

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



**RIESGO ECOTOXICOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE
PLAGUICIDAS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE
PAPA EN CHINCHERO - CUSCO**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO
PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

PRESENTADO POR:

Bach. Luz Estéfanny Quispe Cárdenas

ASESORA:

Mgt. Julia Griselda Muñiz Durán

CUSCO - PERU

2017

CONTENIDO

CONTENIDO	I
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE ANEXOS	VIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
CAPITULO I: GENERALIDADES	8
1. ANTECEDENTES	8
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1. LA PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>)	11
2.2. PLAGUICIDAS	11
2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS	12
2.2.2. TECNICAS ANALITICAS PARA LA DETECCION DE PLAGUICIDAS	15
2.3. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLAGUICIDAS	16
2.3.1. Plaguicidas en la litosfera (suelo)	16
2.3.2. Plaguicidas en la Hidrosfera	16
2.3.3. Plaguicidas en la atmosfera	17
2.4. EVALUACION ECOTOXICOLÓGICA Y GENOTÓXICA DE SUELOS CONTAMINADOS POR PLAGUICIDAS	18
2.4.1. ECOTOXICOLOGÍA	18
2.4.2. GENOTOXICOLOGÍA	19
2.4.3. <i>BIOENSAYOS DE TOXICIDAD</i>	20
2.4.4. EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO (ERE)	25
2.5. LEGISLACIÓN AMBIENTAL EN EL PERÚ	28
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. AREA DE ESTUDIO	30
1.1. UBICACIÓN	30
1.2. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS	30
1.3. CLIMATOLOGÍA	31
1.4. FLORA	31
1.5. FAUNA	32
2. MATERIALES	34
2.1. MATERIALES DE CAMPO	34

2.2.	MATERIALES DE GABINETE	34
2.2.1.	Material biológico y muestra problema	34
2.2.2.	Material de laboratorio	34
3.	METODOLOGÍA	36
3.1.	DISEÑO METODOLÓGICO	36
3.2.	VARIABLES	37
3.3.	ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO	38
3.4.	TIPO DE MUESTREO	40
3.5.	ETAPA I: Análisis fisicoquímicos y cuantificación de plaguicidas en suelos	41
3.5.1.	Análisis fisicoquímicos adicionales:	41
3.5.2.	Cuantificación de plaguicidas residuales en muestras de suelo	41
3.6.	ETAPA II: Estimación de la toxicidad de las muestras de suelo	42
3.6.1.	Prueba de toxicidad directa con <i>Eisenia sp.</i>	42
3.6.2.	Prueba de Toxicidad directa con <i>Vicia faba</i>	46
3.6.3.	Estimación de genotoxicidad de muestras de suelo mediante el Test de Micronúcleos (MN) en <i>Vicia faba.</i>	48
3.6.4.	Análisis de datos	50
3.7.	ETAPA III: Selección de plaguicida, realización de pruebas de toxicidad, y colección de datos ecotoxicológicos y genotóxicos	51
3.7.1.	Selección de plaguicida:	51
3.7.2.	Determinación de concentraciones de Metamidofos para la prueba de toxicidad	51
3.7.3.	Estimación de la ecotoxicidad y genotoxicidad del Metamidofos	52
3.7.4.	Compilación bibliográfica de datos de importancia ecotoxicológica y genotóxica de otros plaguicidas detectados en las muestras de suelo.	57
3.8.	ETAPA IV: Estimación del Riesgo Ecotoxicológico y Genotóxico	58
3.8.1.	Definición del problema	58
3.8.2.	Evaluación de la toxicidad	59
3.8.3.	Evaluación de la exposición	59
3.8.4.	Caracterización del riesgo	60
	CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	61
1.	ETAPA I: ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS Y CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS	61
1.1.	CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO	61
1.2.	CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS RESIDUALES EN MUESTRAS DE SUELO	63
2.	ETAPA II: ESTIMACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE SUELO	74
2.1.	PRUEBA DE TOXICIDAD DIRECTA CON <i>Eisenia sp.</i>	74
2.1.1.	Evaluación del efecto letal	74
2.1.2.	Evaluación del efecto subletal	75
2.2.	PRUEBA DE TOXICIDAD DIRECTA CON <i>Vicia faba</i>	79
2.2.1.	Evaluación del efecto letal: Inhibición en la germinación (IG)	79
2.2.2.	Evaluación del efecto subletal: Biomarcador de Actividad Biológica - Inhibición en el crecimiento radicular (ICR)	81
2.3.	TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) EN <i>Vicia faba</i> : Estimación de la genotoxicidad	83
2.4.	ANÁLISIS INTEGRADO DE ENSAYOS DE TOXICIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS	84

3. ETAPA III. Estimación de la toxicidad bajo condiciones de Laboratorio del plaguicida seleccionado: Metamidofos	87
3.1. PRUEBA DE TOXICIDAD EN <i>Eisenia sp.</i>	87
3.1.1. Evaluación del efecto letal	87
3.1.2. Evaluación del efecto subletal	91
3.2. PRUEBA DE TOXICIDAD EN <i>Vicia faba</i>	97
3.2.1. Evaluación del efecto letal: Porcentaje de inhibición en la germinación (%IG)	97
3.2.2. Evaluación del efecto subletal en <i>Vicia faba</i> : Biomarcador de Actividad Biológica - Porcentaje de Inhibición en el crecimiento radicular (%ICR)	100
3.3. ESTIMACIÓN DE GENOTÓXICIDAD DE PLAGUICIDA METAMIDOFOS MEDIANTE EL TEST DE MICRÓNÚCLEOS (MN) EN <i>Vicia faba</i> .	104
3.4. COMPILACIÓN DE DATOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA MALATION, PARATION Y ENDOSULFAN POR REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	108
3.5. ANÁLISIS INTEGRADO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD	108
3.6. ANÁLISIS INTEGRADO DE DOSIS APLICADA EN CAMPO, RESIDUALES EN SUELOS AGRÍCOLAS DE CHINCHERO Y CONSECUENCIAS EN EL AMBIENTE	109
4. ETAPA IV. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE PLAGUICIDAS USADOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN CHINCHERO	110
4.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	110
4.2. EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO	111
4.2.1. Evaluación de la toxicidad	111
4.2.2. Evaluación de la exposición	113
4.2.3. Caracterización del riesgo ecotoxicológico	116
4.2.4. Caracterización del riesgo genotóxico	118
CONCLUSIONES	122
RECOMENDACIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXOS	131

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.....	13
Tabla 2. Biomarcadores medidos a diferentes niveles biológicos.....	21
Tabla 3. Ubicación de puntos de muestreo en el distrito de Chinchero	38
Tabla 4. Distribución de muestras para los análisis/bioensayos respectivos	40
Tabla 5. Características fisicoquímicas de suelos agrícolas procedenteee de Chinchero.....	61
Tabla 6. Determinación de plaguicidas residuales en muestras de suelo de Chinchero.....	64
Tabla 7. Tabla de Característica de los plaguicidas cuantificados en las muestras de suelo del distrito de Chinchero	69
Tabla 8. Efecto de las muestras de suelo en la mortalidad de <i>Eisenia sp.</i>	75
Tabla 9. Efecto de las muestras de suelo en la variación de peso en gr. de <i>Eisenia sp.</i>	76
Tabla 10. Prueba de ANOVA-Influencia de las muestras de suelo en la variación del peso en <i>Eisenia sp.</i>	76
Tabla 11. Resumen de la prueba Duncan para variación en el peso en <i>Eisenia sp.</i> ...	77
Tabla 12. Biomarcador de comportamiento: Evasión de <i>Eisenia sp.</i> en las muestras de suelo del distrito de Chinchero.	77
Tabla 13. Prueba de ANOVA - Influencia de las muestras de suelo en la evasión mostrada por <i>Eisenia sp.</i>	78
Tabla 14. Resumen de la prueba de Duncan para el porcentaje de evasión en <i>Eisenia sp.</i>	79
Tabla 15. Efecto de las muestras de suelo en la IG en <i>Vicia faba</i>	80
Tabla 16. Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento radicular (%ICR) de <i>Vicia faba</i> expuestos a muestras de suelo de Chinchero.	81
Tabla 17. Prueba de ANOVA - Influencia de las muestras de suelo en la Inhibición del Crecimiento Radicular (%ICR) en <i>Vicia faba</i>	82
Tabla 18. Resumen de la prueba de Duncan para el % ICR en <i>Vicia faba</i>	82
Tabla 19. Frecuencia de MN observados en ápice radicular de <i>Vicia faba</i>	83
Tabla 20. Análisis de ANOVA para el efecto de metamidofos en la mortalidad de <i>Eisenia sp.</i>	88
Tabla 21. CL50 de metamidofos para <i>Eisenia sp.</i> mediante PROBIT	89
Tabla 22. Resumen de prueba de Dunnet para la mortalidad en <i>Eisenia sp.</i>	90
Tabla 23. Análisis de ANOVA para la variación en el peso de <i>Eisenia sp.</i> sometida a diferentes concentraciones del plaguicida metamidofos.....	92
Tabla 24. Resumen de la prueba de Dunnet para la variación de peso en <i>Eisenia sp.</i>	93
Tabla 25. Análisis de ANOVA para Evasión en <i>Eisenia sp.</i> expuesta a metamidofos .	95
Tabla 26. Resumen de la prueba de Dunnet para la respuesta de Evasión en <i>Eisenia sp.</i> expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos	96
Tabla 27. Análisis de ANOVA para el efecto de metamidofos inhibición de la germinación en <i>Vicia faba.</i>	98
Tabla 28. Estimación de la concentración inhibitoria media (CL50) de metamidofos para <i>Vicia faba</i> mediante PROBIT.....	98

