alto índice de reproducción puesto que es cultivada por el hombre. Cuando están en criadero, se les ponen separadores para dividirlos en diferentes etapas, según su tamaño, se procura que el agua tenga suficiente corriente, para que así, esté muy bien oxigenada, no debe haber ningún foco de contaminación y se les tiene que dar una comida especial para que crezcan lo suficiente¹¹.

Cuando la trucha arcoíris vive libre, se adapta muy fácil, en cualquier lugar que viva, su reproducción es muy rápida y continua, lo único que hay que evitar es la contaminación del agua y asegurarnos de que tengan suficiente oxigenación.

Fotografía 4. Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)



Fuente: GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. SOTO RAMOS, Delfina. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. Año 2002.

2.2.1. Anatomo-fisiología del *Oncorhynchus mykiss*

A continuación en la tabla 3 se describe la anatomía y fisiología de la Trucha arcoíris de una manera general con las principales características.

Tabla 3. Anatomo-fisiología del *Oncorhynchus mykiss*

ANATOMIA Y FISILOGIA	CARACTERISTICA
Esqueleto	La trucha tiene un esqueleto óseo, siendo la columna vertebral el eje del cuerpo presentando de 28 a 29 vértebras firmemente unidas mediante tejido conectivo; así la columna puede ser fácilmente curvada. Los peces poseen unas costillas intramusculares falsas, y minúsculos huesecillos en forma de “Y” que son las que nos causan dificultad al comer pescado.
Respiración¹²	<p>El agua contiene solamente alrededor del 5% de la cantidad de oxígeno que hay disponible en el aire. Por lo tanto el aparato respiratorio de los peces se ha adaptado para ser más eficiente. El órgano principal son las branquias o agallas. Están formadas por unas laminillas cubiertas por un fino epitelio por el cual se produce el intercambio gaseoso; la toma de oxígeno y la eliminación de dióxido de carbono.¹²</p> <p>Las branquias de la trucha consisten en dos conjuntos de cuatro arcos branquiales protegidas por el opérculo. El flujo de agua a las branquias es continuo y unidireccional, establecido por un sistema de bombeo. El resultado es que agua entra por la boca y sale por el opérculo pasando a través de las branquias, donde se produce el intercambio gaseoso.¹²</p>
Sistema circulatorio	<p>El corazón bombea sangre hacia las branquias para su oxigenación y de ahí va por los capilares a los tejidos. La sangre venosa retorna al corazón el cual consta de tres cámaras, el seno, la aurícula y el ventrículo¹².</p> <p>El principal producto residual de la trucha es el amoniaco, que es eliminado por las branquias así como el anhídrido carbónico (CO₂). Otras partes más pequeñas de sustancias nitrogenadas y otros productos degradados son filtrados por el riñón¹².</p> <p>El riñón es un órgano oscuro alargado, colocado por debajo de la espina dorsal y por encima de la vejiga natatoria. Del riñón salen los uréteres por lo que es conducida la orina hacia la vejiga urinaria y de ahí al seno urogenital. Para los peces de agua dulce el riñón es muy importante, ya que por ellos se elimina el exceso de agua¹².</p>
Sistema nervioso	El cerebro y la medula espinal están encerrados dentro del cráneo y de la columna vertebral, respectivamente. La organización del sistema nervioso es similar a la de los mamíferos: con un sistema central, periférico y autónomo ¹² .

¹² Anatomía Y Fisiología De La Trucha. <http://www.revistaaquatic.com/asociaciones/PirineosPesca/docs/anatomia.pdf>

En la tabla 4 se presenta de manera muy general los principales órganos de los sentidos con los que cuenta este tipo de pez y sus características principales (Tabla 4).

Tabla 4. Órganos fundamentales de la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

ÓRGANO	CARACTERÍSTICAS
Vista	Órgano sensorial más importante. La trucha tiene los ojos a los lados de la cabeza facilitando la detección de los depredadores en un amplio radio. El enfoque esta producido por un mas o menos acercamiento del cristalino a la retina. Los pescadores se interesan, por la extensión en la cual los objetos aéreos y terrestres pueden ser vistos por el pez cuando se encuentran bajo el agua. El grado de distorsión aumenta conforme el horizonte se acerca ¹² .
Visión y colorido	El pigmento oscuro de las células de la piel de la trucha se halla bajo el control de la vista, de manera que la trucha es capaz de cambiarlo en cierta medida y fabricar su propio matiz. Estas variaciones de coloración, dependen de diferentes cantidades de pigmentos negros, rojos y blancos. Los peces ciegos sin importar su localización son siempre oscuros. Las pintas rojas, así como la coloración asalmonada de la carne son características de truchas que tienen en su dieta crustáceos y caracoles en gran proporción, ya que tienen un alto contenido en carotenos ¹² .
Oído	El oído de la trucha se encuentra completamente en el interior del cráneo conectado con el órgano del equilibrio. Gracias a las propiedades del agua como un gran medio de transmisión del sonido, hace que los salmónidos puedan oír sin necesidad de que el oído este conectado con el medio exterior como ocurre con las orejas de los mamíferos. Así como este pez escucha los sonidos, también los emite ¹² .
Línea lateral	Es un sentido exclusivo de los peces. Sirve para detectar pequeños cambios de la presión del agua causada por los objetos circundantes. La línea lateral es un sistema de poros unidos entre si por una red de pequeños canales situados bajo la superficie del cuerpo a lo largo del costado. Cuando el pez se desplaza, el agua se mueve. La ola de presión refleja la ausencia de obstáculos y retorna al pez. Es una manera que tiene el pez para evitar obstáculos y encontrar comida. Es un sentido muy importante cuando el agua esta turbia y la visión es imposible ¹² .
Olfato	La trucha posee dos orificios nasales en el morro, a través de los cuales posee un olfato muy fino. El agua tiene en disolución multitud de sustancias, que gracias a los movimientos de natación y respiración pasan a través de dichos orificios. Se estimula el epitelio olfativo, pasando este impulso al cerebro ¹² .
Gusto¹³	Estos peces son capaces de distinguir los cuatro sabores básicos; dulce, salado, ácido y amargo. Se han encontrado células gustativas en la boca y sus alrededores aunque hay especies que tienen incluso en la piel y pueden percibir la composición química del agua. Esto es muy importante para los peces migradores como el salmón que sigue los gradientes de olor, reconociendo el de su río natal a donde se dirige para desovar. ¹³

Fuente: Los Autores, 2008

¹³ Anatomía Y Fisiología De La Trucha. <http://www.revistaaquatic.com/asociaciones/PirineosPesca/docs/anatomia.pdf>

2.2.2. Morfología Interna¹⁴

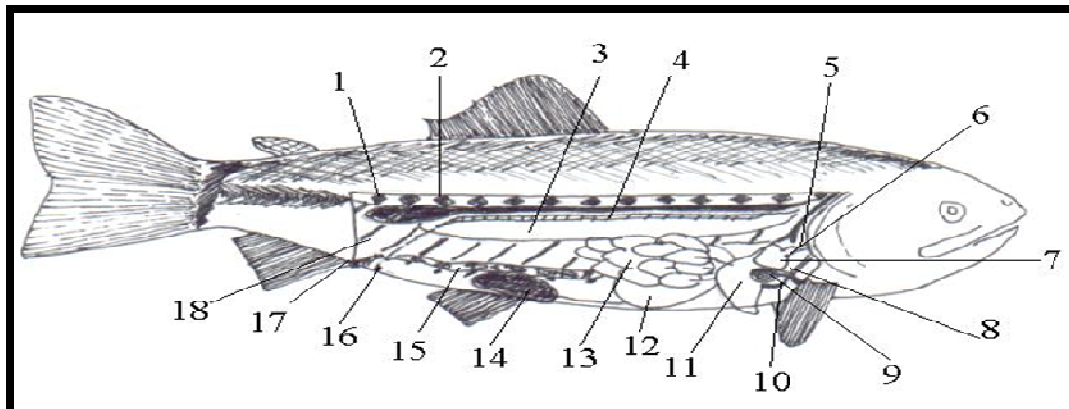
El sistema digestivo de los peces consta, por lo general, de una boca dotada de hileras de dientes afilados o en forma de cepillo, una faringe, un esófago, un estómago y un intestino que termina en un orificio anal (Ver figura 2). Los diferentes órganos que componen el sistema digestivo no están diferenciados con claridad en todas las especies, aunque todas ellas tienen páncreas e hígado.¹⁴

El intestino también tiene muchas variaciones. En los peces exclusivamente carnívoros - como la trucha - es acortado; pero es muy alargado y con muchos dobleces en los peces exclusivamente herbívoros.¹⁴

El hígado de los peces es muy grande con relación al cuerpo, normalmente es de color café rojizo. La función principal de este órgano es eliminar las toxinas del cuerpo y los elementos extraños que puedan afectar al pez. Además del papel que juega en la digestión, el hígado también sirve como un órgano de almacenamiento de grasas y carbohidratos y destruye las células de la sangre y la bioquímica sanguínea. De la misma manera cumple con funciones como la producción de urea y compuestos relacionados con la excreción del nitrógeno¹⁴

¹⁴ HERNÁNDEZ, Álvaro. Manejos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) en piscicultura Manantiales, Puerto Nuevo. Centro de Formación Técnica Zipter. México 1996.

Figura 2. Morfología interna del *Oncorhynchus mykiss* con una división abdominal - dorsal



Fuente: HERNÁNDEZ, Álvaro. Manejos en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscicultura Manantiales, Puerto Nuevo. Centro de Formación Técnica Zipter. México 1996.

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. Riñón | 10. Esófago |
| 2. Vértebra | 11. Hígado |
| 3. Vejiga natatoria | 12. Estómago |
| 4. Ovario | 13. Ciegos pilóricos |
| 5. Bulbo | 14. Vaso |
| 6. Ventrículo | 15. Intestino |
| 7. Aurícula | 16. Gonoporo |
| 8. Cavidad pericárdica | 17. Ano |
| 9. Vesícula | 18. Costillas |

2.2.3. Calidad del agua

Hay varias formas posibles de establecer si el agua de hábitat permite la vida de los peces y su desarrollo normal. Una de estas formas puede ser a través de un análisis detallado del agua. El siguiente cuadro contiene la información necesaria como para establecer si el agua de una laguna y sus afluentes reúne las condiciones mínimas para la vida de los salmónidos u *Oncorhynchus mykiss*¹⁵ (Ver Tabla 5)

¹⁵ Anatomía Y Fisiología De La Trucha. <http://www.revistaaquatic.com/asociaciones/PirineosPesca/docs/anatomia.pdf>

Tabla 5. Características de las aguas apropiadas para *Oncorhynchus mykiss*

CARACTERÍSTICA	VALOR	OBSERVACIONES
Temperatura	Hasta 22 °C	Si el verano registra temperaturas superiores a los 20 °C el ambiente permite su uso temporal, (otoño, invierno, primavera).
Contenido de Oxígeno	Sobre 8 mg/l (p.p.m.)	Mínimo 5 mg/l (p.p.m.)
Valor pH	Mas de 5,5 unidades y menos de 8,5 unidades	Para las truchas el óptimo es un rango entre 7,0 a 8,0. El ideal es 7,6. Máximo tolerable, 9,2.
Capacidad bufferiante Contenido de Amonio (NH ₄) (a Ph menor de 8,5) Hierro total Contenido Nitrito Contenido Nitrato Fosfato inorgánico Gasto de Permanganato de Potasio (KMnO ₄) Requerimiento Químico de Oxígeno (R.Q.O.) Requerimiento Bioquímico de Oxígeno (R5BO) Consumo de Oxígeno (C2dO)		Sobre 1,5 val/cm ³ Hasta 1,0 mg/l (1) Hasta 0,5 mg/l Hasta 0,2 mg/l (1) Hasta 10 mg/l (1) 0,15 - 0,4 mg/l Hasta 40 mg/l (1) Hasta 40 mg/l (1) Hasta 15 mg/l Hasta 6 mg/l (1)

Fuente: GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. 2002.

2.2.4. Temperatura del agua

La temperatura del agua es uno de los factores importantes a tener en cuenta en la explotación de un ambiente. La relación entre temperatura y altitud determinan la capacidad del agua en cuanto al oxígeno que es capaz de retener. El nivel de oxígeno es la limitante principal que puede tener un hábitat para el cultivo de truchas¹⁵.

Los rangos entre los cuales se considera que una trucha puede mantenerse con vida (Truchas Arcoíris), van desde el punto de congelación hasta los 25 °C, deteniéndose el crecimiento debajo de los 4 °C, e ingresando en un área de extremo peligro a partir de los 20 °C en adelante.

2.2.5. El oxígeno

En un cultivo de truchas se recomienda que el contenido de oxígeno en el agua no sea inferior a los 8 mg/l, (el mínimo tolerable es 5 mg/l), razón por la cual las temperaturas por encima de los 20 °C resultan críticas las condiciones de vida de las truchas (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Saturación de Oxígeno del agua dulce a varias temperaturas

TEMPERATURA	OXIGENO DISUELTO	TEMPERATURA	OXIGENO DISUELTO
°C	p.p.m.	°C	p.p.m.
0	14.30	13	10.38
1	13.92	14	10.15
2	13.57	15	9.96
3	13.20	16	9.76
4	12.22	17	9.55
5	12.52	18	9.35
6	12.21	19	9.16
7	11.91	20	9.00
8	11.62	21	8.82
9	11.33	22	8.67
10	11.10	23	8.41
11	10.83	24	8.36
12	10.61	25	8.22

Fuente: GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. 200

2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ROUNDUP® 747_{SG} (GLIFOSATO)

Los plaguicidas o pesticidas son un amplio grupo de sustancias, orgánicas e inorgánicas que se utilizan para combatir las diversas plagas que atacan a los cultivos agrícolas y hortalizas.

Teniendo en cuenta sus características de empleo, los plaguicidas se dividen en los siguientes grupos:

- | | |
|-------------------|------------------|
| a. Insecticidas. | e. Acaricidas. |
| b. Herbicidas. | f. Rodenticidas. |
| c. Nematicidas. | g. Alguicidas |
| d. Molusquicidas. | h. Fungicidas |

Los herbicidas son compuestos fitotóxicos, cuyo uso fundamental es la eliminación de plantas no productivas en los sembradíos y otros cultivos agrícolas. Actualmente, están siendo utilizados diferentes tipos de plaguicidas en la erradicación de cultivos ilícitos como se puede ver en la tabla 7.

Dentro de este grupo de herbicidas encontramos los derivados del ácido carboxílico (Fenoxiacéticos), bipiridilos (Paraquat y Diquat), amidas, dinitrofenoles, ureas, compuestos heterocíclicos (Triazinas, endotal), reguladores del crecimiento de las plantas (auxinas)¹⁶.

¹⁶ Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Colombia 2002

Tabla 7. Plaguicidas utilizados en la erradicación de cultivos ilícitos

Ingrediente activo	Clasificación toxicológica*	Uso estimado (%)	Clase química
Paraquat	II	61.3	Herbicida, bipirildinio
Glifosato	IV	19.1	Herbicida, fosfato
2,4-D	I	9.7	Herbicida, fenoxi
Atrazina	III	4.8	Herbicida, triazina
Diurón	III	2.6	Herbicida, urea
Carbaril	II	Sin dato	Insecticida, carbamato, fungicida carbamato
carbendazim	III	Sin dato	Benzimidazol
Carbofurán	I	Sin dato	Insecticida, carbamato
Cipermetrina	II	Sin dato	Insecticida, piretroide
Diazinón	III	Sin dato	Insecticida, organofosforado
Endosulfán	I	Sin dato	Insecticida, organoclorado
Lambdacihalotrina	III	Sin dato	Insecticida, piretroide
Malatión	III	Sin dato	Insecticida, organofosforado
Mancozeb	III	Sin dato	Fungicida, carbamato
Metamidofos	I	Sin dato	Insecticida, organofosforado
Metil-paratión	I	Sin dato	Insecticida, organofosforado
Metomil	I	Sin dato	Insecticida, carbamato
Monocrotofos	I	Sin dato	Insecticida, organofosforado
Oxicloruro de cobre	III	Sin dato	Fungicida, metálico
Profenofos	II	Sin dato	Insecticida, organofosforado

* La clasificación del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es la siguiente: I muy tóxico; II tóxico; III ligeramente tóxico y IV no tóxico. Datos de la Dirección Nacional de Estupefacientes (DNE)

Fuente: Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Colombia 2002

El glifosato es un herbicida sistémico que actúa en pos-emergencia, no es selectivo, y presenta amplio espectro, se usa para matar plantas no deseadas, como pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas. El Glifosato es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo (N-fosfometilglicina) (ver figura 3). Este es un polvo cristalino blanco e inodoro con un peso específico de 1.704, una presión de vapor muy baja y una solubilidad en agua alta. El glifosato es anfótero y se puede encontrar formando compuestos iónicos diversos, en función del pH del medio. Es un herbicida que actúa después del brote de manera sistémica y no selectiva, es de amplio espectro. Utilizado en agricultura desde hace muchos años y en nuestro país además viene siendo empleado para la

erradicación de cultivos ilícitos por la puesta en marcha del Plan Colombia para reducir este tipo de plantaciones¹⁶.

El glifosato técnico es un ácido, pero se usa comúnmente en forma de sales, la más común de las cuales es la sal isopropilamina (IPA) de N-(fosfonometil) glicina, o sal isopropilamina de glifosato, muy soluble en agua, pero prácticamente insoluble en solventes orgánicos.

El glifosato es uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo. Su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de manejo de malezas en las residencias. En la agricultura, el uso de glifosato se está incrementando y su uso en los cultivos de soya es probablemente mayor desde la introducción de cultivos resistentes al glifosato (Wolfenbarger y Phifer, 2000). Otros usos en agricultura para los productos a base de glifosato incluyen su uso por agricultores como una etapa rutinaria en la preparación de los suelos antes de su siembra. Los usuarios que no pertenecen al campo de la agricultura incluyen las empresas públicas, los municipios y los departamentos regionales de transporte que usan el glifosato para el control de malezas y de otras plantas dañinas. Las propiedades ambientales y relacionadas con la salud humana del glifosato han sido objeto de extensas revisiones (Giesy et al., 2000; Solomon y Thompson, 2003; Williams et al., 2000) y por parte de agencias reguladoras¹⁷.

El glifosato se ioniza fácilmente y, como anión, se adsorbe fuertemente a la materia orgánica en los suelos con pH normal. Por consiguiente, posee poca movilidad en los suelos y es rápidamente removido del agua por la adsorción a los sedimentos y a las partículas de materia suspendidas.¹⁷

El glifosato presenta alteraciones en la enzima colinesterasa, la cual es una enzima fundamental no solo en los peces, sino también en todos los mamíferos, incluidos los humanos, porque "permite un estado de reposo en la membrana nerviosa". Esa

¹⁷ NRA, 1996; USEPA, 1993a, 1997, 1999; World Health Organization International Program on Chemical Safety, Estados Unidos 1994

enzima se necesita para los estados de reposo. De lo contrario, habría un desgaste absoluto del organismo. Cuando un individuo tiene problemas con esa enzima, surgen trémulos musculares, pequeños movimientos y convulsiones¹⁷.

Su nombre comercial más conocido es Roundup el cual es fabricado y distribuido por la empresa Monsanto, del cual existen varias formulaciones caracterizadas comúnmente por contener 480 g/l de sal IPA de glifosato y el surfactante POEA (polioxietyl amina); las diferencias pueden estribar en las concentraciones de los ingredientes y en la clase o mezclas de POEA, el cual es una familia de alquilaminas polietoxiladas sintetizadas de ácidos grasos de origen animal. En algunos casos pueden contener surfactantes adicionales.¹⁸

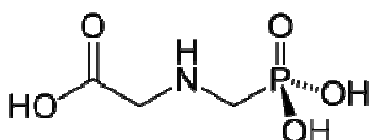


Figura 3. Fórmula química del Glifosato

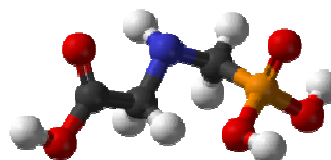


Figura 4 Modelo de bolas y enlaces

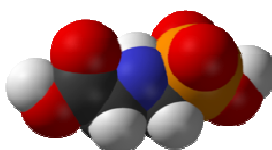


Figura 5 Modelo 3D del Glifosato

2.3.1. Mecanismo De Acción

Aumenta el consumo de oxígeno, aumenta la actividad de la ATP-asa y disminuye el nivel hepático de citocromo P-450, ocasionando desacople de la fosforilación oxidativa, tanto en animales como en vegetales. Pese a ser un compuesto con fósforo, no tiene actividad inhibitoria de las colinesterasas.

¹⁸ Dinham 1999; EPA 1999; Green Peace 1997; Meister 2000; Williams *et al.* 2000

2.3.2. Biotransformación o metabolismo

Su único metabolito descrito es el AMPA (Aminomethyl phosphonic acid), en español la sigla es AAMF (Acido amino metil fosfórico). La biotransformación del glifosato se da únicamente en un grado muy bajo. El AAMF representa el 0,3% de la dosis o menos; el resto es glifosato inalterado.

2.3.3. Toxicidad y efectos indeseables

➤ Toxicocinetica y metabolismo

La Toxicocinetica es el estudio de los procesos que experimenta un tóxico, en este caso el Glifosato, en el organismo en función del tiempo y comprende el seguimiento del tóxico a través del organismo hasta que es eliminado.¹⁸

La absorción del Glifosato por vía oral es incompleta. En las ratas, la absorción ha sido de 14 a 35% después de la ingestión de dosis que varían entre 6.7 y 1.000 mg/kg de Glifosato (Doliner, 1991). La absorción sería más débil para las dosis orales más altas. La absorción cutánea del Glifosato es débil y lenta según arrojan los resultados de estudios llevados a cabo con el Roundup en los monos (Maiback, 1983; Webster, et al., 1991) o sobre muestras de piel humana (Webster et al., 1991).

Cuando se administra una dosis oral única de 10 mg/kg a las ratas, la retención tisular del Glifosato es relativamente débil y corta y el principal producto que se encuentra en los tejidos es el Glifosato inmodificado (Brewster et al., 1991). La administración de las dosis repetidas no parece modificar el esquema de distribución tisular del Glifosato (Williams et al.2000)¹⁸.

Según los estudios en animales, el Glifosato es excretado sin ninguna modificación. Un solo estudio informa acerca de huellas ($\leq 0,4\%$) de ácido aminoetilfosfónico (AMPA), principal metabolito del Glifosato, en las heces y ningún estudio menciona la presencia de metabolito en la orina. El Glifosato es principalmente excretado en las heces (68-80%) y, a un nivel inferior, en la orina (7-31%). La vida media de excreción del

Glifosato es corta, tal como se demostró en un estudio con ratas; 95% de la dosis radioactiva fue excretada dentro de las 48 horas siguientes a la administración (Doliner, 1991). En las especies distintas a los roedores, la absorción tisular del Glifosato es débil. El AMPA es también débilmente absorbido y rápidamente excretado en la orina (Williams et al., 2000)¹⁹.

➤ Toxicidad aguda²⁰

La toxicidad aguda es el potencial que tiene el Glifosato Roundup para causar lesiones o enfermedades cuando se administra en dosis únicas o en dosis múltiples en un periodo corto. Dentro de los efectos se pueden apreciar alteraciones fisiológicas poco después de su administración (por ejemplo, la muerte).²⁰

La Agencia de Protección Medioambiental (EPA) ya reclasificó los plaguicidas que contienen glifosato como clase II, altamente tóxicos, por ser irritantes para los ojos. La Organización Mundial de la Salud (OMS), sin embargo, describe efectos más serios; en varios estudios con conejos, los calificó como "fuertemente" o "extremadamente" irritantes.²⁰

El ingrediente activo (glifosato) está clasificado como extremadamente tóxico (categoría I)²⁰.

Las fórmulas conteniendo glifosato producen mayor toxicidad aguda que el glifosato solo. La cantidad de Round-up (glifosato + POEA) requerida para ocasionar la muerte de ratas es tres veces menor que la de glifosato puro²⁰ (Ver Tabla 8).

En cuanto a las formas de exposición, la toxicidad de ambas presentaciones (glifosato puro, fórmulas compuestas) es mayor en casos de exposición dérmica e inhalatoria (exposición ocupacional) que en casos de ingestión.²⁰

¹⁹ KACZEWER, Jorge. toxicología del glifosato: riesgos para la salud humana Universidad Nacional de Buenos Aires. Pág. 7, año 2002

²⁰ KACZEWER, Jorge. toxicología del glifosato: riesgos para la salud humana Universidad Nacional de Buenos Aires. Pág 7, año 2002.

En humanos, los síntomas de envenenamiento incluyen irritaciones dérmicas y oculares, náuseas y mareos, edema pulmonar, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor abdominal, pérdida masiva de líquido gastrointestinal, vómito, pérdida de conciencia, destrucción de glóbulos rojos, electrocardiogramas anormales y daño o falla renal.²⁰

Estudios realizados por científicos independientes han demostrado que el glifosato ha sido erróneamente calificado como "toxicológicamente benigno".

La revisión de la toxicología del glifosato conducida por un equipo norteamericano de científicos independientes, Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP), identificó efectos adversos en todas las categorías estándar de estudios toxicológicos (subcrónicos, crónicos, carcinogénicos, mutagénicos y reproductivos).²⁰

Sin embargo, un trabajo sobre glifosato publicado en noviembre de 1998 por Caroline Cox, editora del *Jornal Of. Pesticide Reform*, describe efectos adversos que no resultaron de este requerimiento: todos fueron constatados a dosis menores a la mayor dosis estudiada.²⁰

Por otro lado, los estudios toxicológicos sobre el glifosato requeridos oficialmente para su registro y aprobación han sido asociados con prácticas fraudulentas. En 1976, una auditoria realizada por la EPA descubrió serios errores y deficiencias en estudios conducidos por uno de los más importantes laboratorios norteamericanos involucrados en la determinación toxicológica de pesticidas previa a su registro oficial. La EPA acusó públicamente a Industrial Biotest Laboratories (IBT), laboratorio que condujo 30 estudios sobre glifosato y fórmulas comerciales con base en el glifosato (entre estos, 11 de los 19 estudios realizados respecto de su toxicidad crónica), de falsificación rutinaria de datos y omisión de informes sobre incontables defunciones de ratas y cobayos. La EPA denunció el episodio con 7 años de demora (1983) y escasa repercusión mediática²⁰.

Sin embargo, informes del Comité de Operaciones Gubernamentales del Congreso norteamericano y sumarios de la Oficina de Pesticidas y Sustancias Tóxicas de la EPA

confirman detalladamente la fraudulencia y pobre calidad científica de los estudios de IBT.

Además, la EPA denunció en 1991 que Craven Laboratories, empresa que condujo determinaciones para 262 compañías fabricantes de pesticidas, había falsificado estudios, recurriendo a "trucos" tales como falsificar anotaciones de registros de laboratorio y manipular manualmente el equipamiento científico para que éste brindara resultados falsos.²⁰

Tabla 8. Clasificación de la toxicidad aguda del glifosato y del Roundup según las vías de exposición

VÍA DE EXPOSICIÓN	CATEGORÍA DE TOXICIDAD	DOSIS O CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (DL ₅₀ O CL ₅₀)	REFERENCIA
ORAL			
Glifosato	Poco tóxico a ligeramente toxico	4320-5600 mg/Kg (rata)	USDA, 1984; Bababunmi et al, 1978
		1568 mg/kg (ratón)	Bababunmi et al, 1978
		>3800 mg/kg (ratón)	USDA, 1984; Doliner, 1991
Roundup	Muy poco tóxico	5400 mg/kg (rata)	Doliner, 1991
INTRAPERITONEAL			
Glifosato		238 mg/kg (rata)	Bababunmi et al, 1978
		134 mg/kg (ratón)	Bababunmi et al, 1978
CUTANEA			
Glifosato	Muy poco tóxico	>5000 mg/kg (conejo)	US EPA, 1993 USDA 1984.
Roundup	Ligeramente toxico	>17000 mg/kg (rata)	Smith et Oehme, 1992
		>7940 mg/kg (conejo)	USDA, 1984
RESPIRATORIA			
Roundup	Ligeramente tóxico	3.18 mg/kg (rata)	Monsanto 1983

Fuente: Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia – OPS. Pág. 6, año 2001

➤ Toxicidad subcrónica

La toxicidad subcrónica se refiere a efectos tóxicos que ocurren después de exposiciones repetidas (por semanas como es el caso de la presente investigación). Usualmente este término se refiere a una exposición moderada en un período de tiempo moderado.

Un resumen de los valores de NOEC (dosis nociva sin efecto observado) de los estudios de toxicidad subcrónica del Glifosato y de los efectos sistémicos correspondientes se presenta en la tabla 9²¹.

Los diferentes resultados de los estudios de toxicidad subcrónica por vía oral en las ratas no demostraron vinculación alguna entre el Glifosato y una toxicidad específica. En otro estudio en el cual las cantidades de 0, 200, 2000, 5000 o 12500 ppm de Glifosato fueron agregadas a la alimentación de las ratas durante 90 días, se pudo observar un aumento de peso relativo y absoluto de los pulmones a las dosis mas fuertes (USDA, 1988^a). El único efecto observado en las ratas alimentadas a tasas de 0, 5000, 10000 o 50000 ppm de Glifosato en la alimentación durante 3 meses, fue una disminución del crecimiento a la dosis mas fuerte²¹.

²¹ ONIL, Samuel. Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Dirección de toxicología humana - Instituto nacional de salud publica de Quebec. Preparada para la Organización panamericana de la salud – OPS. Septiembre, 2001

Tabla 9. NOEC de los estudios de toxicidad subcrónica del Glifosato y los efectos tóxicos correspondiente.

ESTUDIO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA	NOEC mg//Kg/día	EFEECTO	REFERENCIA
Glifosato			
Vía Oral			
Rata (13 semanas)	>100	No se notó ningún efecto	Doliner, 1991
Rata (90 días)	135	Aumentó del peso relativo y absoluto de los pulmones	USDA, 1988 ^a
Ratón	2490 (NOEC)	Supresión de la ganancia de peso corporal	Williams et al, 2000
Ratón (3 meses)	2305	Disminución del crecimiento a 50000 ppm	USDA, 1988 ^a
Perro (90 días)	>50	No se observó ningún efecto	Doliner, 1991
Perro (1 año)	100 (NOEC)	Aumento de la incidencia de nódulos linfoides en la epididimo a 500 mg/kg	Doliner, 1991
Vía Cutánea			
Conejo (3sem)	5000	No se notó efecto alguno con excepción de una ligera irritación cutánea.	Doliner, 1991
Roundup			
Vía Cutánea			
Conejo (30sem)	>114	Sin toxicidad sistémica, eritema liviano	Doliner, 1991; Killeen, 1975
Inhalación			
Rata (22 días)	> 0,36 (mg/l)	No hubo signo de toxicidad significativamente diferente entre el grupo testigo y el grupo experimental.	Monsanto, 1983b

Fuente: Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia – OPS. Pág. 6, año 2001

➤ Toxicidad crónica y Oncogenicidad

La toxicidad crónica del Glifosato Roundup es la naturaleza de los efectos adversos durante el tiempo prolongado de la exposición. Tales mediciones de los efectos pueden incluir la presentación de un cáncer o el retardo en el crecimiento.

Estudios a largo plazo con animales demuestran que el glifosato es tóxico. Esta afirmación está dada por las diferentes investigaciones realizadas por varias entidades utilizando ratas y ratones como se ve en la Tabla 10 a continuación.²¹

Tabla 10. Estudio de toxicidad crónica realizados en ratas y ratones por diferentes instituciones

ANIMAL EXPUESTO	DOSIS EMPLEADA	EFEECTO OBSERVADO	INVESTIGADOR
Ratas	900 – 1200 mg/kg/día	Disminución del peso corporal en hembras, mayor incidencia de cataratas y degeneración del cristalino y mayor peso del hígado en machos.	Organización Panamericana de la Salud – OPS. Septiembre, 2001
Ratas	400 mg/kg/día	Inflamación de la membrana mucosa estomacal en ambos sexos.	
Ratones	4800 mg/kg/día	Pérdida de peso, excesivo crecimiento, posterior muerte de células hepáticas e inflamación renal crónica en machos; en hembras, excesivo crecimiento de células renales.	
Ratones	814 mg/kg/día	Excesiva división celular en la vejiga urinaria.	
Ratas	0 mg/kg/día 3 mg/kg/día 10 mg/kg/día 31 mg/kg/día	Expuestas durante 26 meses. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos expuestos y el grupo testigo. La incidencia de tumores intersticiales observada a nivel de los testículos no pudo relacionarse con la dosis y es poco probable que esté relacionada con el tratamiento. La posibilidad de un vínculo entre el tratamiento y la aparición de tumores de células C de la tiroides también fue desechada puesto que los tumores también se observaron en el grupo testigo.	Monsanto
Ratas	0 p.p.m. 1000 p.p.m. 5000 p.p.m.	Los demás cambios no neoplásicos observados a fuertes dosis incluyeron hipertrofia centrolobular así como nefritis intersticial (machos) y una basofilia e hipertrofia de las células hepáticas de los túbulos proximales (hembras)	Doliner 1991; Stout et Ruecker 1990 dans US EPA, 1992
		reducción de peso corporal en los dos sexos y del conteo de leucocitos en los machos (a 12 meses solamente)	

Fuente: Los autores, 2008

Un resumen de los valores de NOEC de los estudios de toxicidad crónica del Glifosato y de los efectos sistémicos correspondientes se incluye en la Tabla 11.

Tabla 11. NOEC de los estudios de toxicidad crónica de Glifosato y los efectos tóxicos correspondientes.

ESTUDIO CRONICO	NOEC (mg/kg)	EFEECTO	REFERENCIA
VIA ORAL			
Rata (26 meses)	31	No hay diferencia entre el grupo experimental y el grupo testigo en lo que se refiere a tumores intersticiales de los testículos y la aparición de tumores de la tiroides	US EPA, 1992a
Rata (24 meses)	362	Ligera irritación del estómago, disminución de peso corporal y de la ganancia ponderada (F) disminución del pH urinario, aumento de la incidencia de cataratas y efectos testiculares a 1000 mg/kg/día.	Doliner, 1991
Ratón (2 años)	714	Reducción de pesos corporales (M.F.) y del conteo de leucocitos (M) así como aumento de la incidencia de la necrosis hepática (M) no se presentó aumento importante de las lesiones neoplásicas.	Doliner, 1991; Stout et Ruuecker, 1990
Perro (1 año)	>500	Disminución de las concentraciones de sodio y del potasio sérico	US EPA, 1992a

Fuente: Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia – OPS. Pág. 8, año 2001

➤ Efectos cancerígenos

Los estudios científicos públicamente disponibles fueron todos conducidos por o para sus fabricantes. La EPA clasificó inicialmente al glifosato como clase "D" (no clasificable como carcinógeno humano). Posteriormente, a comienzos de la década de 1990, lo ubicó en clase "C" (Posible carcinógeno humano). Actualmente lo clasifica como Grupo E (evidencia de no carcinogénesis en humanos) ante la falta de evidencias según la información disponible. Sin embargo, la controversia respecto del potencial cancerígeno del glifosato todavía continúa²².

En sucesivos estudios realizados desde 1979 se encontró: Incremento en tumores testiculares intersticiales en ratas machos a la dosis más alta probada (30 mg/kg/día), incremento en la frecuencia de un cáncer de tiroides en hembras; incrementos

²² NIVIA, Elsa. Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato. Colombia 2002

relacionados con la dosis en la frecuencia de un tumor renal raro; incremento en el número de tumores de páncreas e hígado en ratas machos. La EPA no relacionó ninguno de estos tumores con el glifosato: consideró que las estadísticas no eran significativas, que no era posible definir los tumores tiroideos como cáncer, que no había tendencia que lo relacionara con la dosis o que no había progresión a la malignidad²².

Las dudas sobre el potencial carcinogénico del glifosato persisten, porque este ingrediente contiene el contaminante N-nitroso glifosato (NNG) a 0.1 ppm o menos, o este compuesto puede formarse en el ambiente al combinarse con nitrato (presente en saliva humana o fertilizantes), y se sabe que la mayoría de compuestos N-nitroso son cancerígenos.

Adicionalmente, en el caso del Round-up, el surfactante POEA (polioxietileno amino, agente tensoactivo utilizado en la formulación de Roundup 747 en un 15%) está contaminado con 1-4 dioxano, el cual ha causado cáncer en animales y daño hepático y renal en humanos. El formaldehído, otro carcinógeno conocido, es también producido durante la descomposición del glifosato²².

Un estudio reciente, publicado en el Journal of American Cancer Society por eminentes oncólogos suecos, reveló una clara relación entre glifosato y linfoma no Hodgkin (LNH), una forma de cáncer. Los investigadores sostienen que la exposición al herbicida incrementa los riesgos de contraer LNH y, dado el creciente aumento de su uso mundial (en 1998, 112.000 toneladas) desde que se hizo este estudio, urge la necesidad de realizar nuevos estudios epidemiológicos. El hallazgo se basó en un estudio/control de casos poblacionales conducido en Suecia entre 1987 y 1990. Sus autores concluyeron que "la exposición al herbicida incrementa el riesgo de padecer LNH". El aumento en la incidencia de este cáncer detectado en las últimas décadas en países occidentales, ahora también se está viendo en muchos otros países. Según la American Cancer Society, tal incremento alcanzó, desde 1970, la alarmante cifra de un 80%²².

Los herbicidas con base en el glifosato de la corporación Monsanto (por ejemplo, el Round-Up) constituyen un particular motivo de inquietud, ya que el herbicida interactúa con el polímero. La experimentación demostró que el calor y la luz contribuyen a la liberación de acrilamida a partir de la poliacrilamida, y se descubrió que el glifosato influye en la solubilidad de la poliacrilamida, razón por la cual se aconsejó sumo cuidado al mezclar estas dos sustancias²².

Las evidencias parecen indicar con precisión que la acrilamida es liberada por la poliacrilamida ambiental, cuya fuente principal se halla en las fórmulas herbicidas en base a glifosato. La cocción de vegetales que han estado expuestos al glifosato utilizado en cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas, o usados durante la preparación del suelo en cultivos convencionales resultaría en una adicional liberación de acrilamida. La situación se ve empeorada por el hecho de que, en los EE.UU., los aditivos tipo poliacrilamida se consideran "secreto comercial" y la información sobre la composición de las fórmulas herbicidas no están al alcance del público²².

➤ **Acción mutagénica**

La acción mutagénica es la capacidad que tiene el Glifosato Roundup o cualquier otra sustancia de producir cambios en el ADN que subsecuentemente se transmiten a las células de futuras generaciones. Estos cambios pueden, a veces, llevar al desarrollo de cáncer o a cambios en las características del organismo.

Ninguno de los estudios sobre mutagénesis requeridos para el registro del glifosato ha mostrado acción mutagénica. Pero los resultados son diferentes cuando los estudios se realizan con formulas comerciales con base en glifosato: en estudios de laboratorio con varios organismos, se encontró que el Round-Up y el Pondmaster (otra formulación) incrementaron la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en la mosca de la fruta; el Round-Up en dosis altas, mostró un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y fue débilmente mutagénico en Salmonella. También se reportó daño al ADN en pruebas de laboratorio con tejidos y órganos de ratón²².

➤ Efectos sobre el desarrollo y la reproducción

Un resumen de los valores de NOEC de los estudios sobre el desarrollo y la reproducción de Glifosato y los efectos tóxicos correspondientes, se presenta en la Tabla 12.

En un estudio llevado a cabo con ratas grávidas, expuestas a ceba entre los días 6º y 19º de gestación, pudo observarse una ausencia de osificación en los fetos cuya madre había recibido una dosis de 3500 mg/kg/día (Doliner 1991).²²

En los conejos grávidos expuestos a ceba a dosis de 0, 75, 175 o 350 mg/kg/día entre los días 7º y 27º de gestación, se reportaron signos clínicos de toxicidad y una reducción pasajera de peso corporal a las dos dosis más fuertes. También pudieron observarse malformaciones pero estas no pudieron relacionarse con el tratamiento y su número no excedió los valores observados en los testigos (Monsanto 1980 dans US EPA, 1992a).²²

Tabla 12. NOEC de los Estudios del desarrollo y la reproducción y los efectos tóxicos correspondientes para el Glifosato

ESTUDIO CRÓNICO	NOEC (mg/kg/día)	EFEECTO	REFERENCIA
Reproducción			
Rata 3 generaciones	10	Dilatación de los túbulos renales de la generación F3b a dosis maternas de 30 mg/kg/día.	Bio/Dynamics, 1981 dans US EPA, 1992a
Rata 2 generaciones	100 (SBSC) 500 (US EPA)	Disminución del peso de los pequeños y de los adultos a 500 mg/kg/día. Reducción del peso materno de las hembras F, y los pequeños F2a a 500 mg/kg/día	Doliner, 1991; Reyna, 1990 dans US EPA, 1992 ^a
Teratogenicidad			
Rata (Entre los días 6 y 19 de gestación)	1000	Falta de osificación del estemo a la dosis tóxica para la madre (3500 mg/kg/día)	Doliner, 1991
Conejo (Entre los 7 días y 27 de la gestación)	350 (fetal) 175 (maternal)	Reducción pasajera del peso corporal en las madres. No hubo efecto teratogénico.	Monsanto, 1980 dans US EPA, 1993 ^a

Fuente: Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia – OPS. Pág. 10, año 2001

Después de un estudio de reproducción que se llevó a cabo sobre tres generaciones, se expusieron las ratas por vía alimenticia. No pudo observarse ningún efecto vinculado a la fertilidad o a la reproducción.

Sin embargo, en otro estudio con ratas expuestas durante dos generaciones a concentraciones de 0, 100, 500 y 1500 mg/kg/día, no hubo implicaciones renales relacionadas con el tratamiento y que pudieran observarse con el examen histopatológico (Reyna, 1990, en US EPA 1992a).

➤ **Contaminación de alimentos**

El peso de las actuales evidencias científicas permite aseverar que la incidencia y severidad de diversos tipos de cáncer, malformaciones congénitas y trastornos neurológicos sería mucho menor si la población no estuviera expuesta a pesticidas a través de la dieta, el agua y el hábitat.