Tabla 29. Resumen de la prueba de Dunnet para el %IG en Vicia faba a efecto del Metamidofos.....	99
Tabla 30. Prueba de ANOVA para el %ICR de Vicia faba como consecuencia de su exposición a metamidofos.....	101
Tabla 31. Resumen de prueba de Dunnet para la inhibición en el crecimiento radicular (%ICR) de Vicia faba.....	103
Tabla 32. Efecto genotóxico del metamidofos en Vicia faba mediante el Test de Micronúcleos (MN).	104
Tabla 33. ANOVA para la generación de MN en Vicia faba expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos.....	106
Tabla 34. Resumen de la prueba de Dunnet para la generación de MN en Vicia faba expuesta a metamidofos.....	107
Tabla 35. Resumen de Concentraciones de referencia para Eisenia sp. y Vicia faba.....	111
Tabla 36. Valores de referencia relevantes en ecotoxicología a partir de revisión bibliográfica.....	112
Tabla 37. Concentración ambiental de plaguicidas en muestras de suelo evaluadas.....	113
Tabla 38. Resumen de las vías potenciales de exposición para los distintos medios de contacto.....	114
Tabla 39. Clasificación del riesgo ambiental según el CR.....	116
Tabla 40. Tabla resumen de los CR para el suelo agrícola del distrito de Chinchero.....	120
Tabla 41. Profundidad del muestreo según el uso del suelo.....	132
Tabla 42. Profundidad del muestreo según el uso del suelo.....	134
Tabla 43. Efecto de las muestras de suelo en la pérdida (variación) de peso de Eisenia sp.	135
Tabla 44. Bioensayo en Vicia faba – Germinación y crecimiento radicular registrados en muestras de suelo (mm).....	137
Tabla 45. Efecto del metamidofos en la muerte y Pérdida de Peso en Eisenia sp. ...	141
Tabla 46. Ensayo de Evasión en Eisenia sp. expuestas a diferentes concentraciones de metamidofos.....	142
Tabla 47. Bioensayo en Vicia faba – Germinación de semillas expuestas a diferentes concentraciones de metamidofos.....	144
Tabla 48. Bioensayo en Vicia faba – Crecimiento radicular (mm) en diferentes concentraciones de metamidofos – I Parte.....	145
Tabla 49. Bioensayo en Vicia faba – Crecimiento radicular (mm) en diferentes concentraciones de metamidofos - II parte.....	146
Tabla 50. Ensayo de Micronúcleos en Vicia faba.....	149

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destino posible de los plaguicidas en el ambiente luego de su aplicación. Adaptado de Hang et. al., 2010. (Poletta, 2011). _____	17
Figura 2. Formación de MN debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos. (Zalacain et. al., 2005). _____	20
Figura 3. Determinación gráfica de NOEC y LOEC. _____	22
Figura 4. Esquema simplificado del ciclo de análisis de riesgo (Tarazona, 2007)____	25
Figura 5. Niveles de evaluación de riesgo. _____	28
Figura 6. Mapa de ubicación del área de estudio _____	33
Figura 7. Flujograma de Estrategia Experimental. _____	36
Figura 8. Mapa de ubicación Geográfica de los puntos de muestreo _____	39
Figura 9. Esquema de Prueba de Toxicidad con <i>Eisenia sp.</i> para muestras de suelo _____	42
Figura 10. Esquema de Prueba de Evasión con <i>Eisenia sp.</i> para muestras de suelo	43
Figura 11. Flujograma de prueba de toxicidad directa en <i>Eisenia sp.</i> en muestras de suelo _____	43
Figura 12. Esquema de la Prueba de toxicidad directa en <i>Vicia faba</i> para muestra _	46
Figura 13. Flujograma de la prueba de toxicidad directa en <i>Vicia faba</i> en muestras de suelo _____	47
Figura 14. Flujograma del Test de Micronúcleos en <i>Vicia faba</i> _____	49
Figura 15. Esquema de la Prueba de toxicidad de metamidofos en <i>Vicia faba</i> _____	54
Figura 16. Pasos básicos para la evaluación de riesgos a la Salud y el ambiente. _	58
Figura 17. Evaluación de la contaminación por plaguicidas OF en suelos y estándares ambientales de plaguicidas en suelos _____	70
Figura 18. Evaluación de la contaminación por plaguicidas OC y estándares ambientales de plaguicidas en suelos _____	72
Figura 19. Efecto de las muestras de suelo en la variación de peso en <i>Esenia sp.</i> _	76
Figura 20. Evasión de <i>Eisenia sp.</i> en las muestras de suelo del distrito de Chinchero _____	77
Figura 21. Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento radicular de <i>Vicia faba</i> expuestos a residuales de plaguicidas. _____	81
Figura 22. Frecuencia de MN observados en el ápice radicular de <i>Vicia faba</i> _____	83
Figura 23. Resumen de las pruebas de toxicidad y genotoxicidad en <i>Eisenia sp.</i> y <i>Vicia faba</i> _____	84

Figura 24. Porcentaje de Mortalidad en <i>Eisenia sp.</i> en diferentes concentraciones de Metamidofos _____	88
Figura 25. Efecto subletal del metamidofos en la pérdida de peso en individuos de <i>Eisenia sp.</i> _____	91
Figura 26. Efecto subletal de evasión en <i>Eisenia sp.</i> expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos _____	94
Figura 27. Inhibición en la germinación (IG) en <i>Vicia faba</i> expuestos a diferentes concentraciones de metamidofos _____	97
Figura 28. Inhibición en el crecimiento radicular de <i>Vicia faba</i> (%ICR) a efecto de las diferentes concentraciones de metamidofos. _____	101
Figura 29. Efecto genotóxico del metamidofos en <i>Vicia faba</i> , expresado en la formación de MN. _____	105
Figura 30. Comportamiento de la generación de MN en <i>Vicia faba</i> en el tratamiento B. _____	106
Figura 31. Tomada y adaptada de la Guía para la gestión y evaluación de riesgos de Colombia, 2007 _____	114
Figura 32. Tomado de la Guía ERSA, 2015. Muestra el esquema genérico _____	115
Figura 33. Diagrama Textural de la USDA _____	134
Figura 34. Bioensayo con <i>Eisenia sp.</i> con muestras de suelo _____	136
Figura 35. Bioensayo en <i>Vicia faba</i> en muestras de suelo _____	138
Figura 36. Crecimiento Radicular en <i>Vicia faba</i> expuesta a suelos agrícolas procedentes de Chinchero _____	139
Figura 37. Ensayo de Micronúcleos en <i>Vicia faba</i> _____	140
Figura 38. Bioensayo en <i>Eisenia sp.</i> y Ensayo de Evasión _____	143
Figura 39. Bioensayo en <i>Vicia faba</i> expuestos a metamidofos _____	147
Figura 40. Crecimiento Radicular en <i>Vicia faba</i> expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos _____	148
Figura 41. Bioensayo en <i>Vicia faba</i> - Metamidofos _____	150
Figura 42. Muestra compuesta y quarteo para la obtención de muestra final _____	151
Figura 43. Preparación de muestras para análisis de plaguicidas - Envío _____	151
Figura 44. Preparación de muestras para análisis fisicoquímico _____	151
Figura 45. Colección de muestras de suelos agrícola en Chinchero y entrevistas con pobladores _____	152

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de plaguicidas en muestras de suelo procedentes de Chinchero.	131
Anexo 2. Análisis de la Humedad de muestras de suelo procedentes de Chinchero	132
Anexo 3. Análisis Físicoquímico de muestras de suelo procedentes de Chinchero.	133
Anexo 4. Diagrama textural de la USDA y profundidad de muestreo	134
Anexo 5. Bioensayo con <i>Eisenia sp.</i> en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero	135
Anexo 6. Bioensayo con <i>Vicia faba</i> en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero	137
Anexo 7. Ensayo de Micronúcleos en radícula de <i>Vicia faba</i> expuestos a los suelos agrícolas de Chinchero	140
Anexo 8. Bioensayo con <i>Eisenia sp.</i> en diferentes concentraciones de metamidofos (ppm).	141
Anexo 9. Bioensayo con <i>Vicia faba</i> en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero	144
Anexo 10. Ensayo de Micronúcleos en radícula de <i>Vicia faba</i> expuestos a diferentes concentraciones de metamidofos	149
Anexo 11. Fotografías adicionales	151

RESUMEN

El objetivo fue estimar el riesgo ecotoxicológico y genotóxico como resultado de la aplicación de plaguicidas en el cultivo de papa en 3 comunidades del distrito de Chinchero, 2015. La investigación se organizó en 4 etapas: En la etapa I, se realizaron análisis cromatográficos (HPLC y GC) con las muestras de suelo colectadas para determinar las concentraciones de plaguicidas (PEC real), así como la PEC teórica para metamidofos (dosis aplicada en campo). En la etapa II, se evaluó la ecotoxicidad de las muestras de suelo mediante bioensayos en *Vicia faba* (%IG, %ICR) y *Eisenia sp.* (% de mortalidad, %pérdida de peso, % Evasión), y la genotoxicidad mediante el Test de MN en *Vicia faba*. En la etapa III, se establecieron valores PNEC de manera experimental para metamidofos mediante ensayos de ecotoxicidad en *Vicia faba* y *Eisenia sp.* y de genotoxicidad mediante el Test de MN en *Vicia faba* (NOEC y NOAEL); y teóricamente para Malation, Paration y Endosulfan. El Riesgo se estimó en la etapa IV por el CR.

Se identificaron 7 plaguicidas de los 11 evaluados en las diferentes muestras de suelo, entre ellos metamidofos, malation, paration y endosulfan. Las muestras procedentes de Huatata y San José resultaron ser las más ecotóxicas, generando una reducción del peso del 15.85% en *Eisenia sp.* y favorecer una evasión en un 70% y 60% respectivamente; así como producir un 9.06% y 36.26% de ICR en *Vicia faba*. La muestra de Q´uerapata fue la más genotóxica con un 5% de expresión de MN en *Vicia faba*. El efecto del metamidofos en la capacidad germinativa y el crecimiento radicular de las semillas de *Vicia faba*, así como en la mortalidad, reducción del peso y evasión en *Eisenia sp.* fue directamente proporcional a la concentración. Registrándose en *Eisenia sp.* a concentraciones > 625 ppm un 100% de mortalidad y < 5 ppm un 0%. A 5000 ppm, se produce una IG del 70% y una ICR de 84.63% en *Vicia faba*. La mínima concentración en inducir MN en *Vicia faba* fue 39.06 ppm, evidenciándose además que a > tiempo de exposición y a > concentración, el daño genotóxico incrementaba.

Los OF metamidofos, malation y paration representan un riesgo ecotoxicológico moderado para el ambiente y para especies de flora y fauna asociadas (incluyendo al hombre) a 2 meses de la cosecha de papa (CR > 1). Estos mismos no representan un riesgo genotóxico para el ambiente (CR<1). Sin embargo, el metamidofos representa un riesgo ecotoxicológico y genotóxico elevado (CR>10) al momento de su aplicación, afectando otras especies no resistentes. Finalmente, la concentración residual del OC endosulfan en los suelos agrícolas representa un riesgo ecotoxicológico y genotóxico bajo para el ecosistema del lugar.

INTRODUCCIÓN

El plaguicida, según la FAO (2008), es la sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir o controlar plagas (especies de animales, vegetales y otros organismos no deseados). Los plaguicidas organoclorados cuyo uso en su mayoría está prohibido en el Perú, son considerados por Pauta (2014) como altamente tóxicos por ser persistentes, bioacumulables y biomagnificables en la cadena trófica. Los organofosforados y carbamatos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa afectando al sistema nervioso central, algunos son teratogénicos y mutagénicos (Martínez y Gómez, 2007), y muchos son de uso restringido en el país.

Los plaguicidas pueden ser rociados encima de las hojas de las plantas o aplicados directamente en el suelo, tendiendo a acumularse entre las partículas del mismo, situación que se agrava cuando la aplicación del plaguicida es inadecuada, pudiendo además ser trasladados por escorrentías superficiales o percolación a causa de la lluvia hasta cuerpos de agua cercanos (Hoffman *et al.*, 2003; Sutter, 1993) donde se estarían acumulando, contaminando los recursos agua y suelo, afectando así la biota asociada a ellos. Idealmente los plaguicidas deberían afectar sólo al organismo blanco, pero este objetivo es raramente alcanzado debido a las similitudes en los procesos básicos de la vida del organismo blanco y de los organismos no-blanco (Veleminsky y Gichner, 1992).

Por estas razones (contaminación ambiental y efectos adversos sobre la biota expuesta), es que se comienzan a realizar estudios ecotoxicológicos y genotóxicos para determinar la naturaleza y magnitud del daño por la presencia de estos compuestos en el ambiente, para ello los bioensayos o pruebas de toxicidad son ampliamente utilizados. El riesgo ecológico según Sutter (1993) es determinar la probabilidad de los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales en los organismos vivos de un ecosistema incluyendo el hombre como parte del mismo. La evaluación de riesgo ecológico se desarrolla en el marco de la ecotoxicología, disciplina que desarrolla todos los pasos implicados en la evaluación del riesgo ecológico y utiliza métodos toxicológicos, químicos y ecológicos, (Medina y Encina, 2003).

En el distrito de Chinchero ubicado en la provincia de Urubamba, se viene incrementando el uso de plaguicidas en el cultivo de papa con la finalidad de obtener mayor rendimiento por área cultivada, combatiendo así a las diversas plagas que pueden diezmar ese cultivo; por esta razón, en la presente investigación se plantea determinar el riesgo ecotoxicológico y genotóxico que representan los plaguicidas utilizados en el cultivo de papa en el distrito de Chinchero, Cusco.

PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El incremento de la población nacional está generando una presión alimentaria creciente, requiriendo un mayor rendimiento y continuidad en la producción de papa (principal elemento de la dieta en el Perú). En el distrito de Chinchero, reconocido por su alta producción de papa (MVCS, 2006), dicho objetivo se viene logrando con el uso masivo de plaguicidas que ayudan a combatir sus plagas. Es conocido que los plaguicidas son compuestos ecotóxicos y genotóxicos a determinados niveles, y que si no son aplicados de manera adecuada podrían generar problemas de contaminación ambiental, así como provocar daño en diferentes magnitudes a organismos no destinatarios a corto y a largo plazo, además de bioacumularse y biomagnificarse. A pesar de ello, su liberación al ambiente se produce de manera deliberada.

Investigaciones sobre la estimación del riesgo ecotoxicológico y genotóxico de plaguicidas presentes en matrices ambientales se han realizado ampliamente en diversos países a causa del incremento en la conciencia de la protección ambiental, teniendo a Europa y Estados Unidos en la delantera desde décadas atrás. Además, estudios ecotoxicológicos y estimación del riesgo ecológico teórico (con escenarios hipotéticos de concentración ambiental y exposición) se han realizado en países como México y vecinos como Argentina, Chile y Bolivia; y, aunque en el Perú se viene trabajando con plaguicidas desde hace aproximadamente 10 años con la determinación del “riesgo ambiental y/o ecológico del peor caso teórico” para diversos plaguicidas, aún no se han realizado evaluaciones ecotoxicológicas y genotóxicas con muestras ambientales expuestas a los mismos, que reflejan de mejor manera lo que acontece en campo, ni se ha estimado el “Riesgo Ecológico (ecotoxicológico y genotóxico) del peor caso real” que la presencia de estos compuestos en el ambiente representan en los ecosistemas.

Con la presente investigación, se busca llenar esos vacíos de información que a pesar de ser información básica, resulta ser relevante para la gestión ambiental, la misma que permitirá determinar los plaguicidas presentes en suelos agrícolas de tres comunidades del distrito de Chinchero mediante HPLC y GC, y la caracterización ecotoxicológica y genotóxica de los mismos. Se determinó además el riesgo ecológico (ecotoxicológico y genotóxico) que los plaguicidas metamidofos, malation, paration y endosulfan presentes en dichas muestras representan para el ecosistema del lugar.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la presente investigación, se busca responder a las preguntas: ¿El uso de plaguicidas en el cultivo de papa en Chinchero está generando residuales que sobrepasan Estándares Ambientales en el recurso suelo? ¿Es posible evaluar los efectos ecotóxicos y genotóxicos de las muestras de suelo procedente de tres comunidades del distrito de Chinchero mediante bioensayos en *Eisenia sp.* y *Vicia faba*? ¿Cuál es el efecto tóxico del plaguicida metamidofos evaluado mediante bioensayos en *Eisenia sp.* y *Vicia faba*? Y finalmente, ¿Qué riesgo ecotoxicológico y genotóxico implica el uso de estos plaguicidas para el ambiente y el ser humano, en el distrito de Chinchero?

JUSTIFICACIÓN

Los agricultores de Chinchero emplean plaguicidas para llevar una mayor producción de papa sin daño al mercado local y regional (Muñiz, 2012). Por el desconocimiento del ciclo de las plagas y de las propiedades de los plaguicidas como productos químicos, los pobladores desde años atrás comenzaron a dar un uso intenso a los mismos, aplicándolos con mayor frecuencia y en mayor dosis. Por otro lado, es conocido que gran parte de los mismos se quedan en el ambiente, lo que estaría ocasionando en las zonas agrícolas de Chinchero no solo la pérdida de calidad de sus recursos suelo, agua y aire, sino también un desequilibrio ecológico por los daños ocasionados a la biota expuesta, que es necesario conocer.

Normalmente las evaluaciones de calidad ambiental sólo suelen incluir la detección de niveles permisibles en el ambiente, estos no evalúan los efectos que aún las bajas concentraciones de estos plaguicidas pueden tener sobre organismos no blanco por períodos cortos y prolongados; para este fin, los ensayos toxicológicos con organismos de prueba son ampliamente usados, los mismos que son métodos sencillos, prácticos, sensibles y repetibles (Castillo, 2004). La estimación del Riesgo ecotoxicológico y genotóxico que la liberación de estos plaguicidas al ambiente representa para el ecosistema en el distrito de Chinchero necesita de dichas evaluaciones toxicológicas, además del análisis fisicoquímico tradicional.