En cualquier país cuyo sistema preventivo sanitario se precia de cuidar realmente la salud de la población, los límites máximos de residuos de pesticidas en los alimentos son vigilados estrictamente. El objetivo de este control es asegurar que los niveles de residuos se mantengan tan bajos como sea posible, reconociendo que ciertos sectores de la población, tales como los niños y los ancianos, pueden poseer una susceptibilidad incrementada y notando que cualquier pesticida puede utilizarse simultáneamente en más de un cultivo. Estudios conducidos por la EPA para evaluar la magnitud de exposición no laboral a pesticidas entre la población general, concluyen que la exposición dietaria es la ruta que genera el mayor impacto. La exposición dietaria ocurre a través del consumo de alimentos domésticos e importados conteniendo residuos de pesticidas y de la ingestión de agua potable contaminada. La mayoría de expertos sostiene que los residuos de pesticidas en la dieta plantean un muy modesto riesgo para el individuo promedio. El término "promedio" significa una persona adulta, con un estado de salud razonable, que consume una dieta razonablemente apropiada, y que no tiene una predisposición genética, sanitaria o medioambiental ni factores de riesgo inusuales que incrementen su vulnerabilidad a la enfermedad. Esta definición corresponde a aproximadamente dos tercios de la

población. Para el otro tercio, los residuos de pesticidas en la dieta incrementan los riesgos de padecer diversos problemas de salud.

Hasta el advenimiento de los cultivos transgénicos tolerantes al glifosato, el límite máximo de glifosato residual en soja establecido en EE.UU. y Europa era de 0,1 miligramos por kilogramo. Pero a partir de 1996, estos países lo elevaron a 20 mg/Kg, un incremento de 200 veces el límite anterior. Semejante aumento responde a que las empresas productoras de glifosato están solicitando permisos para que se apruebe la presencia de mayores concentraciones de glifosato en alimentos derivados de cultivos transgénicos. Monsanto, por ejemplo, ya fue autorizado para un triple incremento en soja transgénica en Europa y EE.UU. (de 6 ppm a 20 ppm).

Estos vestigios de glifosato y sus metabolitos en la soja transgénica están presentes también en alimentos elaborados en base a la leguminosa. Los análisis de residuos de glifosato son complejos y costosos, por eso no son realizados rutinariamente por el gobierno en Estados Unidos (y nunca realizados en Argentina). Pero existen investigaciones que demuestran que el glifosato puede ser absorbido por las plantas y concentrarse en las partes que se usan como alimento. Por ejemplo, después de su aplicación, se ha encontrado glifosato en fresas, moras azules, frambuesas, lechugas, zanahoria y cebada. Según la Organización Mundial de la Salud, su uso antes de la cosecha de trigo para secar el grano resulta en "residuos significativos" en el grano; el afrecho contiene residuos en concentraciones 2 a 4 veces mayores que el grano.

➤ **Toxicidad en el humano**

Los resultados de varias investigaciones demuestran que la toxicidad aguda y el potencial irritante de Roundup son débiles. Por ejemplo el estudio de Malibach (1986) demuestra que el Roundup no sería mas irritante que un limpiador para todos los usos, un champú para bebé o un detergente para lavar la vajilla (Maibach, 1986). La fórmula comercial no ha demostrado evidencia alguna de inducción de foto-irritación, de dermatitis alérgica o fotoalérgica, ni de sensibilización cutánea.²²

En el medio profesional pocos incidentes han sido reportados, si se tiene en cuenta la utilización importante de Roundup en todo el mundo. Jauhiainen et al, (1991) evaluaron los efectos a corto plazo de la exposición al Glifosato en los aplicadores en el medio agrícola. No pudo observarse ningún efecto a nivel de los parámetros hematológicos, químicos, pulmonares y cardíacos. Los varios estudios que han utilizado la vigilancia biológica para evaluar la exposición profesional demuestran generalmente bajos niveles de absorción de Glifosato (Centro de Toxicología de Quebec, 1988,; Jauhiainen et al., 1991; Lavy et al., 1992). Para la mayoría de los trabajadores que participaron en estos estudios, las concentraciones urinarias de Glifosato medidas fueron generalmente inferiores a los límites de detección.²²

Las irritaciones oculares y cutáneas han sido informadas para el producto concentrado pero la exposición del producto diluido raramente da como resultado efectos nocivos significativos. Además, los efectos irritantes son siempre transitorios (Williams et al., 2000).

Los datos disponibles sobre la ingestión voluntaria de Roundup indican que pueden presentarse decesos u otros efectos serios, pero únicamente cuando se ingieren cantidades verdaderamente importantes.²²

✓ **Signos y síntomas**

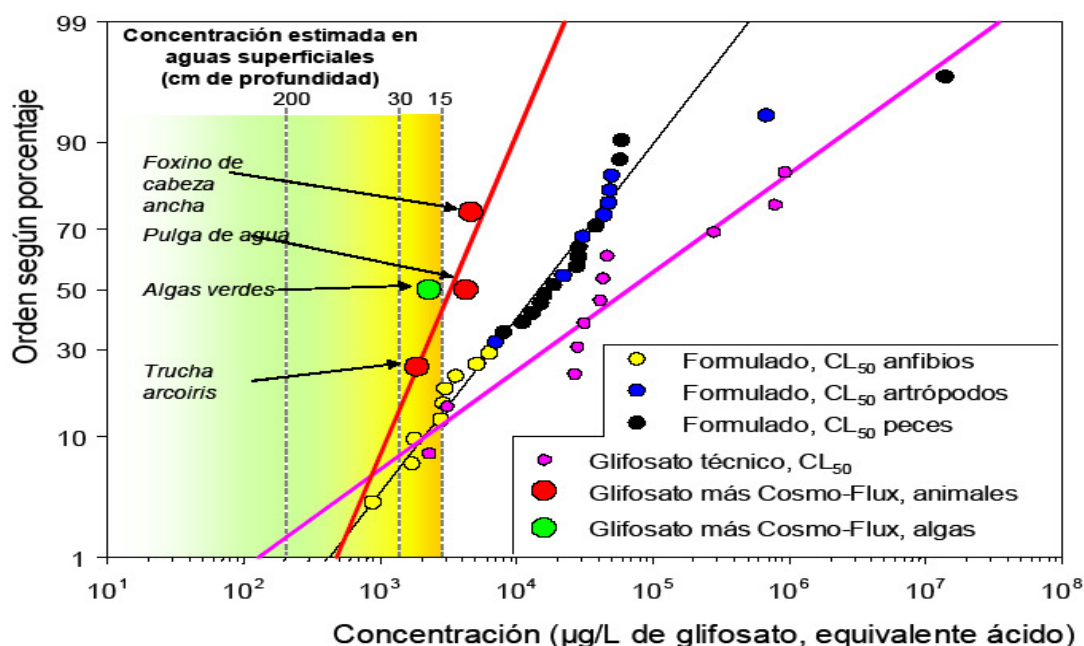
Los pacientes presentan fenómenos de irritación gastrointestinal: náuseas, vómito y dolor abdominal. Se puede presentar irritación de vías aéreas superiores, sin embargo como el tamaño de sus partículas es mayor de 5 micras no alcanza a llegar a vías aéreas inferiores.

➤ **Toxicidad del Glifosato en organismos acuáticos**

La superposición del rango de las concentraciones estimadas de exposición y los valores de toxicidad para las algas verdes y la trucha arcoíris sugiere que existe un riesgo aumentado en aquellas situaciones en las que sucede una aspersión accidental. Esta tendría que ser en una localidad en donde el cuerpo de agua sea de menos de 30

cm de profundidad, debe estar lo suficientemente próximo al cultivo de coca y no estar fluyendo. Debido a que el flujo de agua probablemente resulte a concentraciones inferiores del umbral de la actividad biológica en un periodo de rápida dilución hidráulica, los organismos en el agua en movimiento no estarían en riesgo. Con base en los datos de toxicidad con la formulación de Roundup® para los anfibios, este grupo de organismos puede estar en riesgo; sin embargo, no se han realizado pruebas específicas en anfibios con la mezcla de glifosato más Cosmo-Flux® como es utilizada en Colombia²³ (Ver Gráfica 1).

Grafica 1. Distribución de los valores de toxicidad para el glifosato técnico, glifosato formulado (Roundup®) en organismos acuáticos y en peces y los valores de toxicidad en cuatro especies acuáticas para la mezcla de glifosato y Cosmo-Flux® 411 como se usa en Colombia. El rectángulo amarillo muestra el rango de la predicción de los peores casos de exposición que resultan de la aspersión directa a las aguas superficiales en un rango de 15 a >200 cm de profundidad²³.



Fuente: Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente.

²³ Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América 31 de marzo de 2005. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente.

2.3.4. Tratamiento para la intoxicación con Glifosato Roundup 747

No existe antídoto específico para contrarrestar los efectos de la intoxicación por Glifosato, por lo tanto se realiza tratamiento de descontaminación y manejo sintomático²⁴.

La descontaminación que en caso de exposición por vía dérmica, ya sea por contacto directo del tóxico con la piel o posterior a la ingesta y como consecuencia de la emesis, se presenta contaminación de prendas de vestir y piel. La conducta consiste en retiro y desecho de las ropas contaminadas y baño inmediato con abundante agua y jabón, si hay contaminación ocular se debe lavar con abundante agua por lo menos 25 a 30 min y se debe cubrir el ojo con un apósito limpio.²⁴

En exposición por vía oral se practica el lavado gástrico. Una vez realizado el paso de la sonda nasogástrica y verificado que se encuentra en la cavidad gástrica se practicara en forma manual con una jeringa de 50 cm³ en adultos y 20 cm³ en niños. En adultos se puede emplear agua en pacientes pediátricos se aconseja practicar el lavado gástrico con SSN al 0,9% con el objeto de evitar una intoxicación hídrica que nos complicará el cuadro del paciente. Debe realizarse hasta que se obtenga un contenido gástrico de características claras. Se debe tomar una muestra al inicio del procedimiento, la cual puede ser de utilidad en el laboratorio de toxicología para la posterior confirmación de nuestro diagnóstico²⁴.

Se aconseja la administración de una sustancia con gran capacidad adsorbente que cumpla esta función en la cavidad gástrica y a lo largo del tubo digestivo, con el fin de evitar la absorción de la sustancia tóxica que no fue rescatada mediante el procedimiento del lavado gástrico. En general se emplea carbón activado de origen animal así: 30 gr de Carbón activado (una cucharada sopera) disuelta en 150 cm³ de agua o SSN 0,9% y administrar 1 cm³ por Kg de peso a través de la sonda nasogástrica para dejar en cavidad. Es importante advertir al paciente que sus deposiciones serán negras o muy oscuras (para evitar posteriores diagnósticos errados de HVD) ²⁴.

²⁴ URIBE GRANJA, Camilo. *Toxicología del Glifosato*. Clínica de Toxicología. Bogotá 1996

Una vez administrado el carbón activado se aconseja la administración del evacuante (evacuante) de tipo salino (nunca oleoso), se sugiere sulfato de magnesio (sal de Epsom) 10 gr. en 200cc de agua o SSN 0,9% por SNG pasar a 0,5 cm³ por Kg. de peso. Para administrar el catártico salino el paciente se debe encontrar hidratado previamente y no debe presentar diarrea como parte del cuadro clínico ocasionado por el tóxico. Se colocan líquidos endovenosos en promedio 3000 cm³ para 24 horas para pasar a razón de 120 cm³/h²⁴.

Adicionalmente se utiliza en la lucha contra el cultivo de la amapola, la coca y otras plantas usadas en el desarrollo de estupefacientes. Y también como herbicida en los cultivos de soja, que ha sido manipulada genéticamente para no ser afectada por esta sustancia.²⁴

2.3.5. Destino ambiental

Como resultado de sus propiedades fisicoquímicas específicas, el glifosato es inmóvil o sólo ligeramente móvil en el suelo. El metabolito del glifosato, el ácido aminometil fosfórico, es un poco más móvil en el suelo pero se descompone rápidamente. Este resulta de la lixiviación de cantidades pequeñas presente en los suelos que están destinados a la agricultura normal. La fuerte unión del glifosato con el suelo origina una pérdida casi inmediata de la actividad biológica; sin embargo, los residuos de la unión se descomponen lo suficientemente rápido para hacer que no se presente acumulación, aun después de muchos años de uso regular. La contaminación de las corrientes subterráneas como resultado del uso normal de glifosato es poco probable excepto en el caso de un derrame apreciable o de otra liberación accidental o descontrolada de cantidades considerables al ambiente.²⁵

La gran solubilidad del glifosato y sus sales en el agua sugiere que son móviles en el agua; sin embargo, la unión fuerte y rápida a los sedimentos y partículas, especialmente en aguas poco profundas y turbulentas, o en aquellas que llevan grandes cargas de partículas, remueve el glifosato de la columna de agua (Tooby,

²⁵ Giesy et al. World Health Organization International Program on Chemical Safety. CWQG, 1999.

1985). En el uso agrícola normal, no se espera que haya escape o lixiviación a las aguas superficiales.²⁵

Es probable que la disipación bajo condiciones tropicales como las de Colombia sea más rápida que la que se da en regiones templadas debido a las mayores temperaturas y humedad, las cuales promueven la actividad microbiológica y la degradación química de muchos plaguicidas. Dado que las actividades microbianas del suelo están fuertemente moduladas por la temperatura, se espera que la degradación del plaguicida sea mayor en los suelos tropicales que experimentan temperaturas más altas durante todo el año, que en los suelos templados²⁵.

2.3.6. Impacto Faunístico

El Glifosato es un plaguicida poco tóxico para humanos y animales y, excluyendo el grado tóxico de los solventes y demás componentes de las formulaciones comerciales, comparativamente es menos tóxico que la sal común, la aspirina y hasta la vitamina A. La dosis letal media (DL₅₀) es, aproximadamente, de 4.900 a 5.000 mg, por Kg. de peso vivo de animal, mientras que la aspirina tiene una DL₅₀ de 1.000 mg.²⁶

Sin embargo, el impacto que genera el Glifosato en su presentación como Roundup (Glifosato + Surfactantes) ha mostrado varios efectos en animales afectando su sistema enzimático. En ratas, cuando se les inyectó en el abdomen, disminuyó la actividad de dos enzimas detoxificantes, el citocromo P-450 y una monooxigenasa.²⁷

La FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act), le asignó a la concentración comercial del Glifosato la categoría II por el efecto ocular irritante y la opacidad corneal en conejos. La afección ocular del Roundup, según lo informa el fabricante del herbicida, es originada por la seboamina etoxilada utilizada como componente tensoactivo, a la cual también se le asigna la posibilidad de causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómito y diarrea.²⁷

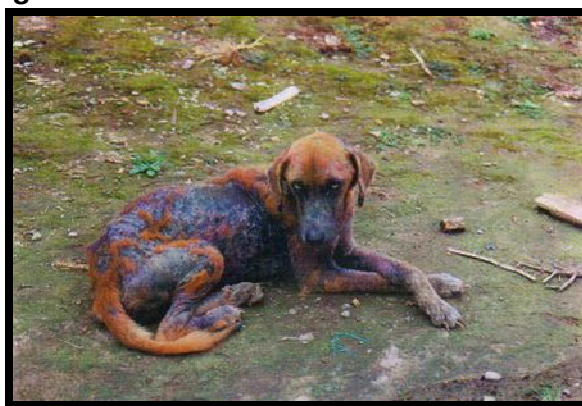
²⁶ MMA. Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. 2000.

²⁷ COX Caroline. Glifosato, Parte 2: La Exposición humana y los Efectos Ecológicos. 1995.

Por último cabe mencionar las quejas que se presentaron con respecto al programa de fumigación con Roundup, ejecutado por el gobierno de los Estados Unidos para eliminar cultivos de amapola en Guatemala, en donde se afirmó la destrucción de la apicultura en las zonas cercanas a las aspersiones. "Aunque el programa de fumigación tuvo un efecto mínimo en los cultivos de amapola, según los campesinos locales, se destruyó la base tradicional de la producción en la región, en particular tomates y abejas."²⁸

El estudio realizado por el Ecuador que hace parte en la controversia actual entre Colombia y ese país, asegura enormes pérdidas de animales domésticos y de consumo humano (Ver Fotografía 5) comprobadas en toda la zona, generando una importante afectación a la economía fronteriza y una fuerte migración de las poblaciones.

Fotografía 5. Presunto daño en animales domésticos.



Fuente: Impactos en la salud ecuatoriana. Fumigaciones fronterizas del Plan Colombia. Octubre 2002.

2.3.7. Vías de exposición en el suelo, el aire, el agua y otros medios

En términos de la aplicación, existen varias vías a través de las cuales el glifosato y los adyuvantes pueden entrar en contacto con el ambiente.²⁸

²⁸ U.S. Department of State cable from Guatemala to Washington, DC. 1991.

El depósito en el cultivo objetivo o blanco es el resultado deseado de la operación; sin embargo, para el propósito de la evaluación de los riesgos en humanos y en el ambiente, son importantes las exposiciones que resultan del movimiento y el depósito por fuera del cultivo. La deriva de la aspersión puede originar la desviación por fuera del cultivo objetivo y puede generar efectos adversos en plantas y animales que no son el blanco. Dada la fuerte adsorción del glifosato al suelo, su depósito en los terrenos cultivados probablemente no tenga efectos significativos en organismos no blanco; sin embargo, la lixiviación de los residuos unidos a las partículas del suelo puede causar contaminación de las aguas superficiales con dichos residuos²⁸.

El depósito directo y la deriva de la aspersión pueden originar contaminación con glifosato de las aguas superficiales locales, si éstas se encuentran en el corredor de rociado o por la deriva de la aplicación. Según sea la profundidad de las aguas, la turbulencia, el flujo y las partículas suspendidas, se podría presentar una exposición de los organismos acuáticos tanto al glifosato como a cualquiera de los adyuvantes presentes en la mezcla del rociado. Los organismos presentes en el cultivo durante la aspersión estarían expuestos a las gotas del rocío y recibirían una dosis teórica, según el área de la superficie expuesta y la masa corporal²⁸.

En Colombia, además de emplearlo como herbicida en la agricultura, también se usa como desecante de granos y, por vía aérea, como madurante en la caña de azúcar y en los programas de erradicación forzosa de cultivos calificados como de uso ilícito. El *Roundup* usado normalmente en la agricultura, contiene 41% de sal IPA de glifosato, el *Roundup*, utilizado en la erradicación de cultivos de uso ilícitos, contiene 43.9% del ingrediente activo²⁸.

Se reporta que el surfactante POEA (polioxietileno amino) contenido en la formulación causa daño gastrointestinal y al sistema nervioso central, problemas respiratorios y destrucción de glóbulos rojos en los seres humanos. POEA (polioxietileno amino) está contaminado con 1-4 dioxano, el cual ha causado cáncer en animales y daño a hígado y riñones en los seres humanos.

El principal metabolito en la degradación del glifosato en ambientes terrestres es el ácido amino-metil-fosfónico (AMPA), el cual es también tóxico.²⁸

El glifosato puede contener cantidades traza de N-nitroso glifosato o este compuesto puede formarse en el ambiente al combinarse con nitrato (presente en la saliva humana o los fertilizantes). La mayoría de compuestos N-nitroso son cancerígenos y no existe nivel seguro de exposición a un cancerígeno. El formaldehído, otro carcinógeno conocido, también es un producto de descomposición del glifosato (glifosato-AMPA-Metilamina Formaldehído).²⁹ Cantidades mínimas del herbicida pueden causar daño a cultivos. Uno de los primeros boletines técnicos de Monsanto (MON-057-1-71) afirmaba que “las aplicaciones aéreas deben evitarse si existe peligro de que el químico se ponga en contacto con especies deseables”. En la etiqueta de *Roundup* en Colombia actualmente se afirma que “los riesgos de causar daños a los cultivos vecinos se reducen considerablemente cuando las aplicaciones se realizan con el viento en calma, dirigido a las malezas, utilizando pantalla protectora para evitar que las gotas de aspersión caigan sobre las partes verdes de las plantas deseables”²⁹.

Una vez realizada la aspersión (de acuerdo con la etiqueta del Roundup), el herbicida que cae al suelo se inactiva de inmediato debido a una reacción química que ocurre con las arcillas, y no deja residuos que puedan afectar las siembras posteriores o penetrar por las raíces de los cultivos ya establecidos. Pero varios investigadores afirman que el glifosato puede desorberse con facilidad en algunas clases de suelo, o sea que se puede liberar de las partículas y puede ser muy móvil en el ambiente del suelo. En cierto tipo de suelo, el 80% del glifosato adicionado se liberó en un período de dos horas²⁹.

Las pérdidas de Glifosato por volatilización o fotodescomposición durante la aspersión se consideran insignificantes, pero puede ser descompuesto por microorganismos, reportándose vidas medias en el suelo (tiempo que tarda en desaparecer la mitad de un compuesto del ambiente) de alrededor de 60 días (2 meses) según la EPA, y hasta de 1 a 3 años según estudios realizados en Canadá y Suecia. La EPA añade que en estudios de campo los residuos se encuentran a menudo al año siguiente (Dinham 1998; Cox 1995). De acuerdo con quejas que se presentan ante la Defensoría del

²⁹ Cox 1995; Dinham 1999; Williams et. al., 2000

Pueblo en Colombia, los cultivos alimenticios son destruidos totalmente por las fumigaciones aéreas de Roundup y se ven afectadas las siembras posteriores²⁹.

Durante la aspersión es probable que el glifosato entre en contacto directo con el agua y contaminarlas debido a que es muy soluble en agua (solubilidad de 12 gramos/litro a 25 °C). Debido a su estado iónico en el agua no se espera que se volatilice de aguas ni de suelos. Su persistencia en aguas es más corta que en suelos, por su capacidad de adsorción a partículas en suspensión como materia orgánica y mineral, a sedimentos y probablemente por descomposición microbial. En investigaciones realizadas en Canadá se ha encontrado que persiste de 12 a 60 días en aguas de estanques, pero persiste más tiempo en los sedimentos del fondo. La vida media en sedimentos fue 120 días en un estudio en Missouri, Estados Unidos. La persistencia fue mayor de un año en sedimentos en Michigan y en Oregon²⁹.

Se ha descubierto que el glifosato contamina aguas superficiales y subterráneas. Por ejemplo, contaminó por escorrentía dos estanques en granjas de Canadá, uno por un tratamiento agrícola y el otro por un derrame, y contaminó aguas superficiales en Holanda. En Estados Unidos se encontraron siete pozos (uno en Texas y seis en Virginia) contaminados con glifosato. En el Reino Unido, desde 1993 la Welsh Water Company ha detectado en las aguas niveles de glifosato por encima de los límites permisibles fijados por la Unión Europea. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos ha encontrado que las exposiciones a residuos de glifosato en aguas de consumo humano por encima del límite máximo autorizado de 0.7 mg/L, pueden causar respiración acelerada y congestión pulmonar, daño renal y efectos reproductivos en seres humanos (Dinham 1999).

2.3.8. Distribución del herbicida

En el Diagrama 1, observamos un esquema con la distribución de los herbicidas en el medio ambiente; un análisis de este esquema nos muestra que este tipo de compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en aguas, suelos y organismos. En el caso que nos preocupa, es decir el medio acuático, la entrada de estos

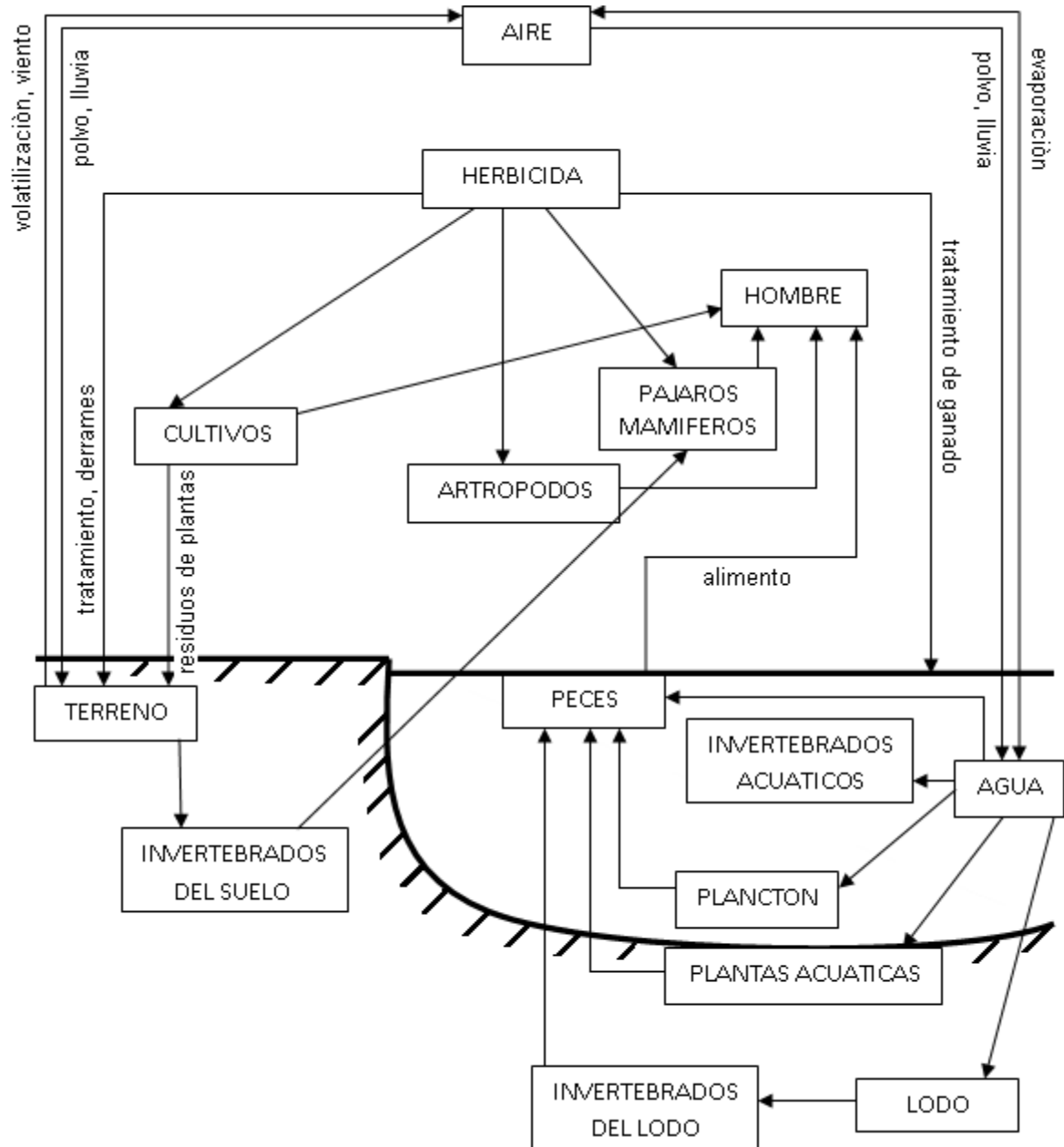
compuestos se produce por aportes directos, por escurrimiento y por transporte atmosférico³⁰.

Cuando los herbicidas llegan al medio acuático, son rápidamente absorbidos por los sedimentos en suspensión, plancton, algas, invertebrados acuáticos, vegetación acuática y peces (Ver Diagrama 1)³⁰.

Las especies acuáticas son especialmente sensibles a este tipo de compuestos, el mecanismo a través del cual respiran muchas de ellas hace que grandes cantidades de agua sean filtradas a través de su organismo, éstos tienen una alta solubilidad en los lípidos, por lo que son rápidamente removidos del agua por material biológico y concentrados en grasas y ceras llegando a acumularse altos niveles de estos compuestos en los organismos; otro mecanismo de ingestión de herbicidas en peces e invertebrados acuáticos es a través de alimentos contaminados³⁰ (Ver Diagrama 2).

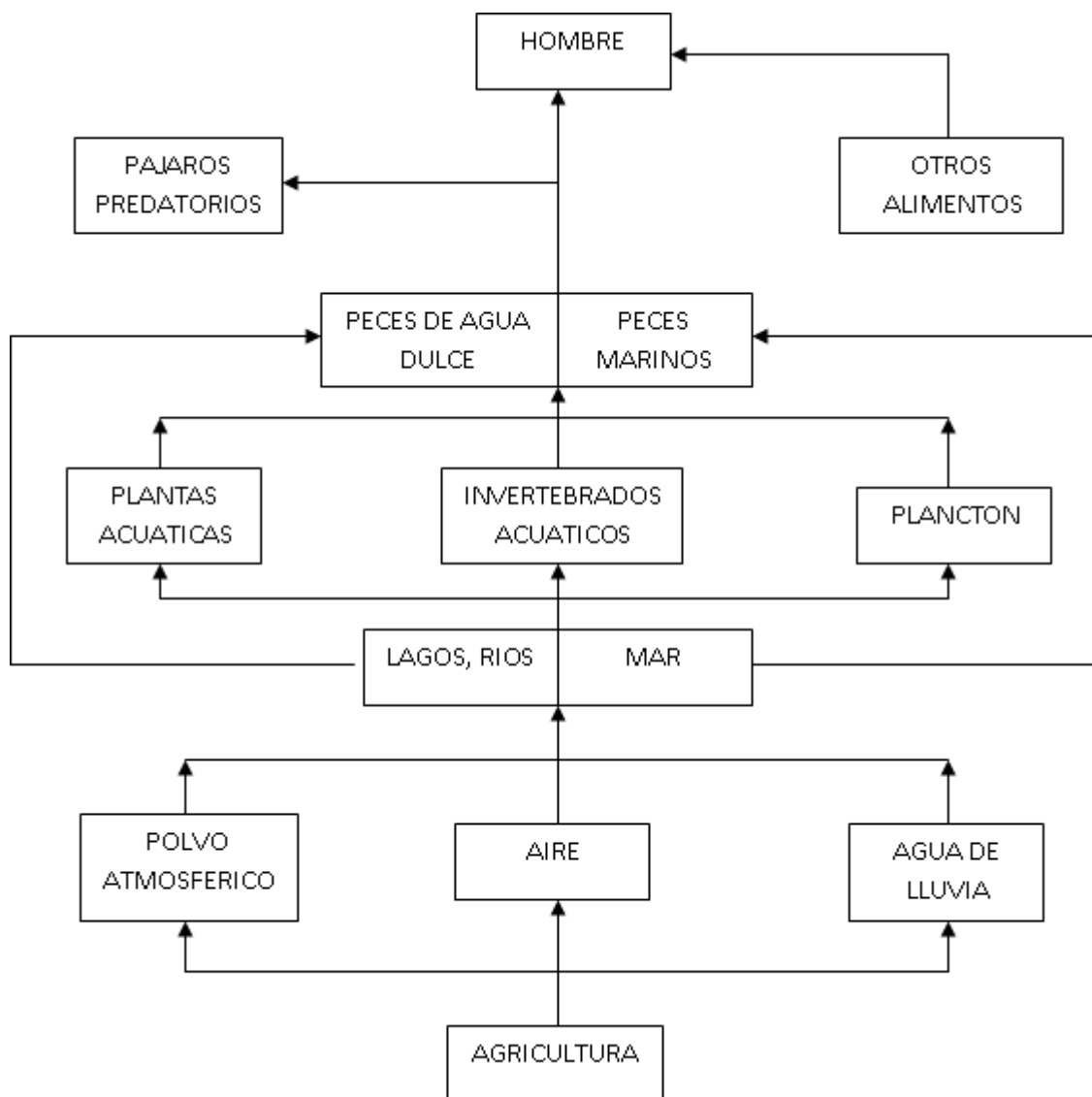
³⁰ Anales del centro de ciencias del mar y limnología sobre la dispersión de herbicidas en el medio ambiente marino. UNAM.

Diagrama 1. Distribución de Herbicidas en el medio ambiente.



Fuente: anales del centro de ciencias del mar y limnología sobre la dispersión de herbicidas en el medio ambiente marino. UNAM.

Diagrama 2. Capacidad que tienen los peces de concentrar los herbicidas.



Fuente: anales del centro de ciencias del mar y limnología sobre la dispersión de herbicidas en el medio ambiente marino. UNAM.

2.4. BIOENSAYOS

En sentido general, la toxicidad de una sustancia puede ser definida como la propiedad que tiene una sustancia, elemento o compuesto, de causar daños en la salud humana o la muerte de un organismo vivo (decreto 1594/84, art 16); sin embargo en sentido amplio, esta se puede definir como la capacidad de causar algún efecto nocivo sobre

algún organismo vivo. En sentido toxicológico, los bioensayos son pruebas para medir la potencia de una sustancia fisiológicamente activa, generalmente de origen desconocido, diseñados para medir los efectos de uno a más contaminantes sobre una a más especies de organismos.

Los bioensayos son definidos como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente tóxico (químico o no) sobre un organismo vivo, a través de la comparación de ese agente con el efecto de una solución patrón o estándar. La prueba de toxicidad corresponde al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente dado para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos; su objetivo primario, además de obtener datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente. (Compañía Estatal de Tecnología de Saneamiento Básico y Protección del Brasil – CETESB 1991).

Los bioensayos de toxicidad con agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado en estos últimos tiempos debido a la brevedad con que se obtiene la información sobre las dosis letales y subletales (CL₅₀), la CL₅₀ es el valor de la concentración que es letal para el 50% de los organismos sometidos a la influencia de la sustancia estudio, y se expresa en partes por millón (p.p.m). (ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. *Determinación de la toxicidad de los detergentes mediante sistemas estáticos utilizando Daphnia magna*. Universidad de la Salle, Facultad de ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Bogotá 1993.)

El uso de bioensayos para la evaluación de toxicidad de sustancias liberadas al medio a través de efluentes, ha llevado a la utilización de biomonitores propios de los ambientes evaluados, lo cual favorece indirectamente la preservación de la biodiversidad local. Sin embargo, la variabilidad en la aplicación de las técnicas experimentales para el mantenimiento de organismos silvestres afecta la interpretación y comparación de los resultados entre laboratorios, por lo que se hace necesario desarrollar metodologías estandarizadas para establecer condiciones controladas

(Palacios y Pereira, 1997). Utilizar organismos provenientes directamente del hábitat natural puede distorsionar los resultados obtenidos por fuentes de variabilidad no previstas, como nutrición, dinámica de la población, estrés por depredación, etc. (Sosnowski et al., 1979). Estas variables pueden ser controladas o eliminadas con las poblaciones de laboratorio; además, el entrecruzamiento consanguíneo que ocurre a lo largo del tiempo en esas poblaciones, resulta en una considerable reducción de la variabilidad genética (Lewontin, 1974)³¹

Por otra parte, a causa de la complejidad del medio ambiente acuático y de las comunidades biológicas que lo integran es difícil establecer el grado de deterioro que afecta a las especies o comunidades acuáticas. Por esta razón es conveniente realizar bioensayos utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, el objetivo primordial de un bioensayo es reflejar la realidad de cómo afectaría a los organismos vivos en su medio natural y para ello es recomendable paralelamente investigar continuamente las comunidades en su propio hábitat (Villamar, 1996)³¹.

Dentro de los organismos comúnmente utilizados en los bioensayos de toxicidad se encuentran los cladóceros, también llamados pulgas de agua, son crustáceos pequeños que constituyen la mitad de la Clase Branchiopoda. El caparazón (bivalvo) encierra al tronco, pero no a la cabeza y suele terminar posteriormente en una espina apical. La cabeza porta un sólo ojo mediano, también posee antenas frecuentemente largas y utilizadas en la natación. Además, presenta de cuatro a seis pares de apéndices troncales y el postabdomen está girado ventralmente hacia delante. La mayoría de estos organismos son pálidos y transparentes y viven casi exclusivamente en agua dulce (Ruppert y Barnes, 1996)³¹.

³¹ Bioensayos de toxicidad aguda en neonatos de *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Crustácea: branchiopoda) expuestos a soluciones de hidróxido de sodio (NaOH)

Por lo general se considera que un organismo es indicador de la calidad del agua, cuando éste invariablemente se encuentra en un ecosistema con características definidas y cuando su población es porcentualmente superior o ligeramente similar al resto de los organismos con los que comparte el mismo hábitat. Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de evaluaciones de la calidad de las aguas dulces de Colombia, el conocimiento que se tiene de la fauna acuática aún requiere un refinamiento (conocimiento de los organismos hasta el nivel de especie), que permita el ideal conocimiento que garantice su manejo racional y sustentable³¹.

Mientras se alcanza este refinamiento específico, se ha impuesto la utilización de índices bióticos y de diversidad, los cuales permiten detallar y clarificar los detalles de los diferentes nichos ecológicos que ocupan dichos organismos.³²

No obstante, existe una gran dificultad para determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental. Dicha determinación implica costos elevados, tiempo, y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con determinados grupos indicadores³².

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Una vez se ha demostrado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador³².

³² Álvarez León, Ricardo. Roldán-Pérez, Gabriel A. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia: uso del método BMWQ. Editorial Universidad de Antioquia. Pág. 170, año 2003.

2.4.1. Bioindicadores (indicadores biológicos)³³

Los indicadores biológicos son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente. Inicialmente, se utilizaron especies o asociaciones de éstas como indicadores y, posteriormente, comenzaron a emplearse también atributos correspondientes a otros niveles de organización del ecosistema, como poblaciones, comunidades, etc., lo que resultó particularmente útil en estudios de contaminación³³.

Las especies indicadoras son aquellos organismos (o restos de los mismos) que ayudan a descifrar cualquier fenómeno o acontecimiento actual (o pasado) relacionado con el estudio de un ambiente. Las especies tienen requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies. A cada especie o población le corresponden determinados límites de estas condiciones ambientales entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). En general, cuando más estenoica sea la especie en cuestión, es decir, cuando más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico. Las especies bioindicadoras deben ser, en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad³³.

El término 'indicador biológico' se ha usado indiscriminadamente, sin que exista un concepto claro sobre su significado ni sobre los eventos que un tal organismo pueda llegar a indicar. Igualmente, en numerosos estudios se mencionan especies indicadoras, pero de forma separada y asistemática, lo que hace necesaria su recopilación y análisis, con énfasis en los sistemas dulceacuícolas del país.³⁴ Por esto, el objetivo de este trabajo de investigación se basó en uno de los indicadores biológicos de ambientes acuáticos continentales mas usados en Colombia (Trucha Arcoíris).

³³ BOLTOVSKOY, E. Indicadores biológicos en la oceanografía. Pág. 66-75. Año 1967

³⁴ PINILLA AGUDELO, Gabriel Antonio. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Colombia, año 2000

A principios de siglo se propuso la utilización de listas de organismos como indicadores de características del agua en relación con la mayor o menor cantidad de materia orgánica. La idea de usar como indicadores a las especies se generalizó, aplicándose a la vegetación terrestre y al plancton marino. En determinadas zonas las plantas se usaron ampliamente como indicadores de las condiciones de agua y suelo; algunas plantas, de la presencia de uranio, etc³⁴.

En oceanografía los bioindicadores se utilizan en estudios de hidrología, geología, transporte de sedimentos, cambios de nivel oceánico, o presencia de peces de valor económico, por ejemplo. Los indicadores hidrológicos son organismos mediante los cuales se pueden diferenciar las distintas masas de agua de mar (masas que difieren en sus características físicas, químicas, de flora y fauna, y que se caracterizan, en general, por su temperatura y salinidad) y determinar sus movimientos. Los organismos pueden ser usados como sensores de una masa de agua, requiriéndose que sean fuertemente estenoicos para que no sobrevivan a condiciones diferentes a las de la masa de agua que caracterizan, o bien como trazadores de una corriente, si son más o menos resistentes a los cambios ambientales y sobreviven en condiciones diferentes, indicando la extensión de una corriente que puede atravesar varias masas de agua. Estos métodos biológicos son más útiles que las determinaciones físicas o químicas especialmente en las zonas marginales, de cambio, y, además, informan sobre el grado de mezcla de dos tipos de agua en las zonas intermedias³⁴.

La utilización de organismos vivos como indicadores de contaminación es una técnica bien reconocida. La composición de una comunidad de organismos refleja la integración de las características del ambiente sobre cierto tiempo, y por eso revela factores que operan de vez en cuando y pueden no registrarse en uno o varios análisis repetidos. La presencia de ciertas especies es una indicación relativamente fidedigna de que durante su ciclo de vida la polución no excedió un umbral³⁴.

Los indicadores de contaminación por desechos industriales generalmente son resistentes a la falta total o parcial de oxígeno, la baja intensidad de luz, etc. Los monitoreos biológicos son muy útiles, ya que, por ej., la acumulación de metales

pesados en organismos acuáticos puede ser 10 millones de veces mayor a la del ambiente donde viven.

El uso de organismos indicadores de contaminación requiere conocer las tolerancias ecológicas y los requerimientos de las especies, así como sus adaptaciones para resistir contaminantes agudos y crónicos. Las investigaciones sobre organismos indicadores de polución comprenden el estudio autoecológico, en el laboratorio, para establecer los límites de tolerancia de una especie a una sustancia o a una mezcla de ellas mediante ensayos de toxicidad; y el sinecológico, que se basa en la observación y análisis de las características ambientales de los sitios en los cuales se detectan con más frecuencia poblaciones de organismos de cierta especie. Algas, bacterias, protozoos, macroinvertebrados y peces son los más usados como indicadores de contaminación acuática³⁴.

Los resultados del estudio de las especies indicadoras de niveles de calidad de agua son más inmediatos, pero requieren un profundo conocimiento para identificar los organismos y sólo son adecuados para las condiciones ecológicas y características regionales; mientras que los resultados numéricos de los estudios de estructura de comunidades, si bien requieren su interpretación ecológica, demandando más tiempo, son independientes de las características geográficas regionales y tienen aplicabilidad aún con informaciones sistemáticas y ecológicas deficientes³⁴.

2.4.2. Tipos de bioensayos

Los bioensayos se pueden clasificar de acuerdo al objetivo que se quiere buscar. En la tabla 13 (WARD Y PARRISH) se muestra la clasificación general de los bioensayos³⁵.

³⁵ Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros.

Tabla 13. Clasificación de los bioensayos

Según su respuesta	Ensayos de toxicidad aguda	Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico o sustancia a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL ₅₀), en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas) (Esclapés, 1999) ³⁵ .
	Ensayos de toxicidad crónica	Estiman la concentración efecto media (CE ₅₀), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del ciclo de vida del organismo empleado. Alternativamente, un ensayo definitivo puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE ₅₀), a una concentración específica (Esclapés, 1999) ³⁵ .
Según el alcance de la respuesta	Ensayos de respuesta directa	
	Ensayos de respuesta indirecta	
Según su finalidad	De toxicidad de muestra única	
	De toxicidad de efluentes	
	De bioestimulación	Se mide la facultad de las aguas residuales o de las sustancias químicas de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas, efecto este de eutroficación que frecuentemente se traduce en una superabundancia o proliferación de algas ³⁵ .
	Organolépticos	Algunos contaminantes pueden producir olores o sabores desagradables en los organismos acuáticos. El contaminante puede no ser nocivo para el organismo acuático, pero puede ocurrir que el organismo pierda valor económico. El mejor procedimiento consiste en la evaluación por parte de personas experimentadas en bromatología y emplear gran número de catadores diestros (FAO, 1981) ³⁵ .