Considerando que la actividad agrícola es la actividad económica más importante en el distrito de Chinchero (MVCS, 2006), y que conservar el recurso suelo es prioritario en el lugar para darle sostenibilidad y calidad a dicha actividad, con la información generada se busca dar respuesta a la ausencia de conocimientos y estudios sobre la contaminación del recurso suelo del distrito de Chinchero por el vertimiento de plaguicidas, y las consecuencias que estos vertimientos generan sobre los organismos vivos y salud del hombre cuando entran en contacto con este recurso. Además se fomentará la investigación básica que mejora la Gestión Ambiental en el país, con especial énfasis en la estimación del Riesgo Ambiental y Ecológico que la norma peruana incorporó en el año 2015 en áreas donde se produce contaminación del recurso suelo, considerado como un recurso fundamental por la misma.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el riesgo ecotoxicológico y genotóxico de plaguicidas utilizados en el cultivo de papa en el distrito de Chinchero (Cusco).

Objetivos específicos

1. Identificar y determinar la concentración de residuos de plaguicidas en suelos de las comunidades en estudio.
2. Estimar la ecotoxicidad y genotoxicidad de las muestras de suelo contaminadas por plaguicidas procedentes de la zona de estudio mediante bioensayos en *Eisenia sp.* y *Vicia faba*.
3. Estimar la ecotoxicidad y genotoxicidad del plaguicida metamidofos, mediante bioensayos en *Eisenia sp.* y *Vicia faba*.
4. Estimar el riesgo ecotoxicológico y genotóxico que representa el uso de metamidofos, malation, paration y endosulfan en el suelo de las comunidades en estudio.

HIPÓTESIS

Los plaguicidas residuales en suelos del cultivo de papa en el distrito de Chinchero (Cusco), constituyen un riesgo ecotoxicológico y genotóxico.

CAPITULO I: GENERALIDADES

1. ANTECEDENTES

Tecuapetla M.G. (2014) (México); estimó el riesgo ecotoxicológico por la aplicación de agroquímicos en el cultivo de *Gerbera* en invernadero mediante el coeficiente de Impacto Ambiental (CIA), para suelo y agua. Se tomó muestras de suelo dentro y fuera de 3 invernaderos, y de agua de riego en cada uno; el efecto tóxico fue determinado con bioensayos en *Eisenia foetida* y *Lactuca sativa* para suelo, y *Daphnia pulex* y *Selenastrum capricornutum* para agua. Encontró que el agua y suelo (dentro y fuera de los invernaderos) resultaron tóxicos para los organismos de prueba, y que el invernadero con mayor valor de riesgo ecotoxicológico no era en el que se aplicaba mayor cantidad de plaguicidas, pero si el que empleaba plaguicidas más tóxicos. Demostró que hay movilidad de plaguicidas entre compartimentos ambientales (suelo, agua y aire) y que el riesgo ecotoxicológico no solo depende del número de compuestos aplicados, sino también de su toxicidad y persistencia en el ambiente.

Marthos L.L. (2014) (Perú); determinó el uso de plaguicidas en el cultivo de papa en cuatro comunidades del distrito de Chinchero (Ocutuan, Cuper alto, Charac y Piuray), mediante la aplicación de encuestas. Encontrando que 18% de los agricultores utilizan plaguicidas catalogados como muy tóxicos, dentro de los cuales se encuentran el Paration y Stermin (metamidofos), plaguicidas restringidos en el Perú. Otro dato importante, es que el 76% de agricultores usan prendas de protección inadecuada y el 24% restante no usa protección al momento de preparación y aplicación del plaguicida, el 24% entierra los envases y el resto lo desecha de manera inadecuada.

Muñiz, G. (2012) (Perú); realizó un estudio sobre la valoración toxicológica de los plaguicidas metamidofos y metalaxyl en papa cultivada en Chinchero (Cusco) y Andahuaylas (Apurímac). Encontró que los plaguicidas metamidofos, Captan, Metalaxyl, Folpet, Tebuconazol y Diclofuamida exceden en algunas muestras los Límites Máximos Residuales (LMR) en papa (que en la mayoría es 0.05 ppm). La CL50 del metamidofos (Lasser 600) en *Vicia faba* fue de 787.133 ppm y para *Eisenia foetida* una CL50 de 409.285 ppm, para ambos organismos se encontró que a dosis crecientes de los plaguicidas, los efectos tóxicos de inhibición en el crecimiento radicular y pérdida de peso incrementaban. El metamidofos induce la formación de Micronúcleos en *Vicia faba* en 0.68% a 500 ppm, y genera daño al ADN según el ensayo cometa en *Eisenia foetida*.

Piola L. (2011) (Argentina); realizó Ensayos Ecotóxicológicos para la evaluación del impacto de los plaguicidas glifosato y clorpirifos en la estructura y función de los suelos agrícolas de Argentina. *Eisenia andrei* fue utilizado en las pruebas de toxicidad con diferentes biomarcadores de genotoxicidad como rojo neutro y Cometa, y marcadores de ecotoxicidad como reproducción y evasión. Debido a la integración de pruebas en laboratorio y campo, observó un patrón similar de respuesta de este organismo en ambos lugares, siendo los ensayos realizados en laboratorio representativos de lo que acontece en campo. Los biomarcadores reflejaron un estrés tóxico producido por los plaguicidas a concentraciones donde no se observó mortalidad, indicando su utilidad para la detección temprana de efectos adversos de agroquímicos sobre las poblaciones.

Sánchez O. (2008) (España); evaluó los riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo de arroz en el Parque Natural de La Albufera de Valencia. Para ello determinó la PEC (Predicted Environmental Concentrations) realizando análisis cromatográficos de fungicidas azólicos (procloraz, tebuconazol, tricloclazol, propiconazol y carbendazima) en muestras de agua del Lago; y estableció los valores PNEC (Predicted Non Effect Concentrations) mediante ensayos de toxicidad en *Artemia franciscana* y *Tramnocephalus platyurus*. El riesgo lo determinó estimando el cociente de riesgo (CR): PEC/PNEC. Encontró que los niveles de contaminación por fungicidas azólicos son inferiores a las concentraciones consideradas tóxicas para los microcrustaceos estudiados, tanto en las aguas de La Albufera como en los arrozales tratados. El riesgo ambiental que representan los fungicidas azólicos estudiados es moderado. Además recomienda el uso de tricloclazol por presentar el menor riesgo ambiental entre los fungicidas azólicos.

Iannacone J. et. al. (2008) (Perú); evaluaron la toxicidad del metamidofos bajo dos formulaciones de diferente categoría toxicológica (Monofós- Ia y Tamarón - Ib) sobre ocho organismos terrestres no destinatarios determinando el riesgo ecológico mediante el cociente de riesgo (CR). Encontraron que la secuencia de mayor a menor cocientes de Riesgo (CR) del metamidofos Ia fue: *Leptomastidea abnormis* > *Copidosoma koehleri* > *Orius insidiosus* > *Porcellio laevis* > *Crhysoperla externa* > *Cryptolaemus montrouzieri*. En cambio para el metamidofos Ib fue: *Leptomastidea abnormis* > *Eisenia foetida* > *Copidosoma koehleri* > *Porcellio laevis* > *C Crhysoperla externa* > *Podisus nigrispinus*. Ambas aplicaciones del metamidofos provocaron un efecto de mayor riesgo sobre *L. Abnormis*. Los CR indicaron un alto riesgo ambiental del metamidofos en el ambiente terrestre.

Iannacone J. et. al. (2007) (Perú); evaluaron la toxicidad del metamidofos bajo dos formulaciones de diferente categoría toxicológica (Monofós- Ia y Tamarón - Ib) sobre cuatro organismos acuáticos no destinatarios: *Chironomus calligraphus*, *Tetrapygnus niger*, *Paracheirodon innesi* y *Oncorhynchus mykiss*, mediante la evaluación del riesgo ambiental. Encontraron que la secuencia de sensibilidad al metamidofos en ambas formulaciones fue *C. calligraphus* > *O. mykiss* = *P. innesi* > *T. niger*, para los cuales se estimó la CL₅₀. Además a través de la estimación de los cocientes de riesgo (CR) con ambas formulaciones del metamidofos en todos los casos se provocó un alto riesgo del metamidofos en el ambiente acuático, a través de la estimación del “peor caso teórico” considerando como valor PEC la dosis recomendada para dichos productos.

Gaytán J. C. (2006) (México); realizó la evaluación ecotoxicológica del estradiol y metabolitos primarios liberados al ambiente por la actividad ganadera, para tal fin se evaluó el efecto tóxico de estos compuestos en bioensayos con *Drosophila melanogaster* y *Vicia faba* evaluando en esta última la inducción de Micronúcleos (MN). En ambos organismos a bajas concentraciones, el estradiol y el estriol (metabolito) manifiestan una capacidad ecotóxica y genotóxica que, aunque no elevada es considerable, y en la inducción de diferentes aberraciones cromosómicas en anafase como fragmentos, cromosomas en anillo y puentes anafásicos.

Loza I. et. al. (2005) (Bolivia); evaluaron la genotoxicidad de suelos expuestos a plaguicidas mediante el Test de Micronúcleos en *Vicia faba*, en relación a propiedades físicas y químicas del suelo (textura, pH, conductividad y materia orgánica). Determinándose que una de las muestras de suelo (expuesta hace 20 años a plaguicidas como el DDT, actualmente en descanso) es franco arcilloso con contenido de materia orgánica de 1.5%, y una frecuencia de MN de 5.5%, y la otra (suelo recientemente expuesto a plaguicida DDT) es del tipo franco arcilloso arenoso y materia orgánica de 3.1% y una frecuencia de MN del 31%. Los resultados muestran que la primera muestra de suelo no es genotóxica; mientras que la segunda, muestra un incremento en su capacidad genotóxica debido quizás a que ésta presenta mayor contenido de humus y arcilla caracterizados por retener los plaguicidas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA PAPA (*Solanum tuberosum*)

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los principales alimentos que se consumen a nivel mundial. Actualmente su cultivo se encuentra presente en más de cien países, el Perú es uno de ellos y es reconocido como uno de los Centros de Origen de la papa. Este tubérculo, por su gran versatilidad económica y ecológica forma parte de la canasta básica de los peruanos, y por ende, es un producto cultivado extensamente en nuestro país (MINAG, 2011).

Debido a que el distrito de Chinchero posee características óptimas para el cultivo de *Solanum tuberosum*, el 55% de agricultores del lugar se dedica al cultivo de papa (Valcárcel, 2005), enfrentándose año tras año a diferentes plagas que destruyen y/o diezman la producción de papa en este sector, siendo las de mayor importancia el gorgojo de los andes (*Premnotrypes latithorax*), la polilla de la papa (*Phthorimea operculella*, *Scrobipalpula absoluta*) y rancha de la papa (*Phytophthora infestans*) (Marthos, 2014). No se puede negar la existencia de una gran demanda de este producto en el mercado, razón por la cual los agricultores de Chinchero empezaron a utilizar plaguicidas para llevar una mayor producción de tubérculos sin daño al mercado local y regional; pero por el desconocimiento del ciclo de las plagas y de las propiedades de los plaguicidas como productos químicos, los pobladores desde años atrás comenzaron a dar un uso intenso a estos productos químicos aplicándolos con mayor frecuencia y en mayor dosis.

o

2.2. PLAGUICIDAS

La población mundial en continuo crecimiento ha generado una presión dantesca en la obtención de alimentos necesarios para abastecer a toda esa población. Este objetivo se ha logrado, no con el aumento de más áreas cultivables, sino con el aumento del rendimiento por unidad de área cultivada, con la implementación de nuevas prácticas agrícolas que incluyen el uso de agroquímicos, que es lo que viene sucediendo con el cultivo de la papa. Los beneficios de los plaguicidas son indudables en la agricultura, pero a su vez han surgido diversos problemas ambientales donde destacan la contaminación de los recursos y del producto de cosecha por el uso excesivo de estos compuestos, así como los potenciales efectos adversos sobre la biota (Sánchez, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (2010), define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre, incluyendo los vectores de organismos causantes de enfermedades humanas, y las especies que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, madera, entre otros; también aquellas otras sustancias destinadas a utilizarse como regulador del crecimiento de la planta, defoliante o desecante, asimismo aquellas que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

Los plaguicidas normalmente se comercializan como formulados complejos, no como sustancias puras y simples. Estos formulados incluyen al *principio activo*, sustancia que posee la propiedad de matar a la plaga, agregado a otros ingredientes, llamados *coadyuvantes*, *surfactantes* o *ingredientes inertes*, cuya función es facilitar la aplicación del producto y aumentar la eficacia del principio activo, favoreciendo su acción. Los surfactantes, incluyen solventes, emulsionantes, tensoactivos, y otras sustancias que pueden representar un porcentaje muy alto del producto formulado (Poletta, 2011).

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS

Debido a la gran variedad de plaguicidas, existen diferentes formas de clasificarlos; Fernández, Pujol y Maher (2012) presentan un resumen:

- ❖ Considerando la **plaga que controlan**, pueden clasificarse en insecticidas, acaricidas, bactericidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, nematocidas, molusquicidas, avicidas, alguicidas.
- ❖ Por su **modo de acción**, pueden ser sistémicos o de contacto; los primeros se aplican sobre una parte de la planta, ingresan a ellas y a través del follaje llegan a otras partes que no fueron tratadas.
- ❖ Teniendo en cuenta su **toxicidad**, la OMS los agrupa en cuatro clases; IA (extremadamente tóxicos), IB (altamente tóxicos), II (moderadamente tóxicos), III (ligeramente tóxicos), IV (Precaución). Esta clasificación es la que adoptan gran parte de los países de América Latina.
- ❖ De acuerdo con su **estructura química**, se los agrupa en carbamatos, clorados, fosforados, compuestos inorgánicos, piretroides, tiocarbamatos, derivados de la urea, arsenicales, bipiridilos y otros.

Para la presente investigación, es importante destacar la clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad, es decir de acuerdo a la capacidad innata de estos compuestos para producir daño o provocar la muerte en la biota expuesta (incluyendo el hombre) a través de una o múltiples exposiciones (Ramirez y Lacasaña, 2001), la que se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.

CLASIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS PLAGUICIDAS			
COLOR ETIQUETA	CLASE SEGÚN LOS RIESGOS	CLASIFICACIÓN DEL PELIGRO	EJEMPLOS
	Clase Ia: Sumamente peligrosos	Muy tóxico	Paration, dieldrin, metamidofos
	Clase Ib: Altamente peligrosos	Tóxico	Eldrín, diclorvos, endosulfan
	Clase II: Moderadamente peligrosos	Nocivo	DDT, Clordano, heptacloro
	Clase III: Poco peligrosos	Cuidado	Malation
	CLASE IV: Sin peligro	Cuidado	

FUENTE: Tomado de OMS, 2010.

Así mismo, es relevante destacar la clasificación de acuerdo a su estructura química:

A. Organoclorados (OC)

Los plaguicidas organoclorados comprenden un grupo de compuestos orgánicos de síntesis derivados de hidrocarburos complejos, en los que uno o más hidrógenos son sustituidos por cloro, donde los enlaces de carbono-cloro son muy estables. Sus propiedades son: reducida volatilidad, alta estabilidad química y alta solubilidad en lípidos y solventes orgánicos, resistencia a la biodegradación, por ello una lenta biotransformación y degradación en el medio ambiente (Alvarez y Cruz, 1989 citado en Pauta, 2014). Estas propiedades han provocado su prohibición en numerosos países ya que constituyen el fundamento que plantean al medio ambiente: persistencia, bioconcentración y biomagnificación en la cadena trófica (Pauta, 2014), representando un potencial de riesgo ecotoxicológico y genotóxico a largo plazo. Entre los OC más conocidos se tiene: endosulfan, clorotalonil, clordano, heptacloro, aldrín, dieldrín, endrín, DDT, hexaclorobenceno, entre otros.

B. Organofosforados (OF)

Son ésteres o amidas derivadas del ácido fosfórico, son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa que se encuentra en las células nerviosas, cuya desactivación paraliza el sistema nervioso. En general son compuestos poco volátiles, muchos de ellos experimentan fotólisis directa e indirecta en la atmósfera, son hidrolizables y biodegradables. Estos compuestos se caracterizan por tener un espectro de acción más estrecho que el de los organoclorados, con lo que se reduce la destrucción de otros insectos que pueden ser beneficiosos. Fácil descomposición a productos no tóxicos, metabolismo relativamente rápido en organismos vertebrados y ausencia de acumulación en los mismos. Sin embargo, una desventaja de estos compuestos es su toxicidad, relativamente alta para los vertebrados y seres humanos, y su persistencia no tan baja como se creyó (**Sánchez y Sánchez, 1984**).

Asimismo se ha descrito que tienen propiedades alquilantes lo cual desde el punto de vista de la mutagénesis es de suma importancia, puesto que actúan directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) añadiendo grupos alquilo principalmente metilo y etilo a las bases nitrogenadas que tienen grupos nucleofílicos capaces de reaccionar con electrófilos (Martínez y Gómez, 2007). En el suelo la biodegradación es más activa a medida que aumenta la materia orgánica, Algunos estudios demuestran que estos pueden adsorberse en el espacio entre capas de algunos minerales del suelo, como la montmorillonita (mineral de arcilla) (Pauta, 2014).

Entre los compuestos organofosforados se tiene: malatión, metamidofos, diazinón, diclorvos, clorpirifos, monocrotofos, paratión, metilparatión, entre otros.

C. Carbamatos (CBM)

Son ésteres de ácido carbámico. El mecanismo de acción es igual al de los organofosforados, la diferencia radica en la duración de la inhibición de la acetilcolinesterasa, que es menor. Son menos persistentes que los OC y los OF, fácilmente degradables por acción de microorganismos y por vía no biológica, especialmente por hidrólisis, son poco volátiles, no tienden a adsorberse a suelos y sedimentos, tampoco se bioconcentran en los organismos (Pauta, 2014). Este grupo de plaguicidas presenta algunas ventajas frente a los compuestos OF como son su eficacia contra insectos resistentes a estos últimos y su mayor seguridad de manejo, pero también presenta desventajas ya que son de producción más difícil, más caros y de mayor toxicidad frente a los insectos polinizadores. (Sánchez y Sánchez, 1984). Entre estos compuestos se tiene: aldicarb, metomilo, carbofuran, entre otros.