Según su técnica	De sistemas estáticos	Se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo (FAO, 1981) ³⁵ .
	De sistemas de renovación	Los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas) (Esclapés, 1999). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo (FAO, 1981).
	De sistemas de flujo continuo	Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales (Esclapés, 1999). Se realizan con la renovación continua o casi continua de las diluciones sometidas al ensayo, con el fin de mantener casi constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas ³⁵ .

Fuente: Los autores

Los bioensayos se pueden realizar en el laboratorio bajo condiciones controladas o en el campo directamente en el medio natural (Tortorelli y Hernández, 1995). Los bioensayos de laboratorio pueden ser mono o multiespecíficos. Los monoespecíficos son diseñados para obtener información acerca de los efectos de la calidad de agua sobre la supervivencia y aspectos de la estructura y dinámica de una población dada. Los multiespecíficos pueden ofrecer información sobre el impacto a nivel de una comunidad determinada (Tortorelli y Hernández, 1995)³⁵.

Los bioensayos de campo consisten en la exposición de una o más poblaciones a la acción directa del cuerpo de agua, para ello se utilizan contenedores que permiten mantener la población en estudio en un espacio adecuado, sin afectar su relación con el medio. Estos proponen, principalmente, estudiar los efectos sobre comunidades o poblaciones, sin prestar atención a los mecanismos de acción de los contaminantes a nivel de los individuos en particular (Tortorelli y Hernández, 1995)³⁵.

A continuación se dan a conocer las ventajas y desventajas que presenta la realización de las pruebas tanto *in situ* como *ex situ*. (Ver Tabla 14)

Tabla 14. Comparación de las ventajas y desventajas que presentan las pruebas de toxicidad realizadas en el laboratorio y en el medio natural.

TIPO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Laboratorio	Disponibilidad de metodologías estandarizadas	Deficiencia de realismo
	Comparación de especies de diferentes niveles tróficos	Incapacidad de predecir efectos bajo condiciones de campo
	Posibilidad de utilizar las especies mas sensibles	Aplicable solo en especies probadas
Campo	Los resultados pueden correlacionarse con los datos físico-químicos	Incapacidad de aislar los factores causantes
	Proporciona evidencia incuestionable del deterioro	No utilizable para pruebas de hipótesis
	Indica los contaminantes responsables de la afectación	

Fuente: Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. (Del Valls y Conradi, 2000).

No existe un ensayo ni un organismo universal para utilizarlo en todos los experimentos de laboratorio, pero todos tienen su utilidad; sin embargo, es esencial entender las limitaciones de estas pruebas de toxicidad (Del Valls y Conradi, 2000). La selección del tipo de prueba a emplearse dependerá de los objetivos del ensayo, la disponibilidad de los recursos, los requerimientos de los organismos de prueba, las características de la sustancia a evaluar y de los objetivos y alcances particulares del estudio.

2.4.3. Selección de Especies³⁶

Para obtener la máxima información de los bioensayos es necesario seleccionar los organismos más apropiados (Ver Tabla 15). Se debe tener en cuenta que requieren

³⁶ DELLVALS y CONRADI. Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. 2000

diferentes períodos de aclimatación en el laboratorio, según las especies, y es sumamente importante que los organismos de ensayo se manipulen con cuidado, no sufran daños, se encuentren sanos y sean de edad o tamaño uniformes (FAO, 1981).³⁶ Según Henry (1988) la selección de organismos para bioensayos debe basarse en:

- ✓ Los objetivos del programa toxicológico
- ✓ La información disponible sobre los posibles organismos
- ✓ Las características de las especies
- ✓ Las instalaciones y equipos de laboratorio
- ✓ El nivel de capacitación de los técnicos

Los organismos acuáticos frecuentemente tienen ciclos de vida y requerimientos de cultivo y de manejo complejos. El desarrollo de esta información es una tarea larga que frecuentemente requiere años de investigación. Es recomendable que se consideren solo aquellos organismos de los que se tiene suficiente información en cada una de estas tareas. Las especies con información limitada sobre cultivo y procedimientos de prueba deben evitarse (Henry, 1988)³⁶.

Tabla 15. Grupos de organismos utilizados en bioensayos y su adaptabilidad al laboratorio según Henry (1988)

Adaptabilidad de los organismos como especies para bioensayos			
Organismos para bioensayos	Adaptabilidad del organismo		¿Comúnmente utilizado como un organismo para bioensayos?
	Cultivo de laboratorio	Recolección de campo	
Algas	Excelente	Muy difícil de recolectar cultivo puro	Si
Protozoos	Excelente	Muy difícil de recolectar cultivo puro	Muy limitado
Rotíferos	Bueno	Muy difícil de recolectar cultivo puro	Limitado
Cladóceros	Excelente	Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo	Si
Copépodos	Mediano	Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo	Limitado
Camarones	Bueno	Bueno	Si
Anélidos	Mediano	Mediano	Limitado
Insectos	Bajo	Mediano	Si
Moluscos	Bueno	Mediano	Si
Crustáceos	Bajo	Mediano	
Peces	Excelente	Alta tasa de mortandad después de la recolección de campo	Si

Fuente: Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. (Del Valls y Conradi, 2000).

2.4.4. Ensayos preliminares³⁷

Estos ensayos se utilizan para determinar en forma preliminar, la toxicidad de una sustancia o de los efluentes. Los tratamientos son dos y consisten de un control (se usa agua de laboratorio preparada para el cultivo) y efluente o sustancia pura sin diluir (100 %). El número de réplicas, densidad de los organismos y procedimientos generales son los mismos empleados en el ensayo definitivo para la especie en cuestión. A excepción de los ensayos con microalgas, la duración de las pruebas

³⁷ DELLVALS y CONRADI. Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. 2000

preliminares, generalmente es la mitad de la duración de las definitivas. La determinación de oxígeno disuelto, temperatura, alcalinidad, dureza total y conductividad específica se realizan como en el ensayo definitivo (Rodríguez y Esclapés, 1995).³⁷

Estos ensayos están diseñados para proveer un estimado preliminar de las concentraciones, cuando se desconoce la toxicidad de la muestra a evaluar. Se preparan de cinco a diez diluciones de exposición. Este ensayo permite definir el orden de magnitud del intervalo de las concentraciones entre las cuales se debe realizar el ensayo definitivo (Rodríguez y Esclapés, 1995).³⁷

2.4.5. Ensayo definitivo³⁷

Una vez obtenidos los resultados de 0 y 100% de mortalidad en los ensayos preliminares, se comienza ampliando el rango en el cual se obtuvo el 50% de mortalidad de los organismos, exponiéndolos durante un período de tiempo determinado a una serie de concentraciones de un efluente o un compuesto de interés.

Las soluciones de preparación en un ensayo definitivo son aquellas que contiene una cantidad predeterminada de efluente o compuesto puro, a las cuales se exponen los organismos. Las soluciones de exposición se preparan diluyendo la muestra a evaluar con el agua de dilución apropiada hasta alcanzar las siguientes concentraciones de exposición: (6,25; 12,5; 25; 50 y 100) %. Si se sospecha que el efluente es altamente tóxico o si ocurre una mortalidad significativa en la dilución de 6,25 % durante las primeras horas de prueba, entonces se deben incluir menores concentraciones del tóxico.³⁷

Se deben consultar protocolos específicos en relación a recipientes o envases de exposición, volúmenes, densidad de individuos, réplicas, duración y condiciones del ensayo, mediciones rutinarias y otros detalles (Rodríguez y Esclapés, 1995). La mortalidad de los organismos se registra a los 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, y luego cada 24 h (Esclapés, 1999)³⁷.

A continuación se dan a conocer los principales componentes que se deben tener en cuenta en la realización de Bioensayos³⁸:

2.4.6. Componentes de los ensayos de toxicidad³⁸

➤ Tóxicos de referencia

Un tóxico de referencia es un compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las pruebas³⁸.

Para ello, en la etapa inicial del montaje de un método de prueba debe seleccionarse un compuesto soluble, de pureza $\geq 99\%$, al cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada, con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto esperado. Una vez definido el patrón de la relación dosis-respuesta para el compuesto elegido, puede ser empleado como tóxico de referencia³⁸.

El registro histórico de la respuesta al tóxico de referencia, expresada a través de los valores de CL₅₀ /CI₅₀/CE₅₀, es de utilidad para el control del estado fisiológico de los organismos empleados y sirve de evidencia para demostrar la estabilidad de su respuesta biológica.

Algunos de los compuestos que pueden emplearse como tóxicos de referencia son: cloruro de sodio NaCl (US EPA (1993)), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇). Otras agencias, como Environment Canadá, recomiendan al Zinc (II) como tóxico de referencia inorgánica y fenol para sustancias orgánicas; sin embargo,

³⁸ DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo. Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Colombia, año 2000

estos compuestos pueden sustituirse por otros, dependiendo de la especie de prueba, la matriz utilizada y los puntos finales medidos³⁸.

La precisión de los resultados de las pruebas de toxicidad en el laboratorio es calculada a través de la confección de cartas o gráficos de control. Este gráfico es una herramienta que permite determinar la variabilidad de los resultados y, en consecuencia, definir la aptitud de un laboratorio para obtener resultados confiables³⁸.

➤ **Cartas de control de calidad**

La carta control es la herramienta de registro que brinda los elementos de juicio para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los organismos de prueba a un tóxico de referencia, con un margen de confianza del 95%. Esta carta es el medio de referencia para evidenciar el control de la sensibilidad de la especie empleada, de la estabilidad de la respuesta biológica y de la repetitividad (exactitud) de los resultados obtenidos³⁸.

La carta control se genera a partir de los resultados de pruebas sucesivas al tóxico de referencia seleccionado, para el cual se obtiene el valor de la concentración de efecto medio ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$). Inicialmente ésta puede ser construida con un mínimo de cinco datos y posteriormente se debe continuar realizando ensayos con el tóxico para ingresar mensualmente nuevos valores hasta completar una serie de veinte resultados³⁸.

Los valores se van integrando a manera de puntos en un gráfico que relaciona el número de ensayo, ubicado en el eje X o abscisa, y el valor de la concentración de efecto medio ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$), en el eje Y u ordenada. Posteriormente, los valores son empleados para el cálculo del valor promedio y la desviación estándar (σ) de la población de datos. Con estos parámetros estadísticos se calculan los valores límite (superior e inferior) que definen el intervalo de variación aceptable o intervalos de confianza (95%) en el que deberán encontrarse los valores de $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$ obtenidos para futuros ensayos con el tóxico de referencia³⁸.

Para la elaboración de las cartas control, se debe preparar una solución estándar del tóxico de referencia seleccionado. Con la solución estándar del tóxico se preparan diluciones para obtener una serie de concentraciones, de manera que se logre obtener al menos dos valores de efecto mayor al 50% y dos más, menores a dicho porcentaje. En general, es de esperar que la serie de concentraciones utilizada produzca a través del tiempo la misma respuesta en cada concentración; se procede a calcular el punto final de la prueba ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$) utilizando cualquiera de las técnicas estadísticas recomendadas. La carta control es utilizada para evaluar la tendencia de los resultados, por lo que el promedio acumulado y los límites de confianza son recalculados con cada nuevo dato obtenido³⁸.

Si en más de un ensayo con los tóxicos de referencia el valor cae fuera de los límites, los resultados de las pruebas efectuadas deben considerarse provisionales y sujetos a confirmación. Si el problema persiste y el valor de $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$ del tóxico de referencia se aleja significativamente del intervalo esperado, deberá realizarse una revisión de la sensibilidad de los organismos de prueba y eliminar los datos generados bajo estas circunstancias³⁸.

Este valor se establece realizando un mínimo de cinco o más ensayos con diferentes lotes de organismos, el mismo tóxico de referencia, iguales concentraciones, las mismas condiciones y el mismo análisis de datos³⁹.

➤ **Preparación de soluciones de control**

✓ **Control positivo**

Generalmente, como control positivo se utiliza una solución del tóxico con una concentración cercana a la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$. Para su elaboración, se prepara inicialmente una solución estándar con una alta concentración a partir de la cual se preparan soluciones menos concentradas, utilizando como diluyente agua dura

³⁹ DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo. Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Colombia, año 2000

reconstituida (US EPA, 1991), o el medio recomendado para cada prueba. En todos estos procedimientos se debe emplear material volumétrico. Estas diluciones deben prepararse hasta obtener una concentración cercana al valor promedio de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$, obtenida en cada laboratorio³⁹.

✓ **control negativo**

El control negativo corresponde a una solución del medio de cultivo del organismo, o puede utilizarse agua reconstituida con las características de pH, dureza y alcalinidad óptimas para el desarrollo de los organismos. Cualquiera que sea la solución seleccionada, existe un porcentaje de efecto máximo que no debe ser superado durante las pruebas.³⁹

✓ **Blanco de procedimiento**

Cuando las muestras son sometidas a un proceso de extracción o concentración previo a un análisis de toxicidad, se recomienda incluir un blanco de procedimiento por cada lote de muestras. La preparación del blanco depende del método aplicado, sin embargo se debe seguir todo el protocolo establecido para la muestra. La toxicidad resultante en este blanco no debe exceder el 10% (APHA, 1998); en caso contrario los resultados quedan invalidados, pues la respuesta estaría indicando interferencias producto del procesamiento de la muestra. Los resultados de toxicidad para el blanco no deben mostrar efecto, de lo contrario los resultados reportados para las muestras no son aceptables³⁹.

➤ **Replicabilidad y sensibilidad**

La sensibilidad de las pruebas depende del número de réplicas por concentración, nivel de significancia establecido y tipo de análisis estadístico que se lleve a cabo. Por esta razón, cuando la variabilidad permanece constante, la sensibilidad de la prueba puede incrementarse aumentando el número de réplicas. Sin embargo, el mínimo número de réplicas variará con los objetivos de la prueba y el método estadístico seleccionado para el análisis de los datos³⁹.

Existen muchos factores que pueden afectar el éxito y la precisión de un ensayo de toxicidad; los más importantes son:

- ✓ Experiencia y habilidad del analista.
- ✓ Edad, condición y sensibilidad de los organismos de prueba.
- ✓ Calidad del agua de dilución.
- ✓ Control de temperatura.
- ✓ Calidad y cantidad de alimento suministrado a los organismos.

Por tanto, los resultados dependen del origen y tipo de las especies utilizadas y de las condiciones bajo las cuales se llevan a cabo las pruebas. Igualmente, la replicabilidad y precisión serán función del número de organismos utilizados por concentración³⁹.

➤ **Muestras duplicadas**

Las muestras duplicadas corresponden a muestras colectadas al mismo tiempo en una misma fuente. Cuando se colectan menos de cinco muestras no es necesario tomar duplicados. Cuando el número de muestras está entre cinco y diez, se debe tomar una muestra por duplicado; si son más de diez se debe tomar el 10% del total de muestras como duplicados. Cada muestra duplicada debe procesarse y ensayarse bajo las mismas condiciones de las otras muestras.

Los resultados de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ obtenidos de muestras duplicadas de una muestra deben ser analizados mediante una prueba estadística para establecer si las diferencias observadas son, o no, estadísticamente significativas (APHA, 1998)³⁹.

➤ **Puntos finales ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$, NOEC, LOEC)**

El objetivo de un ensayo de toxicidad en una muestra de agua, efluente o compuesto puro, es estimar la concentración segura o concentración a la cual no se observa efecto; sin embargo, este término es más un concepto biológico que un resultado estadístico, por lo que los resultados aquí utilizados serán: la concentración más alta a

la cual no se observa efecto (NOEC); la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC); la concentración efectiva (CE) correspondiente a una estimación de la concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos; concentración letal (CL), la cual corresponde a la concentración del tóxico o efluente o muestra que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población expuesta³⁹.

El valor de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se debe obtener tanto para el tóxico de referencia como para las muestras simples o duplicadas. Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se pueden utilizar técnicas de estimación de punto, tales como los métodos Probit, Spearman-Kärber, gráfico, etc., para lo que se pueden utilizar programas computacionales especialmente diseñados³⁹.

3. METODOLOGIA

A continuación se da a conocer de forma detallada como se realizó este proyecto de investigación: diseño experimental, aclimatación de los organismos, pruebas de toxicidad, los resultados obtenidos y su respectivo análisis estadístico.

La metodología esta compuesta por II fases:

3.1. FASE I. DISEÑO Y ACLIMATACIÓN

3.1.1. Diseño Experimental

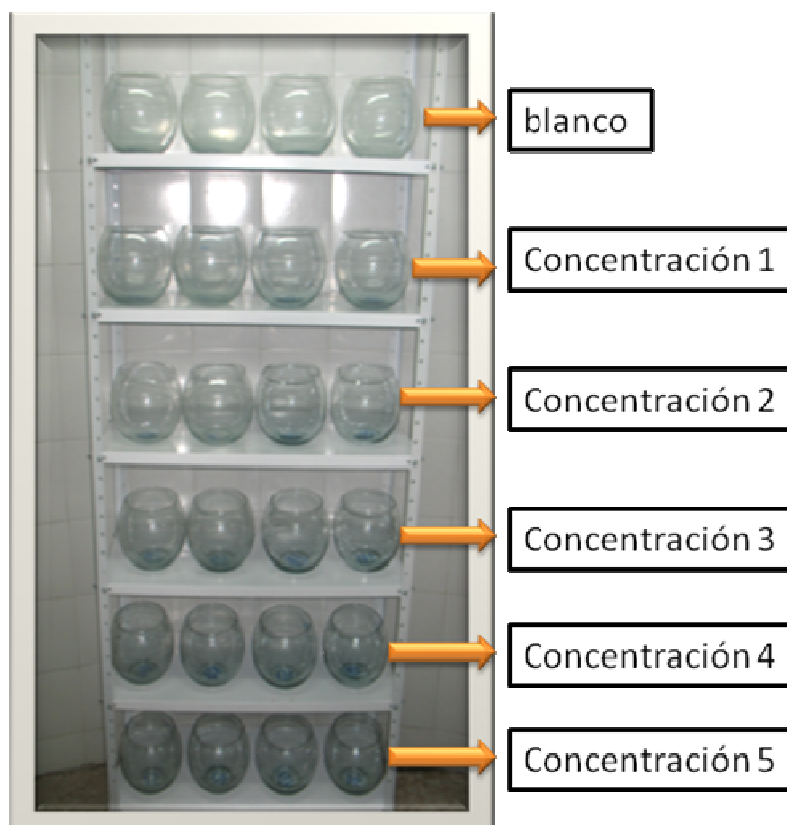
Para la realización de ésta investigación se tuvieron en cuenta 3 variables las cuales se describen a continuación:

- ✓ **Variable independiente:** Esta variable la cual se manejo como independiente durante la realización de las pruebas de toxicidad fue la concentración de las sustancias de interés (Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) y Glifosato (Roundup[®] 747_{SG}), buscando establecer un efecto sobre una determinada población en donde todas las unidades experimentales son homogéneas.
- ✓ **Variable dependiente:** La concentración Letal Media (CL₅₀₋₉₆) del Glifosato Roundup[®] 747_{SG} se manejó como la variable dependiente durante la investigación en un tiempo de exposición de 96 horas. Este resultado depende de los efectos que tiene el Glifosato Roundup[®] 747_{SG} sobre los organismos de prueba.
- ✓ **Constantes:** Permanecieron constantes los organismos empleados en cada ensayo (5 alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por pecera), tiempo de exposición (96 horas) y los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH y oxígeno disuelto). Estos parámetros fueron controlados con el fin de cumplir con los protocolos internacionales validados para éste tipo de ensayo CETESB LBp01 (Ver anexo C y D). Cabe resaltar que este protocolo fue

suministrado por el profesor Pedro Miguel Escobar Malaver y a su vez por los grupos anteriores que trabajaron con dicho protocolo.

Inicialmente se realizaron pruebas preliminares utilizando concentraciones de 20 - 100 p.p.m. de dicromato de potasio para la sensibilidad y entre 0.001 - 100 p.p.m. para el glifosato Roundup® 747_{SG}. Luego de obtener estos datos preliminares se realizaron 20 pruebas definitivas de dicromato de potasio y 10 pruebas de glifosato Roundup® 747_{SG}, utilizando cinco (5) organismos por pecera, basándose en los protocolos establecidos por CETESB, baterías de cinco concentraciones más el control y cuatro replicas por ensayo, con un total de 24 peceras por prueba toxicológica, 120 organismos por montaje y 20 organismos por concentración, correspondiendo cada uno al 5%. Como se muestra a continuación. (Ver fotografía 6).

Fotografía 6. Montaje de las pruebas de toxicidad



Fuente: los autores 2008.

Una vez obtenidos los resultados de mortalidad, se realizó el análisis probit para la obtención de la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆), utilizando el protocolo LBp03, “análisis de regresión y análisis probit” (ver anexos E), donde se da a conocer el procedimiento para la obtención de la misma. Los datos obtenidos a partir del experimento diseñado estadísticamente, fueron analizados por el método conocido como Análisis de Varianza ANOVA. Ésta es una técnica que consiste en aislar y estimar las varianzas separadas que contribuyen a la varianza total de un experimento; es entonces posible, ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas (CETESB). El protocolo de este método se encuentra especificado en el Anexo F.

3.1.2. Aclimatación y Mantenimiento

➤ Preparación de los acuarios

Para realizar las pruebas de toxicidad primero se tuvieron que adecuar los acuarios, colocando aireadores mecánicos para permitir una óptima aireación de los acuarios por un periodo aproximado de 10 días. Durante este periodo de tiempo los acuarios alcanzaron condiciones óptimas para la aclimatación de los alevinos antes de la realización de las pruebas (Ver fotografía 7). Los parámetros que se debían monitorear constantemente en este lapso de tiempo antes de la introducción de los alevinos eran:

- ✓ Oxígeno Disuelto (O.D.): > 6 p.p.m.
- ✓ pH: 7 unidades
- ✓ Temperatura: < 18 °C

Estos parámetros se tuvieron en cuenta con el fin de tener los acuarios en óptimas condiciones antes de introducir los alevinos y realizar las pruebas.

Fotografía 7. Adecuación previa de los acuarios



Fuente: Los autores 2008

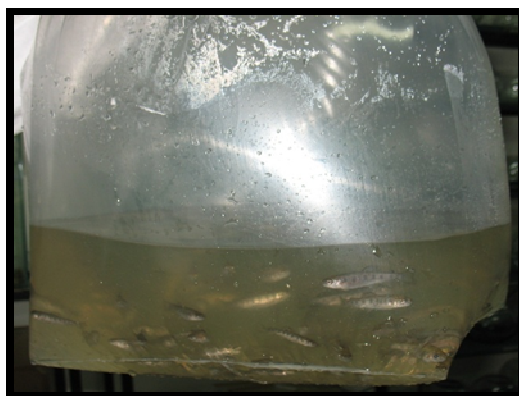
➤ **Aclimatación de los alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)**

Una vez obtenidas las condiciones adecuadas en los acuarios (transcurridos los 10 días), los alevinos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron obtenidos de la granja piscícola de Suralá en Chocontá, Cundinamarca. Los organismos fueron transportados en bolsas de polietileno de calibre 100 * 40 cm donde se introducen aproximadamente 200 alevinos de 4 cm cada uno con 35 días de nacidos (Ver fotografía 8).

Para el transporte de los alevinos los operarios de la granja deben inyectar oxígeno en las bolsas para que los peces estén bien acondicionados para el viaje. Una vez que los peces estuvieron en el lugar donde se realizaron las pruebas (laboratorio de Bioensayos de la Universidad de la Salle), se introdujeron las bolsas (donde se trasladaron los peces) en los 2 acuarios de 100 litros cada uno (Ver fotografía 9) por un periodo aproximado de una hora y media a dos horas. Este paso se realizó con el fin de igualar la temperatura del medio donde vienen los alevinos (bolsa), con la de los acuarios donde serán depositados. Transcurrido el periodo mencionado, se introdujeron los peces en pequeños grupos evitando verter el agua donde vienen al acuario (evitar contaminación del agua). Se debe tener en cuenta que la cantidad de

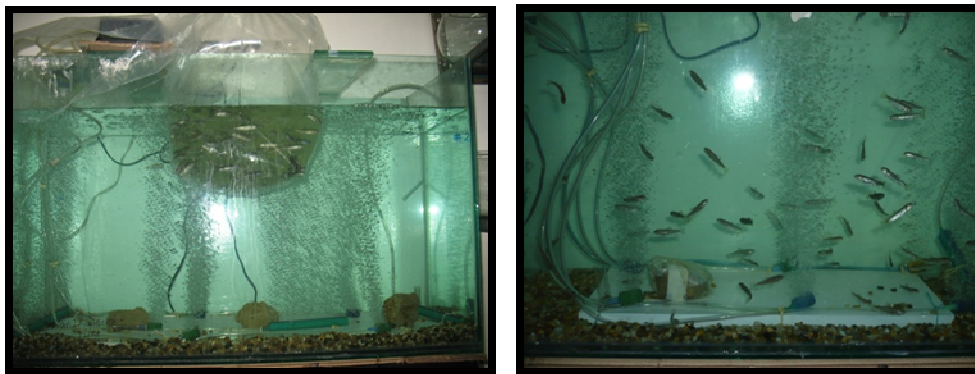
alevinos por acuario de 100 Lt. debe ser de 130 para no saturar los acuarios y además evitar que se consuma rápidamente el oxígeno disuelto presente en el agua (Ver fotografía 10). Según los protocolos internacionales (CETESB LBp01), los peces deben permanecer en los acuarios 15 días antes de ser realizadas las pruebas para evitar que los mismos se mueran por situaciones adversas al efecto del tóxico.

Fotografía 8. Traslado de los alevinos de Trucha Arcoíris en bolsas de polietileno.



Fuente: Los autores, 2008

Fotografía 9 y 10. Aclimatación de los alevinos antes de introducirlos a los acuarios e introducción de los mismos a los acuarios.



Fuente: los autores 2008

3.1.3. Alimentación

Los alevinos fueron alimentados dos veces al día (una vez en la mañana y una vez en la tarde) con Nutripez. Es necesario tener en cuenta que el alimento se suspende 24

horas antes del inicio de las pruebas de toxicidad para garantizar los resultados y su confiabilidad.

El alimento para los alevinos fue conseguido en casas de acuario en forma de hojuelas siendo importante conocer la proporción de su componente principal. La composición del alimento Nutripez en hojuela con vitaminas y minerales (el suministrado a los alevinos) es la siguiente:

Tabla 16. Composición del alimento de los alevinos

NUTRIPEZ EN HOJUELAS	
Composición	
Proteína mínima	38%
Grasa mínima	8%
Fibra máxima	2.5%
Ceniza máxima	9.8%
Humedad máxima	5%

Fuente: Los autores, 2008

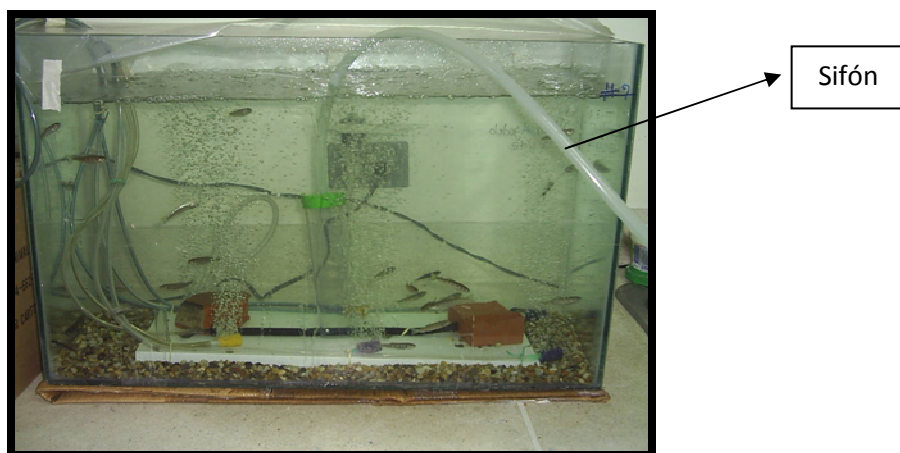
El alimento se mantuvo siempre en un lugar seco y fresco, protegido de la luz solar. Los sobrantes de dicho alimento en el acuario fueron retirados (por aspiración) ya que se podía descomponer y ser perjudicial para los alevinos.

La cantidad recomendada para los peces juveniles es del 5% al 7% de alimento diario respecto del peso corporal.

➤ **Mantenimiento de los acuarios durante el proceso de aclimatación de los alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)**

Una vez introducidos los alevinos a los acuarios debe hacerse un mantenimiento periódico (cada 2 días) de los mismos para evitar la producción de amonio, gases y la infección de los peces o en su defecto su muerte. Este mantenimiento se hace por medio de un sifón para retirar las heces y el exceso de comida que hay presente en el acuario (Ver fotografía 11). Para evitar la presencia de hongos en el acuario se le agregó al agua 2 gotas de azul de metileno.

Fotografía 11. Mantenimiento de los acuarios.



Fuente: los autores 2008

➤ Preparación del Agua de Dilución

El agua que fue utilizada para el mantenimiento de los acuarios y para las pruebas de toxicidad de los alevinos, fue preparada en un tanque de aproximadamente 1 m³ (ver fotografía 12). Esta fue oxigenada y declorada durante un periodo de tiempo de 8 a 10 días aproximadamente, hasta alcanzar una saturación del 80% de oxígeno (mediante bombas), para su previa utilización en las pruebas de sensibilidad y de toxicidad. Una vez transcurrido ese periodo se verificó que el oxígeno disuelto tuviera valores de 6.0 a 7.5 mg/l, temperatura entre 17 y 19 °C y pH de 6.5 y 7.5 unidades cumpliendo con los parámetros establecidos por los protocolos de CETESB LBp01.

El agua de dilución que se preparó en este tanque fue utilizada para las pruebas de sensibilidad con Dicromato de potasio y de toxicidad con Glifosato Roundup[®] 747_{SG} en las 24 peceras de 2,5 Lt cada una. Se realizó esta operación para garantizar la presencia de Oxígeno en el momento de realizar las pruebas y así garantizar que la mortalidad de los peces se debió exclusivamente al efecto del tóxico en los alevinos y no por razones distintas. En cada pecera se agregó la cantidad de tóxico dependiendo de las concentraciones que se manejaron y se llevó a 2000 ml (2 Lt.) con esta agua de dilución.

Fotografía 12. Preparación de agua de dilución.



Fuente: los autores 2008

3.2. FASE II. PRUEBAS DE TOXICIDAD

3.2.1. PRUEBAS PRELIMINARES Y DEFINITIVAS

En esta fase de la investigación se describen las pruebas de toxicidad donde se emplearon alevinos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, con un tamaño de 4 cm, peso de 1 gr y 35-45 días de nacidos.

A continuación damos a conocer como se prepararon las soluciones, el montaje de las pruebas de toxicidad, la realización de las pruebas de sensibilidad con Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (sustancia de referencia) y finalmente pruebas toxicológicas con Glifosato Roundup^R 747_{SG}, el cual es un herbicida utilizado en Colombia para la fumigación de cultivos ilícitos.

➤ Montaje de la prueba

El montaje se realizó utilizando 24 peceras de 2.5 litros cada una, colocadas en un stand acondicionado para la prueba. Estas 24 peceras se distribuyeron en 6 baterías con diferentes concentraciones y cada una organizada por cuadruplicado.

La primera batería de peceras fue utilizada como blanco y las 5 restantes fueron utilizadas para las diferentes concentraciones del tóxico, con el fin de obtener la CL₅₀₋₉₆. Las concentraciones preliminares fueron preparadas teniendo en cuenta los rangos conocidos de anteriores investigaciones del agente tóxico y las concentraciones definitivas fueron preparadas teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las pruebas preliminares y llevadas a las peceras a un volumen de 2 litros con agua de dilución. La prueba inicia en el momento de haber colocado el último alevino de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* en la última pecera. La lectura de las pruebas se realizó a las 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y finalmente a las 96 horas de haber comenzado la prueba de toxicidad. Estos resultados son registrados en una tabla de datos que se encuentra especificada en el anexo A.

3.2.2. Pruebas preliminares de toxicidad con Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

Al implementar los test de toxicidad, se hace necesario efectuar su estandarización que consiste en establecer la sensibilidad de la especie y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia, en este caso Dicromato de potasio K₂Cr₂O₇.

Las pruebas que se realizaron de sensibilidad abarcaron grandes rangos de concentraciones con el fin de establecer el 0 y 100% de la mortalidad del tóxico sobre los organismos utilizados.

Para la realización de las pruebas preliminares de sensibilidad se preparó la solución madre, es decir la solución base para la realización de las demás soluciones. Esta solución fue preparada a partir de dicromato de potasio a una concentración de 1000 p.p.m., ya que en investigaciones realizadas en la Universidad de la Salle se establecieron rangos de sensibilidad con una mortalidad del 50% de los organismos a

prueba. En anteriores investigaciones se utilizaron rangos de 0 – 500 p.p.m. arrojando como resultado que a una concentración de 100 p.p.m. la mortalidad de los organismos expuestos al tóxico es del 100%, dando como resultado la utilización de rangos que oscilan entre 0 – 100 p.p.m.

3.2.3. Pruebas definitivas de toxicidad con Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

Una vez obtenidas las concentraciones preliminares, se realizaron las pruebas definitivas utilizando los rangos selectivos de acuerdo con los resultados de los ensayos preliminares que permitieron la obtención de la respectiva CL₅₀₋₉₆. Para la obtención de la CL₅₀₋₉₆ se realizaron 19 pruebas de sensibilidad con los alevinos de trucha arcoíris hasta encontrar el dato exacto y garantizar la veracidad de los resultados.

Durante esta prueba se expusieron alevinos de Trucha Arcoíris a diferentes rangos de soluciones de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇), determinando las concentraciones que producirían la muerte del 50% de los organismos expuestos en un periodo de 96 horas. Las concentraciones que se utilizaron de K₂Cr₂O₇ fueron: 20 ppm., 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm y un blanco (agua decolorada). Cada concentración se realizó por cuadruplicado, es decir se realizó la prueba repitiendo cada concentración 4 veces para obtener resultados más exactos en las 24 peceras (Ver anexo A). Se tomaron éstas concentraciones basándonos en investigaciones realizadas anteriormente por la Universidad de la Salle (0-100ppm), Universidad Nacional de Colombia, Laboratorio de la CAR y Grupo Monsanto, con el fin de corroborar dichos estudios y comprobar si la sensibilidad de los organismos de prueba es la misma.

Las soluciones que se utilizaron para las pruebas se realizaron agregando cada concentración a cada una de las baterías y se llevo a un volumen de 2000 ml con agua de dilución. Una vez realizado este procedimiento y llenadas todas las peceras se agitaron muy bien y se esperó por un periodo de 15 minutos antes de empezar a colocar los peces. Previo a la introducción de los organismos es necesario pasar cada uno por agua limpia para evitar que las peceras se llenaran de heces o comida lo cual perjudicaría la prueba. Al introducir el último alevino en la última pecera empieza a

correr el tiempo el cual termina 96 horas después de iniciada la prueba. Cabe resaltar que durante las 96 horas los peces no pueden ser alimentados. A medida que los peces fueron muriendo, debieron ser sacados de las peceras para evitar errores en los resultados.

Durante la investigación, se realizaron otras pruebas de sensibilidad después de las pruebas con el Glifosato Roundup^R 747_{SG} para comprobar que los datos se encuentren en el rango previamente establecido.

Finalmente, obtenidos los resultados de mortalidad, se realizó el análisis de varianza y por último el análisis Probit para la obtención de la CL₅₀₋₉₆ (Miller – Miller 1996).

3.2.4. Pruebas preliminares de toxicidad con glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Para la realización de las pruebas preliminares se preparó la solución madre, es decir la solución base para la elaboración de las demás soluciones; fue preparada a partir del glifosato Roundup^R 747_{SG}, a una concentración de 1000 p.p.m.

Se prepararon seis (6) concentraciones iniciales, basándose en la concentración letal media del glifosato Roundup^R 747_{SG} establecida en investigaciones realizadas por la Universidad Nacional de Colombia y por la empresa Monsanto, las cuales arrojaron rangos de 7.2 a 12 ppm. Se realizó la prueba por cuadruplicado y se observó el comportamiento de la misma para saber si era necesario disminuir o aumentar los valores de las concentraciones. Las concentraciones iniciales utilizadas fueron 0.001p.p.m., 0.01 p.p.m., 0.1 p.p.m., 1.0 p.p.m., 10 p.p.m. y 100 p.p.m., estos valores se tomaron con base a los proporcionados en la metodología CETESB (ver anexo C y D), donde se indica tomar valores aleatorios en base 10.

3.2.5. Pruebas definitivas de toxicidad con glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Las pruebas definitivas con glifosato Roundup^R 747_{SG} se realizaron teniendo en cuenta los rangos de 0% y 100% de mortalidad, los cuales fueron obtenidos en las pruebas preliminares empleando aquellos que permitieron obtener la respectiva concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) del glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Esta etapa se estableció mediante la metodología descrita en el protocolo LBp02 “Pruebas de Toxicidad” obteniendo la concentración letal media (CL_{50-96}) del glifosato Roundup® 747_{SG}, con sus límites de confianza, manejando la metodología descrita en el protocolo LBp03 Análisis de Regresión y Análisis Probit (Ver anexo E) y validando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo LBp04 “Análisis de varianza” (Ver anexo F). Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación del grupo de Bioensayos y se encuentran en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria.

Las pruebas definitivas son consideradas válidas según metodología CETESB, dentro de las siguientes condiciones:

- ✓ La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y preferiblemente no más que el 5%.
- ✓ Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa, se descarta y se requiere la repetición de la misma.
- ✓ La concentración de oxígeno disuelto en las soluciones test durante el transcurso del ensayo debe ser mayor a 4 mg/l.

3.2.6. Obtención de Resultados

El valor se calcula con una confiabilidad del 95%. La estimación de este valor sigue un modelo matemático que asume relación continua entre dosis y respuesta. Este valor se obtiene por medio del método Probit; que es un modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición. Obteniéndose la CL_{50-96} con sus respectivos límites de confianza, para ello se realizó el protocolo LBp03 “Análisis de regresión y Análisis Probit”. Después de tener este resultado se procede a realizar el análisis de varianza según el protocolo LBp04 “Análisis de varianza” para comprobar que a diferentes

concentraciones de la sustancia pura o vertimiento, produce un diferente efecto en todos los organismos.

3.2.7. Análisis de Varianza para las Pruebas Toxicológicas

Para lograr un análisis de varianza adecuado se siguió el protocolo LBp04 “Análisis de varianza”, el cual se encuentra en el laboratorio de bioensayos de la facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle (Ver anexo F).

Se inicia postulando una hipótesis nula y una hipótesis de alternativa para la realización de la ANOVA, como se muestra a continuación:

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos.

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

Para el análisis del resultado se debe tener en cuenta la siguiente condición:

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

$F_c < F_t$: se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

Para determinar si dos variables difieren o no significativamente una de la otra, debemos hacer uso de la distribución F, ésta distribución fue escrita por primera vez por el estadístico R.A. Fisher.

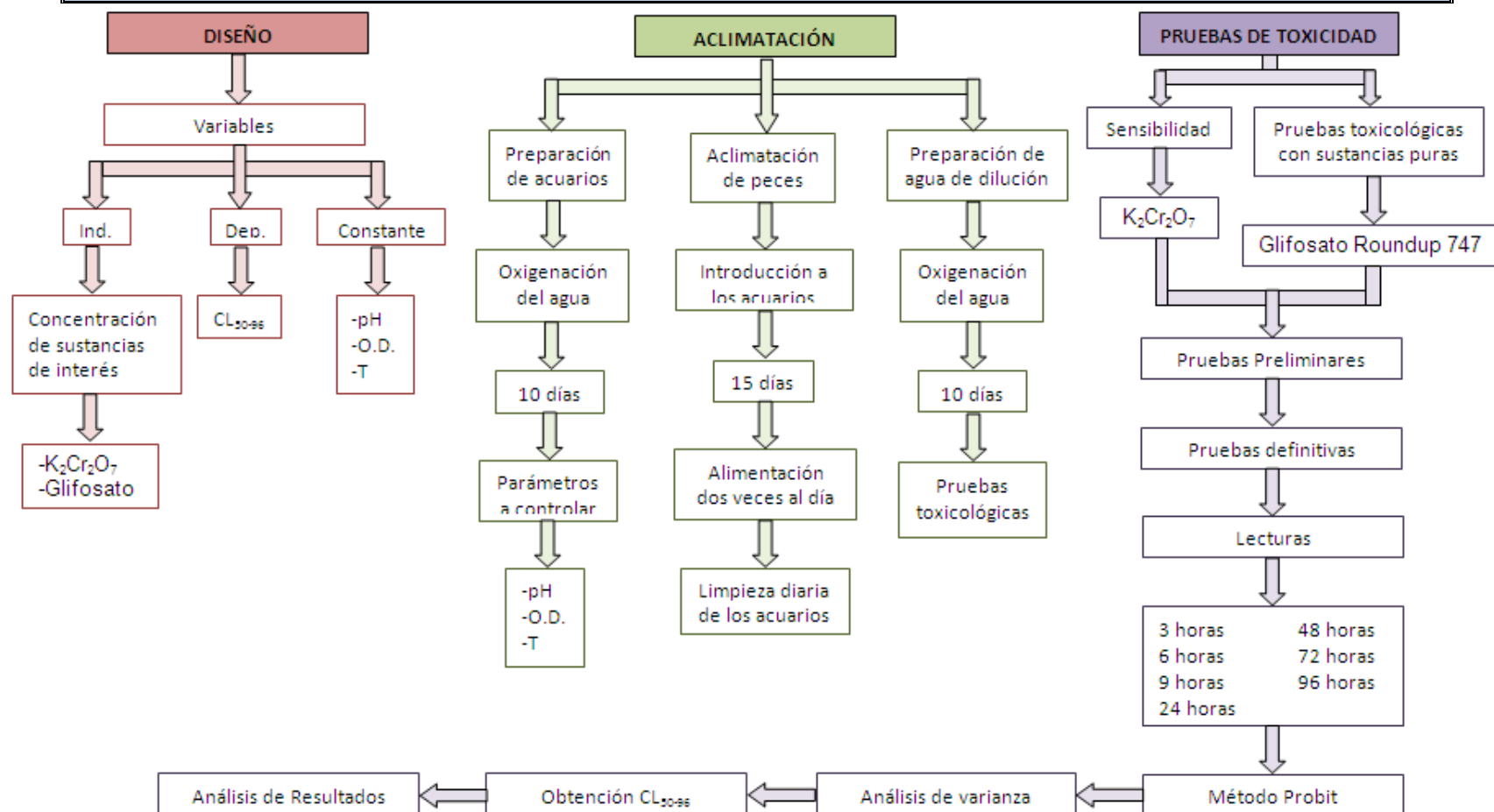
Inicialmente se deberá comenzar buscando el número de grados de libertad del grupo al que corresponda la varianza más pequeña. Una vez hallada y moviéndonos por la columna determinaremos la entrada del número de grados de libertad del grupo al que corresponda la varianza mas grande.