D. Piretroides

Tienen su origen en insecticidas naturales derivados del extracto de piretro obtenido de las flores del crisantemo, conocidos como piretrinas. Posteriormente fueron obtenidos sintéticamente y en la actualidad se han fabricado alrededor de 100 diversos productos comerciales. Su ingreso a los insectos es por contacto o ingestión. También actúan en el sistema nervioso central causando modificaciones en la dinámica de los canales de Na⁺ de la membrana de la célula nerviosa, provocando que incremente su tiempo de apertura prolongando la corriente de sodio a través de la membrana, tanto en insectos como en vertebrados **(He 1994, Perry et al. 1998 citado en Martínez y Gómez, 2007)**.

2.2.2. TECNICAS ANALITICAS PARA LA DETECCION DE PLAGUICIDAS

El análisis de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales tiene dos etapas fundamentales de similar importancia: una de tratamiento de muestra y otra de análisis. La etapa de preparación de muestra es muy crítica en matrices medioambientales, porque suelen ser muy complejas con contenidos muy bajos de los analitos. En cuanto a la etapa de análisis de contaminantes orgánicos fundamentalmente se emplean las técnicas cromatográficas, destacando las aplicaciones de la cromatografía de gases y de líquidos **(García y Pérez, 2012)**:

A. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Es probablemente el método más empleado en estudios medioambientales por su amplia versatilidad en la detección de la mayor parte de los contaminantes medioambientales analizados por cromatografía de líquidos. Sin embargo, presenta una limitada sensibilidad y selectividad cuando las muestras medioambientales son complejas y los contaminantes se encuentran a niveles traza **(García y Pérez, 2012)**.

B. Cromatografía de gases (GC)

Aunque la GC es la técnica cromatográfica más extensamente aplicada y con mayor versatilidad en el análisis de contaminantes ambientales, su aplicación se ve altamente limitada por la ausencia de volatilidad de muchos compuestos y/o la inestabilidad térmica que presenten (García y Pérez, 2012) La mayoría de los detectores GC son detectores de ionización (FID, NPD, FPD, MSD), su respuesta es sensible al cambio de masa del analito **(Stachenko y Martínez, 2009)**.

2.3. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLAGUICIDAS

Cuando un plaguicida es aplicado a un cultivo, solamente alcanza el organismo “blanco” aproximadamente el 1%, mientras que el 25 % es retenido en el follaje, el 30 % llega al suelo y el 44 % restante es exportado a la atmósfera y a los sistemas acuáticos por escorrentía y lixiviación (Brady y Weil, 1996 citado en Bruno, 2016). La contaminación de los diferentes compartimentos ambientales (agua, suelo y aire) por plaguicidas es el problema más grave de la agricultura actual. El problema se agrava cuando el plaguicida es transportado desde el suelo hacia el aire, agua o vegetación/animales, pudiendo entrar en contacto con una amplia gama de organismos, incluyendo los seres humanos (Sánchez, 2008).

2.3.1. Plaguicidas en la litosfera (suelo)

Los plaguicidas llegan al suelo por aplicación directa o por otras vías, como por escurrimiento o lavado de plantas, a través del agua de lluvia que arrastra el plaguicida suspendido o disuelto en la atmósfera, cuando se entierran los restos de cultivos tratados o desecho de envases vacíos (Raldúa, 1995). La evaluación del grado de contaminación del suelo por plaguicidas es de suma importancia debido a que estos pueden ser transferidos a los alimentos. Los plaguicidas se acumulan en el suelo, especialmente cuando los tratamientos se repiten año tras año, persisten largo tiempo, los suelos orgánicos retienen mayor cantidad de residuos que los arenosos. Esta contaminación afecta a los microorganismos del suelo, disminuye la descomposición de la materia orgánica, y modifica la estructura de los suelos, disminuye la fertilidad y finalmente favorece la erosión (García, 1997).

2.3.2. Plaguicidas en la Hidrosfera

Los residuales de plaguicidas presentes en los suelos pueden ser trasladados por escorrentías superficiales o percolación a causa de la lluvia hasta cuerpos de agua cercanos (ríos o lagunas). La presencia de estos en el agua suele tener más amplias repercusiones que en el caso del suelo por diversos motivos como difusión más rápida a un mayor volumen del medio y capacidad de desplazarse a lugares lejanos. Esta contaminación ocasiona la pérdida de la flora y fauna acuática, y la pérdida del recurso como fuente de agua y alimento (Hoffman *et al.*, 2003; Sutter, 1993).

2.3.3. Plaguicidas en la atmosfera

Se produce por la aplicación aérea no controlada, por la pérdida durante el transporte y durante la aplicación y por la evaporación de aguas contaminadas. El movimiento del aire puede desplazar los contaminantes atmosféricos desde sus sitios de origen a largas distancias, como las altas concentraciones de insecticidas organoclorados y de PBC encontradas en animales árticos y antárticos por García (1997). El movimiento de los plaguicidas que ocurre cuando son liberados al ambiente, se resume adecuadamente en la Figura 1.

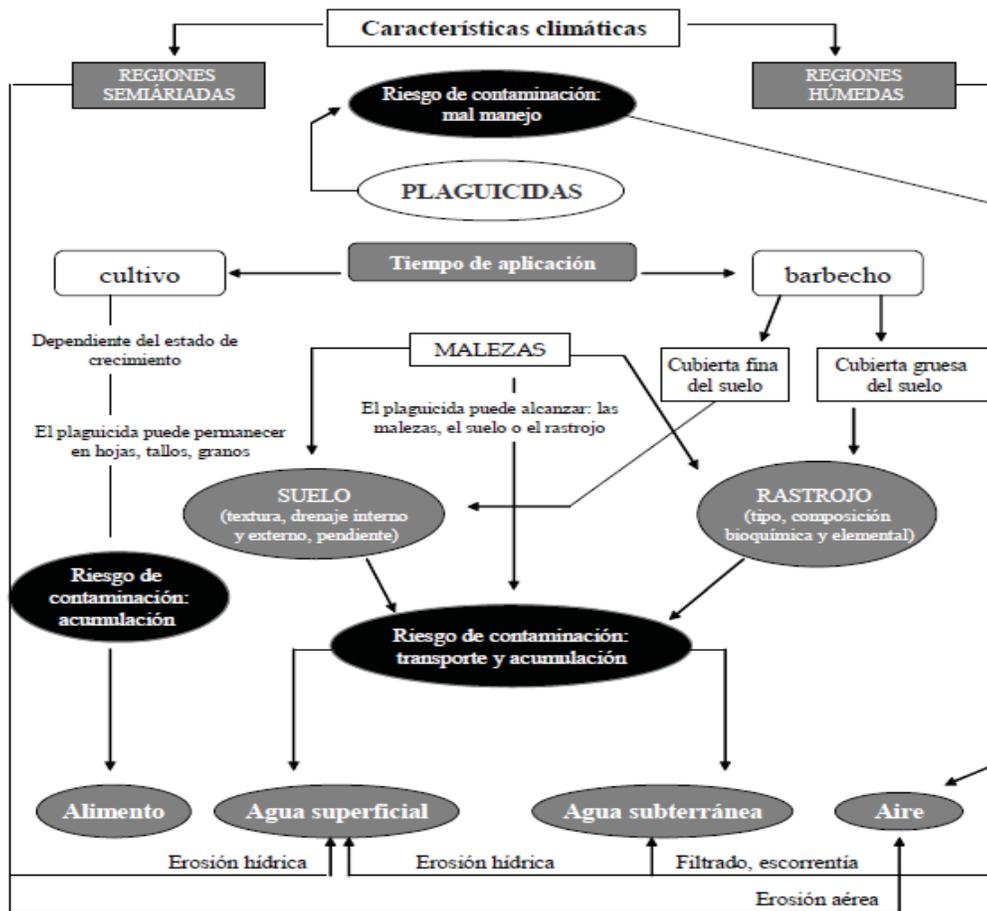


Figura 1. Destino posible de los plaguicidas en el ambiente luego de su aplicación. Adaptado de Hang *et. al.*, 2010. (Poletta, 2011).

2.4. EVALUACION ECOTOXICOLÓGICA Y GENOTÓXICA DE SUELOS CONTAMINADOS POR PLAGUICIDAS

Tradicionalmente, las evaluaciones de la calidad de los suelos se basaban en el análisis de parámetros físico-químicos. Cuando se evalúan los efectos biológicos adversos asociados con suelos contaminados con plaguicidas, resulta muy difícil, si no imposible, aislar e identificar los componentes químicos individuales que provocan impacto sobre los ecosistemas locales; por otra parte, los resultados de los ensayos dependen no sólo de las propiedades físico-químicas intrínsecas del plaguicida, sino también de su biodisponibilidad en el suelo (Römbke *et. al.* 2005a, Reinecke y Reinecke 2007 citado en Piola, 2011). Los pobladores del distrito de Chinchero emplean una serie de plaguicidas pertenecientes a los grupos de los Organoclorados (OC), Organofosforados (OF), Carbamatos (C) y Pirretroides (P); por lo que la determinación del potencial ecotoxicológico de los suelos no puede ser atribuido a un compuesto en específico.

2.4.1. ECOTOXICOLOGÍA

A diferencia de la toxicología ambiental, la que se aplica solamente al estudio de los efectos directos de las sustancias en el ser humano; la ecotoxicología es definida como el estudio del destino y de los efectos de las sustancias tóxicas sobre un ecosistema cuando estas son introducidos al medio ambiente y la influencia que las condiciones ambientales tienen sobre el comportamiento del tóxico. La ciencia en sí requiere una comprensión de los principios ecológicos y de la teoría ecológica, así como del modo en que las sustancias químicas afectan en potencia a individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas (Klassen y Watkins, 2001). La Ecotoxicología estudia aquellos cambios que resultan relevantes para la conservación de la estructura y función de los ecosistemas (Tarazona, 2007). Evidentemente puede considerarse que el ser humano forma parte del ecosistema y por lo tanto debería incluirse dentro del conjunto de poblaciones y comunidades bióticas consideradas por la ecotoxicología (Tecuapetla, 2014).

Los procedimientos más habituales en Ecotoxicología son los bioensayos, que se realizan con organismos generalmente de una única especie y en condiciones controladas de laboratorio. Con ellos se pretende obtener información acerca de los efectos producidos por una sustancia pura o mezcla compleja, además provee la base para evaluaciones que permitan determinar qué sustancias podrán ser liberadas al ambiente y en qué cantidad (Sánchez, 2008; Tecuapetla, 2014).

2.4.2. GENOTOXICOLOGÍA

La genética toxicológica es una ciencia multidisciplinaria, que estudia la interacción de agentes físicos y químicos (a niveles subtóxicos de exposición) con el material genético, así como los mecanismos de respuesta al daño y sus consecuencias sobre los organismos manifestado en la alteración del material genético o en sus componentes asociados, teniendo así alteraciones como la carcinogénesis y teratogénesis. La teratogénesis se refiere al efecto de los genotóxicos sobre el desarrollo embrionario y la carcinogénesis es el proceso por el que una célula normal pierde el control de su ciclo celular, desarrollando de manera autónoma, para generar así el crecimiento tumoral o neoplasia (**Guachalla y Ascarrunz, 2003**).

Los Micronúcleos (MN)

Una medida de inestabilidad genética inducida por compuestos genotóxicos es el incremento en la formación de micronúcleos que son visibles fácilmente al microscopio óptico. Durante la división celular el material genético (ADN) se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación del AD, a roturas cromosómicas y al efecto de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica. El material genético que se desprende y que no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado "micronúcleo" (MN) (**Zalacain et. al., 2005**).

Pastor, 2002 destaca dos puntos relevantes sobre los Micronúcleos:

- Se requiere una división celular después del daño para que se formen y puedan ser visualizados.
- Los MN pueden ser consecuencia tanto de agentes clastogénicos (agentes físicos o químicos capaces de inducir roturas cromosómicas) como aneugénicos (agentes químicos que impiden la fijación de las fibras del huso al cinetocoro de un cromosoma entero).

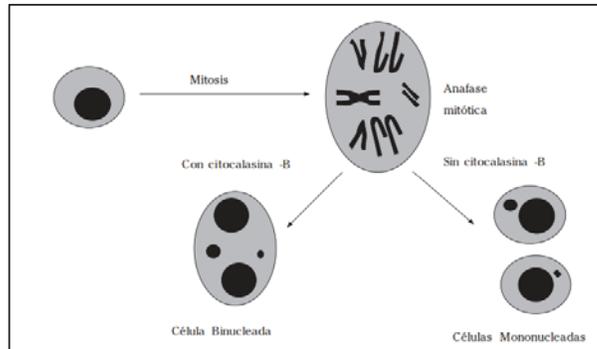


Figura 2. Formación de MN debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos.

FUENTE: Zalacain *et. al.* (2005)

2.4.3. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

Entendiendo que la *toxicidad* se refiere al potencial inherente de una sustancia para causar daño sistémico a los organismos. Los ensayos biológicos o bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas, donde la toxicidad aparente evaluada es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico (reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etc); los efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación y pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades (Ronco *et. al.*, 2004). Por lo que, un objetivo importante de los bioensayos es valorar el impacto sobre los ecosistemas naturales y calcular los factores de riesgo, ya que poblaciones naturales de plantas y animales son expuestos frecuentemente a residuos tóxicos como plaguicidas, metales pesados, detergentes, etc (USEPA, 2008).

Los organismos biológicos son detectores de condiciones ambientales complejas, resultado de un conjunto de factores difíciles de separar, considerándolos como finos sensores de los cambios que operan durante cierto tiempo en un ecosistema. La gran mayoría de los estudios se realizan sobre sustancias puras y compuestos, pero también están destinados a la vigilancia y control ambiental, como la valoración de vertidos industriales, lixiviados de residuos, suelos contaminados y otras mezclas complejas (**Fuentes *et. al.*, 2006**). Las pruebas de toxicidad realizadas en organismos vivos, conocidas como bioensayos, pueden ser de dos tipos (Menzer y col, 1994 citado en Tecuapetla, 2014):

- *Pruebas o Ensayos de toxicidad aguda:* Son relativamente simples, de corta duración y de bajo costo. Se evalúa los efectos agudos que el compuesto en prueba causa en el organismo expuesto, provocando generalmente la muerte del organismo expuesto (muerte, parálisis, inhibición de crecimiento).
- *Pruebas o Ensayos de toxicidad crónica:* son más complejas y requieren más tiempo; éstas son diseñadas para ciclos de vida de especies particulares con la finalidad de obtener información sobre los efectos crónicos que producen respuestas subletales en los organismos expuestos, provocan un estado de alteración de la homeostasis, pero no desemboca en la muerte de la célula (cambios en el comportamiento, fisiología, bioquímica, dificultad en la reproducción, teragenocidad, cancer etc).

A. Biomarcadores

En los ensayos o pruebas de toxicidad realizadas con organismos vivos, la respuesta medida o evaluada es conocida como biomarcador que son medidos a diferentes niveles biológicos y que representa los efectos que produce la presencia de un contaminante en el ambiente (Medina y Encina, 2003). Un biomarcador es un indicador bioquímico, fisiológico o ecológico del estrés físico, químico o biológico en los organismos y sus poblaciones. Es un trazador de las reacciones que pueden ocurrir a diferentes niveles – molecular, celular, en el organismo completo, en las poblaciones o comunidades (Pulgarin y Martínez, 2010). La Tabla 2 describe los biomarcadores en diferentes niveles biológicos.

Tabla 2. Biomarcadores medidos a diferentes niveles biológicos

NIVEL DE ORGANIZACIÓN	RESPUESTA
Molecular	Expresión de genes de estrés, usando genes reporteros como el gen de la lucifererasa que produce una proteína luminiscente ante la exposición a un contaminante.
Celular	Incremento en la actividad de proteínas indicadoras de estrés o enzimas involucradas en los procesos de detoxificación.
Organismo completo	Daños histológicos o formación de tumores
Poblaciones	Tasas de supervivencia, crecimiento y mortalidad
Comunidades	Cambios en la diversidad y abundancia de especies

Fuente: Instituto Nacional de Ecología (Pulgarin y Martínez, 2010).
 Disponible en http://www.ine.gob.mx/dqicurg/sqre/ti_eco.html

B. "Endpoints" o valores de referencia final

De acuerdo a Sparling (2016), un bioensayo de toxicidad es definido por sus puntos finales, duracion y modelo de exposicion. Por muchos años el llamado "estandar de oro" a determinar era establecer la Dosis o Concentración Letal media, que viene a ser la cantidad que estadisticamente mata al 50% de la poblacion en prueba.

- **DL50 (Dosis Letal media):** se usa cuando la cantidad del contaminante a la que un animal es expuesto es conocida exactamente cuando son suministradas por inyecciones o cuando el contaminante es aplicado a la piel como crema o aceite, o cuando se alimenta a un animal forzadamente.
- **CL50 (Concentración Letal media):** es usada cuando el contaminante esta presente en compartimentos ambientales como el agua y suelo, asi como alimento, y la concentracion no se conoce con precision y puede variar de alguna forma entre individuos, en caso de semillas el valor se conoce como la Concentración de Inhibición (de la germinación) media (CI50).

Sin embargo, ello cambio con el tiempo, Newman y Zhao (2008) definen los conceptos de otros puntos o valores de referencia de medición como son el LOEC y NOEC de la siguiente manera:

- **LOEC (Lowest Observed Effect Concentration):** Concentracion mas baja donde se observa efecto. En otras palabras, es la mínima concentracion con una respuesta estadisticamente diferente de aquella respuesta encontrada en la referencia (control negativo).
- **NOEC (No Observed Effect Concentration):** Concentracion en la que no se observa efecto alguno. Es decir, la concentracion mas alta con una respuesta que no es significativamente diferente de la respuesta del referente (control negativo).