En este punto establecido, podremos concretar el valor crítico de F, el cual es necesario para rechazar la hipótesis nula, punto en el cual se plantea si no hay diferencias entre la varianza. La F, por si misma, se define como:

$$F = \frac{S^2 (\text{Varianza más grande})}{S^2 (\text{Varianza más pequeña})}$$

Para nuestro caso encontramos el valor crítico para F= 2.7728, por ello si Fc (calculado) es mayor que Ft (teórico), se rechaza la hipótesis nula.

DIAGRAMA 3. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50-96}) DEL GLIFOSATO ROUNDUP[®] 747_{SG} POR MEDIO DE BIOENSAYOS UTILIZANDO ALEVINOS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)



4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el desarrollo y análisis de las pruebas de toxicidad con glifosato Roundup® 747_{SG} y el tóxico de referencia (Dicromato de potasio), se adoptó la metodología ya establecida CETESB (Brasil), donde se identifican los pasos para obtener pruebas exitosas y comparativas con otros bioensayos regidos por la misma metodología.

A continuación se expresan los resultados obtenidos por este proyecto de investigación, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita.

4.1. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO (K₂Cr₂O₇).

Para obtener la sensibilidad de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), se calculó la concentración letal media CL₅₀₋₉₆ tomando como tóxico de referencia el Dicromato de Potasio, según lo establecido por la CETESB (Brasil), metodología que se ha venido trabajando en los anteriores grupos de investigación de Bioensayos de la facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.

La concentración letal media del Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇) se determinó con las concentraciones definitivas, realizadas entre el mes de mayo de y agosto de 2008, en las cuales se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 0% al 100%. Estos resultados, se calcularon con el programa estadístico Probit, en el cual se incluyeron los datos de los ensayos, determinando los respectivos límites de confianza al 95% (Ver anexo G). Con los resultados obtenidos se construyó la carta de control con el valor promedio y la desviación estándar, donde se presentan los resultados obtenidos de la evaluación (Ver Tabla 17).

Tabla 17. Carta de Control de Sensibilidad con Dicromato de Potasio y sus límites de confianza

N° de pruebas	Fecha	Límite Inferior (mg/L)	CL ₅₀₋₉₆ (mg/L)	Límite Superior (mg/l)
1	27/05/2008	31,0239	46,0041	58,6144
2	27/05/2008	43,3051	50,9009	58,8893
3	27/05/2008	39,8538	46,6607	53,6649
4	09/06/2008	37,4158	45,1073	52,3955
5	09/06/2008	40,2108	47,8316	55,2045
6	09/06/2008	43,5403	50,8601	57,0970
7	23/06/2008	46,8855	53,7093	60,1547
8	23/06/2008	45,3242	52,5067	59,4713
9	23/06/2008	58,9431	52,3423	45,5158
10	07/07/2008	54,0000	63,0600	73,1500
11	07/07/2008	58,0800	64,6500	70,9200
12	07/07/2008	54,9200	62,6200	70,2900
13	21/07/2008	52,4500	60,2500	67,8900
14	21/07/2008	44,0300	52,8500	61,8800
15	21/07/2008	51,0200	58,1000	64,7600
16	04/08/2008	43,3100	49,7900	55,5500
17	04/08/2008	39,7412	60,2373	93,5596
18	04/08/2008	43,2141	54,6811	64,2487
19	19/08/2008	41,4307	55,2281	66,9956
		Sumatoria	1027,3895	
		Promedio (X) CL₅₀₋₉₆	54,0731	
		S	5,98590404	
		2S	11,9718081	
		Limite superior (X+2S)	66,0449	
		Limite inferior (X-2S)	42,1013	

Fuente: Los autores 2008

Como resultado de la concentración letal media para la obtención de la sensibilidad de los organismos (alevinos de trucha arcoíris) frente al tóxico de referencia en la investigación, sus límites de confianza son:

Límite inferior: 42,1013 (mg/L)

CL₅₀₋₉₆: 54,0731 (mg/L)

Límite superior: 66,0449 (mg/L)

En la tabla 18 se hace una comparación del resultado de esta investigación con los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, los cual nos verificó la veracidad de los resultados obtenidos en esta investigación.

Tabla 18. Comparación de los resultados de sensibilidad con Dicromato de potasio con otras investigaciones

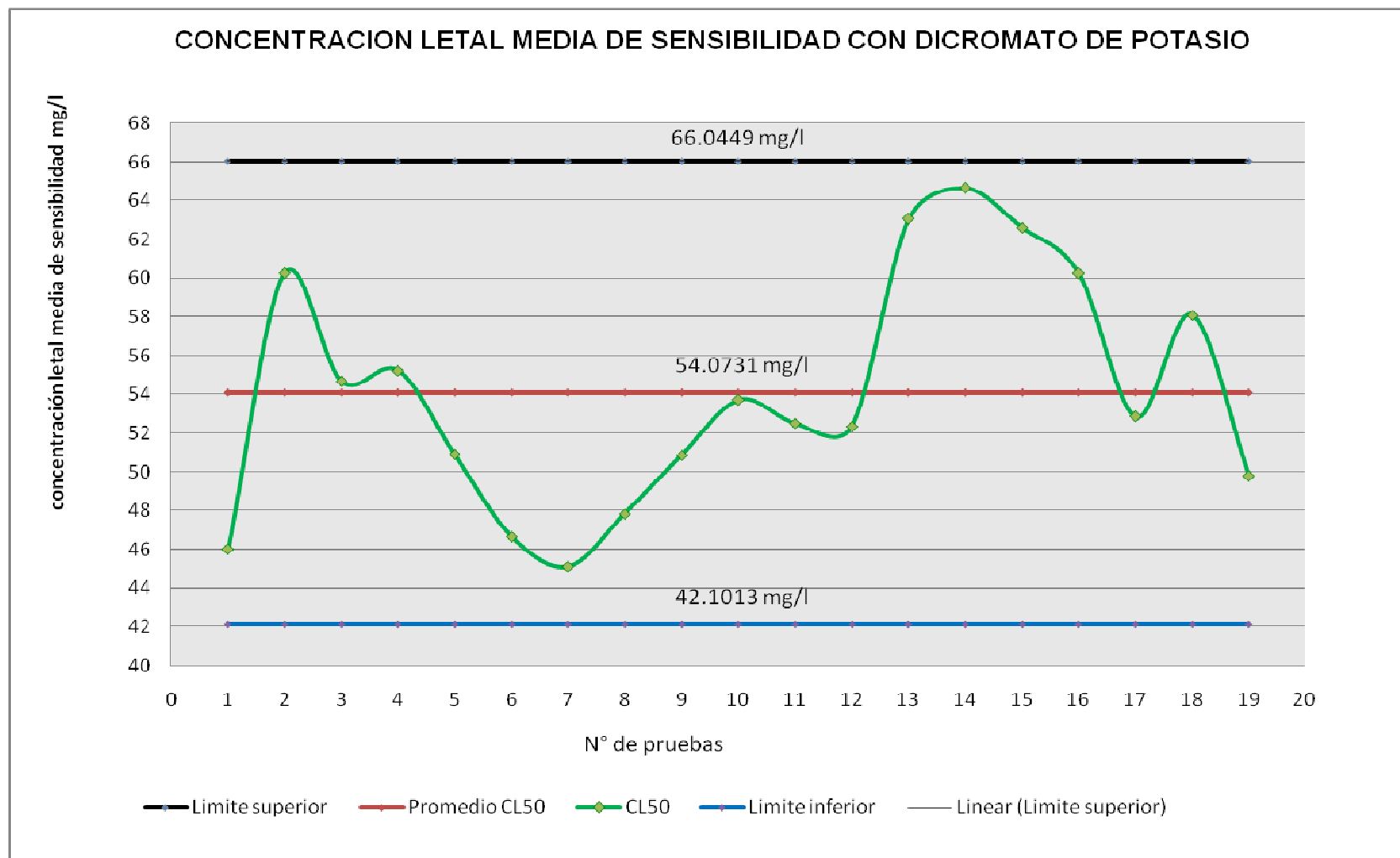
TITULO DE LA INVESTIGACIÓN	INVESTIGADORES	RESULTADOS OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO
Determinación de la concentración letal media (CL_{96}^{50}) de Níquel y Plomo mediante bioensayos con Trucha arco iris “alevinos de (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	Julián Agudelo Paula Ortiz	$CL_{50-96} = 51.43 \text{ mg/l}$
Determinación de la concentración letal media (CL_{96}^{50}) de Cadmio y Aluminio mediante bioensayos con Trucha arco iris “alevinos de (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	Ángela Grijalva Javier Bernal	$CL_{50-96} = 56,43 \text{ mg/l}$
Determinación de la concentración letal media (CL_{50-96}) del mercurio y el cromo utilizando alevinos de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	Carolina Matias Alejandra Duran	$CL_{50-96} = 55,98 \text{ mg/l}$
Universidad Nacional	Jaime F. González. (docente de la facultad de Medicina Veterinaria de la universidad nacional)	$CL_{50-96} = 55,932 \text{ mg/l}$
Determinación de la concentración letal media (CL_{50-96}) del glifosato Roundup 747, por medio de bioensayos utilizando alevinos de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	Enrique Gámez Carmen Barros	$CL_{50-96} = 54,07 \text{ mg/l}$

Fuente: Los autores

Podemos concluir de la anterior tabla que el resultado arrojado en la presente investigación ($CL_{50-96} = 54,07 \text{ mg/l}$) se encuentra dentro del rango (60 ppm – 80 ppm) y cercano a los valores obtenidos en las demás investigaciones, lo cual nos indica que los resultados obtenidos son confiables.

En la Gráfica 2, se presenta la distribución de las sensibilidades de la carta de control obtenidas durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio (CL_{50-96}) obtenido y sus respectivos límites.

Grafica 2. CL₅₀₋₉₆ Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇).



Fuente: Los autores 2008

Estos ensayos se realizaron con el fin de establecer la sensibilidad de la especie y su respuesta frente a un tóxico de referencia según las repeticiones del ensayo. Con estas pruebas se certificó que la respuesta de la población se debe a la sustancia que se desea analizar y no a variaciones del cultivo o a fallas operacionales en la aplicación del método, determinando el rango de variabilidad y sensibilidad frente al tiempo de exposición⁴⁰.

La concentración letal media (CL_{50-96}) promedio obtenida en las pruebas de sensibilidad es 54,0731 mg/l y sus límites de confianza son 66,0449 mg/l (límite superior) y 42,1013 mg/l (límite inferior) expresados como Dicromato de Potasio.

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad fueron muy similares, dando confiabilidad al momento de hacer los ensayos preliminares y definitivos del toxico (Roundup^R 747_{SG}), garantizando el buen estado fisiológico y de aclimatación de los organismos y así mismo garantizando un buen resultado de las pruebas.

⁴⁰ BERNAL Y ROJAS. 2007.

4.2. ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza se realizó siguiendo la metodología del protocolo LB04 del laboratorio de bioensayos de la Universidad de la Salle “Análisis de Varianza” (Ver anexo F).

Para la realización del análisis de varianza ANOVA de cada una de la pruebas, se postuló la hipótesis nula y la hipótesis alternativa de la siguiente forma:

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos.

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

Para el análisis del resultado se debe tener en cuenta la siguiente condición:

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

$F_c < F_t$: se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

En el anexo K, se encuentran todos los resultados de la manera como se ingresaron al programa y los distintos resultados arrojados.

4.2.1. Análisis de Varianza de las Pruebas Definitivas de Sensibilidad dicromato de potasio K₂Cr₂O₇

En la tabla 19 se presentan los resultados del análisis de varianza para las 19 pruebas definitivas con el Dicromato de potasio:

Tabla 19. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de sensibilidad Dicromato de Potasio.

N° Prueba	ANOVA		
	FECHA	Fc (F calculado)	Ft (F teórico)
1	27/05/2008	12.60	2.77
2	27/05/2008	10.08	
3	27/05/2008	56.51	
4	09/06/2008	32.78	
5	09/06/2008	41.07	
6	09/06/2008	48.79	
7	23/06/2008	52.82	
8	23/06/2008	70.64	
9	23/06/2008	30.86	
10	07/07/2008	08.62	
11	07/07/2008	10.94	
12	07/07/2008	04.10	
13	21/07/2008	15.27	
14	21/07/2008	33.22	
15	21/07/2008	58.20	
16	04/08/2008	33.22	
17	04/08/2008	45.04	
18	04/08/2008	79.46	
19	19/08/2008	58.33	

Fuente: Los autores 2008

Como lo muestra la tabla 19, se observa que F calculado es mayor al F teórico, esto quiere decir, que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Podemos concluir que las diferentes concentraciones producen efectos diferentes en los organismos de prueba, esto comprueba que al aumentar la concentración del Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇) aumenta la mortalidad de los organismos de prueba.

4.3. ENSAYOS CON EL HERBICIDA AGRICOLA GLIFOSATO ROUNDUP^R 747_{SG}

Para la realización de las pruebas de toxicidad se emplearon alevinos de trucha arco iris de 4cm y 35-45 días de nacidos los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de Glifosato Roundup^R 747_{SG} por un periodo de 96 horas, ya que esta demostrado que en este periodo de tiempo la mortalidad de los organismos de prueba se presenta por la acción del tóxico y no por inanición (alimento) u otras variables (pH,

temperatura, oxígeno disuelto). El resultado de esta exposición es la concentración letal media CL_{50-96} , la cual produce la mortalidad al 50% de la población expuesta.

Inicialmente se determinó el 0 y el 100% de la mortalidad de los alevinos con la prueba preliminar, teniendo en cuenta con que concentración ningún organismo se veía afectado (0%) y de la misma manera con que concentración se morían todos los organismos del tratamiento (100%). Al obtener estos rangos se realizaron repeticiones con el fin de corroborar los datos y garantizar la homogeneidad de los resultados. Una vez realizadas las pruebas preliminares, se iniciaron las pruebas definitivas teniendo en cuenta los resultados arrojados inicialmente (0% y 100% de mortalidad) para determinar el rango y hallar el valor de la CL_{50-96} del Glifosato Roundup^R 747_{SG}. De igual manera se cumplió con los protocolos internacionales establecidos por CETESB.

Se realizaron las diez (10) pruebas con concentraciones que variaban desde 0.001 p.p.m. hasta 100 p.p.m. de Glifosato Roundup^R 747_{SG}, donde los valores más altos representaban una mortalidad del 100% y el mas bajo representaba una mortalidad del 0% (Ver anexo B).

Una vez obtenidos los resultados de las 10 pruebas se determinaron los Límites de confianza Inferior (LCI) y límites de confianza Superior (LCS) a través del software estadístico PROBIT, los datos obtenidos de CL_{50-96} , LCI y LCS fueron promediados para determinar la Concentración letal media definitiva como se observa en la Tabla 20 (Carta de Control de Prueba de toxicidad para el Glifosato Roundup^R 747_{SG} y sus límites de confianza) que se presenta a continuación:

Tabla 20. Carta de Control de Prueba de toxicidad para el Glifosato Roundup^R 747_{SG} y sus límites de confianza

N° de pruebas	Fecha	Límite Inferior (mg/L)	CL_{50-96} (mg/L)	Límite Superior (mg/l)
1	19/08/2008	0,2332	0,9768	4,9765
2	19/08/2008	0,2566	0,8087	2,7715
3	02/09/2008	0,3506	0,9670	2,8471
4	02/09/2008	0,5195	1,3897	4,0570
5	02/09/2008	0,3877	1,1354	3,6883
6	15/09/2008	0,2567	0,9215	3,9773
7	15/09/2008	0,3361	1,0486	3,6792
8	15/09/2008	0,2872	0,8048	2,4255
9	30/10/2008	0,3506	0,9670	2,8471
10	07/10/2008	0,3361	1,0486	3,6792
		Sumatoria	10,06	
		Promedio (X)	1,006	
		Desviación estándar (S)	0,190	
		2S	0,381	
		Limite superior (X+2S)	1,388	
		Limite inferior (X-2S)	0,625	

Fuente: Los Autores 2008

Como resultado de la concentración letal media del Glifosato Roundup^R 747_{SG} utilizando los organismos (alevinos de trucha arcoíris) y sus límites de confianza son:

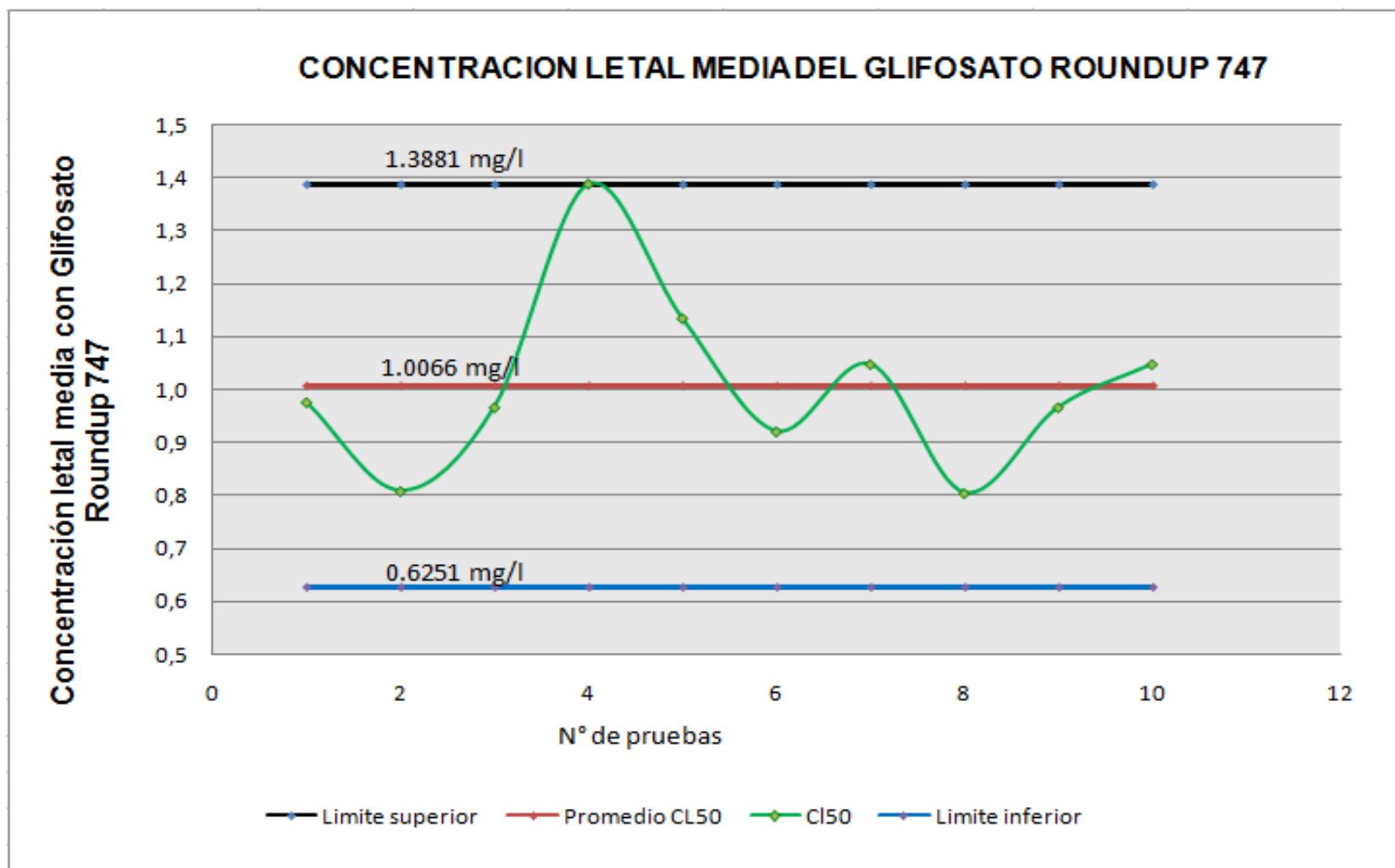
Limite Inferior: 0.625 mg/L

CL_{50-96} : 1.006 mg/L

Limite Superior: 1,388 mg/L

En la Gráfica 3, se presenta la distribución de los resultados de la carta de control obtenidos durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio obtenido y sus respectivos límites

Grafica 3. Carta de control de la Prueba de toxicidad para el Glifosato Roundup^R 747_{SG}









Fuente: Los Autores 2008

Como se puede observar en la gráfica 3 y en la tabla 20 los valores de toxicidad para la concentración letal media del Glifosato Roundup^R 747_{SG} varían en un rango de 0.625 mg/L (Límite Inferior) a 1,388 mg/L (Límite superior) y con un promedio de 1.006 mg/L. Es necesario afirmar que estos valores están por debajo de los establecidos por el Grupo Monsanto (7-12 p.p.m.), quien es el encargado de la fabricación y distribución de este herbicida en muchos países del mundo incluyendo Colombia. Comparando la legislación internacional de varios países con la nuestra que permite límites de 7-12 p.p.m., podemos observar que se encuentra en rangos superiores ya que en Estados Unidos se maneja un límite de 0.7 p.p.m., Canadá 0.28 p.p.m., Argentina 1.2 p.p.m., y en Brasil y Dinamarca esta prohibido el uso de este herbicida agrícola por sus efectos tóxicos, demostrando que Colombia maneja una normatividad imprecisa y muy flexible. Actualmente este herbicida es utilizado para las fumigaciones de cultivos ilícitos sin ningún reparo ya que se guían de los resultados mostrados por el grupo Monsanto. Es por esto que los datos obtenidos por esta investigación deben ser tenidos en cuenta y ser incluidos en el Decreto 1594 de 1984 ya que son datos reales y comprobados mediante pruebas toxicológicas. Se debe establecer un valor máximo permisible en la norma que no sea igual o mayor al valor de la CL₅₀₋₉₆ (1,006 p.p.m.) del Glifosato Roundup^R 747_{SG} sino que se encuentre por debajo el valor del límite inferior encontrado (0,625 p.p.m.).

En la tabla 21 se puede observar el comportamiento de los alevinos de trucha arcoíris frente al glifosato Roundup^R 747_{SG} durante el periodo de la prueba y utilizando un rango de concentración de 1 p.p.m. y 10 ppm de glifosato Roundup^R 747_{SG}.

Tabla 21. Registro fotográfico del comportamiento de los alevinos de trucha arcoíris en un rango de 1 p.p.m. y 10 p.p.m. de glifosato Roundup^R 747_{SG}.

TIEMPO	OBSERVACIONES
<p style="text-align: center;">3 horas</p> 	<p>Una vez comenzada la prueba se puede observar que los alevinos de trucha arcoíris se encuentran en buen estado y en este periodo de tiempo no hay mortalidad de los organismos expuestos al glifosato Roundup 747.</p>
<p style="text-align: center;">6 horas</p> 	<p>En este periodo de tiempo los organismos a prueba están comenzando a asimilar el toxico (glifosato Roundup 747) y a presentar nado errático, pero todavía no se presenta mortalidad.</p>
<p style="text-align: center;">24 horas</p> 	<p>A las 24 horas de comenzada la prueba los a los organismos expuestos ya demuestran las consecuencias del toxico (glifosato Roundup 747) y se observa la muerte de uno de los alevinos de trucha arcoíris. Muestran además dificultad para respirar (asfixia), se va oscureciendo la epidermis, mostraron signos nerviosos y movimientos natatorios lentos.</p>

<p>48 horas</p> 	<p>Una vez se encuentra el toxico (glifosato Roundup 747) en su metabolismo los alevinos de trucha arcoíris, comienzan a presentar dificultad para respirar y se observa inflamación en las branquias, oscurecimiento de la epidermis, signos nerviosos, algunos peces subían a la superficie con movimiento rápidos, en muchos de los casos los ojos se ubicaban fuera de sus orbitas y muchos de los peces saltaban de las peceras para evitar el tóxico.</p>
<p>72 horas</p> 	<p>En el periodo de tiempo de las 48 horas a las 72 horas ya se puede observar que el 50% de la población de alevinos de trucha arcoíris ha muerto. Cabe resaltar que después de transcurrido este lapso de 72 horas, la mortalidad de los organismos se mantiene estable sin mostrar diferencias entre las 72 y las 96 horas. En este tiempo se encuentra visible cual es la concentración que produce el 100% de la muerte de los organismos en prueba.</p>
<p>96 horas</p> 	<p>En el periodo de tiempo de las 72 horas y las 96 horas la mortalidad de los organismos permanece constante, ya que el toxico (glifosato Roundup 747) ya ha producido los efectos en los organismos.</p>

Fuente: Los Autores 2008

4.3.1. Comparación de los Resultados

Las concentraciones letales medias (CL₅₀₋₉₆) del Glifosato Roundup^R 747_{SG}, obtenidas en la presente investigación, fueron comparadas con otros resultados conseguidos en laboratorios de investigación en Colombia y en el exterior, para validar los resultados obtenidos (Ver tabla 22).

Tabla 22. Comparación de resultados

Formulación	ORGANISMO	CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA	REFERENCIA
Glifosato Roundup Original	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 8,2 mg/L	Grupo Monsanto Argentina
Glifosato®	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 22 mg/L	Bayer CropScience
Glifosato Max	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 1.2 mg/L	Grupo Monsanto Argentina
Glifosato Roundup PRO®	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 5.4 mg/L	Grupo Monsanto Argentina
Roundup® Transorb	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 20 mg/L	MONSANTO Europe S.A.
Roundup® FG	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : >1000 mg/L	Arysta Life Science
Glifosato Roundup PRODry®	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 3.0 mg/L	Monsanto Company
Roundup® Plus	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : >989 mg/L	Monsanto Company
Roundup®	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 13.0 mg/L	Katia Lily Montenegro Rayo Trick: Media-Tryck Lunds Universitet Lund 2004
Roundup® Ultra	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 7.4 y 12 mg/L	Mitchell et al. (1987)
Roundup® Ultra	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 2.3 y 13 mg/L	Folmar et al. (1979)
Roundup® Ultra	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 54.8 mg/L	Hildebrand et al. (1982) en laboratorio
Roundup® Ultra	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀₋₉₆ : 52.0 mg/L	Hildebrand et al. (1982) en campo
Roundup^R 747_{SG}	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL₅₀₋₉₆: 1.006 mg/l	Determinación de la CL₅₀₋₉₆ del Glifosato Roundup 747 por medio de alevinos de trucha arcoíris

Fuente: Los Autores 2008

4.4. ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza se realizó siguiendo la metodología del protocolo LB04 “Análisis de Varianza” (Ver anexo L).

Para la realización del análisis de varianza ANOVA de cada una de la pruebas, se postuló la hipótesis nula y la hipótesis alternativa de la siguiente forma:

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos.

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

Para el análisis del resultado se debe tener en cuenta la siguiente condición:

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

$F_c < F_t$: se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

En el anexo L, se encuentran todos los datos de la manera como se ingresaron al programa y los distintos resultados arrojados.

4.4.1. Análisis de Varianza de las Pruebas Definitivas de Glifosato Roundup^R 747_{SG}

En la tabla 23 se presentan los resultados del análisis de varianza para las 10 pruebas definitivas con el Glifosato Roundup^R 747_{SG}:

Tabla 23. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de Glifosato Roundup^R 747_{SG}.

ANOVA			
N° de Prueba	FECHA	Fc (F calculado)	Ft (F teórico)
1	19/08/2008	8.76	2.77
2	19/08/2008	15.99	
3	02/09/2008	20.96	
4	02/09/2008	39.60	
5	02/09/2008	16.29	
6	15/09/2008	15.6	
7	15/09/2008	28.73	
8	15/09/2008	30.33	
9	30/10/2008	20.96	
10	07/10/2008	28.73	

Fuente: Los Autores 2008

Como lo muestra la tabla 23, se observa que F_c (F calculado) > F_t (F teórico), indicando que se rechaza la hipótesis nula la cual indica que a diferentes concentraciones de tóxico se produce el mismo efecto en los organismos y se acepta la hipótesis alterna o verdadera. Podemos afirmar, teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, que al aumentar las concentraciones del tóxico (Glifosato Roundup^R 747_{SG}) el porcentaje de mortalidad de los organismos también aumenta. Dicho de otra manera, las diferentes concentraciones producen efectos diferentes en los organismos de prueba.

5. ALTERNATIVAS TECNICO AMBIENTALES PARA EL MANEJO ADECUADO DEL ROUNDUP^R 747_{SG}

5.1. SUBESTIMACIÓN DEL IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN A AGROTÓXICOS SOBRE LA SALUD HUMANA.

Sabemos que los agroquímicos producen efectos tóxicos agudos y crónicos. Los impactos de largo plazo (crónicos) sobre la salud humana pueden resultar tanto a partir de una única exposición a altas dosis de pesticidas, como también de exposiciones a lo largo de un extenso período de tiempo, aunque los niveles de exposición sean bajos. Pese a que la gente no sepa que estuvo expuesta, los problemas consecuentes pueden emerger muchos años luego de una exposición crónica a bajas dosis de pesticidas.

En virtud de la gran cantidad de pesticidas presentes en el ambiente y de la cantidad de posibles tejidos “blanco” y destinos finales que a menudo difieren dependiendo de la etapa de la vida en que sucede la exposición, se torna evidente la necesidad de abandonar el condicionamiento de toda medida protectora a la demostración científica de la inocuidad de estas sustancias basada en los criterios de peligrosidad recomendados por la OMS.

Ni las estrategias actuales ni las propuestas protegen la salud pública o el medio ambiente. Para ubicar a los plaguicidas en los diferentes rangos de peligrosidad la OMS se basa en la toxicidad del plaguicida, medida a través de la Dosis Letal 50 (DL₅₀). Este parámetro se define como un valor estadístico del número de miligramos del tóxico por kilo de peso, requerido para matar el 50% de una gran población de animales de laboratorio expuestos.

En caso de que un plaguicida ocasione daño a órganos vitales, posea efectos acumulativos muy marcados, sea particularmente peligroso o alergénico, la OMS realiza ajustes en su clasificación, ubicándolo en una categoría que indique mayor

peligro. De esta forma la clasificación se basa en la DL₅₀ de los plaguicidas, pero no utiliza exclusivamente este parámetro (PNUMA, 2000).

Recientemente se realizó un informe por parte de CICAD-OEA (Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas) donde se estableció que el glifosato no es muy móvil en el ambiente y se une rápida y fuertemente al entrar en contacto con el suelo y con sedimentos acuáticos. Además de tener una actividad biológica de corta duración en suelos y agua sin presentar filtración. Los estudios realizados demostraron, según este informe, que el Glifosato no es tóxico y no presenta efectos epidemiológicos en el ser humano.⁴¹

Por otra parte, el Instituto de Estudios Ambientales (IDEA) Universidad Nacional de Colombia presentó un informe mostrando serias inconsistencias en los resultados mostrados por la CICAD (Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas). Argumentan que en el Informe de la CICAD solo se tomaron en cuenta en el punto referente a la salud humana estudios secundarios y se buscaron efectos en donde posiblemente no los había o donde eran mínimos. Otro aspecto que señalan es que no se tomo en cuenta los efectos por aspersión aérea con Roundup en la remoción de la cobertura vegetal.⁴¹

Recalcan que en el informe la información acerca de las áreas afectadas por fuera de los cultivos objetivos de las fumigaciones no se midió ya que solo se tuvieron en cuenta observaciones visuales.⁴¹

Finalmente, expresan que en la mayoría de los casos referentes a la salud humana (exposición directa en campesinos, exposiciones vía dieta y agua de consumo) se recurre a estudios literarios y no se tomaron en cuenta más de 8.000 denuncias que existen en la DNE (Dirección Nacional de Estupefacientes).⁴¹

⁴¹ Estudio de los efectos del programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. CICAD, 2005. www.oas.org

El laboratorio de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Caen en Francia realizó un estudio donde demuestra que la utilización de las concentraciones de glifosato actuales para la agricultura afecta la actividad enzimática de la células de la placenta (células llamadas JEG3 cells)⁴².

El estudio probó el proyecto con concentraciones mas bajas de glifosato hasta niveles donde no fuera toxico, demostrando que aún en las concentraciones cien veces menores era toxico para estas células⁴².

Realizando este estudio también se comprobó que el glifosato sorpresivamente se vuelve más tóxico por el ingrediente activo del Roundup permitiendo que las plantas a las que se les aplicaba hicieran mayor bioacumulación de esta toxina. El problema radica en que las toxinas cuando son consumidas por el hombre pasan al torrente sanguíneo y afectan precisamente las enzimas que están en las células de la placenta. Finalmente menciona que la toxicidad en las células placentarias podría inducir algunos problemas de la reproducción⁴².

Por su parte, la Doctora Elsa Nivia (Ingeniera agrónoma. Licenciada en biología y química. Directora ejecutiva RAPALMIRA – América latina) afirma que el Roundup por contener el surfactante POEA (Polioxietileno Amino) tiene una toxicidad aguda tres veces mayor que la del glifosato. El POEA causa daño gastrointestinal y al Sistema Nervioso Central, problemas respiratorios y destrucción de glóbulos rojos en humanos. El POEA está contaminado con 1-4 dioxano, el cual ha causado cáncer en animales y daño a hígado y riñones en humanos⁴³.

Manifiesta además que, el glifosato puede contener cantidades traza de N- nitroso glifosato o este compuesto puede formarse en el ambiente al combinarse con nitrato

⁴² RICHARD, Sophie. MOSLEMI, Safa. BENACHOUR, Nora. SIPAHUTAR, Herbert. Informe sobre efectos diferenciados del glifosato y Roundup sobre células placentarias. laboratorio de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Caen en Francia

⁴³ NIVIA, Elsa. Red de Acción en Plaguicidas Y Alternativas- América Latina- Colombia. Sentencia del tribunal de Cundinamarca, expediente Número 02-022

(presente en saliva humana o fertilizante); y que la mayoría de compuestos N- nitrosos son cancerígenos y no existiendo nivel seguro de exposición a un cancerígeno. El formaldehído, otro carcinógeno conocido, es también un producto de descomposición del glifosato⁴³.

Algunas de las formulaciones comerciales del Glifosato incorporaban este surfactante POEA, en una proporción cercana al 15 %. Este compuesto, según varias investigaciones toxicológicas, puede ser causa de daños gastrointestinales, ciertas afecciones al sistema nervioso central, algunos problemas respiratorios y ser capaz de destruir los glóbulos rojos en la sangre humana.

Del POEA se dice, también, que puede contener una impureza identificada como 1- 4 Dioxano la cual, se menciona igualmente, que ha demostrado tener capacidad cancerígena para animales y de causar daño en el hígado y los riñones de los humanos.

5.2. MUCHOS RIESGOS SANITARIOS TODAVÍA SON DESCONOCIDOS

Todavía es mucho lo que no sabemos sobre los problemas de salud que pueden resultar de la exposición a pesticidas. La mayoría de pesticidas nunca han atravesado una evaluación de riesgo sobre seres humanos. Recientemente se desató una polémica en los EE.UU. debido a un programa de la EPA que estaba a punto de pagarle 1.000 dólares a cada familia cuyos niños serían expuestos a pesticidas y videofilmados durante dos años. Aún así, los lineamientos de evaluación de riesgos de la EPA no requieren la observación de diversas zonas álgidas de testeo tales como la neurotoxicidad del desarrollo o la disrupción endócrina. Tampoco es evaluada por esta agencia norteamericana la exposición múltiple, es decir, a varios pesticidas diferentes simultáneamente, aún cuando este tipo de exposición ocurre con suma frecuencia. Por otro lado, los ingredientes no activos en las fórmulas comerciales de pesticidas (llamados “ingredientes inertes”) también pueden ser dañinos, y no son identificados en las etiquetas del producto.⁴³

5.3. EFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA DE LA DERIVA DE AGROQUÍMICOS POR ASPERSIÓN AÉREA.

El desvío o deriva de pesticidas es inevitable cada vez que se fumiga. La magnitud de la deriva es máxima a partir de la fumigación aérea, en la cual típicamente se pierde alrededor de un 40 % del pesticida aplicado. Esta deriva debido a la aspersión aérea es constatada a cientos de metros del sitio de aplicación, y puede llegar a varios kilómetros. Incluso la fumigación terrestre puede derivar a distancias considerables.

Los efectos de la deriva sobre la salud humana son difíciles de investigar, aunque existen varios estudios que documentaron problemas sanitarios vinculados a este tipo de exposición. La deriva ocurre en todo lugar y momento en los que se utilizan pesticidas mediante aplicación aérea. La magnitud de deriva puede variar entre un 5 y un 60 % aunque se estima que alrededor de un 40% de una aplicación aérea de pesticidas abandona el “área blanco”. Varios pesticidas de extenso uso se encuentran con frecuencia muy lejos del sitio de su aplicación y en concentraciones bastante mayores a los niveles de exposición aguda o crónica considerados “seguros” por las agencias reglamentadoras. Para que las agencias encargadas se responsabilicen de velar por la salud pública a través de una reducción y eliminación del uso de los pesticidas susceptibles a la dispersión en el aire, se deben tener en cuenta algunos hechos:

1. El movimiento de cualquier pesticida (insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc.) por el aire lejos de su sitio de aplicación, se considera dispersión e incluye rocío, polvos, pesticidas volatilizados o en estado de vapor, y partículas del suelo contaminadas. A veces la dispersión es obvia porque toma la forma de una nube de gotitas o polvo durante la fumigación, o a veces se presenta como un olor desagradable después de la fumigación. A menudo es insidiosa, invisible e inodora, y puede persistir durante días, semanas o hasta meses después de la aplicación debido a que las sustancias químicas volátiles se evaporan y contaminan el aire.

2. A pesar de la necesidad de aplicar controles durante la fumigación para reducir la dispersión en el aire asociada con la aplicación de los pesticidas, estos no son suficientes para controlar la dispersión que ocurre después de aplicar pesticidas volátiles. Para encarar adecuadamente todos los efectos dañinos causados por la dispersión de los pesticidas en el aire, se debe regular la dispersión después de la aplicación tal como esta se regula durante la aplicación.

5.4. LA LEGISLACIÓN VIGENTE NO REGULA LA MAYORÍA DE LA DISPERSIÓN EN EL AIRE QUE OCURRE POSTERIORMENTE A LAS APLICACIONES DE PESTICIDAS.

La dispersión de los pesticidas en el aire resulta en muchos casos de envenenamiento cada año. Entre los años 1997 y 2000, la dispersión de los pesticidas en el aire causó la mitad de todos los casos reportados de envenenamiento por pesticidas relacionados con su uso en la agricultura, así como la cuarta parte de todos los casos reportados de envenenamiento por todos los usos de pesticidas. Muchos de los casos de envenenamiento causados por la dispersión de los pesticidas en el aire no se reportan, porque ni la víctima, ni el médico, relacionan los síntomas con el uso de pesticidas. En otros casos, el médico no presenta el informe o la persona afectada no acude a o no cuenta con los recursos económicos para la atención médica necesaria ⁴³.

5.5. EL PROGRESIVO EFECTO DEL GLIFOSATO

Para comprobar que tan inocuo o tóxico es realmente el glifosato, herbicida polémico por ser el elegido para erradicar los cultivos ilícitos en Colombia, los investigadores experimentaron su acción en cuatro especies de peces de gran importancia en

acuicultura⁴⁴.

La tilapia, un pez de origen africano que en las especies foráneas ocupa el primer lugar en producción; el yamú, peces omnívoros oriundos de la Orinoquía Colombiana con poca fuerza en el mercado, pero con grandes cualidades nutricionales; el bocachico del Magdalena, ad portas de la extinción, y la cachama blanca, especie que en el primer experimento, realizado hace un año, sufrió daños severos en branquias e hígado.⁴⁴

El estudio, apoyado por la Fundación Internacional para la Ciencia, IFS, organismo sueco que promueve la investigación en países en vía de desarrollo, ha tenido como objetivo observar lo que le ocurre a una especie animal, en este caso, peces, cuando se expone aguda y crónicamente a concentraciones bajas de herbicidas, como sucede en las zonas de fumigación.⁴⁴

En este nuevo estudio los peces fueron expuestos durante 96 horas a concentraciones subletales, entre 10 y 30 partes por millón, de glifosato en su forma comercial, Roundup®, y a concentraciones altas, entre 45 y 90 partes por millón.

Las dos especie más susceptibles a la acción del químico, aun en concentraciones bajas, fueron el bocachico y el yamú, que registraron altas mortalidades. La tilapia fue la especie más resistente, pues solo murió cuando estuvo en contacto con las concentraciones más altas.⁴⁴

Antes que los animales murieran manifestaron signos nerviosos y dificultad respiratoria. Según el profesor González – investigador principal de la Universidad Nacional, “al estar en el fondo, algunos peces subían con rapidez a la superficie, como queriendo salir del acuario. A veces nadaban sobre su eje o, si estaban en la superficie, se dejaban caer pesadamente al fondo”.⁴⁴

⁴⁴ CORDERO HEREDIA, David y SÁNCHEZ, Francisca. Regulaciones internacionales del glifosato. Boletín 245 de la Red por una América Latina Libre de Transgénicos RALLT / Coordinación: [Acción Ecológica](#)

Al observar el comportamiento de la enzima acetilcolinesterasa, presente en el tejido nervioso, la sangre y el plasma, entre otros, los investigadores notaron que bajaba o aumentaba repentinamente su actividad. Ante los impulsos, esta enzima es la encargada de hacer que las células nerviosas entren en un estado de reposo. Si no fuera así, el organismo se agotaría. Se observó que el glifosato, tanto en concentraciones bajas como altas, alteraba la enzima y llevaban a que la transmisión de impulsos fuera continua, de ahí los síntomas nerviosos de los peces.⁴⁴

Estos mismos cambios en la enzima colinesterasa fueron corroborados en experimentos de 17 días de duración, en cachama blanca y tilapia roja expuestas a 5 partes por millón del herbicida.

Otro cambio importante ocurrió en la respiración de los animales, pues la mayoría buscaba oxígeno en la superficie del acuario. Lo que más llamó la atención fue que la sangre de los peces se tornaba oscura. Al respecto, el director del Laboratorio comenta: “Notamos que el Roundup® causa oxidación en el hierro de la hemoglobina, fenómeno conocido como estado de metahemoglobina o sangre achocolatada, que lleva a que el individuo no pueda captar oxígeno y respirar adecuadamente”.

El Roundup®, al igual que el paraquat, indujo la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, que ocasiona la muerte de las células.⁴⁴

Es necesario aclarar que los experimentos se hicieron con un glifosato cuyos surfactantes, químicos que le permiten adherirse y actuar sobre la maleza, son menos tóxicos que los utilizados para fumigar los cultivos ilícitos.

El profesor González señala que aunque estos resultados se circunscriben a los peces, y por lo tanto sería prematuro extrapolarlos a otras especies, hay que tener en cuenta que enzimas como la acetilcolinesterasa y los cambios en la hemoglobina también podrían presentarse en organismos superiores, como los animales terrestres, incluido el ser humano.⁴⁴

5.6. LOS CONTROLES DE LA DISPERSIÓN SON INEFICACES.

El lenguaje que se utiliza en las etiquetas de los productos pesticidas, no contribuye a un control adecuado de la dispersión en el aire durante la fumigación.

En el año 2000, la U.S. EPA norteamericana comenzó un proceso para que las etiquetas fueran más consistentes con todos los productos y, en un principio, se basó en medidas para proteger la salud, prohibiendo, a través de las etiquetas, que la dispersión de los pesticidas en el aire alcanzara a las personas, a los edificios ocupados por personas, a las propiedades y los sitios ajenos al campo fumigado. Desgraciadamente, la agencia produjo una enorme ambigüedad al declarar que un nivel bajo de dispersión, el cual no definieron, es inevitable y así aceptable.⁴⁴

5.7. REGULACIONES INTERNACIONALES DEL GLIFOSATO.

A continuación en la [tabla 24](#) se describen las normativas de varios países, así como de organismos internacionales, sobre el uso del glifosato. Las regulaciones varían de acuerdo al estándar de protección que cada Estado ofrezca a sus habitantes en materia de salud y nutrición. Muchas de las cosechas que se realizan en la zona de frontera con Colombia se encuentran contempladas en estas regulaciones e indican el residuo máximo de glifosato que pueden contener para que sean aptas para el consumo humanos⁴⁵.

Tabla 24. Normatividad de varios países sobre el uso del Glifosato

PAÍS	NORMATIVIDAD
ESTADOS UNIDOS	<p>EPA: Debido a la aprobación de la ley sobre seguridad de agua potable, la EPA determinó niveles seguros de químicos en el agua potable que causen problemas de salud. Estos niveles son llamados metas máximas de niveles contaminantes (MCLG).</p> <p>El MCLG para el glifosato se fijó en 0,7 ppm porque este nivel no podría causar</p>

⁴⁵ CORDERO HEREDIA, David y SÁNCHEZ, Francisca. BOLETIN 245 de la RED POR UNA AMERICA LATINA LIBRE DE TRANSGENICOS / Coordinación: Acción Ecológica

	<p>ningún problema.</p> <p>Basado en esto se fijó un Standard llamado nivel de contaminación máximo (MLC) los cuales son fijados lo más cercano posible a los MCLG.</p> <p>El MCL ha sido fijado en 0,7 ppm porque la EPA cree que con los recursos y tecnología actuales, este es el nivel mínimo en que los sistemas de agua pueden ser requeridos para remover el contaminante en el caso en que ocurra en el agua potable.</p> <p>El glifosato está clasificado por la EPA como clase E (evidencia de no carcinogénesis en humanos). Exposiciones continuadas a residuos en aguas en concentraciones superiores a 0,7 mg/l pueden causar efectos negativos en seres humanos.</p> <p>Según la EPA, en Estados Unidos el glifosato se propone usar en vegetación indeseada, dentro y fuera de sembradíos, bosques, áreas industriales y áreas residenciales. La etiqueta del producto que ha venido utilizando hasta la fecha estipula "Este producto es solamente para uso en áreas donde no hay cultivos o árboles. No para uso en cultivos, árboles, u otras plantas cultivadas para la venta u otros usos comerciales". La fumigación de cultivos de alimentos ciertamente no es consistente con el uso "no-agrícola" de herbicidas en los Estados Unidos, de acuerdo con los requisitos de la EPA.</p> <p>Consiste en aplicaciones de soluciones concentradas de herbicida donde hay poco o ningún contacto de trabajadores con las plantas que han sido fumigadas. La EPA usa especificaciones en formulaciones significativamente menos tóxicas, autorizando el uso de un máximo de 2,94% de solución. La mayoría de las etiquetas para uso forestal y vías de transporte de glifosato en Estados Unidos sugiere la aplicación con helicóptero.</p> <p><u>Farm Chemicals Handbook (1990):</u> No se recomiendan las aplicaciones aéreas, únicamente en áreas no agrícolas y cultivos con las consideraciones anotadas y el ingrediente activo está clasificado como categoría II.</p>
ECUADOR	<p>El INIAP establece que el uso del glifosato está dirigido al combate de malezas anuales y perennes de hoja angosta y ancha en áreas cultivadas y no cultivadas. Es aplicado sobre el follaje y trasladado al sitio de acción donde ejerce su acción tóxica. Para este propósito el INIAP recomienda el uso del glifosato en áreas agrícolas considerando aplicaciones dirigidas con pantalla en cultivos perennes y totales sobre áreas no cultivadas. La dosis que se recomienda aplicar varía de 2 a 4 litros de producto comercial por hectárea, considerando dosis menores para especies anuales y mayores para especies perennes.</p>

COLOMBIA	<p>EL Ministerio de interior y de justicia/ Dirección Nacional de Estupefacentes establece que para la aspersión de cultivos de coca se utiliza:</p> <p>Mezcla de glifosato, agua y coadyuvante: 23,65 Lt./ha (10,4 Lt. de glifosato/ha)</p> <p>Aspersión de 1,04 ml por mt².</p> <p>Concentración máxima de 480 mg/l (p.p.m.)</p> <p>Cada mt² asperjado recibe 0,499ml de ingrediente activo.</p> <p>Carga del avión 300-450 galones (1137-1705 litros).</p> <p>Descarga efectiva (de Roundup Ultra con 43,9% de glifosato) 23,4 Lt./ha (30 a 50 gotas/cm²) 10,3 Lt./ha de glifosato.</p> <p>Depósito de mezcla 0,4-0,7mn3/cm2 40-70 l/ha.</p>
CANADA⁴⁶	<p>El texto para tratamiento pre-cosecha que va a aparecer en la etiqueta de Roundup incluye afirmaciones sobre: (1) impedir contaminación de agua, (2) mantener una zona parachoques de 15 m alrededor de áreas de no concentración, (3) impedir derivación o sobre-aspersión en áreas de no concentración de hábitats de vegetación y fauna. La etiqueta contiene también una declaración que prohíbe la aplicación por avión.</p> <p>Roundup se debe aplicar en la pre-cosecha en 2,5 Lt. /ha en 50 a 100 Lt. /ha de agua limpia por la aplicación únicamente del suelo. Roundup se debe aplicar cuando el cultivo tiene 30% o menos contenido de humedad de grano. Esta etapa ocurre típicamente 7 a 14 días antes de la cosecha. Las aplicaciones para el control de hierba (tanto para la administración de cosecha o no) debe ser hecho en la etapa correcta de tanto del crecimiento de hierba como cosecha. La aplicación más temprana puede reducir el rendimiento de la cosecha y/o la calidad, y puede llevar a residuos excesivos de glifosato en la cosecha.</p> <p>Evitar sobre-aspersión o deriva hacia hábitats importantes de fauna tales como las masas de agua, fuentes de agua, bosques y otra cubierta en las orillas de campos frecuentados por fauna. NO APLICAR POR AVION.</p> <p>Estándares para agua potable en Canadá y criterios de salud</p> <p>-Concentración Máxima Aceptable Intermedio (IMAC) de glifosato es 0,28 mg/L (p.p.m.) (Guideline January 1987).</p> <p>-Cantidad Admitida Insignificante Diariamente para el glifosato (NDI) de 0.03 mg/kg bw por día.</p>
PAISES BAJOS	<p>El glifosato puede ser aplicado a cereales, papas y espárragos inmediatamente (más de 7 días) antes de la cosecha, pero solo cuando la maduración está completa. Tratamiento para cultivos no maduros van a resultar en niveles mayores</p>

⁴⁶ Dirección General de producción e inspección de alimentos. Dirección de pesticidas Documento de decisión E92-02

	de residuos, cultivo desecación.
BRASIL	Desde 1998 organismos genéticamente alterados fueron prohibidos gracias a una demanda presentada por grupos de consumidores. Por tanto el uso del glifosato quedó restringido. Monsanto impulsa campañas para su legalización.
DINAMARCA	Después de estudios que revelaron que el agua que consumían los daneses contenía 5 veces más glifosato de lo permitido para el consumo humano, el Ministerio de Salud prohibió su uso en sitios cercanos a fuentes de agua, así como en temporadas o sectores lluviosos, de tal forma que no pueda llegar a contaminar el agua. Esta prohibición se encuentra vigente desde 2003.
UNION EUROPEA	En 1996 se estableció el límite máximo de glifosato residual en soya: 20 mg/kg. La compañía Monsanto, por su parte, consiguió un permiso en el que se establece una concentración máxima de glifosato en alimentos derivados de cultivos transgénicos de 20 p.p.m. en la soya transgénica.
PARAGUAY	El 30 de junio de 2005, Hermann Schlender y Alfredo Laustenlager fueron condenados por homicidio culposo, por la muerte de Silvino Talavera. Silvino Talavera murió el 7 de enero de 2003 víctima de una seria deshidratación por vómito y diarrea producidos por la exposición a Roundup de Monsanto. En dicho caso se determinó que el uso irresponsable del agro tóxico en aspersiones aéreas y sin utilizar las recomendaciones del fabricante genera responsabilidad penal. El litigio se concentró en demostrar el nexo causal entre la fumigación y la muerte de Silvino Talavera, los jueces del caso determinaron que dicho vínculo quedó demostrado con los síntomas que presentaban los pobladores de la región.

Fuente: CORDERO HEREDIA, David y SÁNCHEZ, Francisca. BOLETIN 245 de la RED POR UNA AMERICA LATINA LIBRE DE TRANSGENICOS / Coordinación: Acción Ecológica. Regulaciones internacionales del glifosato

A continuación en la tabla 25 se muestra un resumen de los niveles permisibles en cada país.

Tabla 25. Comparación de resultados de los límites permisibles en diferentes países

PAIS	Límite Permisible (p.p.m.)	Cantidad por Hectárea (Lt/ha.)
Estados Unidos	0.7	2.5
Ecuador	-	2 – 4
Colombia	7 - 12	23.4
Canadá	0.28	2.5
Brasil	Uso de Glifosato Prohibido	
Dinamarca	Uso de Glifosato Prohibido	
Unión Europea	20 p.p.m. por permiso conseguido por Monsanto en cultivo de Soya	-

Fuente: Los Autores 2008

Podemos concluir de la anterior tabla que Colombia es un país muy permisivo en cuanto a la utilización del glifosato, ya que la presente investigación arrojó un valor de concentración letal de 1.0066 mg/l; lo cual indica que a una concentración de glifosato mayor a ésta las consecuencias serán mas nocivas para los organismos que se encuentren en contacto con el toxico (glifosato).

Recientemente, la Universidad Nacional de Colombia analizó un estudio realizado de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato. Sobre estudios que indican riesgos en la salud se destacó la investigación que realizó Maldonado (2003) y que presenta evidencias de lesiones genéticas en el 36% de las células de la totalidad de mujeres que estuvieron expuestas a fumigaciones con el herbicida en la frontera colombo – ecuatoriana.

Otras evidencias en la misma línea debieron ser consultadas (Nivia, 2001; Warren, 2001; Kaczewer, 2002)⁴⁷.

Igualmente, Richard *et al.*, en una reciente investigación sobre los efectos diferenciales del glifosato y el Round-up, demuestran que el glifosato es tóxico para las células placentarias humanas dentro de las 18 horas siguientes a la exposición en concentraciones más bajas que las usadas en agricultura y que este efecto se incrementa con el aumento en la concentración y el tiempo de exposición o en presencia de coadyuvantes del Roundup⁴⁷.

Estos investigadores reflexionaron que la salud de los seres humanos no es solamente física, también es mental. Hubiera sido interesante explorar qué efectos psicológicos tiene la fumigación aérea en las percepciones de niños, hombres y mujeres que se ven afectados por estas acciones en donde participan, como lo admite el equipo de expertos, aviones de combate y helicópteros artillados⁴⁷.

⁴⁷ SICARD, Tomás León. BURGOS SALCEDO, Javier. TORO PÉREZ, Catalina y LUENGAS BAQUERO, César. Estudio de los efectos del programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Universidad Nacional de Colombia - Instituto de Estudios Ambientales (IDEA). Bogotá, mayo 11 de 2005.

Colombia es quizás, el único país del mundo en donde existen más de 8.000 personas que se han quejado por diversos efectos de las fumigaciones. Es con ellos y para ellos que se debieran realizar los estudios sobre efectos nocivos en salud, animales domésticos, cultivos lícitos y ecosistemas. Las bases de datos de la Defensoría del Pueblo y de la Dirección Nacional de Estupefacientes, contienen abundante información que podría utilizarse en este caso⁴⁷.

Entre los reportes de daños ocasionados por las fumigaciones en Colombia existen informes sobre la muerte de peces y otra vida acuática, así como daños a cultivos lícitos, bosques vírgenes y fauna, incluso daño a la salud humana. Dado el hecho de que muchos ríos pasan desde Colombia a Ecuador, y que haya reportes de fumigaciones encima de cuerpos de agua en Colombia, el Gobierno ecuatoriano ha expresado su debida preocupación sobre los posibles efectos nocivos que podrían generarse en el medio ambiente y la población ecuatorianos⁴⁸.

Miembros del Gobierno ecuatoriano también están alarmados sobre el hecho de que antes de iniciar las fumigaciones, ni el Gobierno de Colombia ni el Gobierno de los Estados Unidos (el cual suministra los equipos y tiene un rol muy activo en estas operaciones) ha hecho investigaciones sobre los efectos ambientales de las varias formulaciones que han estado utilizando sobre los ecosistemas más diversos de Colombia. Tal uso masivo de unas formulaciones de herbicidas no investigadas y la continua substitución de una formulación por otra no estaría permitido en los Estados Unidos ni en la mayoría de los países del mundo. Como resultado de esta utilización masiva de una formulación no estudiada y la falta de investigación, Ecuador podría estar enfrentando un peligro de proporciones no conocidas⁴⁸.

Pero formulaciones como "Roundup" que contiene glifosato y -que también contienen un surfactante - son más peligrosas que glifosato en sí en sistemas acuáticos. Los efectos de Roundup (glifosato y surfactante) en biotas acuáticas son tan serios que la

⁴⁸ BÍGWOOD, Jeremy. Un resumen breve de la literatura científica con respeto a los efectos nocivos de formulaciones que contienen glifosato en biotas acuáticas y suelos. Ministerio del Ambiente del Ecuador. 6 de Marzo, 2002.

misma Monsanto - la compañía que produce Roundup - prohíbe el uso cerca o encima de cuerpos de agua⁴⁸.

La toxicidad de estas formulaciones de glifosato en ríos no esta solamente limitada a peces, sino a anfibios, insectos, invertebrados (incluyendo crustáceos) y sin duda otras especies encontradas en ríos y otros cuerpos de agua. Uno de los problemas más serios de las formulaciones de glifosato utilizadas en Colombia es que algunos de los ingredientes son por sí mismos más tóxicos a la vida acuática que el mismo glifosato.

Además, en la combinación que se utiliza en las fumigaciones, la suma de éstos tiene un efecto aditivo de toxicidad⁴⁸.

El glifosato tiene efectos negativos en nemátodos y otras lombrices e invertebrados. Una investigación en Nueva Zelandia mostró que el glifosato tenía efectos significativos en el crecimiento y sobrevivencia de lombrices comunes del suelo. El glifosato aumenta el crecimiento de hongos patogénicos según muchas investigaciones publicadas en la literatura científica. Como resultado, estos hongos predominan en un área para liberar sus propias toxinas (micotoxinas), que son tóxicas para muchas de las otras formas de vida cercanas, incluso mamíferos.

Un grupo de científicos conducidos por el bioquímico profesor Gilles-Eric Seralini, de la Universidad de Caen, en Francia, encontró que las células placentarias humanas son muy sensibles al Roundup aún en las concentraciones más bajas actualmente empleadas en uso agrícola⁴⁹.

Después que un estudio epidemiológico sobre la población granjera de Notario, Canadá, demostró que la exposición al glifosato -el ingrediente dominante del Roundup- casi duplicó el riesgo en los últimos abortos, Seralini y su equipo decidieron

⁴⁹ SERALINI GILLES, Eric. Confirman la peligrosidad del Glifosato. Universidad de Canes, Francia. Febrero 10 de 2006.

investigar los efectos del herbicida en las células de la placenta humana. Su estudio confirmó la toxicidad del glifosato al verificar que después de 18 horas de exposición a concentraciones bajas, las células de placenta humana comenzaron a morir en grandes proporciones. Seralini sugiere que esto podría explicar los altos niveles de nacimientos prematuros y de abortos observados entre las mujeres granjeras que utilizan el glifosato⁴⁹.

El equipo de Seralini comparó a fondo los efectos tóxicos de la fórmula del Roundup (en su expresión comercial de glifosato más aditivos químicos) sólo con el principio activo aislado, el glifosato, encontrando que el efecto tóxico aumenta en presencia de los coadyuvantes o añadidos del Roundup. Estos agregados desempeñan, así, un papel facilitador que hace al Roundup dos veces más tóxico que su ingrediente activo aislado, el glifosato⁴⁹.

Otro estudio, lanzado en abril de 2005 por la Universidad de Pittsburgh, EEUU, sugiere que el Roundup es un peligro para otras formas de vida no vegetales. El biólogo Rick Relyea encontró que el Roundup es extremadamente mortal para los anfibios. En lo que se considera uno de los estudios más completos sobre los efectos de los pesticidas en organismos no vegetales en un escenario natural, Relyea encontró que el Roundup causó una declinación de 70 por ciento en la biodiversidad anfibia y una caída de 86 por ciento en la masa total de renacuajos.⁴⁹

Sin que resultara sorprendente, Monsanto salió a refutar algunos de los resultados de los estudios mencionados en el artículo. Lo que ocurrió fue un intercambio abierto entre el Dr. Rick Relyea y Monsanto, donde el científico defendió sus hallazgos. Por otra parte, hasta donde se tiene conocimiento, no ha aparecido ningún otro estudio posterior sobre el Roundup.⁴⁹

5.8. PRÁCTICAS FRAUDULENTAS EN LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE PESTICIDAS POR PARTE DE LABORATORIOS CONTRATADOS POR LOS GOBIERNOS

En 1976, una auditoria realizada por la EPA descubrió serios errores y deficiencias en estudios conducidos por uno de los más importantes laboratorios norteamericanos

involucrados en la determinación toxicológica de pesticidas previa a su registro oficial. La EPA acusó públicamente a Industrial Biotest Laboratories (IBT), laboratorio que condujo 30 estudios sobre glifosato y fórmulas comerciales en base a glifosato (entre estos, 11 de los 19 estudios realizados respecto de su toxicidad crónica), de falsificación rutinaria de datos y omisión de informes sobre incontables defunciones de ratas y cobayos. La EPA denunció el episodio con 7 años de demora (1983) y escasa repercusión mediática. Sin embargo, informes del Comité de Operaciones Gubernamentales del Congreso norteamericano y sumarios de la Oficina de Pesticidas y Sustancias Tóxicas de la EPA confirman detalladamente la fraudulencia y pobre calidad científica de los estudios de IBT.

Además, la EPA denunció en 1991 que Craven Laboratories, empresa que condujo determinaciones para 262 compañías fabricantes de pesticidas, había falsificado estudios, recurriendo a “trucos” tales como falsificar anotaciones de registros de laboratorio y manipular manualmente el equipamiento científico para que éste brindara resultados falsos. Estudios sobre residuos de Round-up en papas, uvas y remolachas fueron parte de las pruebas cuestionadas. En 1992, el dueño de Craven Laboratories y tres de sus empleados fueron declarados culpables de 20 diferentes causas penales. El dueño fue sentenciado a 5 años de prisión y una multa de 50.000 dólares; la multa para Craven Laboratories fue de 15,5 millones de dólares. Pese a que los estudios toxicológicos del glifosato identificados como fraudulentos ya han sido reemplazados, estos hechos arrojan una sombra de dudas sobre la totalidad de los procedimientos oficiales de registro de pesticidas.

En la tabla 26 se resume una comparación de las aseveraciones de Monsanto, empresa creadora y mayor comercializadora mundial del glifosato, con los hallazgos de la investigación independiente.

Tabla 26. Comparación de las aseveraciones de Monsanto, con los hallazgos de las investigaciones independientes.

Aseveraciones de Monsanto	Investigaciones independientes
El Roundup posee un bajo potencial irritativo para ojos y la piel y además no constituye un riesgo para la salud humana.	El Roundup está entre los pesticidas más denunciados por ocasionar incidentes de envenenamiento en varios países. El Roundup ocasiona un espectro de síntomas agudos, incluyendo eczema recurrente, problemas respiratorios, hipertensión arterial y reacciones alérgicas.
El Roundup no ocasiona ningún efecto adverso reproductivo.	En ensayos de laboratorio sobre conejos el glifosato efectos dañinos duraderos sobre la calidad del esperma y el recuento espermático.
El Roundup no es mutagénico en mamíferos.	En experimentos de laboratorio se observó daño en el ADN de órganos y tejidos de ratones.
El Roundup es ambientalmente seguro.	En el medioambiente agrícola, el glifosato es tóxico para organismos benéficos del suelo y artrópodos predadores benéficos, e incrementa la susceptibilidad a enfermedades de los cultivos. El uso de glifosato en forestación y agricultura genera efectos indirectos perjudiciales en pájaros y pequeños mamíferos al dañar su provisión alimenticia y su hábitat. El contenido de POEA en el Roundup es letal para los renacuajos de tres especies de sapos terrestres y arbóreos en Australia. El gobierno australiano prohibió el uso de estos productos cerca de aguas. Dosis sub-letales de glifosato provenientes de la deriva dañan las comunidades de plantas silvestres y pueden afectar algunas especies situadas hasta a 20 metros del fumigador. El uso de glifosato en zonas arables ocasiona acronecrosis o gangrena regresiva en árboles perimetrales. El glifosato promueve el crecimiento poblacional de un caracol acuático que es el huésped intermedio de fasciolosis hepática en mamíferos. La degradación del glifosato por microorganismos en el agua puede estimular los efectos eutroficativos.
El Roundup es rápidamente inactivado en el suelo y el agua.	El glifosato es muy persistente en el suelo y los sedimentos. El glifosato inhibió la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en trébol durante 120 días luego de su aplicación. Residuos de glifosato fueron hallados en lechuga, zanahoria y cebada cuando fueron plantados un año después de la aplicación de glifosato. Los fertilizantes en base a fosfatos pueden inhibir la degradación en suelo del glifosato.

El Roundup es inmóvil y no percola en los suelos.	<p>El glifosato puede desorberse fácilmente de las partículas del suelo en un amplio espectro de tipos de suelos. Puede ser extensivamente móvil y percolar hacia capas más profundas del suelo.</p> <p>El glifosato puede ser transportado por partículas del suelo en forma de deriva secundaria.</p>
El Roundup no contamina el agua potable cuando es utilizado por autoridades locales sobre superficies duras.	En Inglaterra, la Welsh Water Company detectó niveles de glifosato superiores al límite establecido por la Unión Europea todos los años desde 1993. El Inspectorado de Agua Potable recomienda que el glifosato sea monitoreado, especialmente en áreas donde es utilizado por autoridades locales sobre superficies duras.
Es virtualmente imposible que se desarrolle resistencia a glifosato en malezas	En 1996, se descubrió una gramínea forrajera resistente al glifosato en Australia.
El desplazamiento de genes desde cultivos transgénicos a especies convencionales o malezas y la transferencia horizontal ocurren a corta distancia y pueden manejarse con facilidad	En aquellos cultivos que han sido examinados, las densidades de polen son mucho más altas y sus patrones de dispersión difieren de los de campos grandes en comparación con aquellos constatados en lotes experimentales. La dispersión de polen por el viento sucede a distancias mucho mayores y a concentraciones más altas que las predichas por extrapolaciones a partir de cultivos experimentales. La transferencia genética desde cultivos de oleaginosas transgénicos es inevitable.
Los cultivos Roundup Ready reducirán los niveles de utilización de herbicidas.	Los cultivos tolerantes a herbicidas intensificarán e incrementarán la dependencia del uso agrícola de herbicidas más que conducir a reducciones significativas. Una variedad de herbicidas tendrá que ser reintroducida para controlar voluntarios glifosato-resistentes y malezas resistentes.

Fuente: Impactos sanitarios y ambientales del glifosato: Las implicaciones del aumento en la utilización de glifosato en asociación con cultivos genéticamente modificados. Julio de 2001. Informe realizado por David Buffin y Topsy Jewell, miembros del Pesticide Action Network, UK. Tabla basada en datos de: Monsanto Company, 1985, Toxicology of Glyphosate and Roundup Herbicide. Monsanto Company, Department of Medicine and Environmental Health, Missouri, USA; Monsanto Company, Web Site: www.monsanto.com, 18th January 1998; Monsanto Advertising Supplements in Farmers's Weekly, Roundup 91, 7 June 1991, and Roundup 92, 5th June 1992; Pesticide Outlook, Dec. 1997, Royal Society of Chemistry, Vol. 8, No. 6, pp3-4.

5.9. SITUACIÓN ACTUAL DE COLOMBIA

5.9.1 La fórmula química utilizada

Aunque ha sido imposible confirmar cuál es la mezcla química que está siendo rociada, de acuerdo con los parámetros técnicos del Consejo Nacional de Estupefacientes para

las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos, se aplican las siguientes cantidades en la mezcla⁵⁰:

- ✓ Carga del avión 300 – 450 galones (1137 – 1705 litros).
- ✓ Descarga efectiva (de Roundup, con 43.9% de glifosato) 23.4 litros/hectárea (30 a 50 gotas/cm²) 10.3 L/ha de glifosato.
- ✓ Depósito de mezcla 0.4 - 0.7 mm³/cm² 40 – 70 litros/ha.

La mezcla utilizada contiene: **44% de Roundup**, mientras que la etiqueta de uso en los Estados Unidos para Roundup permite concentraciones de **1,6% a 7,7%** para la mayoría de los usos y, como máximo, una concentración del 29%. La etiqueta de EEUU indica que en la mayor parte de las condiciones, la aplicación aérea no deberá exceder de **1 litro** (quart) por acre del producto formulado. En Colombia, la tasa corresponde a casi **4,5 veces** esa cantidad⁵⁰.

Si se considera que un avión de 300 galones (1.137 litros) deposita 40 L/ha de la mezcla, con una descarga efectiva de 23,4 L/ha de Roundup, esta descarga equivale a 10,3 L/ha de glifosato en forma de sal IPA. Esto significa que el glifosato se aplica en concentraciones del 26%, y no al 1% recomendado en Estados Unidos para aplicaciones terrestres, con equipos de protección y dirigido a las malezas agrícolas. A esta situación se añade que el Cosmo Flux 411F, cuadruplica la acción biológica del glifosato⁵⁰.

5.10. IMPACTO AMBIENTAL

La estrecha relación entre los cultivos de coca y amapola y las áreas de parques naturales y reservas forestales hace necesario analizar los efectos desencadenados en estos ecosistemas.

⁵⁰ MALDONADO, Adolfo. GALLARDO, Lucía. ALVAREZ, Talía. RODRÍGUEZ, Fernando. Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia. Octubre - 2002

En general, las áreas de reserva forestal se caracterizan por poseer suelos muy frágiles, pobres en nutrientes, no aptos para la ganadería ni la agricultura. Estos ecosistemas forestales han sido afectados por procesos de deforestación asociados a movimientos de colonización, establecimiento de cultivos ilícitos y construcción de pistas de aterrizaje⁵⁰.

Se ha estimado que por cada hectárea de coca se deforestan aproximadamente 4 ha de bosque y 2.5 ha por cada hectárea de amapola⁵¹. Otros procesos asociados al establecimiento de los cultivos ilícitos incluyen quema y erosión de los suelos de bosque; contaminación con sustancias empleadas en la elaboración de la base de coca, en la cual, según la Dirección de Policía Antinarcóticos, se utilizan 440 L de gasolina por hectárea de coca, 4 L/ha de ácido sulfúrico, 2 L/ha de permanganato de potasio y 3 L/ha de amoníaco, entre otros. Los vertimientos a partir del procesamiento de la hoja de coca están constituidos por ácido sulfúrico (1,9 L por Kg de base de coca), amoníaco (1,25 L por Kg de base de coca) y aguas residuales contaminadas (193,75 L por Kg de base de coca). Se ha estimado que entre 1999 y el 2001 se vertieron al medio 152.463 L de ácido sulfúrico y amoníaco, 9.377.694 L de aguas residuales del procesamiento y 30.250.625 Kg de residuos de hoja de coca contaminados⁵².

Aunque se ha venido justificando la práctica de fumigación bajo los parámetros establecidos en Colombia sobre cultivos de coca y amapola con base en su riesgo relativamente menor, no es posible mirar esta práctica con tolerancia, mas aún cuando no ha sido soportada en estudios científicos que avalen su inocuidad y existe un gran número de artículos científicos que advierten sobre el riesgo de la contaminación con Roundup® sobre poblaciones animales y humanas así como las consecuencias directas e indirectas de esta práctica sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres.

⁵¹Correa, H. D., Ruiz, S. L., Arévalo, L. M. (eds.) 2006. Plan de acción en biodiversidad de la cuenca del Orinoco-Colombia/2005-2015-Propuesta técnica. Bogotá. D. C.: Corporinoquia, Cormacarena, IAvH, Unitrópico, Fundación Horizonte Verde, Universidad Javeriana, Unillanos, WWF-Colombia, GTZ-Colombia, Bogotá, D.C., 330 p.

⁵²Ramos R.E. & Ramos B. Evaluación Ambiental del Impacto de cultivos de Coca y el procesamiento de la hoja de coca. Universidad de los Andes, Bogota, Colombia. Disponible en: www.cultivosilicitoscolombia.gov.co/documentos/eval_ambiental.pdf

Recientemente, Álvarez (2002)⁵³ puso en evidencia la amenaza potencial que existe sobre la biodiversidad de aves a partir de los establecimientos de cultivos de coca y amapola en áreas de bosque, los cuales están asentados principalmente en zonas de alta biodiversidad correspondiendo a 101.850 ha abarcando el 62,3% de las 162.510 ha censadas en el 2000, de las cuales la mayor parte se encuentra en el Amazonas, correspondiendo a 78.800 ha. Las restantes hectáreas se encuentran ubicadas principalmente en áreas forestales del sur y noroccidente de los Andes y tierras bajas adyacentes al Darién, así como en la sierra Nevada de Santa Marta, la serranía del Perijá y la serranía de San Lucas⁵³.

5.11. EL IMPACTO NEGATIVO DE LAS FUMIGACIONES AÉREAS CON GLIFOSATO AL MEDIO AMBIENTE VULNERA LA CALIDAD DE VIDA Y DE SALUD DE LOS POBLADORES

El glifosato, como es un herbicida no selectivo, su utilización debe contemplar parámetros técnicos, su uso debe ser mediante aplicaciones dirigidas ya sea con mangueras o pistolas y, en lo posible, por aspersión terrestre para evitar contaminar otras especies vegetales, animales y cuencas hídricas.⁵³

La fumigación aérea supondría la existencia únicamente de monocultivos ilícitos de gran extensión y ubicados en lugares de difícil acceso, suposición equivocada que ha conllevado a atacar todo tipo de cultivos de manera indiscriminada, dejando de cumplir la única función para lo cual se ha legitimado su uso: erradicar los cultivos ilícitos. Todo el entorno es afectado desfavorablemente: la flora, la fauna, el equilibrio ambiental, las cuencas hídricas, el suelo; lo que se traduce en deforestación, erosión, agotamiento de fuentes de agua, pérdida de la biodiversidad, contaminación y disminución de alimentos. En su conjunto significa deterioro de la salud y calidad de vida de los colectivos.⁵³

⁵³ Álvarez, M.D., 2002. Illicit crops and bird conservation priorities in Colombia. *Conserv. Biol.* 16, 1086-1096.

Por ello es criticable la decisión del gobierno de fumigar con glifosato los cultivos de manera indiscriminada, tal como lo enuncia la resolución 005/2000 del CNE (Control Nacional de Estupefacientes):

- ✓ Cuando se trate de extensiones de terreno que excedan las dos hectáreas y el cultivo ilícito sea único, tomando en cuenta consideraciones topográficas y la cercanía de asentamientos humanos, se procederá a la aspersión aérea controlada del agente químico glifosato. También serán objeto de aspersión aérea con glifosato, las áreas de cultivos ilícitos donde se compruebe los cultivos: fraccionados y/o mezclados con cultivos lícitos, formas de cultivo utilizadas para evadir las acciones del programa de erradicación del herbicida. Art. 3.
- ✓ Área de cultivo fraccionado: aquella área de terreno que se divide mediante barreras vivas y/o artificiales, secuencia de plantaciones lícitas, cultivos de pancoger, o bosque nativo, con cultivos ilícitos. Área de cultivo mezclado: aquella plantación ilícita que dentro de su área de siembra presenta plantas lícitas e ilícitas. Art. 4.
- ✓ La erradicación de los cultivos ilícitos será responsabilidad de la Policía Nacional, a través de la Dirección Antinarcóticos. Para el cumplimiento de esta función, empleará los recursos humanos y técnicos que permitan prevenir y minimizar los posibles daños que se puedan derivar de dicha actividad. Art. 5.
- ✓ Reconocimiento de áreas de cultivos ilícitos: este reconocimiento se hará mediante la identificación y ubicación de los cultivos ilícitos, su extensión, medio circundante, características del entorno social, cultural, económico, epidemiológico, sanitario y ambiental, riesgos potenciales, aprovechamiento y existencia de cultivos lícitos y su localización.

- ✓ Parágrafo 1o.: La identificación, ubicación, extensión y medio circundante de los cultivos ilícitos será coordinado por la Dirección Nacional de Estupefacientes y lo ejecutará la Policía Nacional.
 - ✓ Parágrafo 2o.: Con el fin de caracterizar el entorno social , cultural, económico, epidemiológico, sanitario y ambiental, riesgos potenciales, aprovechamiento y existencia de cultivos lícitos y su localización, la Policía Nacional-Dirección Nacional de Estupefacientes solicitará la información relacionada con estos temas a las gobernaciones, secretarías de Agricultura, alcaldes, corporaciones autónomas regionales, seccionales del ICA, direcciones departamentales de salud, universidades, institutos de investigación científica y organizaciones no gubernamentales y cualquier otra institución pública o privada que tenga información relacionada con estos temas.
 - ✓ Para efectos de suministrar dicha información, las autoridades tendrán un plazo de diez (10) días hábiles, contados a partir de la solicitud de la información. En caso de no obtener la información requerida, se dejará constancia.
 - ✓ Corresponde a la Policía Nacional-Dirección Antinárcóticos y a la Dirección Nacional de Estupefacientes analizar y evaluar tanto la información suministrada por las entidades mencionadas en este artículo, como la obtenida en el parágrafo 1o., con el propósito de determinar los riesgos potenciales en relación con la salud humana, el medio ambiente y las actividades agropecuarias en las áreas que serán objeto de aspersión aérea con glifosato.
- Art. 2.

Como se desprende de la anterior resolución, la fumigación aérea afectará sin contemplación toda la biodiversidad que exista alrededor de los cultivos ilícitos.

También se observa que el CNE (Consejo Nacional de Estupefacientes) y la Policía Nacional conocen o presumen la existencia de potenciales riesgos ambientales, culturales, culturales y en la salud. Sin embargo, parece que lo importante para el CNE es que se fumigue sin importar los costos que se deriven de esos riesgos.

5.12. ALTERNATIVAS

Teniendo en cuenta toda la información recopilada y demostrada anteriormente por medio de diferentes investigaciones y estudios realizados por instituciones y laboratorios podemos plantear una serie de alternativas para un manejo técnico-ambiental adecuado para el manejo del Glifosato Roundup en Colombia y disminuir en gran parte el impacto ambiental generado por este tóxico.

- ✓ Debido a los inconvenientes presentados desde la aspersión con Glifosato Roundup y a las serias acusaciones teniendo en cuenta los diferentes casos exhibidos por intoxicación por este herbicida es necesario hacer un monitoreo permanente. Además, ante la decisión del Gobierno de aprobar el programa de erradicación, se recomienda la constitución de un comité, compuesto por médicos epidemiológicos y toxicológicos, que se encargue del diseño y ejecución de un programa de Tóxico-vigilancia en personas que pudieran estar expuestas al Glifosato por causa del programa de esta erradicación. Por esto, es necesario un tiempo prolongado y mayores recursos humanos y técnicos para la completa puesta en marcha de un programa de vigilancia epidemiológica.
- ✓ En caso de su uso, este herbicida debe ser agregado manualmente directamente en el terreno o en su defecto por aspersión en helicóptero y NO aplicado con aeronaves de alas fijas. Esto se debe a que la fumigación aérea es inadecuada, peligrosa para el medio ambiente e inexacta. Es inadecuada porque el avión no pasa a la misma altura sobre el cultivo que se quiere destruir. La aspersión sobre el follaje a más de 3 metros de altura puede permitir la evaporación y/o deriva del producto. El glifosato no llega al cultivo. Se presenta el arrastre del herbicida hacia zonas donde no es conveniente que caiga la aspersión. Al entrar y salir el avión de los lotes con cultivos ilícitos, rodeados de árboles, las zonas de cultivo en estos sitios (de entrada y salida del avión) no reciben la dosis suficiente para morir. Los cultivos quedan en estado recuperable y en algunos casos producen más que los de las áreas no tratadas. Es peligrosa para el medio ambiente, porque el glifosato que por evaporación o deriva no llega al cultivo indeseado, cae en zonas adyacentes. Se

afectan los bosques y los cultivos deseados. Dependiendo de su susceptibilidad, estos pueden morir. Es poco exacta. En cultivos de formas irregulares y/o cercanas a los bosques no reciben las dosis necesarias del herbicida. El cultivo ilícito se recupera. En muchos casos no recibe el glifosato. El costo del control de los ilícitos se torna muy alto. No se obtiene el propósito de su eliminación. Concluyendo con esta idea es recomendable que el gobierno prohíba definitivamente la aspersión aérea de este herbicida por violar todas las normas legales vigentes y por las evidencias acumuladas en los mismos Parques Nacionales de nuestro país y por las graves consecuencias para los pobladores de los Parques Naturales Nacionales y áreas adyacentes.

- ✓ **En cuanto al almacenamiento, transporte y uso de plaguicidas**, las entidades o personas que almacenan, transportan y aplican plaguicidas están obligadas a obtener las respectivas autorizaciones, licencias y permisos para las citadas actividades y para el funcionamiento de las pistas aéreas y el uso de las pistas de uso público. Se debe tener en cuenta la altura de vuelo, velocidad y clase de aeronaves que se deben usar; señalización o bandereo; la comprobación de no presencia de seres vivos y el rotulado de los empaques de las sustancias tóxicas, entre otras (Ver anexo M).
- ✓ Debe ser transportado y almacenado con una clara etiqueta, en un envase rígido a prueba de filtraciones, hecho de acero inoxidable, fibra de vidrio, aluminio, plástico o plástico revestido de acero (Ver Anexo N). No mezclar, rociar o guardar en un envase galvanizado o no revestido de acero. El almacenamiento debe ser bajo llave, mantener fuera del alcance de los niños o personas no autorizadas y mantener bien lejos de la comida o bebidas.
- ✓ Vestimenta de protección debe ser utilizada por todas las personas que manejen el componente (Ver anexo N). Adecuadas facilidades deben estar a disposición todo el tiempo durante el manejo y el lugar de manejo debe ser cerrado. Comer, beber y fumar debe ser prohibido durante el manejo y antes y después debe limpiarse.

- ✓ Deben proveerse todas las facilidades requeridas para el manejo de cualquier químico (Ver anexo M).
- ✓ Si es distribuidos por avión, los pilotos y cargadores deben tener entrenamiento especial en métodos de aplicación y reconocimiento de síntomas tempranos de envenenamiento por pesticidas. Los cargadores deben vestir overoles, guantes de plástico y gafas (Ver anexo N). Hombres de pabellón deben adicionalmente vestir un sombrero impermeable, y tienen que estar localizados lejos de la zona de fumigación.
- ✓ Es necesario establecer una franja de protección sanitaria mucho más amplia. La discusión respecto de cuán extensa debe ser la zona de protección sanitaria debe partir de un enfoque que mida su efectividad en términos de la mayor precaución posible. Una de las mejores maneras de empezar a comprender las complejidades que ello implica es comenzar por una revisión de falencias e insuficiencias en los criterios vigentes. Hasta ahora, la determinación de una extensión razonable se basa en dos tipos de datos:
 1. la magnitud de deriva desde el último surco tratado teniendo en cuenta la dirección del viento.
 2. las características toxicológicas de los pesticidas utilizadas conjuntamente con los niveles de exposición considerados tolerables.
- ✓ Tradicionalmente, el nivel de exposición tolerable se denomina “dosis de referencia”, y representa el NOAEL (No Observable Adverse Effect Level, nivel de efecto adverso no observable) dividido por un factor de seguridad de 100. Una vez determinados los niveles residuales, éstos deben traducirse toxicológicamente en la magnitud de dosis corporal total. Dado que la deriva se expresa generalmente como masa de residuos depositados sobre una superficie dada (en mg/m²), usualmente se asume que, conocida la superficie corporal de un ser humano, y ya sea la totalidad o una fracción de su superficie corporal estuviese expuesta, la división por el peso corporal brindaría como resultado una dosis en unidades de

mg/kg. Estas unidades son las mismas que se utilizan en la concepción de la dosis de referencia. Claramente, el estándar protector más conservador sería el de un niño, porque los niños poseen la mayor área de superficie por unidad de peso corporal. Obviamente, el cálculo de la dosis de absorción dérmica de residuos de agrotóxicos resultantes de la deriva se basa en la eficiencia de penetración dérmica en infantes para cada producto particular. Por lo tanto, consideramos inapropiados los estándares toxicológicos actuales para el establecimiento de la magnitud de la franja de protección sanitaria periurbana, aún cuando fuese establecida en 500 m. para fumigación terrestre y 2.000 m. para fumigación aérea.

- ✓ **Sugerencias para la minimización de la exposición humana a agroquímicos en la interfase agro-urbana:** Son imprescindibles una evaluación y un análisis multidisciplinario de factores ambientales en el origen de la patología humana, que incluyan la implementación de medidas tales como⁵⁴:

- Manejo integrado de plagas.
- Control biológico de plagas.
- Control ecológico de plagas.
- Manejo seguro de agroquímicos
- Estudio del efecto del particulado grueso y otros contaminantes del aire sobre alergias, cánceres, distress y otras dolencias.
- Estudio del efecto de la contaminación de las fuentes de agua y suelo.
- Estudios sobre residuos y calidad de alimentos consumidos por toda la población. (suelo sano, planta sana, animal sano, hombre sano).
- Formación de equipos integrados multidisciplinarios donde se estudie paralelamente las causas y efectos de los diferentes factores que inciden sobre el hombre en el sector agropecuario.
- Organización de jornadas específicas para la problemática del sector agropecuario donde interactúen profesionales de las diferentes especialidades relacionados con lo agropecuario, lo alimentario y lo médico.

⁵⁴ USAL, Gustavo Otamendi. Jornada de evaluación y análisis multidisciplinario de factores ambientales en el origen de la patología humana, Universidad del Salvador.

- Toma de conciencia para iniciar la toma de medidas correctivas, en las cuales el objetivo perseguido será la mitigación de los riesgos ambientales.
- ✓ Se debe exigir que sean aplicados por aplicadores capacitados y venderlos únicamente a estos productores o aplicadores.
- ✓ Evitar el registro de nuevos plaguicidas Categoría I.
- ✓ Fiscalizar el cumplimiento estricto de la legislación vigente. Esto provocará un uso más racional de los plaguicidas Categoría I ya que serán vendidos exclusivamente bajo receta profesional.
- ✓ Aplicar un impuesto a los plaguicidas Categoría I. Los recursos generados serán destinados a la mejora de la fiscalización del cumplimiento de la legislación vigente, a la implementación de un plan nacional de recolección de envases vacíos y a la promoción de alternativas menos tóxicas, priorizando la agricultura orgánica.
- ✓ Medición de los niveles de plaguicidas en cursos de agua (con énfasis en los Categoría I) que atraviesen zonas agrícolas de alto uso de plaguicidas y que sean claves como fuentes de agua para bebida o que desemboquen en cursos de agua donde se extrae agua para potabilizar.
- ✓ Realizar control de residuos de plaguicidas en los alimentos donde normalmente se hace un uso intensivo de los plaguicidas Categoría I.
- ✓ Promover la investigación en técnicas alternativas como producción orgánica y agroecológica a nivel nacional como forma de aumentar la producción de alimentos libres de plaguicidas.
- ✓ **Medidas que se deben tomar tanto a niveles regional como nacional:** Las acciones que deben tomar a nivel regional, incluyen:

- La eliminación paulatina del uso de los pesticidas fumigantes altamente tóxicos y de alto consumo.
- Asesorar a los productores agrícolas durante la transición hacia el uso de productos alternativos menos tóxicos.
- Diseñar regulaciones de fácil ejecución que sean efectivas para prevenir la dispersión en el aire.
- Exigir el uso de zonas amortiguadoras, rotulado y notificación para todas las aplicaciones de pesticidas.
- Consultar con las comunidades afectadas y crear leyes que las protejan.
- Exigir que los fabricantes de pesticidas financien los costos del monitoreo del aire como una condición para mantener el registro de sus productos.
- Trabajar con los inspectores agrícolas de los municipios para aumentar el monto de las multas, así como mejorar la aplicación de las regulaciones ya existentes.
- Trabajar con los inspectores agrícolas de los municipios para establecer e implementar un protocolo uniforme como respuesta al envenenamiento por pesticidas.

Las acciones que deben tomar a nivel nacional incluyen:

- Mantener una norma de cero dispersiones de pesticidas en el aire en el lenguaje usado en las etiquetas de los pesticidas.
- Incluir la exposición a los pesticidas acarreados en el aire, dentro de las evaluaciones del riesgo para todos los pesticidas.
- Reducir las tasas permisibles de aplicación
- Emitir nuevas regulaciones, bajo la ley del Aire Limpio, para clasificar los sitios de aplicación de pesticidas como fuentes contaminantes.

Esto implica que tenemos obligación basada en la confianza de la población de tomar acciones precautorias para proteger la salud y los ecosistemas aún enfrentándonos a la incertidumbre científica.

- ✓ Establecer objetivos. El principio de precaución promueve un planeamiento basado en metas bien claras más que en escenarios futuros y cálculos de riesgo que pueden estar plagados de error y tendenciosidad.
- ✓ Empezar la búsqueda y la evaluación de alternativas. Las alternativas deberían tender a reducir o eliminar las emisiones, escapes y exposiciones. El objetivo de las acciones reglamentadoras debería ser el de prevenir la polución y las exposiciones, y no determinar la magnitud de daño o riesgo que debe tolerar una comunidad. Todo el espectro de alternativas será tomado en consideración incluyendo la evaluación de la actividad propuesta. Las alternativas a una actividad potencialmente peligrosa propuesta deben investigarse tan minuciosamente como a la actividad misma.
- ✓ Aumentar la democracia. Las comunidades afectadas tienen el derecho a participar en las decisiones. No se debe trasladar a las comunidades el peso de la prueba sobre una actividad mientras otro se está llenando los bolsillos. Los debates sobre políticas de reglamentación, actividades contaminantes deben ser abiertos, transparentes y brindar seguridad a las voces de las comunidades impactadas

CONCLUSIONES

- ▲ Se determinó la concentración letal media (CL_{50-96}) del Glifosato Roundup^R 747_{SG} sobre alevinos de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), estableciendo que el valor de la CL_{50-96} , con sus respectivos límites de confianza, osciló entre 0.6251 mg/L y 1.3881 mg/L presentando un valor promedio de 1.0066 mg/L indicando que a esta concentración se muere la mitad de los organismos expuestos al glifosato. Estos datos fueron obtenidos siguiendo minuciosamente los protocolos establecidos por CETESB y por la Universidad de la Salle, garantizando resultados confiables.
- ▲ La Concentración Letal Media (CL_{50-96}) del Glifosato Roundup^R 747_{SG} sobre organismos de Trucha Arcoíris, se encuentran por debajo de los valores establecidos por la empresa Monsanto (fabricante y distribuidor del herbicida en Colombia) y el gobierno los cuales indican que es de 7 a 12 p.p.m.; y por lo tanto inferior a los valores permitidos para su aspersión. Esto demuestra que los datos mostrados y aprobados por el gobierno son muy generales, no específicos y elevados en comparación con los resultados arrojados por la presente investigación.
- ▲ Durante toda la realización de las pruebas de toxicidad fue necesario mantener un control constante de parámetros de calidad del agua (pH, temperatura y Oxígeno Disuelto), verificando así que la muerte de los organismos se genera por el herbicida y no por otro factor, como se puede observar en los resultados presentados en este documento.
- ▲ Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad fueron homogéneos y constantes, dando una viabilidad al momento de hacer los ensayos preliminares y definitivos con el glifosato, estableciendo el buen estado fisiológico y de aclimatación (15 días) de los alevinos de trucha arco iris, garantizando la confiabilidad de los resultados. Se estableció que los datos de la Concentración Letal Media (CL_{50-96}) para el Dicromato de Potasio (tóxico de referencia para determinar la sensibilidad de la especie), con sus respectivos límites de confianza, osciló entre 42,1013 mg/L y 66,0449 mg/L presentando un valor promedio de

54,0731 mg/l. Estos datos fueron comparados con otras investigaciones realizadas la Universidad de la Salle donde se han obtenido datos como **56,43 mg/L** (Determinación de la CL₅₀₋₉₆ del Mercurio y el Cromo utilizando alevinos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* – Carolina Matías Parrado y Alejandra Duran Páez), **56,43 mg/L** (Determinación de la CL₅₀₋₉₆ de Cadmio y Aluminio mediante bioensayos con Trucha arcoíris “alevinos de *Oncorhynchus mykiss* – Ángela Grijalba y Oscar Javier Bernal) y **51.43 mg/l** (Determinación de la CL₅₀₋₉₆ del Plomo y Níquel utilizando alevinos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* – Julián Agudelo y Paula Ortiz). Además los datos fueron corroborados por investigaciones realizadas por la Universidad Nacional la cual arrojó un dato de **55.932 mg/l** (Investigación realizada por la facultad de Veterinaria – Ingeniero Jaime F. González), verificando la veracidad de los datos y demostrando la confiabilidad de los mismos.

- ▲ Al obtener los resultados se les realizó el análisis de varianza con una confiabilidad del 95%. Esto nos demostró estadísticamente que la hipótesis nula, la cual indica que a diferentes concentraciones de tóxico se produce el mismo efecto en los organismos, fue rechazada, aceptando la hipótesis verdadera la cual señala que a diferentes concentraciones los efectos sobre los organismos varían (a mayor concentración, mayor número de organismos muertos)
- ▲ Durante los ensayos con el Glifosato Roundup^R 747_{SG} se observaron reacciones en los alevinos como dificultad para respirar (asfixia), presencia de hongos en la piel, oscurecimiento de la epidermis, signos nerviosos, algunos peces subían a la superficie, movimientos natatorios lentos y en muchos casos los ojos se ubicaban fuera de sus orbitas. Una vez que los peces sentían la presencia del tóxico en el agua, empezaban a nadar en todos los sentidos a grandes velocidades y muchos de ellos saltaban de las peceras para evitar ingerir el tóxico.
- ▲ Teniendo en cuenta los casos y problemas expuestos por el uso del Glifosato Roundup^R 747_{SG} en la erradicación de cultivos ilícitos en el País, y el resultado obtenido en la presente investigación, podemos llegar a la conclusión que este

herbicida (Glifosato Roundup^R 747_{SG}) es altamente tóxico para el medio ambiente y la salud humana. Comparando la legislación vigente (en cuanto a concentraciones de este herbicida y la CL₅₀) de varios países como Estados Unidos que maneja un límite de 0.7 p.p.m., Canadá 0.28 p.p.m., Argentina 1.2 p.p.m., y el caso de Brasil y Dinamarca donde esta prohibido el uso de este herbicida agrícola por sus efectos tóxicos, Colombia maneja una normatividad imprecisa y muy flexible permitiendo rangos de 7 – 12 p.p.m. Se debe tomar mayor conciencia al usar este herbicida y realizar investigaciones mas profundas por parte de las autoridades competentes y no directamente por la empresa encargada de su fabricación y distribución (Monsanto). Es por esto que se deben tener en cuenta varias alternativas como las planteadas por este trabajo de investigación para su uso y manejo adecuado. Se debe tener en cuenta que si es el caso se debe prohibir su uso y distribución en el país como lo han hecho en muchos otros países.

- ▲ Teniendo en cuenta el resultado de CL₅₀₋₉₆ obtenido por la presente investigación, en Colombia se sobrepasa de manera considerable este límite establecido de CL₅₀₋₉₆= 1.006 p.p.m., permitiendo concentraciones de 7 – 12 p.p.m. Esto se debe en gran parte a la intervención de Estados Unidos con la puesta en marcha del Plan Colombia que tiene como objetivo principal la erradicación de cultivos ilícitos por medio de aspersiones aéreas con Glifosato Roundup en altas concentraciones. Debido al evidente problema del narcotráfico y el acelerado crecimiento de los cultivos ilícitos, el gobierno ha incrementado de la misma manera las concentraciones y cantidades del Glifosato. Con esto, se busca acelerar la erradicación de este tipo de cultivos sin importar que este herbicida entre en contacto directo con el medio ambiente generando impactos negativos sobre este.

RECOMENDACIONES

Se deben asegurar condiciones óptimas como la temperatura e iluminación en el laboratorio de Bioensayos para evitar cualquier cambio inesperado en el mismo y evitar alteraciones a los organismos utilizados para las pruebas y por lo tanto en los resultados obtenidos.

Es importante tener un control constante de parámetros como pH, O.D. y temperatura antes y durante las pruebas de toxicidad. Esto se realiza para garantizar excelentes condiciones de los organismos para la realización de las pruebas.

Se considera necesario utilizar el laboratorio de bioensayos exclusivamente para este tipo de pruebas. Si se trabaja con metales pesados o residuos peligrosos, es necesario contar con un lugar especial para preparar las soluciones y evitar la contaminación del laboratorio. Esto se debe a que existen residuos peligrosos que se disuelven en el agua y por lo tanto pueden ocasionar la muerte de los organismos de prueba.

Se debe manejar cada sustancia de interés sanitario en recipientes distintos, con el fin de evitar la contaminación de los mismos y la alteración de los resultados de las pruebas.

Es recomendable realizar una prueba de sensibilidad con dicromato de potasio al mismo tiempo de la prueba con la sustancia tóxica de interés para garantizar el bueno estado de los organismos en el momento de la realización de la prueba.

Al trabajar con organismos como los alevinos de Trucha Arcoíris es necesario garantizarle una adecuada alimentación durante el tiempo de aclimatación, teniendo en cuenta que 24 horas antes de la prueba esta debe suspender para garantizar el éxito de la prueba y comprobar que la mortalidad de los organismos se debió al tóxico y no a otro factor externo; ya que si se le suministra alimento antes de las pruebas, el

tóxico va a ingresar directamente al organismo por la vía oral y no por la vía dérmica como se desea que ocurra.

Para evitar la mortandad elevada de los organismos es necesario contar con un buen número de aireadores para garantizar un alto nivel de oxígeno disuelto (80% de saturación) y además no saturar los acuarios de peces. Es recomendable agregar a cada acuario de 100 Lt. una cantidad de 130 peces para evitar la saturación y la disminución del oxígeno.

Al realizar los análisis para la determinación de la Concentración Letal Media, es necesario realizarlo con diferentes microorganismos de la cadena trófica para garantizar la validez de los bioensayos y ampliar los resultados.

Los reactivos que se utilicen durante el proceso de bioensayo, deben ser reactivos analíticos y de marca reconocida, para garantizar que las soluciones sean de calidad y que no varíen los resultados por fallas de reactivos.

Es importante seguir realizando pruebas de toxicidad con organismos nativos, empleando las sustancias de interés sanitario descritas en el Decreto 1594 de 1984, obteniendo así la mayor cantidad de referencias que puedan complementar los datos que allí se encuentran para que posteriormente sean aplicados en los diferentes climas, especies y ecosistemas del territorio nacional teniendo en cuenta la gran variedad y las diferencias entre cada uno de ellos.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez León, Ricardo. Roldán-Pérez, Gabriel A. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia: uso del método BMWQ. Editorial Universidad de Antioquia. Pág. 170, año 2003.
- ANAYA, Ana Luisa. El Perifiton de la Reserva de "El Edén", Quintana Roo, México: Un Biomejorador Potencial en la Agricultura. UNAM, Instituto de Fisiología Celular. México 1997
- ARCOS PULIDO, Mireya del Pilar. ÁVILA DE NAVIA, Sara Lilia. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. División de Investigaciones, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca pág. 69 y71 año 2005.
- BÍGWOOD, Jeremy. Un resumen breve de la literatura científica con respeto a los efectos nocivos de formulaciones que contienen glifosato en biotas acuáticas y suelos. Ministerio del Ambiente del Ecuador. 6 de Marzo, 2002.
- Bioensayos de toxicidad aguda en neonatos de *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Crustácea: branchiopoda) expuestos a soluciones de hidróxido de sodio (NaOH)
- BOLTOVSKOY, E. Indicadores biológicos en la oceanografía. Pág. 66-75. Año 1967
- CETESB, 1990. L5.019-I. Agua, test de toxicidad aguda con peces. Sistema estático.
- CORDERO HEREDIA, David y SÁNCHEZ, Francisca. Regulaciones internacionales del glifosato. Boletín 245 de la Red por una América Latina Libre de Transgénicos RALLT / Coordinación: Acción Ecológica

- CORREA, H. D., RUIZ, S. L., ARÉVALO, L. M. (eds.) 2006. Plan de acción en biodiversidad de la cuenca del Orinoco-Colombia/2005-2015-Propuesta técnica. Bogotá. D. C.: Corporinoquia, Cormacarena, IAvH, Unitrópico, Fundación Horizonte Verde, Universidad Javeriana, Unillanos, WWF-Colombia, GTZ-Colombia, Bogotá, D.C., 330 p.
- COX Caroline. Glifosato, Parte 2: La Exposición humana y los Efectos Ecológicos. 1995.
- CURTIS, Helena. Biología 6° Edición en español. Editorial Panamericana, Buenos Aires - Argentina. Pág.1405. Año 2001.
- DEL VALLS, T. y CONRADI M. Avances en ecotoxicología marina: comparación entre test de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. Ciencias Marinas. 2000
- DELLVALS y CONRADI. Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros. 2000
- DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo. Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos. Colombia, año 2000
- ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex* para la evaluación de muestras ambientales.1997
- ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Protocolo del método PROBIT, Protocolo de Análisis de Varianza (ANOVA) y Protocolos de Bioensayos.
- ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. PARRA MARTINEZ, Yanneth. LONDOÑO PEREZ, Rubén Darío. Determinación de la concentración letal media CL₅₀₋₄₈ del arsénico y del níquel sobre *Daphnia pulex*. Universidad de la Salle. Bogotá 2008.

- ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Determinación de la toxicidad de los detergentes mediante sistemas estáticos utilizando *Daphnia magna*. Universidad de la Salle, Facultad de ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Bogotá 1993.
- Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente.
- GRIMALDO V., Wilson Yesid. Determinación de la integridad ecológica de un ecosistema acuático con base en monitoreos biológicos. Vol. 2; pág. 25 – 33. Colombia 1998
- GUTIÉRREZ LÓPEZ, Samir. SOTO RAMOS, Delfina. Investigación de campo Esc. José María Morelos, Michoacán. Año 2002.
- HERNÁNDEZ, Álvaro. Manejos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) en piscicultura Manantiales, Puerto Nuevo. Centro de Formación Técnica Zipter. México 1996.
- Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América 31 de marzo de 2005.
- KACZEWER, Jorge. Toxicología del glifosato: riesgos para la salud humana Universidad Nacional de Buenos Aires. Pág. 7, año 2002
- MALDONADO, Adolfo. GALLARDO, Lucía. ALVAREZ, Talía. RODRÍGUEZ, Fernando. Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia. Octubre – 2002
- MARGALEF, R. Ecología. Omega, Barcelona. Pág. 951, año 1991

- MMA. Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. 2000.
- NARANJO, Luis Germán. Humedales de Colombia, bases técnicas para su conservación y uso sostenible. Instituto Von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Primera edición. Colombia 1999.
- NIVIA, Elsa. Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato. Colombia 2002
- NIVIA, Elsa. Red de Acción en Plaguicidas Y Alternativas- América Latina- Colombia. Sentencia del tribunal de Cundinamarca, expediente Número 02-022
- ONIL, Samuel. Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Dirección de toxicología humana - Instituto nacional de salud publica de Quebec. Preparada para la Organización panamericana de la salud – OPS. Septiembre, 2001
- RAMOS, R.E. y RAMOS, B. Evaluación Ambiental del Impacto de cultivos de Coca y el procesamiento de la hoja de coca. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Disponible en: www.cultivosilicitoscolombia.gov.co/documentos/eval_ambiental.pdf
- Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia – OPS. Pág. 6, año 2001
- ROLDÁN PÉREZ, Gabriel Alfonso. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia. Uso del método BMWP/Col. 2006
- SERALINI GILLES, Eric. Confirman la peligrosidad del Glifosato. Universidad de Canes, Francia. Febrero 10 de 2006.
- SICARD, Tomás León. BURGOS SALCEDO, Javier. TORO PÉREZ, Catalina y LUENGAS BAQUERO, César. Estudio de los efectos del programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y

de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Universidad Nacional de Colombia - Instituto de Estudios Ambientales (IDEA). Bogotá, mayo 11 de 2005.

- Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Veterinaria, laboratorio de veterinaria
- URIBE GRANJA, Camilo. Toxicología del Glifosato. Clínica de Toxicología. Bogotá 1996
- USAL, Gustavo Otamendi. Jornada de evaluación y análisis multidisciplinario de factores ambientales en el origen de la patología humana, Universidad del Salvador.

INFOGRAFIA

- www.epa.gov
- <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh3.html>
- <http://www.biologiamarina.com/dev/projects/bentos.asp>
- http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/trucha_arcoiris/trucha_arco.htm
- <http://www.revistaaquatic.com/asociaciones/PirineosPesca/docs/anatomia.pdf>

ANEXOS

ANEXO A
CARTAS DE CONTROL PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO K₂Cr₂O₇



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 1

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 27/05/2008

Finalización: 31/05/2008

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
20	1	1	1	0	2	1	0	0	2	1	2	0	5	20	25
40	1	3	1	2	2	3	1	2	2	3	2	2	9	20	45
60	1	3	2	0	2	4	3	0	3	4	4	0	11	20	55
80	2	3	2	2	3	4	2	3	3	4	3	4	14	20	70
100	3	3	4	3	4	5	5	4	5	5	5	5	20	20	100
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	20	5

Límite superior: 58.6144 mg/L

CL50-96: 46.0041 mg/L

Límite inferior: 31.0239 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 2

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 27/05/2008

Finalización: 31/05/2008

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	2	0	0	0	2	2	0	0	3	3	0	0
60	0	2	0	0	1	2	2	0	1	2	4	0
80	0	0	2	0	1	2	3	1	1	4	3	1
100	0	0	0	0	2	2	2	5	3	3	2	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	4	3	0	0	4	3	0	0	4	4	0	0	8	20	40
60	1	2	4	1	2	3	4	1	4	3	4	1	12	20	60
80	2	4	3	3	2	4	4	5	2	4	4	5	15	20	75
100	4	0	4	5	4	1	5	5	4	5	5	5	19	20	95
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0

Límite superior: 58.8893 mg/L

CL50-96: 50.9009 mg/L

Límite inferior: 43.3051 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 3

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 27/05/2008

Finalización: 31/05/2008

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	1	1	1	1	2	2	1	1	3
60	0	1	0	0	0	3	0	1	2	3	2	1
80	0	1	0	1	1	2	1	1	2	3	3	3
100	5	4	1	3	5	5	5	5	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	40	2	2	1	3	2	2	2	3	2	2	2	9	20	45
60	60	4	3	2	2	4	4	2	3	4	4	2	13	20	65
80	80	2	5	4	3	4	5	4	3	4	5	4	16	20	80
100	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
Control	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0

Límite superior: 53.6640 mg/L

CL50-96: 46.6607 mg/L

Límite inferior: 39.8538 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 4

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 09/06/2008

Finalización: 13/06/2008

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
40	3	0	2	1	3	0	2	1	3	0	2	1
60	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	2
80	3	1	1	1	3	1	1	1	3	2	2	1
100	3	1	3	3	3	1	3	3	4	3	4	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	20	5
40	3	0	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	8	20	40
60	1	3	2	2	3	3	3	5	3	3	3	5	14	20	70
80	3	3	4	3	4	5	5	4	4	5	5	4	18	20	90
100	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	19	20	95
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0

Límite superior: 52.3955mg/L

CL50-96: 45.1073 mg/L

Límite inferior: 37.4158 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 5

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 09/06/2008

Finalización: 13/06/2008

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS					
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera					
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	% Mortalidad
20	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1/20	5
40	2	3	1	2	2	3	1	2	2	3	1	2	8/20	40
60	4	2	3	2	4	2	3	2	4	2	3	2	11/20	55
80	4	3	5	5	4	3	5	5	4	3	5	5	17/20	85
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Límite superior: 55.2045

CL50-96: 47.8316

Límite inferior: 40.2108

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

SENSIBILIDAD: 6

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 09/06/2008

Finalización: 13/06/2008

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS					
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera					
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	% Mortalidad
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0
40	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3	1	1	7/20	35
60	3	2	4	3	3	2	4	3	3	2	4	3	12/20	60
80	5	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	4	17/20	85
100	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	19/20	95
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	

Límite superior: 57.0970

CL50-96: 50.8601

Límite inferior: 43.5403

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 7

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 23/06/2008

Finalización: 27/06/2008

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1
60	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	2
80	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	5	4
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS					
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera					
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	% Mortalidad
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0
40	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	5/20	25
60	3	4	2	2	3	4	2	2	3	4	2	2	11/20	55
80	5	3	5	4	5	3	5	4	5	3	5	4	17/20	85
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Límite superior: 60.1547

CL50-96: 53.7093

Límite inferior: 46.8855

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 8

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 23/06/2008

Finalización: 27/06/2008

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3
80	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5	4
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº muertos % Mortalidad	
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera					
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1/20	5
40	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	4/20	45
60	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	10/20	50
80	5	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5	4	18/20	90
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0

Límite superior: 59.4713

CL50-96: 52.5067

Límite inferior: 45.3242

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 9

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 23/06/2008

Finalización: 27/06/08

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2
60	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	3
80	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	4	5
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS					
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera					
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	% Mortalidad
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	5
40	2	0	2	2	2	0	2	2	2	0	2	2	6/20	40
60	3	1	4	3	3	1	4	3	3	1	4	3	11/20	60
80	5	3	4	5	5	3	4	5	5	3	4	5	17/20	85
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0

Límite superior: 58.9431

CL50-96: 52.3423

Límite inferior: 45.5158

RESPONSABLE: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 10

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 04/08/08

Finalización: 08/08/08

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
40	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	7	20	35
50	1	1	1	1	3	2	2	2	3	2	2	2	9	20	45
60	2	1	0	1	3	2	2	1	3	3	2	2	10	20	50
70	1	1	2	1	3	2	2	1	3	3	3	1	10	20	50
80	2	1	2	3	3	2	4	4	4	2	5	4	15	20	75
Control	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	20	5

Límite superior: 93.5596 mg/L

CL50-96: 60.2373 mg/L

Límite inferior: 39.7412 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 11

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 04/08/08

Finalización: 08/08/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
40	0	1	0	1	2	3	0	1	2	3	1	1	7	20	35
50	0	1	1	1	1	1	3	2	1	2	3	2	8	20	40
60	1	2	1	1	3	3	1	2	3	3	2	2	1	20	50
70	1	3	1	2	2	3	2	4	2	3	3	5	13	20	65
80	3	2	1	3	4	4	2	4	4	4	3	5	16	20	80
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0

Límite superior: 64.2487 mg/L

CL50-96: 54.6811 mg/L

Límite inferior: 43.2141 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

SENSIBILIDAD: 12

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio

Inicio: 04/08/08

Finalización: 08/08/08

Concentración	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
40	0	1	1	1	1	1	3	2	1	2	3	2	8	20	40
50	0	2	1	0	0	3	2	2	0	3	3	1	7	20	35
60	1	2	1	1	1	4	2	2	1	5	2	2	10	20	50
70	1	2	2	1	2	3	3	2	2	3	4	3	12	20	50
80	2	3	1	4	3	4	3	5	3	4	4	5	16	20	80
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0

Límite superior: 66.9956 mg/L

CL50-96: 55.2281 mg/L

Límite inferior: 41.4307 Mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA

ANEXO B

CARTAS DE CONTROL PARA LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA CON GLIFOSATO ROUNDUP 747



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

PRUEBA: 1 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 19/08/08 Finalización: 23/08/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
0.01	0	0	0		0	0	0		1	0	0	
0.1	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
1.0	0	0	0		0	0	0		2	1	1	
10	0	0	0		0	0	0		2	0	1	
100	0	0	0		0	0	0		5	5	5	
Control	0	0	0		0	0	0		0	0	0	

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS					
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de muertos /Nº total	% mortal obtenido
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
0.001	0	2	0		0	2	0		0	2	0		2/15	13.3
0.01	1	0	1		1	0	1		1	1	1		3/15	20
0.1	1	0	0		2	1	0		3	1	0		4/15	26.6
1.0	3	2	2		3	2	2		3	2	2		7/15	46.6
10	2	1	2		3	1	3		3	1	4		8/15	53.3
100	5	5	5		5	5	5		5	5	5		15/15	100
Control	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0/20	0

Límite superior: 4.9765 mg/L

CL50-96: 0.9768 mg/L

Límite inferior: 0.2332 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 2

Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup

Inicio: 19/08/08

Finalización: 23/08/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2
10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	4
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	2/20	10	
0.01	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	4/20	20	
0.1	1	0	0	2	2	1	0	2	3	1	0	2	6/20	30	
1.0	3	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	9/20	45	
10	2	1	2	4	3	1	3	4	3	1	4	4	12/20	60	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 2.7715 mg/L

CL50-96: 0.8087 mg/L

Límite inferior: 0.2566 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS)

PRUEBA: 3

Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup

Inicio: 02/09/08

Finalización: 06/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1.0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1
10	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	1	2
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1/20	5	
0.01	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	3/20	15	
0.1	1	0	0	3	2	1	0	3	3	1	0	2	6/20	35	
1.0	3	2	2	1	3	2	2	1	3	2	2	1	8/20	40	
10	2	3	2	2	3	4	3	2	3	4	4	2	13/20	65	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 2.8471 mg/L

CL50-96: 0.9670 mg/L

Límite inferior: 0.3506 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 4 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 02/09/08 Finalización: 06/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
10	0	0	0	0	1	1	0	2	2	1	2	3
100	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1/20	0	
0.01	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2/20	5	
0.1	1	0	0	1	1	1	1	2	1	1	1	2	5/20	25	
1.0	1	1	2	1	1	2	3	2	1	2	3	2	8/20	40	
10	2	1	2	3	2	2	3	4	2	3	3	4	12/20	60	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 4.0570 mg/L

CL50-96: 1.3897 mg/L

Límite inferior: 0.5195 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 5 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 02/09/08 Finalización: 06/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0.01	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
1.0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	1	0
10	0	0	0	2	1	1	0	4	3	1	2	4
100	0	3	0	0	5	3	4	2	5	4	5	3
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	2/20	0	
0.01	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0	3/20	5	
0.1	0	2	0	1	0	2	1	2	0	2	1	2	5/20	25	
1.0	3	2	1	0	3	2	1	1	3	2	1	1	7/20	40	
10	3	2	2	5	3	2	3	5	3	2	3	5	13/20	60	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 3.6883 mg/L

CL50-96: 1.1354 mg/L

Límite inferior: 0.3877 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 6 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 15/09/08 Finalización: 19/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
0.01	0	0	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0
0.1	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1
1.0	0	1	1	0	0	1	1	1	2	2	1	2
10	2	1	1	0	2	1	1	0	2	2	1	1
100	0	3	4	1	5	3	4	1	5	5	4	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	2/20	0	
0.01	0	2	1	1	0	3	1	1	0	3	1	1	5/20	5	
0.1	2	1	0	1	2	1	1	2	2	1	1	2	6/20	25	
1.0	2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	3	2	9/20	40	
10	3	2	2	2	3	2	4	2	3	2	4	2	11/20	60	
100	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	19/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 3.9773 mg/L

CL50-96: 0.9215 mg/L

Límite inferior: 0.2567 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 7 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 15/09/08 Finalización: 19/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0.01	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0
0.1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
1.0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2	0
10	1	0	1	0	1	0	1	0	2	2	2	1
100	1	4	3	0	2	4	5	4	5	5	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	2/20	10	
0.01	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	4/20	20	
0.1	1	0	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	5/20	25	
1.0	1	1	2	1	2	1	3	2	2	1	3	2	8/20	40	
10	2	2	3	3	4	2	3	3	4	2	3	3	12/20	60	
100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20/20	100	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 3.6792 mg/L

CL50-96: 1.0486 mg/L

Límite inferior: 0.3361 mg/L

RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA



UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Bogotá - Colombia

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).

PRUEBA: 8 Sustancia de Prueba: Glifosato Roundup Inicio: 15/09/08 Finalización: 19/09/08

	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS			
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera			
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.001	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2
1.0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	2	1	1
10	1	0	2	0	1	0	2	0	3	1	2	2
100	0	0	0	0	3	1	3	0	3	4	5	5
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				Nº de muertos /Nº total		% mortal obtenido
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera						
Nominal	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
0.001	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1/20	5	
0.01	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	3/20	15	
0.1	1	2	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	6/20	30	
1.0	1	1	2	3	2	1	2	3	2	1	3	2	8/20	40	
10	3	3	2	3	5	3	4	3	5	3	4	3	15/20	75	
100	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	19/20	95	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	0	

Límite superior: 2.4255 mg/L

CL50-96: 0.8048 mg/L


Límite inferior: 2.4255 mg/L


RESPONSABLES: Enrique Gámez, Carmen Barros

Elaborado por: Pedro Miguel Escobar.

TOXICIDAD ACUÁTICA

ANEXO C PROTOCOLO CETESB

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp01
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)	Página 1 de 4
		Versión 0
CONTENIDO 1. Objetivo 2. Materiales 3. Definiciones 4. Principio del método 5. Procedimiento 6. Bibliografía 7. Anexo D1 Aclimatación de peces. 1. OBJETIVO Realizar la aclimatación de los organismos de prueba <i>Trucha arco iris (Oncorhynchus Mykiss)</i> , a nivel de laboratorio, para posteriores pruebas de ensayo. 2. MATERIALES ✓ Acuarios ✓ Aireadores ✓ Filtros ✓ Difusores ✓ Oxímetro ✓ Alimento para peces. ✓ Agua de clorinada 3. DEFINICIONES <u>Oncorhynchus mykiss:</u> Salmónido que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande, puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas, que les permite aprisionar las presas capturadas. Son característicos de agua dulce.		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp01
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Página 2 de 4
		Versión 0

Acuarios: Recipientes de vidrio donde se mantienen peces vivos y vegetación acuática.

Aireadores: Equipo empleado para oxigenar el agua de los acuarios.

Oxímetro: Monitores empleados para medir la cantidad de oxígeno presente en el agua.

Agua de cloro residual: Es aquella que por aireación, es removido el cloro residual presente en la misma.

Aclimatación: Proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. Se suele usar este término para referirse a procesos que ocurren durante un período de tiempo corto, como la vida de un organismo individual o grupo.

Alevinos: Cría de ciertos peces de agua dulce que se emplea para repoblamiento de ríos y lagos.

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aclimatación de los alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), se realiza según la metodología CETESB, con el fin de adaptar los mismos a un nuevo ambiente para la posterior realización de las pruebas de toxicidad a nivel de laboratorio.

5. PROCEDIMIENTO






5.1. ACLIMATACIÓN


5.1.1. Los alevinos de trucha arco iris se aclimatan en acuarios de 100 L y 50 L, esto dependiendo de la cantidad de organismos.

5.1.2. El agua de los acuarios debe estar preparada (aireada) 8 días antes de la llegada de los alevinos, con el fin de remover el cloro residual presente en el agua y evitar así la muerte de los mismos.


5.1.3. Se deben tener en cuenta algunos parámetros según lo establecido en los protocolos de la CETESB, para evitar la muerte de los alevinos.


- ✓ Oxígeno: 6 – 8 mg/l
- ✓ Temperatura: 15-18 °C
- ✓ pH: 6.5 – 7.5 unidades


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div></div> <div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div> <div>Bogotá • Colombia</div>	LBp01
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Página 3 de 4
		Versión 0
<p>5.1.4. En el momento de la llegada de los alevinos de trucha arco iris, se debe introducir la bolsa donde vienen en el acuario, con el fin de contrarrestar las diferencias de temperaturas, esto se debe hacer por un lapso de tiempo de 2 horas.</p> <p>5.1.5. Después de las dos horas se empiezan a sacar los peces de la bolsa cuidadosamente y se distribuyen uniformemente en el acuario, para evitar el estrés y la muerte de los alevinos.</p> <p>5.1.6. Los alevinos son aclimatados por un lapso de tiempo de 15 días aproximadamente según lo establecido por la CETESB, para un mejor desempeño de los mismos en las pruebas de toxicidad.</p> <p>5.1.7. Durante el proceso de aclimatación, los acuarios deben ser limpiados por medio de una aspiradora, para remover las eses de los peces y el exceso de comida presente en el agua, esto para evitar que el amonio generado en las eses produzca la muerte de los alevinos de trucha arco iris, es importante anotar que en el caso de que los peces presenten hongos en su cuerpo, se debe aplicar unas gotas de azul de metileno, para prolongar la vida de los organismos.</p>		
		
Figura 1. Acondicionamiento de los acuarios	Figura 2. Aclimatación inicial de los alevinos	
		
Figura 3. Aclimatación de los alevinos	Figura 4. Mantenimiento de los alevinos	
Fuente: Los Autores 2008		


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp01
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Página 4 de 4
		Versión 0
<div>6. BIBLIOGRAFIA</div> <div><div>✓</div>EPA., 1994</div> <div><div>✓</div>BERNAL Y ROJAS, Determinación de la concentración letal media del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática. Bogotá, D.C., 2007.</div> <div><div>✓</div>ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando <i>Daphnia Pulex</i> para la evaluación de muestras ambientales. Santafé de Bogotá, D.C., 1997.</div> <div><div>✓</div>COMPAÑÍA DE TECNOLOGÍA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL DE SAO PAULO, BRASIL - CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.017/ 92.</div> <div><div>✓</div>PROYECTO CAR – BID – CONTRATO 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, D.C., 1994.</div>		
<div>Elaboró:</div> <div><div>Pedro Miguel Escobar Malaver</div><div>Carmen Barros Santiago</div><div>Enrique Gamez Rojas</div></div>		
<div>Primera Revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver</div>		

ANEXO D PROTOCOLO PRUEBAS DE TOXICIDAD

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	<i>Página 1 de 8</i>
		<i>Versión 0</i>
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Definiciones Materiales Principio del método Procedimiento Bibliografía Anexo <p>1. OBJETIVO</p> <p>Determinar la concentración letal media (CL^{50}_{-96}) de una sustancia pura o de un vertimiento mediante pruebas estáticas sin renovación de la sustancia pura o efluente, que produce la muerte al 50% de los organismos expuestos en un tiempo de 96 horas.</p> <p>2. DEFINICIONES</p> <p><u>Prueba Estática:</u> Ensayo toxicológico en el cual no existe renovación de las soluciones test a lo largo de toda la prueba (corto tiempo de duración no más de 96 horas).</p> <p><u>Condiciones de la Prueba:</u> Medición de parámetros de control después de cada una de las pruebas, con el fin de demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas. Para ello se verifica el pH, el oxígeno disuelto y la dureza.</p> <p><u>Concentración Letal (CL^{50}_{-96}):</u> Concentración del compuesto tóxico que afecta al 50 % de la población de la especie modelo, causando su muerte, bajo condiciones de prueba en un tiempo de 96 horas.</p> <p><u>Pruebas de Sensibilidad:</u> Estandarización de pruebas de toxicidad, cuyo propósito es establecer la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones de las mismas; con esto se garantiza y certifica la confiabilidad de los datos en relación con la capacidad de respuesta de los organismos.</p> <p>Con las pruebas se determina el rango de sensibilidad frente al tiempo de exposición y, de igual manera,</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02																
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	Página 2 de 8																
		Versión 0																
<p>se comprueba que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto del tóxico de referencia y no a fallas operacionales en la aplicación del método, elaborando así cartas de control, teniendo en cuenta la precisión y exactitud que se deben y pueden obtenerse en los resultados generados por un determinado bioensayo. Los tóxicos de referencia a utilizar en estas pruebas pueden ser: NaCl, KCl, CdCL, CuSO₄, SDS o K₂CR₂O₇.</p> <p>Pruebas Preliminares (Screening Test): Pruebas de toxicidad donde se establece el rango de concentraciones de sustancias problema o vertimientos, en las cuales hay efectos observables en los organismos de prueba sin que se presente alta mortalidad.</p> <p>Pruebas Definitivas: Pruebas de toxicidad que se realizan a partir de los resultados de las pruebas preliminares. En ellas se determinan si se pueden mantener las mismas concentraciones, o si es necesario cambiar el factor de dilución en algún intervalo u otro aspecto que resulte relevante.</p> <p>Pruebas de Toxicidad Aguda: El principio de estas pruebas es determinar bajo condiciones específicas de una sustancia pura, o efluente, su letalidad al 50% de la población expuesta después de un período de exposición de 24, 48, 72 o 96 horas. Esta determinación se designa como la concentración letal media en el tiempo de exposición.</p> <h3>3. MATERIALES</h3> <table><tr><th>CANTIDAD</th><th>MATERIAL</th></tr><tr><td>24</td><td>Peceras de 2.5 Lt.</td></tr><tr><td>6</td><td>Balones aforados de 1000 ml</td></tr><tr><td>4</td><td>Pipetas aforadas de 25 ml y 10 ml</td></tr><tr><td>2</td><td>Probetas de 1000 ml</td></tr><tr><td>1</td><td>Stand con 6 entrepaños</td></tr><tr><td>2</td><td>Pipeteadores</td></tr><tr><td></td><td>Mallas de recolección</td></tr></table> <h3>4. PRINCIPIO DEL MÉTODO</h3> <p>Las pruebas de toxicidad se realizan según la metodología CETESB (1992), con el fin de exponer individuos de 15 días de nacidos a diferentes porcentajes de dilución de una sustancia de interés sanitario o de un vertimiento, determinándose la concentración que afecta al 50 % de la población del organismo de prueba <i>Trucha arco iris (Oncorhynchus Mykiss)</i>, causando su muerte, en un tiempo determinado.</p>			CANTIDAD	MATERIAL	24	Peceras de 2.5 Lt.	6	Balones aforados de 1000 ml	4	Pipetas aforadas de 25 ml y 10 ml	2	Probetas de 1000 ml	1	Stand con 6 entrepaños	2	Pipeteadores		Mallas de recolección
CANTIDAD	MATERIAL																	
24	Peceras de 2.5 Lt.																	
6	Balones aforados de 1000 ml																	
4	Pipetas aforadas de 25 ml y 10 ml																	
2	Probetas de 1000 ml																	
1	Stand con 6 entrepaños																	
2	Pipeteadores																	
	Mallas de recolección																	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	<i>Página 3 de 8</i>
		<i>Versión 0</i>
<p>5. PROCEDIMIENTO</p> <p>5.1 PREPARACIÓN DE SUSTANCIAS PURAS PARA PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUA</p> <p>5.1.1 Preparar la cantidad de tóxico requerido, según los datos obtenidos estequiométricamente en 1L de agua destilada en un balón aforado de 1000 ml, a partir de esto realizar 5 diluciones siguiendo un factor de 10. (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10).</p> <p>5.2 VERTIMIENTOS</p> <p>5.2.1 Determinar el sitio de muestreo en la industria</p> <p>5.2.2 Realizar la caracterización fisicoquímica del agua residual, siguiendo los lineamientos de la EPA (2005), (DQO, O.D, pH, conductividad, sólidos suspendidos).</p> <p>5.2.3 Establecer si es necesario efectuar un tratamiento a la muestra (filtración, precipitación, centrifugación) para facilitar el montaje de las pruebas de toxicidad.</p> <p>5.2.4 Mantener refrigerada la muestra por un tiempo no mayor a 12 horas.</p> <p>5.2.5 Preparar diluciones partiendo del 100% del efluente y a partir de ella preparar soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100% del efluente, diluyendo con agua de clorinada a un volumen final de 2000 ml.</p> <p>5.2.6 Realizar las pruebas toxicológicas en un tiempo no mayor a 24 horas.</p> <p>5.3 MONTAJE DE LA PRUEBAS TOXICOLÓGICAS</p> <p>5.3.1. Colocar en un estante 24 peceras, los cuales, deben estar distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones (pruebas de sensibilidad, sustancia pura y muestra analítica) y en un control de agua de clorinada. (Figura 1)</p> <p>5.3.2. Adicionar la cantidad indicada al realizar los cálculos de los diferentes porcentajes de concentración con ayuda de una pipeta graduada en las peceras mencionadas anteriormente, siendo preparadas cuatro (4) replicas por concentración, cada una con su respectivo control (agua de clorinada).</p> <p>5.3.3. Transferir a cada pecera 5 alevinos de trucha arco iris de 15 días de nacidos con ayuda de una malla, aclimatados 15 días previos a la prueba. Cada concentración necesita 20 organismos y en cada batería de ensayo se utilizan 120 organismos. (Figuras 3 ,4 y 5)</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	<i>Página 4 de 8</i>
		Versión 0

- 5.3.4. Observar y tomar la lectura durante las 3, 24, 48,72 y 96 horas de los peces muertos en cada pecera, reportando los datos en el formato FLB001 “Registro de resultados por muestra analizada”.
- 5.3.5. Realizar la medición de parámetros de control el pH y OD después de cada prueba, tomando de manera aleatoria cualquier concentración, con el fin de demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas, reportando estos datos en el Formato FLB001.
- 5.3.6. Registrar y reportar los datos en la siguiente tabla:

Tabla 1. Formato FLB 001. Reporte de datos de bioensayos

Concentración	Réplicas				Total muertos	%Mortalidad	pH	O.D.	Dureza
	1	2	3	N					

Fuente: Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos acuáticos

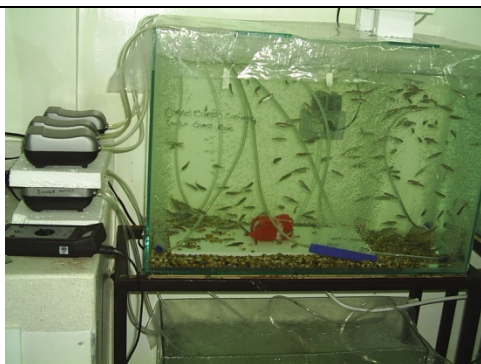





Figura 1. Aclimatación de los alevinos



Figura 2. Baterías de ensayo

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	Página 5 de 8
		Versión 0
<div></div> <p>Figura 3. Alevinos en baterías de ensayo</p>		
<p>5.3.7. Este procedimiento se realiza hasta encontrar los rangos de concentraciones que produce la muerte al 50% de los organismos, tanto para la realización de las pruebas definitivas de sensibilidad como para sustancias puras y vertimientos.</p>		
<p>5.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD</p>		
<p>5.4.1. Realizar las pruebas definitivas de sensibilidad con un patrón primario como es el Dicromato de potasio, siguiendo la metodología descrita en los pasos 5.2.1. hasta 5.2.6. utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.</p>		
<p>5.4.2. Los rangos de dicromato de potasio que producen la muerte al 50% de los organismos están entre 20 y 100 mg/L de dicromato de potasio.</p>		
<p>5.4.3. Con los resultados obtenidos entre este rango determinar la concentración letal media CL₅₀₋₄₈ de cada prueba de sensibilidad por medio del “Método Probit” (Protocolo LB 06): “Análisis de Regresión y análisis Probit”.</p>		
<p>5.4.4. Realizar una carta de control con los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad y determinar la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) promedio para el dicromato de potasio, así como la desviación estándar (σ) de la CL₅₀₋₄₈, sus límites superior (promedio +2(σ)), e inferior (promedio - 2(σ))</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	<i>Página 6 de 8</i>
		Versión 0
<p>5.4.5. Estos resultados corresponden al intervalo de la concentración en el cual varía la respuesta de los organismos al tóxico de referencia, con una confiabilidad del 95%.</p> <p>5.4.6. La carta de control se debe realizar como mínimo con 20 pruebas de sensibilidad con el dicromato de potasio. Cada mes se genera una nueva carta de control.</p> <p>5.5. PRUEBAS DEFINITIVAS</p> <p>5.5.1. Realizar las pruebas definitivas siguiendo la metodología descrita en los pasos 5.3.1. hasta 5.3.6. utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.</p> <p>5.5.2. Reportar estos resultados en el Formato FLB001</p> <p>5.5.3. Obtener la concentración letal media (CL50-96) con su respectivo límite superior e inferior con una confiabilidad del 95% por medio del “Método Probit” (Protocolo LB06): “Análisis de Regresión y Análisis Probit”.</p> <p>5.5.4. Realizar el análisis de varianza (ANOVA) del resultado, con el procedimiento descrito en el Protocolo LB07: “Análisis de Varianza”.</p> <p>5.5.5. Notas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y, preferiblemente, no más que el 5%. 2. Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa y se requiere la repetición de la misma. 3. La concentración de oxígeno medida en el bioensayo después de 96 horas debe ser mayor de 2 mg/l. 4. Se debe realizar semanalmente una prueba de sensibilidad con los rangos establecidos del dicromato de potasio; el resultado de la concentración letal media (CL50-96) del tóxico de referencia debe estar dentro de los límites superiores e inferiores establecidos en la carta de control. <p>6. BIBLIOGRAFÍA</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ BERNAL, Y & ROJAS, A. 2007. ✓ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 20. 2005. ✓ ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando <i>Daphnia Pulex</i> para la evaluación de muestras ambientales. Santafé de Bogotá; 1997. ✓ Fuente: Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos acuáticos ✓ CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.017 y L5.022 1992 		


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp02
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE TOXICIDAD	<i>Página 7 de 8</i>
		<i>Versión 0</i>
Elaboro: Pedro Miguel Escobar Malaver Carmen Barros Santiago Enrique Gamez Rojas		
Primera Revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver		




INICIO: _/_/_/ HORAS
FINALIZACION: _/_/_/ HORAS

[illegible][illegible]

ANEXO E
PROTOCOLO DEL METODO PROBIT

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL MÉTODO DE PROBIT	Página 1 de 22 Versión 0
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Definiciones Principio del modelo matemático Procedimiento Bibliografía Anexo 1: Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad Anexo 2: Representación gráfica del cálculo de la CL50 Anexo 3: Determinación del Chi-cuadrado (χ^2). Anexo 4: Factor (p) para el Probit calculado (Y). <p>1. OBJETIVO</p> <p>Evaluar los resultados de los ensayos por medio de un modelo estadístico</p> <p>2. DEFINICIONES</p> <p><u>Concentración:</u> Magnitud física que expresa la cantidad de un elemento o un compuesto por unidad de volumen.</p> <p><u>Dosis:</u> Contenido de principio activo, expresado en cantidad por unidad de toma, por unidad de volumen o de peso en función de la presentación, que se administrará de una vez.</p> <p><u>Efecto:</u> Consecuencia positiva o negativa, de la ocurrencia de un evento.</p> <p><u>Modelo:</u> Conceptualización de un evento, un proyecto, una hipótesis, el estado de una cuestión, que se representa como un esquema con símbolos descriptivos de características y relaciones más importantes con un fin: ser sometido a modelización como un diseño flexible, que emerge y se desarrolla durante el inicio de la investigación como una evaluación de su relevancia.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 2 de 22 Versión 0
<p><u>Toxicidad aguda:</u> La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.</p> <p><u>Probit:</u> Modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.</p> <p>3. PRINCIPIO DEL MODELO MATEMÁTICO</p> <p>En un experimento típico de pruebas de toxicidad se tiene la siguiente situación:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Concentración de la sustancia o dosis (d). ✓ Número de individuos (n). ✓ Número de organismos muertos o afectados (r). ✓ Porcentaje de efecto (p). $p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$ <p>La representación gráfica de p vs. d, o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal.</p> <p>Una forma de abordar este problema es transformando d a una escala logarítmica ($X = \log_{10}(d)$), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, como se muestra en la figura 1; de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 3 de 22 Versión 0

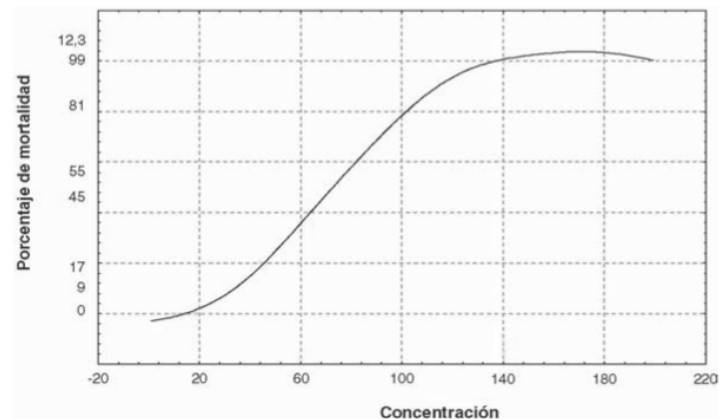


Figura 1. Relación dosis-respuesta

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades Probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bi-variado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = a + bx$$

Donde:


$$y \text{ (expresado en unidades Probit)} = z + 5$$


$$z = \text{Variable normal estándar} = z_0 \text{ tal que la Prob}(z \leq z_0) = p$$


a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión


Así, cuando $p = 50\%$ entonces $y = 5$, por lo tanto:

$$X_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^5$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03																																			
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 4 de 22																																			
		Versión 0																																			
<p>Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un <i>software</i> como el suministrado por la <i>US Environmental Protection Agency</i> (US EPA): <i>Probit Analysis Program</i>. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores <i>m</i>-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs. Dosis dentro del marco de la regresión.</p> <p>4. PROCEDIMIENTO</p> <p>Para el cálculo de la CL50 por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%).</p> <p>Con los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda con <i>Oncorhynchus Mykiss</i> se debe construir una tabla que contenga los siguientes datos:</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Concentración de la sustancia ensayada en %✓ Logaritmo en base 10 de las concentraciones (x)✓ Número de organismos en cada concentración✓ Número de organismos muertos en cada concentración (r).✓ Porcentaje de mortalidad en cada concentración (P).✓ Probit empírico (PE).✓ Probit esperado o calculado (Y). <p>Los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla 4 del Anexo 1 con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones, y se tabula en la tabla 1.</p>																																					
<table><tr><th colspan="7">Tabla 1: Cálculo de la CL50 por el método Probit</th></tr><tr><th>Concentración del agente tóxico (%)</th><th>Log10 de la concentración (X)</th><th>Núm. de organismos (N)</th><th>Núm. de muertos (r)</th><th>Porcentaje de mortalidad (P)</th><th>Probit empirico (PE)</th><th>Probit calculado (Y)</th></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>			Tabla 1: Cálculo de la CL50 por el método Probit							Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empirico (PE)	Probit calculado (Y)																					
Tabla 1: Cálculo de la CL50 por el método Probit																																					
Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empirico (PE)	Probit calculado (Y)																															

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 5 de 22 Versión 0
<p>A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadriculado, colocando en el eje X el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (Figura 1 Anexo 2), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje X se denomina <i>m</i> y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de <i>S</i> correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (<i>x</i>) por unidad de incremento del Probit.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de <i>S</i> correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (<i>x</i>) por unidad de incremento del Probit</p> <p>En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:</p> $S = (X - x) / (PE - Pe)$ <p>Donde:</p> <p>X: Mayor concentración</p> <p>x: Menor concentración</p> <p>PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración</p> <p>Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración</p> <p>A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadriculado, colocando en el eje X el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (Figura 1 Anexo 2), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje X se denomina <i>m</i> y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 6 de 22 Versión 0
<p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit</p> <p>En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:</p> $S = (X - x) / (PE - Pe)$ <p>Donde:</p> <p>X: Mayor concentración</p> <p>x: Menor concentración</p> <p>PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración</p> <p>Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración</p> <p>Así, los valores del Probit esperado o calculado (Y) para cada concentración podrán ser calculados utilizando la siguiente expresión:</p> $Y = 5 + \frac{(x - m)}{S}$ <p>Una vez calculados se colocan en la columna correspondiente de la tabla 2.</p> <p>La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre la concentración de la sustancia tóxica y la respuesta en unidades probit es la prueba de CHI-cuadrado (X^2). Los datos para el cálculo de este valor se colocan en una tabla 5 (Anexo 3) de la siguiente</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá • Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 7 de 22 Versión 0

forma:

- ✓ Concentración de la sustancia estudiada en %
- ✓ Logaritmo decimal de la concentración (x).
- ✓ Probit calculado o esperado (Y).
- ✓ Numero de organismos (N)
- ✓ Mortalidad observada (r)
- ✓ Porcentaje de efecto esperado (P).

La mortalidad esperada (*NP'*) se calcula multiplicando (*N*) por (*P'*).

El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtiene hallando la diferencia entre la mortalidad observada y la esperada. La contribución al Chi cuadrado de cada uno de los valores se calcula:

$$(r - NP)^2 / NP(1 - P)$$

Y para el cálculo de los grados de libertad (*n*):


$$n = K - 2$$

donde *K* es el número de concentraciones utilizadas

Con los datos obtenidos se diligencia la Tabla 2 para el cálculo del intervalo de confianza:

Tabla 2. Valores de X2 para una P=0.05.	
Grados de libertad(<i>n</i>)	X2

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá · Colombia</div></div>	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	<div>Página 8 de 22</div> <div>Versión 0</div>

$$EE \log_{10} CL_{50} = \left\{ S^2 \left(\frac{1}{SNp} + \frac{(m - x)^2}{SNp(x - x^2)} \right) \right\}^{0.5}$$

Inicialmente, se construye una tabla en la cual se incorporen los siguientes datos:

✓

Logaritmo decimal de las concentraciones (x).

✓

Número de organismos por concentración (N).

✓

Probit esperado o calculado (Y).

✓

Factor *p*, el cual se obtiene de la tabla 5 del Anexo 3 con el valor Y.

✓

Productos *Np*, *Npx* y *Npx2*, obtenidos de los datos de la misma tabla

✓

Sumatoria de los productos correspondientes a los valores *SNp*, *SNpx* y *S Npx2*

✓

Factor *p* debe ser obtenido en la tabla entrando el valor de Probit calculado

✓

Producto *Np* resultante de la multiplicación de los valores de número de organismos por el factor *p* y su respectiva sumatoria.

✓

Producto *Npx* resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de las concentraciones con su respectiva sumatoria.


✓


Producto *Npx2* resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de la concentración con su respectiva sumatoria.


Con todos los datos anteriores, se diligencia la Tabla 3:


Tabla 3. Cálculo del error estándar del log10 CL50.						
Log 10 de la concentración (x)	Núm. De organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx ²)

Al tener la CL50 y no olvidando que el intervalo de confianza es 95% tendremos la concentración letal con sus limites inferior y superior respectivamente.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 9 de 22
		Versión 0
<p>Para el desarrollo de esta investigación se adquirió el Software de Probit, el cual determinar la CL50-48 y los limites de confianza mas rápido, y su procedimiento es el siguiente:</p> <p>Se instala el programa en un computador que cuente con un software de Windows 98 en adelante, creándose una carpeta de Probit en el escritorio.</p> <p>Dentro de esta carpeta quedarán registrados varios archivos; se dirige al archivo con nombre PROBFIS2 y se da doble clic donde se abre una ventana de la siguiente manera:</p> <div><p>ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989</p><p>Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== ></p></div>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 10 de 22 Versión 0
<p>Da dos opciones para manejar el programa, la (1) es para introducir los datos con el teclado, la (2) para introducirlos en fila. Es este paso se escribe (1), y sale:</p> <div data-bbox="448 620 1142 1124" data-label="Code-Block"> <pre> ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989 Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== > 1 Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3 </pre> </div> <p>Ahora se le da un nombre al archivo que se crea con los resultados que determina el programa, así:</p> <div data-bbox="507 1348 1133 1888" data-label="Code-Block"> <pre> ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989 Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== > 1 Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3 Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati ===== > B </pre> </div>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 11 de 22 Versión 0
<p>Ahora el programa pide que se inserten el numero de concentraciones, sin el control, numero de muertes en el control, numero de organismos en el control, así:</p> <div data-bbox="493 656 1142 960" data-label="Text"> <pre> Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3 Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati ===== > B NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5 NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0 NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20 </pre> </div> <p>Ahora se procede a ingresar los datos de las concentraciones comenzando por la concentración menor, el numero de muertes en cada una y el número de tratamientos, así:</p> <div data-bbox="493 1164 1142 1668" data-label="Text"> <pre> Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3 Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati ===== > B NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5 NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0 NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20 == > INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 0.1 NUMERO MORTI= 0 NUMERO TRATTATI=20 </pre> </div> <p>Así sucesivamente hasta completar los datos de las 5 concentraciones. Al terminar este paso se da enter y se cierra esta ventana; en la carpeta de probit aparece un archivo con el nombre que se le designó a esa batería donde dará los resultaos de la CL50 con los limites de confianza</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 12 de 22 Versión 0

Este procedimiento se debe realizar para cada batería de ensayo, quedarán registrados los resultados en su respectivo archivo.

5. EJEMPLO

Se realizó una prueba de toxicidad, de la cual se obtuvieron los siguientes porcentajes de mortalidad:

Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (Y)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

No se debe olvidar que los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla 4 del Anexo 1 con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje X el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (Figura 1 Anexo 2), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje X se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CL50. Teniendo en este caso un $m = 1.72$, por lo tanto la CL50 = 52.5 mg/l.


En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores:

$$x_m = 0.8 \quad PE = 3.30$$

$$x_M = 2.0 \quad PE = 5.55$$

Si:

$$S = (X - x) / (PE - PE)$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 13 de 22 Versión 0

Siendo:

xM = Mayor concentración.
 xm = Menor concentración.
 PE = Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.
 PE = Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Tendremos:

$$S = (2.0 - 0.8) / (5.55 - 3.30)$$
$$S = 0.533$$

Obteniendo así la tabla del Chi-cuadrado (X^2) como se observa en el Anexo E.

Se remplaza en la ecuación los valores:


$$n = K - 2$$
$$n = 5 - 2 = 3$$

En la tabla 3 se determina el valor de X^2 para tres grados de libertad, el valor obtenido es 7,82; al compararlo con el valor obtenido en la tabla, se observa que:

$$7.82 > 0.482$$

Por lo tanto, la recta está bien ajustada; en caso contrario, trazar nuevamente la recta y volver a calcular el Chi cuadrado.

Tabla 3. Valores de X^2 para una $P=0.05$.	
Grados de libertad(n)	x^2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 <div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div> Bogotá • Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 14 de 22
		Versión 0

Cálculo del intervalo de confianza

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE \log_{10} CL_{50} = \left\{ S^2 \left(\frac{1}{\sum Np} + \frac{(m - x)^2}{\sum Np(x - x^2)} \right) \right\}^{0.5}$$

Así se construye la grafica:

Cálculo del error estándar del log10 CL50.

Log 10 de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx2)
2,0	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,7	20	4,96	0,635	12,70	21,59	36,70
1,4	20	4,40	0,558	11,16	15,62	21,87
1,1	20	3,84	0,388	7,76	9,54	9,39
0,8	20	3,27	0,194	3,88	3,10	2,48
			(Σ)'	46,88	71,61	115,96

En este caso sería:


$$S= 0.533$$
$$x= \sum Npx / \sum Np= 1.527$$
$$m= 1.72$$
$$\sum Np= 46.88 \quad \sum Npx= 71.61 \quad \sum Npx^2=115.96$$
$$\sum Np(x-x^2) = Npx2 - \{(\sum Npx)2/\sum Np\} = 6.574$$


Sustituyendo estos valores en la expresión:


$$EE \log_{10} CL_{50} = 0.0875$$


Así, el EE de CL50 será:

$$EECL_{50} = \log 10 \times EE \log_{10} CL_{50} \times 10^m$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 15 de 22 Versión 0
<p>Donde:</p> $\log_{10} = 2.3026$ $EE \log_{10} CL_{50} = 0.0875$ $10^m = 51.97$ <p>Sustituyendo los valores en la expresión:</p> $EECL_{50} = 32.96$ <p>Como la:</p> $CL_{50} = 51.97$ $Intervalodeconfianza = m \pm EECL_{50}$ $al95\% = 51.97 + 32.46 = 84.43$ $51.97 - 32.46 = 37.14$ <p>Por tanto, la CL50 con los respectivos límites será:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Limite inferior: 41.9 ppm • CL 50: 52.5 ppm • Limite Superior: 63.1 ppm <p>Utilizando el Software con los datos del ejemplo anterior sería:</p> <div data-bbox="515 1467 1077 1955" style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCOLARE LA LC NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20 A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451 Marzo 1989</p> <p>Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ? Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare > ===== > 1</p> <p>Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ? ===== > 3</p> <p>Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati ===== > B</p> </div>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03																																			
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 16 de 22 Versión 0																																			
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 10px;"> <p>NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5 NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0 NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20</p> <p>== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 6.25 NUMERO MORTI= 1 NUMERO TRATTATI=20</p> <p>== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 12.50 NUMERO MORTI= 2 NUMERO TRATTATI=20</p> <p>== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 25 NUMERO MORTI= 5 NUMERO TRATTATI=20</p> <p>== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 50 NUMERO MORTI= 9 NUMERO TRATTATI=20</p> <p>== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE CONCENTRACIONE= 100 NUMERO MORTI= 15 NUMERO TRATTATI=20</p> </div>																																					
<p>Al terminar de digitar los datos en el programa, se cierra esta ventana y al abrir el archivo de nombre B, los datos salen registrados de la siguiente manera:</p>																																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONCENTRAZIONE</th> <th>LOG (CONC)</th> <th>N. TRATTATI</th> <th>N. MORTI osservati</th> <th>attesi</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6.25</td> <td>0.7959</td> <td>20.</td> <td>1.</td> <td>0.68</td> </tr> <tr> <td>12.50</td> <td>1.0969</td> <td>20.</td> <td>2.</td> <td>2.20</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>1.3979</td> <td>20.</td> <td>5.</td> <td>5.28</td> </tr> <tr> <td>50.00</td> <td>1.6990</td> <td>20.</td> <td>9.</td> <td>9.73</td> </tr> <tr> <td>100.00</td> <td>2.0000</td> <td>20.</td> <td>15.</td> <td>14.27</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Controllo</td> <td>20.</td> <td>0.</td> <td>0.00</td> </tr> </tbody> </table>			CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI osservati	attesi	6.25	0.7959	20.	1.	0.68	12.50	1.0969	20.	2.	2.20	25.00	1.3979	20.	5.	5.28	50.00	1.6990	20.	9.	9.73	100.00	2.0000	20.	15.	14.27	Controllo		20.	0.	0.00
CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI osservati	attesi																																	
6.25	0.7959	20.	1.	0.68																																	
12.50	1.0969	20.	2.	2.20																																	
25.00	1.3979	20.	5.	5.28																																	
50.00	1.6990	20.	9.	9.73																																	
100.00	2.0000	20.	15.	14.27																																	
Controllo		20.	0.	0.00																																	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03														
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 17 de 22														
		Versión 0														
<p>PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$: (Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)</p> <p>Intercetta (a) = 1.5801 Pendenza (b) = 1.9932 es = 0.3991 Media delle X = 1.5377 Media delle Y = 4.6451 CHI quadro = 0.4327</p> <p>ALTRI PARAMETRI STATISTICI :</p> <p>Numero di punti = 5 Gradi di libert... = 3 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001 Numero di cicli = 1</p> <table><tr><th rowspan="2">END POINT</th><th rowspan="2">CONCENTRAZIONE</th><th colspan="2">LIMITI FIDUCIALI (95%)</th></tr><tr><th>inferiore</th><th>superiore</th></tr><tr><td>LC1</td><td>3.5373</td><td>0.7646</td><td>7.1428</td></tr><tr><td>LC50</td><td>51.9726</td><td>37.1407</td><td>84.4326</td></tr></table>			END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		inferiore	superiore	LC1	3.5373	0.7646	7.1428	LC50	51.9726	37.1407	84.4326
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)														
		inferiore	superiore													
LC1	3.5373	0.7646	7.1428													
LC50	51.9726	37.1407	84.4326													
<p>Como se observa tanto el método manual como con el Software, los resultados de la CL 50 y los limites de confianza son iguales.</p> <p>6. BIBLIOGRAFÍA</p> <p>✓ http://www.metodologia probit.htm</p> <p>✓ http://www.unizar.es/guiar/1/Accident/An_conse/Probit.htm</p>																
<p>Tomado de: BERNAL Y ROJAS, Determinación de la Concentración Letal Media del Mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática. Bogotá, D.C., 2007</p>																

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 18 de 22 Versión 0

7. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 4. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

A Valores entre 99, 0 y 99, 9.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 19 de 22 Versión 0

ANEXO 2

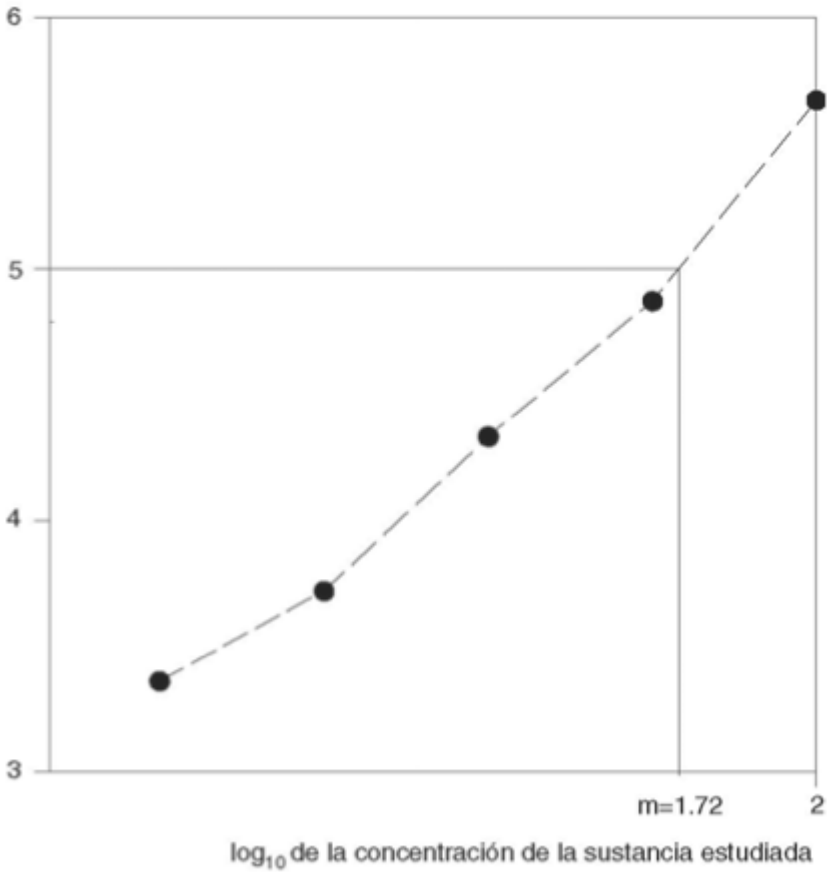



Figura 1. Representación gráfica del cálculo de la CL50


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp03
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Página 21 de 22
		Versión 0


ANEXO 4


Tabla 6. Factor (p) para el Probit calculado (Y).

Y	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,069	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,264	0,302	0,336	0,370	0,406
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,583	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,589	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,059	0,050	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001

ANEXO F
PROTOCOLO ANÁLISIS DE VARIANZA - ANOVA

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 1 de 6 Versión 0
CONTENIDO <ol style="list-style-type: none">ObjetivoDefinicionesPrincipio del modeloProcedimientoEjemploBibliografíaAnexo A 1. OBJETIVO <p>Comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos.</p> 2. DEFINICIONES <p><u>Variable:</u> Conceptos que forman enunciados de un tipo particular denominado hipótesis. Las variables se refieren a propiedades de la realidad que varían.</p> <p><u>Variable Dependiente:</u> Características de la realidad que se ven determinadas o que dependen del valor que asuman otros fenómenos o variables independientes.</p> <p><u>Variables independientes:</u> Los cambios en los valores de este tipo de variables determinan cambios en los valores de otra (variable dependiente).</p> <p><u>Grados de libertad:</u> Número efectivo de observaciones que contribuyen a la suma de cuadrados en un ANOVA, es decir, el número total de observaciones menos el número de datos que sean combinación lineal de otros.</p> <p><u>Hipótesis:</u> Propositiones provisionales y exploratorias sobre la veracidad o falsedad de un concepto, una teoría o un modelo con un alcance de trabajo de investigación por simulación y con métodos.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 2 de 6 Versión 0
<p>3. PRINCIPIO DEL MODELO</p> <p>El análisis de varianza parte de algunos supuestos que han de cumplirse:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La variable dependiente debe medirse al menos a nivel de intervalo. • Independencia de las observaciones. • La distribución de la variable dependiente debe ser normal. • Homogeneidad de las varianzas <p>Los modelos de <i>efectos aleatorios</i> asumen que en un factor se ha considerado tan sólo una muestra de los posibles valores que éste puede tomar; estos modelos se usan para describir situaciones en que ocurren diferencias incomparables en el material o grupo experimental. El ejemplo más simple es el de estimar la media desconocida de una población compuesta de individuos diferentes y en el que esas diferencias se mezclan con los errores del instrumento de medición.</p> <p>La técnica fundamental consiste en la separación de la suma de cuadrados (SS, 'sum of squares') en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo. Como ejemplo, mostramos el modelo para un ANOVA simplificado con un tipo de factores en diferentes niveles. (Si los niveles son cuantitativos y los efectos son lineales, puede resultar apropiado un análisis de regresión lineal).</p> $SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Error}} + SS_{\text{Factores}}$ <p>El número de grados de libertad (gl) puede separarse de forma similar y se corresponde con la forma en que la distribución chi-cuadrado describe la suma de cuadrados asociada.</p> $gl_{\text{Total}} = gl_{\text{Error}} + gl_{\text{Factores}}$		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá • Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	

4. PROCEDIMIENTO

Al realizar una prueba de toxicidad, se pasan los datos correspondientes a la Tabla 1

Tabla 1. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Yi	Yi Promedio
	1	2	3	4		

4.3. Se plantea la hipótesis nula y la hipótesis XXXX

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_n$

H₁: $\mu_1 \neq \mu_2$, para algún par


4.4. El tratamiento de análisis de varianza se hace mediante la Tabla 2:


Tabla 2. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	SS _{TTO}	a – 1	$\frac{SS_{TTO}}{a - 1}$	$\frac{SS_{TTO} / a - 1}{SS_E / N - a}$	F α (V ₁ V ₂)
Error	SS _E	N – a	$\frac{SS_E}{N - a}$		
Total	SS _T	N – 1			

Donde:

- N: Número total de observaciones; N: a * n
- n: número de observaciones en cada grupo
- a: numero de tratamientos

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 4 de 6 Versión 0
<div data-bbox="325 495 625 869"> <ul style="list-style-type: none"> ✓ FV : Fuente de varianza ✓ SS: Suma de cuadrados ✓ GL: Grados de libertad ✓ Ms: Cuadrados medios ✓ Fc: F calculado ✓ Ft: F tabulado ✓ V₁: a – 1 ✓ V₂: N – a </div> <div data-bbox="325 963 1072 994"> <p>4.5. Para obtener el SS_{TTO}, se debe reemplazar la siguiente formula:</p> </div> <div data-bbox="715 1012 970 1099"> $SS_{TTO} = \sum_{i=1}^{a=5} \frac{Y_i^2}{n} - \frac{\bar{Y}^2}{N}$ </div> <div data-bbox="325 1202 1051 1234"> <p>4.6. Para obtener el SS_T, se debe reemplazar la siguiente formula:</p> </div> <div data-bbox="684 1301 999 1388"> $SS_T = \sum_{i=1}^{a=5} \times \sum_{j=1}^{n=5} = Y_{ij}^2 \times \frac{\bar{Y}^2}{N}$ </div> <div data-bbox="325 1491 590 1523"> <p>4.7. Para obtener el SS_E:</p> </div> <div data-bbox="764 1565 925 1597"> $SS_E = SS_T - SS_{TTO}$ </div> <div data-bbox="325 1639 1367 1720"> <p>4.7. Al obtener el Fc lo comparamos el Ft, para refutar o aceptar alguna hipótesis, esto se hace así:</p> </div> <div data-bbox="719 1803 973 1834"> <p>Fc > Ft Se rechaza la Ho</p> </div> <div data-bbox="724 1865 968 1897"> <p>Fc < Ft Se acepta la Ho</p> </div>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 5 de 6 Versión 0

5. EJEMPLO

De una prueba de toxicidad que se realizó en el laboratorio, se obtuvieron los siguientes resultado:

Tabla 3. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Total	Porcentaje de mortalidad
	1	2	3	4		
10	5	5	5	5	20	100
5	5	5	5	5	20	100
1	4	3	4	3	14	70
0,5	1	2	1	0	4	20
0,1	0	1	0	1	2	10
Control	0	0	0	0	0	0

De la cual partimos de dos hipótesis así:

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos.

Teniendo en cuenta que tenemos:

Tratamientos:	6
Observaciones:	4
Total:	24

Podemos construir la tabla 2 del análisis de varianza de la siguiente forma:


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LBp04
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS VARIANZA (ANOVA)	Página 6 de 6 Versión 0

Tabla 4. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	101,83	5	20,37	244,40	2.77
Error	1,5	18	0,08		
Total	103,33	23			

Como podemos observar el $F_c > F_t$, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna, concluyendo que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los organismos prueba.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ <http://www.estadistico.com/arts.html?20011022>
- ✓ http://www.udc.es/dep/mate/estadistica2/sec3_7.html
- ✓ http://es.wikipedia.org/wiki/An%C3%A1lisis_de_varianza

Tomado de: BERNAL Y ROJAS, Determinación de la Concentración Letal Media del Mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática. Bogotá, D.C., 2007

ANEXO G
REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON ALEVINOS DE
TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) Y ANÁLISIS PROBIT PARA EL DICRIMATO DE
POTASIO.

PRUEBA: 1

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)

INICIO: 27/05/2008

FINALIZACION: 31/05/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	5.	3.74
40.00	1.6021	20.	9.	9.25
60.00	1.7782	20.	11.	13.25
80.00	1.9031	20.	14.	15.72
100.00	2.0000	20.	20.	17.21
Controllo		20.	1.	1.25

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) =	-0.1475	
Pendenza (b) =	3.0957	es = 0.7433
Media delle X =	1.7439	
Media delle Y =	5.2525	
CHI quadro =	5.8279	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti =	5	
Gradi di libert... =	3	
Mortalit... naturale =	0.0626	es = 0.0531
Numero di cicli =	4	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	8.1533	1.3395	15.9306
LC50	46.0041	31.0239	58.6144

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 2

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)**INICIO: 27/05/2008****FINALIZACION: 31/05/2008**

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	1.22
40.00	1.6021	20.	8.	7.25
60.00	1.7782	20.	12.	12.72
80.00	1.9031	20.	15.	16.02
100.00	2.0000	20.	19.	17.81
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) =	-2.8344	
Pendenza (b) =	4.5903	es = 0.7116
Media delle X =	1.7405	
Media delle Y =	5.1551	
CHI quadro =	1.7380	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti =	5	
Gradi di libert... =	3	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	15.8467	8.9624	21.7519
LC50	50.9009	43.3051	58.8893

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 3**SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)****INICIO: 27/05/2008****FINALIZACION: 31/05/2008**

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	2.53
40.00	1.6021	20.	9.	8.77
60.00	1.7782	20.	13.	13.28
80.00	1.9031	20.	16.	15.95
100.00	2.0000	20.	20.	17.50
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -2.6311
 Pendenza (b) = 4.5724 es = 0.6298
 Media delle X = 1.7182
 Media delle Y = 5.2252
 CHI quadro = 1.5841

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
 Gradi di libert... = 3
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	14.4604	8.7508	19.5248
LC50	46.6607	39.8538	53.6649

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 4

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	1.	0.92
40.00	1.6021	20.	8.	8.03
60.00	1.7782	20.	14.	14.45
80.00	1.9031	20.	18.	17.65
100.00	2.0000	20.	19.	19.01
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -2.8969
Pendenza (b) = 4.7737 es = 0.8017
Media delle X = 1.7207
Media delle Y = 5.3171
CHI quadro = 0.1190

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	14.6871	7.6548	20.6710
LC50	45.1073	37.4158	52.3955

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 5

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi

20.00	1.3010	20.	1.	1.07
40.00	1.6021	20.	8.	7.09
60.00	1.7782	20.	11.	12.76
80.00	1.9031	20.	17.	16.14
100.00	2.0000	20.	20.	17.95
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -2.8380
 Pendenza (b) = 4.6663 es = 0.7308
 Media delle X = 1.7427
 Media delle Y = 5.2941
 CHI quadro = 2.4706

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
 Gradi di libert... = 3
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	15.1768	8.3468	21.0864
LC50	47.8316	40.2108	55.2045

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 6

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	0.49
40.00	1.6021	20.	7.	6.36
60.00	1.7782	20.	12.	13.10

80.00	1.9031	20.	17.	16.92
100.00	2.0000	20.	19.	18.66
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) =	-4.1157	
Pendenza (b) =	5.3422	es = 0.8563
Media delle X =	1.7507	
Media delle Y =	5.2368	
CHI quadro =	0.7355	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti =	5	
Gradi di libert... =	3	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	18.6602	10.9765	24.9051
LC50	50.8601	43.5403	58.0970

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 7

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 23/06/2008

FINALIZACION: 27/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	0.15
40.00	1.6021	20.	5.	4.58
60.00	1.7782	20.	11.	11.94
80.00	1.9031	20.	17.	16.56
100.00	2.0000	20.	20.	18.64

Controllo	20.	0.	0.00
-----------	-----	----	------

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) =	-6.0954	
Pendenza (b) =	6.4133	es = 1.0027
Media delle X =	1.7773	
Media delle Y =	5.3029	
CHI quadro =	1.1269	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti =	5	
Gradi di libert... =	3	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	23.2982	15.0263	29.7037
LC50	53.7093	46.8855	60.1547

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 8

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 23/06/2008

FINALIZACION: 27/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	1.	0.42
40.00	1.6021	20.	4.	5.41
60.00	1.7782	20.	10.	11.73
80.00	1.9031	20.	18.	15.81
100.00	2.0000	20.	20.	17.94
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -4.4987
 Pendenza (b) = 5.5218 es = 0.8427
 Media delle X = 1.7700
 Media delle Y = 5.2751
 CHI quadro = 4.3634

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
 Gradi di libert... = 3
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	19.9032	12.2412	26.1483
LC50	52.5067	45.3242	59.4713

NOTA: Se LC \checkmark al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \checkmark necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 9

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 23/06/2008

FINALIZACION: 27/06/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	0.33
40.00	1.6021	20.	6.	5.44
60.00	1.7782	20.	11.	12.23
80.00	1.9031	20.	17.	16.40
100.00	2.0000	20.	20.	18.40
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -5.2146
 Pendenza (b) = 5.9427 es = 0.8921
 Media delle X = 1.7669
 Media delle Y = 5.2856
 CHI quadro = 1.4722

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
 Gradi di libert... = 3
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

```
=====
END POINT      CONCENTRAZIONE      LIMITI FIDUCIALI (95%)
                                inferiore      superiore
LC1             21.2518             13.6212      27.3686
LC50            52.3423             45.5158      58.9431
=====
```

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate,
 il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi
 di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto
 di statistica.

PRUEBA: 10

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 04/08/2008

FINALIZACION: 08/08/2008

```
=====
CONCENTRAZIONE  LOG (CONC)  N.TRATTATI      N.MORTI
                                osservati      attesi
40.00           1.6021      20.             7.           6.65
50.00           1.6990      20.             9.           8.69
60.00           1.7782      20.            10.          10.48
70.00           1.8451      20.            10.          11.99
80.00           1.9031      20.            15.          13.26

Controllo              20.             1.           1.01
=====
```

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -0.3798
Pendenza (b) = 3.0226 es = 1.3096
Media delle X = 1.7705
Media delle Y = 4.9727
CHI quadro = 1.5967

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0507 es = 0.0487
Numero di cicli = 1

```
=====
```

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	10.2383	0.0005	23.4477
LC50	60.2373	39.7412	93.5596

```
=====
```

NOTA: Se LC \checkmark al di fuori del range di conc. analizzate,
il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi
di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \checkmark necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto
di statistica.

PRUEBA: 11

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 04/08/2008

FINALIZACION: 08/08/2008

```
=====
```

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
40.00	1.6021	20.	7.	5.95
50.00	1.6990	20.	8.	8.79
60.00	1.7782	20.	10.	11.25
70.00	1.8451	20.	13.	13.25
80.00	1.9031	20.	16.	14.82
Controllo		20.	0.	0.00

```
=====
```

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX :

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -1.8425
Pendenza (b) = 3.9373 es = 1.2433

Media delle X = 1.7638
 Media delle Y = 5.1020
 CHI quadro = 1.0847

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
 Gradi di libert... = 3
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

```
=====
END POINT      CONCENTRAZIONE      LIMITI FIDUCIALI (95%)
                                inferiore      superiore
LC1             14.0283             1.3801        24.4464
LC50            54.6811             43.2141       64.2487
=====
```

NOTA: Se LC \bar{S} al di fuori del range di conc. analizzate,
 il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi
 di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \bar{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto
 di statistica.

PRUEBA: 12

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 19/08/2008

FINALIZACION: 23/08/2008

```
=====
CONCENTRAZIONE  LOG (CONC)      N.TRATTATI      N.MORTI
                                osservati      attesi
40.00           1.6021      20.             8.         6.31
50.00           1.6990      20.             7.         8.82
60.00           1.7782      20.            10.        10.98
70.00           1.8451      20.            12.        12.76
80.00           1.9031      20.            16.        14.19

                Controllo      20.             0.         0.00
=====
```

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) = -1.0671
 Pendenza (b) = 3.4825 es = 1.2279
 Media delle X = 1.7646
 Media delle Y = 5.0780

CHI quadro = 2.4481

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

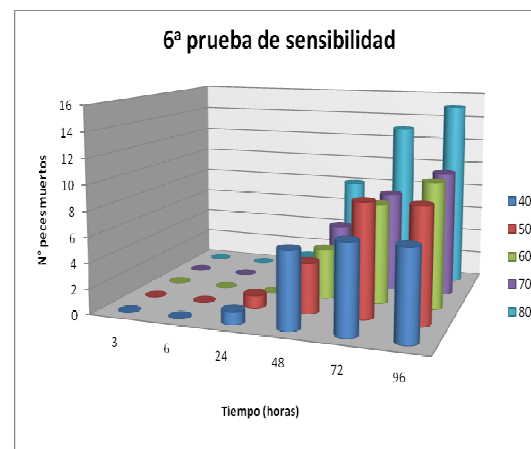
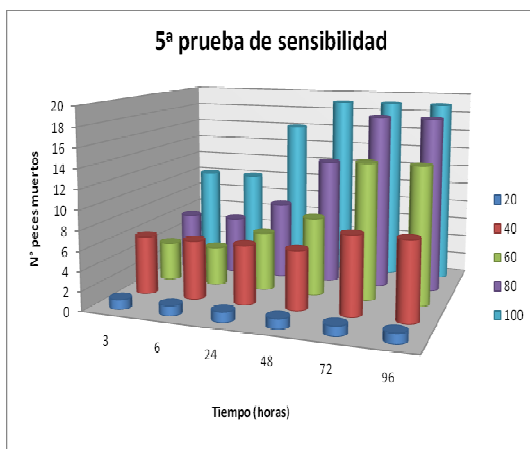
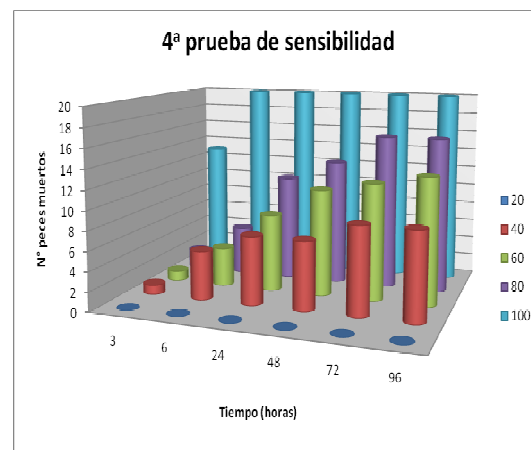
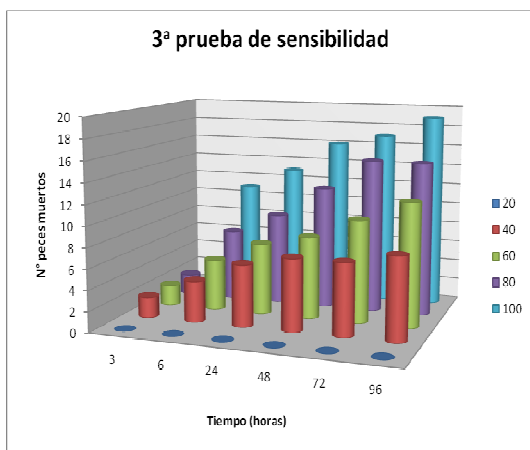
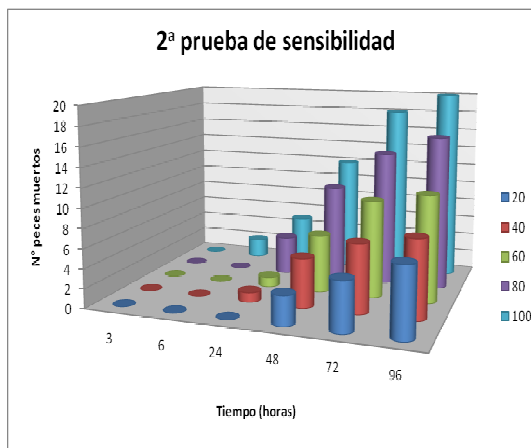
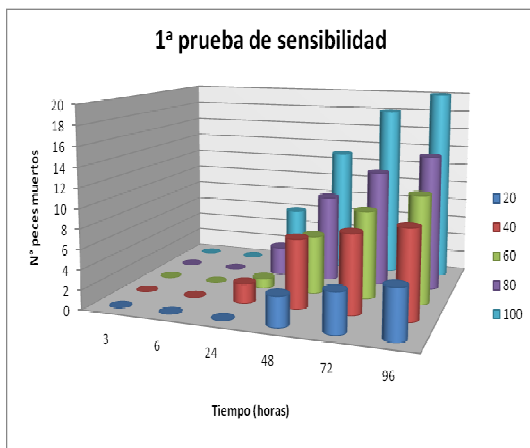
```
=====
```

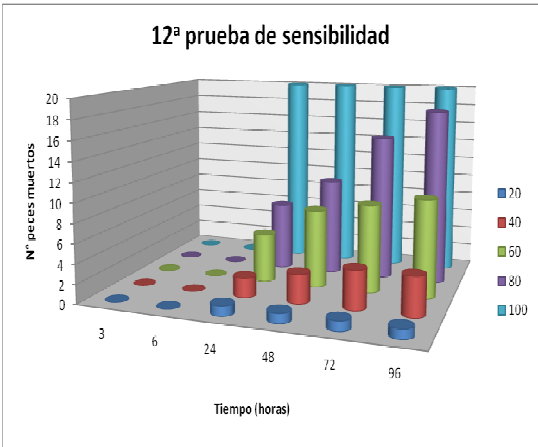
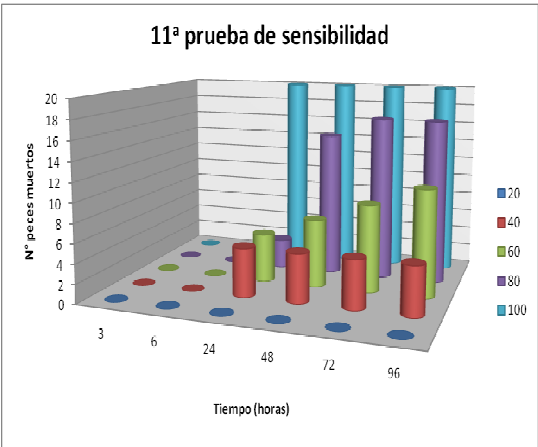
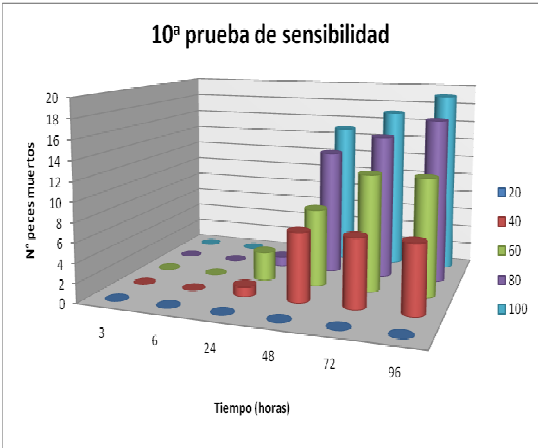
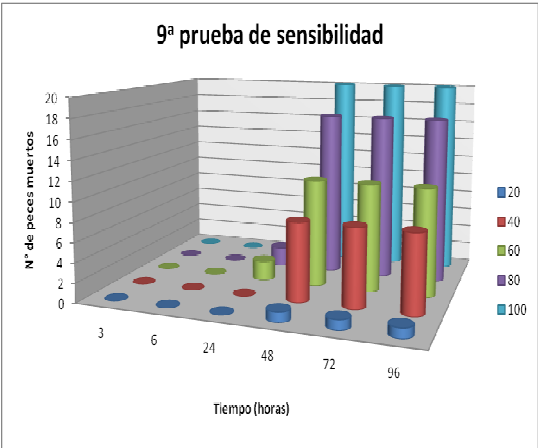
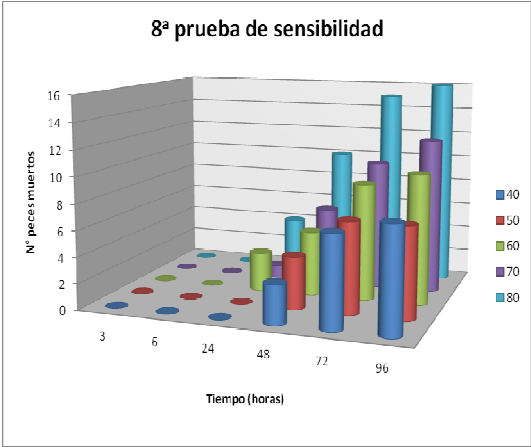
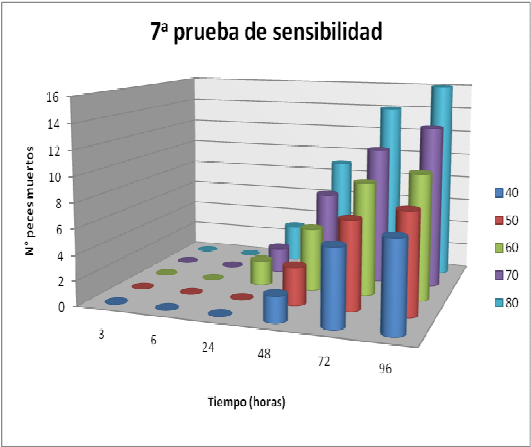
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	11.8622	0.3343	23.0022
LC50	55.2281	41.4307	66.9956

```
=====
```

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate,
il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi
di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto
di statistica.

ANEXO H **GRAFICAS DE LOS REGISTROS DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON** **ALEVINOS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) PARA EL DICROMATO DE** **POTASIO - SENSIBILIDAD**





ANEXO I
REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON ALEVINOS DE
TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) Y ANÁLISIS PROBIT PARA EL GLIFOSATO
AGRICOLA RUNDUP

PRUEBA: 1

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 19/08/2008

FINALIZACION: 23/08/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	15.	2.	1.87
0.01	-2.0000	15.	3.	3.04
0.10	-1.0000	15.	4.	4.56
1.00	0.0000	15.	7.	6.35
10.00	1.0000	15.	8.	8.26
100.00	2.0000	15.	15.	10.09
Controllo		15.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) =	5.0047	
Pendenza (b) =	0.4579	es = 0.0871
Media delle X =	-0.2736	
Media delle Y =	4.8794	
CHI quadro =	3.7694	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti =	6	
Gradi di libert... =	4	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0000	0.0000	0.0002
LC50	0.9768	0.2332	4.9765

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 2

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup**INICIO: 19/08/2008****FINALIZACION: 23/08/2008**

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	2.	2.07
0.01	-2.0000	20.	4.	3.78
0.10	-1.0000	20.	6.	6.16
1.00	0.0000	20.	9.	9.03
10.00	1.0000	20.	12.	12.03
100.00	2.0000	20.	20.	14.76
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) =	5.0462	
Pendenza (b) =	0.5006	es = 0.0780
Media delle X =	-0.2692	
Media delle Y =	4.9114	
CHI quadro =	3.5452	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti =	6	
Gradi di libert... =	4	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0000	0.0000	0.0002
LC50	0.8087	0.2566	2.7715

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 3**SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup**

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	1.	1.19
0.01	-2.0000	20.	3.	2.78
0.10	-1.0000	20.	6.	5.44
1.00	0.0000	20.	8.	8.97
10.00	1.0000	20.	13.	12.72
100.00	2.0000	20.	20.	15.90
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) = 5.0086
 Pendenza (b) = 0.5882 es = 0.0849
 Media delle X = -0.1780
 Media delle Y = 4.9039
 CHI quadro = 2.9422

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti = 6
 Gradi di libert... = 4
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0001	0.0000	0.0009
LC50	0.9670	0.3506	2.8471

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 4

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	1.	0.90
0.01	-2.0000	20.	2.	2.27
0.10	-1.0000	20.	5.	4.72
1.00	0.0000	20.	8.	8.17
10.00	1.0000	20.	12.	12.02
100.00	2.0000	20.	20.	15.43
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) =	4.9127	
Pendenza (b) =	0.6111	es = 0.0873
Media delle X =	-0.0798	
Media delle Y =	4.8639	
CHI quadro =	2.9673	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti =	6	
Gradi di libert... =	4	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0002	0.0000	0.0016
LC50	1.3897	0.5195	4.0570

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 5

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	2.	1.51
0.01	-2.0000	20.	3.	3.07
0.10	-1.0000	20.	5.	5.43
1.00	0.0000	20.	7.	8.46
10.00	1.0000	20.	13.	11.74
100.00	2.0000	20.	20.	14.74
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) = 4.9702
 Pendenza (b) = 0.5407 es = 0.0810
 Media delle X = -0.1834
 Media delle Y = 4.8710
 CHI quadro = 4.4503

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti = 6
 Gradi di libert... = 4
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0001	0.0000	0.0006
LC50	1.1354	0.3877	3.6883

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 6

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/2008

FINALIZACION: 19/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi

0.00	-3.0000	20.	2.	1.94
0.01	-2.0000	20.	5.	3.84
0.10	-1.0000	20.	6.	6.57
1.00	0.0000	20.	9.	9.86
10.00	1.0000	20.	11.	13.17
100.00	2.0000	20.	19.	15.96
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) = 5.0161
 Pendenza (b) = 0.4527 es = 0.0800
 Media delle X = -0.3126
 Media delle Y = 4.8746
 CHI quadro = 4.4191

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti = 6
 Gradi di libert... = 4
 Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
 Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0000	0.0000	0.0001
LC50	0.9215	0.2567	3.9373

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.
 La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
 Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 7

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/200

FINALIZACION: 19/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	2.	1.92

0.01	-2.0000	20.	4.	3.51
0.10	-1.0000	20.	5.	5.75
1.00	0.0000	20.	8.	8.50
10.00	1.0000	20.	12.	11.46
100.00	2.0000	20.	20.	14.22
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) =	4.9896	
Pendenza (b) =	0.5026	es = 0.0783
Media delle X =	-0.2275	
Media delle Y =	4.8753	
CHI quadro =	4.2917	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti =	6	
Gradi di libert... =	4	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0000	0.0000	0.0003
LC50	1.0486	0.3361	3.6792

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate, il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi di un valore stimato per estrapolazione.

La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.

Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto di statistica.

PRUEBA: 8

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/200

FINALIZACION: 19/09/2008

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N. TRATTATI	N. MORTI	
			osservati	attesi
0.00	-3.0000	20.	1.	0.79
0.01	-2.0000	20.	3.	2.49
0.10	-1.0000	20.	6.	5.82
1.00	0.0000	20.	8.	10.40

10.00	1.0000	20.	15.	14.86
100.00	2.0000	20.	19.	17.90
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log(conc) ponderati)

Intercetta (a) =	5.0575	
Pendenza (b) =	0.6100	es = 0.0942
Media delle X =	-0.2508	
Media delle Y =	4.9046	
CHI quadro =	1.9788	

ALTRI PARAMETRI STATISTICI :

Numero di punti =	6	
Gradi di libert... =	4	
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001
Numero di cicli =	1	

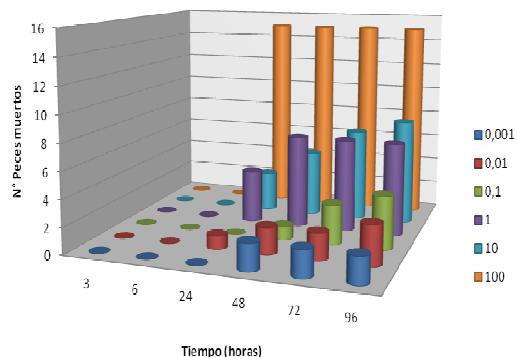
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0001	0.0000	0.0011
LC50	0.8048	0.2872	2.4255

NOTA: Se LC \hat{S} al di fuori del range di conc. analizzate,
il valore deve essere preso con estrema cautela trattandosi
di un valore stimato per estrapolazione.
La stessa avvertenza vale per i limiti di confidenza.
Se \hat{S} necessaria altra assistenza, rivolgersi ad un esperto
di statistica

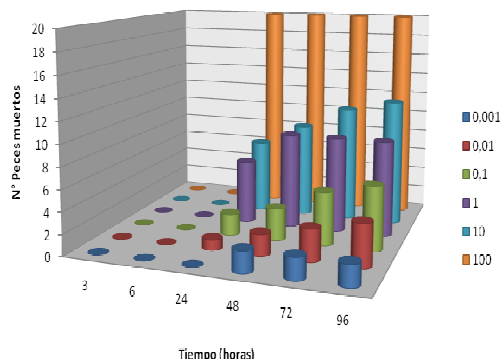
ANEXO J

GRAFICAS DE LOS REGISTROS DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON ALEVINOS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) PARA EL GLIFOSATO ROUNDUP 747

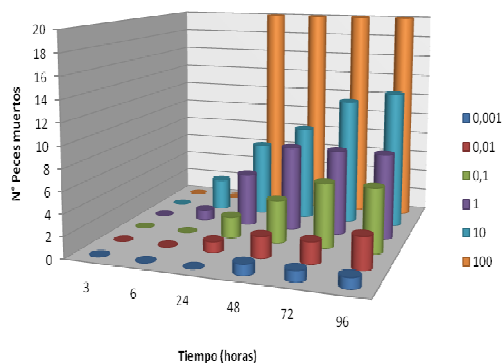
1ª prueba Glifosato Roundup 747



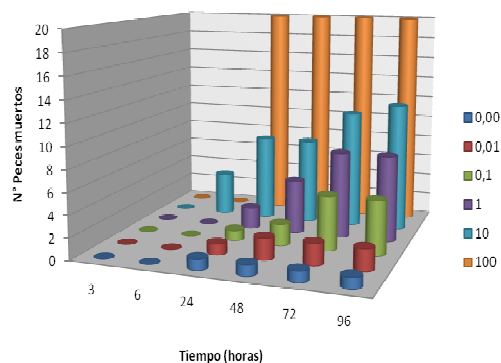
2ª prueba Glifosato Roundup 747



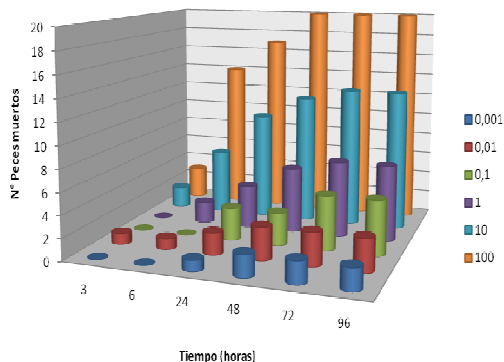
3ª prueba Glifosato Roundup 747



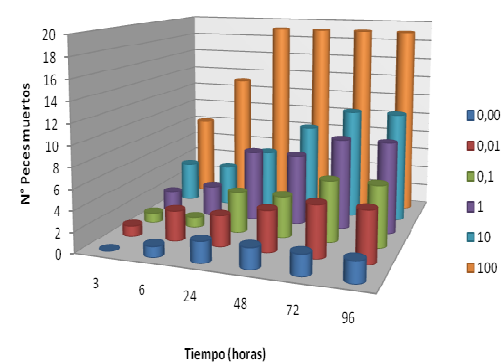
4ª prueba Glifosato Roundup 747

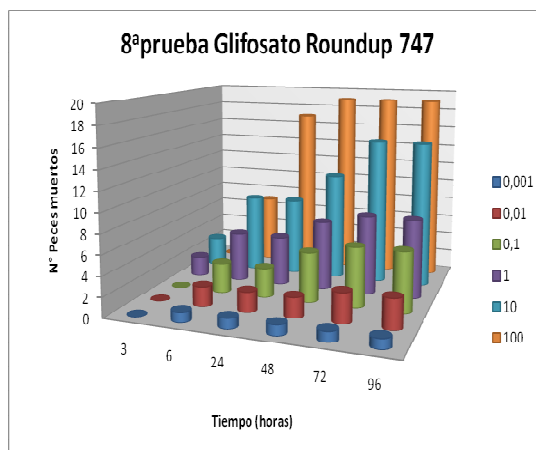
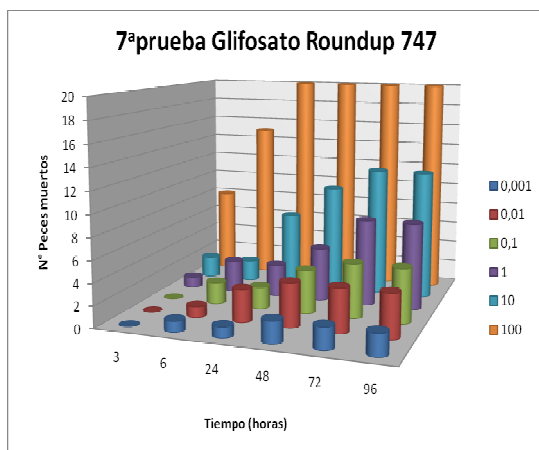


5ª prueba Glifosato Roundup 747



6ª prueba Glifosato Roundup 747





ANEXO K
REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON ALEVINOS DE
TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) Y ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL
DICROMATO DE POTASIO.

PRUEBA: 1

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 27/05/2008

FINALIZACION: 31/05/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	3	4	3	4	14	3,5
60	3	4	4	0	11	2,75
40	2	3	2	2	9	2,25
20	2	1	2	0	5	1,25
Blanco	0	0	1	0	1	0,25
total					60	15

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	56	5	11,2	<u>12,6</u>	2,77
Dentro de Grupos	16	18	0,88888889		
Total	72	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 2

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 27/05/2008

FINALIZACION: 31/05/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	4	5	5	5	19	4,75
80	2	4	4	5	15	3,75
60	4	3	4	1	12	3
40	4	4	0	0	8	2
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					54	13,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	77	5	15,4	<u>10,08</u>	2,77
Dentro de Grupos	27,5	18	1,52777778		
Total	104,5	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 3

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 27/05/20088

FINALIZACION: 31/05/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	3	5	4	16	4
60	3	4	4	2	13	3,25
40	3	2	2	2	9	2,25
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					58	14,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	86,3333333	5	17,2666667	<u>56,5090909</u>	2,77
Dentro de Grupos	5,5	18	0,30555556		
Total	91,8333333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos
H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.
Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 4

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	4	5	19	4,75
80	4	5	5	4	18	4,5
60	3	3	3	5	14	3,5
40	3	1	3	1	8	2
20	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					60	15

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	86,5	5	17,3	<u>32,7789474</u>	2,77
Dentro de Grupos	9,5	18	0,52777778		
Total	96	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos
H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.
Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 5

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	3	5	5	17	4,25
60	4	2	3	2	11	2,75
40	2	3	1	2	8	2
20	0	1	0	0	1	0,25

Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	57	14,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	83,375	5	16,675	<u>36,3818182</u>	2,77
Dentro de Grupos	8,25	18	0,45833333		
Total	91,625	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 6

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 09/06/2008

FINALIZACION: 13/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	4	19	4,75
80	5	4	4	4	17	4,25
60	3	2	4	3	12	3
40	2	3	1	1	7	1,75
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					55	13,75

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	84,70833333	5	16,94166667	<u>48,792</u>	2,77
Dentro de Grupos	6,25	18	0,34722222		
Total	90,95833333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 7

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)**INICIO:** 23/06/2008**FINALIZACION:** 27/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	5	3	5	4	17	4,25
60	3	4	2	2	11	2,75
40	2	1	1	1	5	1,25
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	91,70833333	5	18,34166667	<u>52,824</u>	2,77
Dentro de Grupos	6,25	18	0,347222222		
Total	97,95833333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos**H1:** Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.**Fc > Ft:** Se rechaza la hipótesis nula.**PRUEBA: 8****SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)****INICIO:** 23/06/2008**FINALIZACION:** 27/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	5	4	5	4	18	4,5
60	3	2	2	3	10	2,5
40	2	1	1	0	4	1
20	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico

Entre grupos	93,20833333	5	18,64166667	<u>70,6421053</u>	2,77
Dentro de Grupos	4,75	18	0,263888889		
Total	97,95833333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 9

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 23/06/2008

FINALIZACION: 27/06/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	5	3	4	5	17	4,25
60	3	1	4	3	11	2,75
40	2	0	2	2	6	1,5
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					54	13,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	90	5	18	<u>30,8571429</u>	2,77
Dentro de Grupos	10,5	18	0,583333333		
Total	100,5	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 10

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 04/08/2008

FINALIZACION: 08/08/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		

80	4	2	5	4	15	3,75
70	3	3	3	1	10	2,5
60	3	3	2	2	10	2,5
50	3	2	2	2	9	2,25
40	1	2	2	2	7	1,75
Blanco	0	1	0	0	1	0,25
				total	52	13

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	26,33333333	5	5,26666667	<u>8,61818182</u>	2,77
Dentro de Grupos	11	18	0,61111111		
Total	37,33333333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 11

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 04/08/2008

FINALIZACION: 08/08/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
80	4	4	3	5	16	4
70	2	3	3	5	13	3,25
60	3	3	2	2	10	2,5
50	1	2	3	2	8	2
40	2	3	1	1	7	1,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	54	13,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	38	5	7,6	<u>10,944</u>	2,77
Dentro de Grupos	12,5	18	0,69444444		
Total	50,5	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos
H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.
Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 12

SUSTANCIA DE PRUEBA: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

INICIO: 19/08/2008

FINALIZACION: 23/08/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
80	3	4	4	5	16	4
70	2	3	4	3	12	3
60	1	5	2	2	10	2,5
50	0	3	3	1	7	1,75
40	1	2	3	2	8	2
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	36,2083333	5	7,24166667	<u>5,99310345</u>	2,77
Dentro de Grupos	21,75	18	1,20833333		
Total	57,9583333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos
H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.
Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

ANEXO L

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON ALEVINOS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus Mykiss*) Y ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL GLIFOSATO AGRICOLA ROUNDUP

PRUEBA: 1

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 19/08/2008

FINALIZACION: 23/08/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	0	15	3,75

10	3	1	4	0	8	2
1,0	3	2	2	0	7	1,75
0,1	3	1	0	0	4	1
0,01	1	1	1	0	3	0,75
0,001	0	2	0	0	2	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					39	9,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	36,5	5	7,3	<u>8,76</u>	2.77
Dentro de Grupos	10	12	0,83333333		
Total	46,5	17			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 2

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 19/08/2008

FINALIZACION: 23/08/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
10	3	1	4	4	12	3
1,0	3	2	2	2	9	2,25
0,1	3	1	0	2	6	1,5
0,01	1	1	1	1	4	1
0,001	0	2	0	0	2	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	12,75

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	52,2083333	5	10,4416667	<u>15,99</u>	2.77
Dentro de Grupos	11,75	18	0,65277778		
Total	63,9583333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 3

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
10	3	4	4	2	13	3,25
1,0	3	2	2	1	8	2
0,1	3	1	0	2	6	1,5
0,01	1	1	1	0	3	0,75
0,001	0	1	0	0	1	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	51	12,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	61,125	5	12,225	<u>20,96</u>	2.77
Dentro de Grupos	10,5	18	0,58333333		
Total	71,625	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 4

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
10	2	3	3	4	12	3
1,0	1	2	3	2	8	2
0,1	1	1	1	2	5	1,25
0,01	0	1	1	0	2	0,5
0,001	0	0	1	0	1	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					48	11,75

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	63,25	5	12,65	<u>39,6</u>	2.77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,31944444		
Total	69	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 5

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 02/09/2008

FINALIZACION: 06/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
10	2	3	3	5	13	3,25
1,0	3	2	1	1	7	1,75
0,1	0	2	1	2	5	1,25
0,01	2	0	1	0	3	0,75
0,001	1	1	0	0	2	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					50	12

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	58,83333333	5	11,76666667	<u>16,2923077</u>	2.77

Dentro de Grupos	13	18	0,72222222		
Total	71,8333333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 6

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/2008

FINALIZACION: 19/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	4	5	19	4,75
10	3	2	4	2	11	2,75
1,0	2	2	3	2	9	2,25
0,1	2	1	1	2	6	1,5
0,01	0	3	1	1	5	1,25
0,001	1	1	0	0	2	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	12,5

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	43,33333333	5	8,666666667	15,6	2.77
Dentro de Grupos	10	18	0,555555556		
Total	53,33333333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 7

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/2008

FINALIZACION: 19/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
10	4	2	3	3	12	3
1,0	2	1	3	2	8	2
0,1	1	1	1	2	5	1,25

0,01	0	1	2	1	4	1
0,001	0	0	1	1	2	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	51	12,25

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	53,875	5	10,775	<u>28,7333333</u>	2.77
Dentro de Grupos	6,75	18	0,375		
Total	60,625	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

PRUEBA: 8

SUSTANCIA DE PRUEBA: Glifosato Roundup

INICIO: 15/09/2008

FINALIZACION: 19/09/2008

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	4	5	5	5	19	4,75
10	5	3	4	3	15	3,75
1,0	2	1	3	2	8	2
0,1	1	2	1	2	6	1,5
0,01	0	1	1	1	3	0,75
0,001	0	1	0	0	1	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
				total	52	12,75

ANALISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	61,08333333	5	12,21666667	<u>30,3310345</u>	2.77
Dentro de Grupos	7,25	18	0,402777778		
Total	68,33333333	23			

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones es igual para todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones tienen un efecto diferente sobre los organismos expuestos.

Fc > Ft: Se rechaza la hipótesis nula.

ANEXO M

SUSTANCIAS TÓXICAS (NO COMBUSTIBLES)

PELIGROS POTENCIALES

A LA SALUD

- ✓ Altamente tóxico, puede ser fatal si se inhala, se ingiere o por absorción cutánea.
- ✓ Evitar cualquier contacto con la piel.
- ✓ Los efectos de contacto o inhalación se pueden presentar en forma retardada.
- ✓ El fuego puede producir gases irritantes, corrosivos y/o tóxicos.
- ✓ Las fugas resultantes del control del incendio o la dilución con agua, pueden ser corrosivas y/o tóxicas y causar contaminación.

INCENDIO O EXPLOSION

- ✓ Las sustancias no-combustibles no encienden por sí mismas, pero se pueden descomponer al calentarse y producir vapores corrosivos y/o tóxicos.
- ✓ Los contenedores pueden explotar cuando se calientan.
- ✓ La fuga resultante puede contaminar las vías navegables.

SEGURIDAD PÚBLICA

- ✓ Llamar primero al número de teléfono de respuesta en caso de emergencia en el documento de embarque.
- ✓ Cómo acción inmediata de precaución, aísle en todas direcciones, el área del derrame o escape como mínimo 50 metros (150 pies) para líquidos, y 25 metros (75 pies) para sólidos.
- ✓ Mantener alejado al personal no autorizado.
- ✓ Permanezca en dirección del viento.
- ✓ Manténgase alejado de las áreas bajas.

ROPA PROTECTORA

- ✓ Use el equipo de aire autónomo de presión positiva (SCBA).
- ✓ Use ropa protectora contra los productos químicos, la cual esté específicamente recomendada por el fabricante. esta puede proporcionar poca o ninguna protección térmica.
- ✓ El traje de protección estructural de los bomberos provee protección limitada únicamente en situaciones de incendio; no es efectivo en derrames con posible contacto directo con la sustancia.

EVACUACION

Incendio

- ✓ Si un tanque, carro de ferrocarril o autotank está involucrado en un incendio, AISLE a la redonda a 800 metros (1/2 milla) a la redonda; también, considere la evacuación inicial a la redonda a 800 metros (1/2 milla).

RESPUESTA DE EMERGENCIA

Incendios Pequeños

- ✓ Polvos químicos secos, CO₂ o rocío de agua.

Incendios Grandes

- ✓ Use rocío de agua, niebla o espuma regular.
- ✓ Mueva los contenedores del área de fuego si lo puede hacer sin ningún riesgo.
- ✓ Hacer un dique de contención para el agua que controla el fuego para su desecho posterior; no desparrame el material.
- ✓ Utilice rocío de agua. No usar chorros directos.

Incendio que involucra Tanques o Vagones o Remolques y sus Cargas

- ✓ Combata el incendio desde una distancia máxima o utilice soportes fijos para mangueras o chiflones reguladores.
- ✓ No introducir agua en los contenedores.
- ✓ Enfríe los contenedores con chorros de agua hasta mucho después de que el fuego se haya extinguido.
- ✓ Retírese inmediatamente si sale un sonido creciente de los mecanismos de seguridad de las ventilas, o si el tanque se empieza a decolorar.
- ✓ Siempre manténgase alejado de tanques envueltos en fuego.
- ✓ Para incendio masivo, utilizar los soportes fijos para mangueras o los chiflones reguladores; si esto es imposible, retirarse del área y dejar que arda.

DERRAME O FUGA

- ✓ No tocar los contenedores dañados o el material derramado, a menos que esté usando la ropa protectora adecuada.
- ✓ Detenga la fuga, en caso de poder hacerlo sin riesgo.
- ✓ Prevenga la entrada hacia vías navegables, alcantarillas, sótanos o áreas confinadas.
- ✓ Cubra con una hoja de plástico para prevenir su propagación.
- ✓ Absorber con tierra seca, arena u otro material absorbente no combustible y transferirlo a contenedores.

- ✓ No introducir agua en los contenedores.

PRIMEROS AUXILIOS

- ✓ Mueva a la víctima a donde se respire aire fresco.
- ✓ Llamar a los servicios médicos de emergencia.
- ✓ Aplicar respiración artificial si la víctima no respira.
- ✓ No usar el método de respiración de boca a boca si la víctima ingirió o inhaló la sustancia: proporcione la respiración artificial con la ayuda de una máscara de bolsillo con una válvula de una sola vía u otro dispositivo médico de respiración.
- ✓ Suministrar oxígeno si respira con dificultad.
- ✓ Quitar y aislar la ropa y el calzado contaminados.
- ✓ En caso de contacto con la sustancia, enjuagar inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente por lo menos durante 20 minutos.
- ✓ Para contacto menor con la piel, evite esparcir el material sobre la piel que no esté afectada.
- ✓ Mantener a la víctima en reposo y con temperatura corporal normal.
- ✓ Los efectos de exposición a la substancia por (inhalación, ingestión o contacto con la piel) se pueden presentar en forma retardada.
- ✓ Asegúrese que el personal médico tenga conocimiento de los materiales involucrados, y tomar las precauciones para protegerse a sí mismos.

ANEXO N

DATOS DE SEGURIDAD

Nombre Comercial: **ROUNDUP®**. Herbicida – Granulado Soluble SG.

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO.

Recomendaciones Técnicas: Lea siempre las instrucciones de la etiqueta.

Precauciones a tomar: Evitar la contaminación de alimentos, semillas y fertilizantes. No contaminar los cursos de agua al limpiar los equipos.

Recomendación sobre manipulación segura, específicas: Usar guantes y equipo de ropa protector impermeable. No inhalar. Usar máscara NIOSH/MSHA aprobada para vapores orgánicos.

Condiciones de almacenamiento: Almacenar solo en envases cerrados y debidamente rotulados a temperaturas frescas, lejos de alimentos, agentes reductores y ácidos.

Embalajes recomendados y no adecuados: se recomiendan acero inoxidable, aluminio, fibra de vidrio, plástico y de vidrios. Incompatible estanques de acero galvanizado o sin capa protectora.



Rotulo de envase para el almacenamiento

CONTROL DE EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL.

Medidas para reducir la posibilidad de exposición: Use el equipo de protección completo recomendado.

Protección respiratoria: Se requiere de equipo especial cuando se usa el producto según las recomendaciones de la etiqueta.

Guantes de protección: Evitar el contacto con el producto, si este es prolongado y repetido, usar guantes.

Protección a la vista: Usar antiparras y/o protector facial.

Otros equipos de protección: Usar ropa protectora (mameluco, guantes, protectores de calzado, gorro, etc.) debe estar limpio cada día.

Ventilación: reducir la inhalación de este producto, restringiendo el área de trabajo y manipulación en lugar ventilado e instalando extractores en los lugares donde se manipula el producto.

A continuación se dan a conocer los elementos de protección personal:



Mascara para gases



Guantes de caucho



Overol



Botas de caucho



Cofia impermeable



Gafas de seguridad

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD.

Estabilidad: Estable por lo menos 5 años bajo óptimas condiciones de almacenaje y manipulación.
Condiciones que deben evitarse: Reacciona con el acero galvanizado o sin capa protectora para producir hidrógeno gas altamente inflamable que podría explotar. Puede reaccionar con material cáustico (básico) para liberar calor.

Incompatibilidad (materiales que deben evitarse): Almacenar en envases y aplicar con equipos solo de acero inoxidable, aluminio, fibra de vidrio, plástico y envases con cubierta plástica.

Productos peligrosos de la combustión: Monóxido de carbono (CO), Oxido de nitrógeno (NOx), Oxidos de fósforos (PxOy), amoníaco (NH3).

CONSIDERACIONES SOBRE DISPOSICIÓN FINAL.

Método de eliminación del producto en los residuos: Obsérvese la legislación local. Incineración en establecimientos controlados y autorizados por la autoridad competente para estos efectos.

Eliminación de los envases/ embalajes contaminados: se deben disponer de acuerdo a las normativas vigente en un lugar aprobado por la autoridad competente .

Eliminación de los envases vacíos: Eliminarlos correctamente evitando contaminación ambiental o fuentes de agua. No reutilice nunca recipientes que han contenido ya producto. Siga las disposiciones legales locales, regionales, e internacionales para estos efectos.

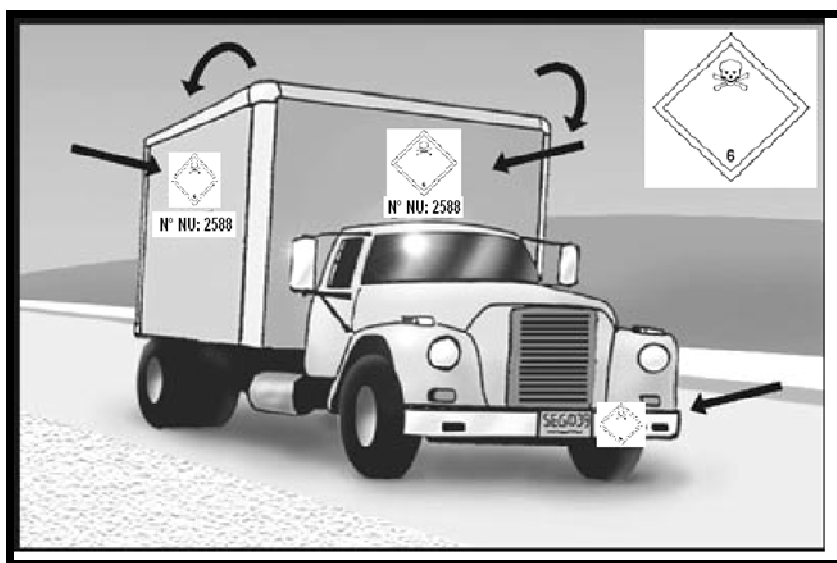
INFORMACIÓN SOBRE TRANSPORTE.

Marcas aplicables: VENENO. Calavera con tibias cruzadas

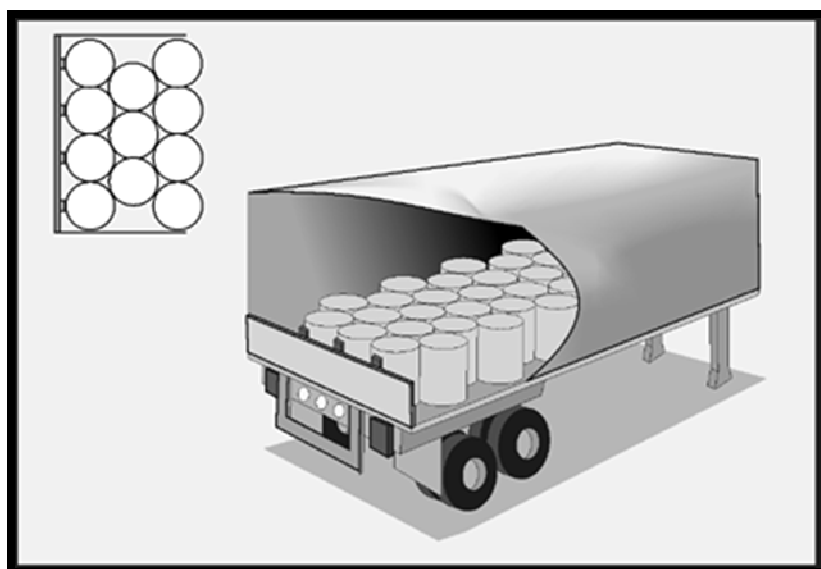
Nº6.1. Colores blanco y negro para etiqueta y rótulo.

Nº NU: 2588

Plaguicida tóxico sólido Guía 151



Requisitos de la unidad de transporte. Unidad de transporte con el rótulo de identificación de la sustancia peligrosa y la placa con el número de las naciones unidas ubicada en todas las



Método para el cargado de canecas

Lineamientos para el envasado de residuos tóxicos.



División 6.1: Sustancias Tóxicas. Son líquidos o sólidos que pueden ocasionar daños graves a la salud o la muerte al ser ingeridos, inhalados o entrar en contacto con la piel. Ej. Cianuros, Sales de metales pesados, plaguicidas.