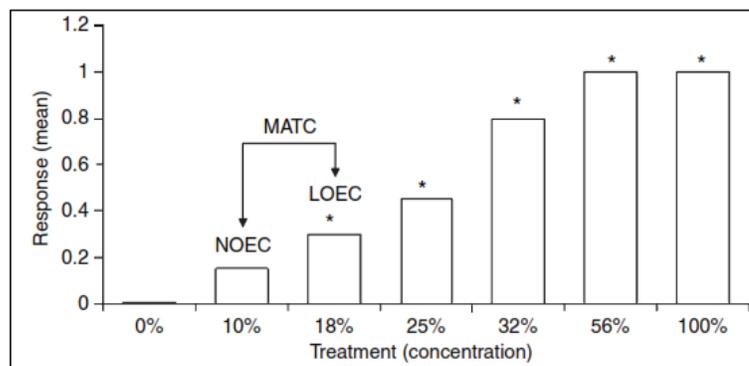


Figura 3. Determinación gráfica de NOEC y LOEC.

FUENTE: Newman Zhao, 2008

De acuerdo a Sparling (2016); algunos experimentos realizados en 1970 demostraron que las concentraciones para matar un animal o causar la inhibición de la germinación de una semilla (CL50 o DL50) en ensayos de toxicidad exceden a las concentraciones que se espera encontrar en el ambiente, esos ensayos revelaban que es lo que podía potencialmente pasar bajo condiciones muy severas, pero no necesariamente bajo condiciones naturales. Se encontró que concentraciones mas bajas eran capaces de producir diferentes efectos subletales (reducido crecimiento o desarrollo, histopatología, evasión, etc). Por lo que otros “endpoints” fueron desarrollados evaluando marcadores subletales, así se tiene:

- **NOAEL (No Observed Adverse Effects Level):** Definido como la mas alta dosis o concentracion ensayada de un químico que no produce algún efecto dañino sobre los organismos ensayados, concentración que al estar presente en el ambiente no representa ningún estrés para los organismos.
- **LOAEL (Lowest Observed Adverse Effects Level):** Viene a ser la concentracion o dosis mas baja de un compuesto que causa una alteracion adversa en la morfología, función, capacidad, crecimiento, desarrollo de los organismos ensayados.

C. Ensayos de toxicidad realizados en la presente investigación:

En la presente investigación se realizaron diferentes pruebas de toxicidad con organismos biológicos sobre 2 organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos: un invertebrado (detrívoro) y un vegetal (productor).

C.1. Ensayo de toxicidad con *Eisenia sp.*

Los bioensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados y de sustancias puras (Iannacone, *et. al.*, 2008). Este género de lombriz *Eisenia sp.* es de amplia distribución, fácil manejo y cultivo. Su principal característica morfológica es la presencia de segmentos externos e internos en su cuerpo, son hermafroditas y cuando son adultas se observa una protuberancia epidérmica denominada clitelo en el que se forman los capullos en los cuales son depositados los huevos (Santamaría, 1996 citado en Cuevas *et. al.*, 2008). Las especies de lombriz empleadas frecuentemente en ensayos de toxicidad son *Eisenia andrei* y *Eisenia foetida*, pertenecientes a la familia Lumbricidae. El suelo artificial y el suelo contaminado son representativos de la exposición de la lombriz al compuesto analizado (Cuevas *et. al.*, 2008).

C.2. Ensayo de toxicidad con *Vicia faba*

El daño a las plantas por los contaminantes puede afectar directamente a la estructura y la función de un ecosistema, al reducir la producción primaria, incrementar el lavado y erosión del suelo y degradar el hábitat de la vida silvestre, Wang y Freemark, 1995 citado en Cuevas *et. al.*, 2012). Los bioensayos de toxicidad con semillas, evalúan los efectos adversos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación y desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.

En la germinación ocurren cuatro procesos: la imbibición o toma física de agua, la formación de los sistemas enzimáticos e inicio de la síntesis de proteínas y de RNA, la emergencia de la radícula y la iniciación del crecimiento. La activación de la semilla es inhibida ante la presencia de compuestos tóxicos, afectando la germinación de la misma. La división celular de los meristemos radiculares puede afectarse, retardando el proceso de mitosis o alterando el proceso de alargamiento radicular (Uribe, 2008), ésta última respuesta permite determinar el efecto tóxico de compuestos presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación. Los efectos letales de los contaminantes sobre las plantas pueden significar pérdidas ecológicas y económicas muy importantes; incluso los efectos subletales tienen un impacto significativo sobre la producción de alimentos y el desarrollo de la vegetación natural, e implicaciones adversas para los organismos pertenecientes a niveles superiores en la cadena alimenticia (Wang y Freemark, 1995 citado en Cuevas *et. al.*, 2012).

C.3. Ensayo de Micronúcleos en *Vicia faba*

Las plantas han permitido demostrar el efecto de agentes físicos y químicos sobre el incremento en la frecuencia de mutaciones y aberraciones cromosómicas inducidas. Uno de los sistemas para evaluar el daño citogenético que ha demostrado ser versátil y eficiente, es el de las células meristemáticas de la raíz de haba (*Vicia faba*), debido a que es de fácil manejo, de mantenimiento relativamente económico y que tienen pocas cromosomas de buen tamaño para realizar un estudio citológico y se distinguen con claridad a un aumento de 400X en su análisis al microscópico (Valencia, 1992 citado en Prieto *et. al.*, 2003).

2.4.4. EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO (ERE)

La evaluación del riesgo ecológico según Sutter (1993), es un proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales; recurre tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de las reacciones de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y escala trófica. En la práctica, la evaluación de riesgo ecológico de acuerdo a Medina y Encina (2003), se desarrolla en el marco de la ecotoxicología, disciplina que desarrolla todos los pasos implicados en la evaluación del riesgo ecológico y utiliza métodos toxicológicos, químicos y ecológicos, para describir la interacción entre agentes contaminantes y organismos, entre agentes contaminantes y ecosistemas, y entre organismos y ecosistemas, respectivamente.

A. Evaluación de riesgo ecotoxicológico

Las evaluaciones de riesgos constituyen la mejor herramienta disponible para apoyar desde el punto de vista científico técnico la toma de decisiones (instrumento de gestión) relacionadas con sustancias químicas y las actividades potencialmente contaminantes. En las evaluaciones de riesgos ambientales o ecológicos (ERA) se trata de identificar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos sobre la estructura y función de los ecosistemas y la magnitud de los mismos, y se considera que el nivel de protección es de poblaciones o comunidades; no el de individuos, donde los receptores son grupos taxonómicos relevantes para cada compartimento ambiental (aire, agua, sedimentos o suelo). En realidad, la evaluación de riesgos es parte de un proceso más complejo: el análisis de riesgos (Tarazona, 2007). En la Figura 4 se muestra las fases de este proceso.

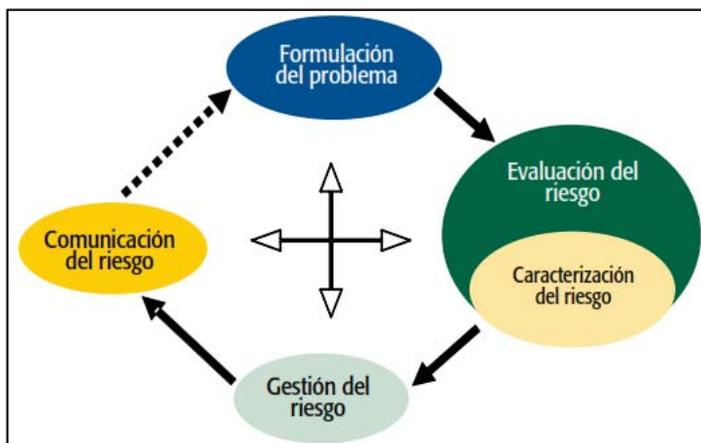


Figura 4. Esquema simplificado del ciclo de análisis de riesgo.

FUENTE: Tarazona, 2007

El análisis o caracterización de riesgo comprende las siguientes fases (Tarazona, 2007):

1. **Definición o formulación del problema:** En la que se establecen cuáles son los riesgos (tipos, actividades, etc.) que se van a analizar, así como las condiciones del análisis. Supone el desarrollo de un modelo conceptual que permita establecer las pautas básicas de la evaluación y el plan de trabajo. El modelo conceptual es una descripción y representación visual de las relaciones existentes entre los contaminantes y los receptores que pueden verse afectados; incluye las fuentes y vías por las que se eliminan las sustancias químicas al medio ambiente, el comportamiento de estas sustancias en los diferentes compartimentos ambientales, y las rutas por las cuales llegan a los organismos vivos y provocan sus efectos.
2. **La evaluación de riesgos:** como fase de revisión del conocimiento científico que se estructura en:
 - a) **Evaluación de los efectos:** Identificando cuales son los peligros para la salud y/o el medio ambiente causados por la sustancia y estableciendo relaciones dosis/respuesta para aquellos más relevantes.
 - b) **Evaluación de la exposición:** estudiando los mecanismos y vías por los que la sustancia alcanza a los receptores relevantes y realizando estimaciones cuantitativas de la exposición para los receptores relevantes.
 - c) **Caracterización del riesgo:** Comparando los niveles de exposición con los efectos esperables para establecer, cualitativa o cuantitativamente, la probabilidad de que se produzcan efectos y la magnitud de los mismos.
3. **La gestión de los riesgos:** En la que se consideran las posibles medidas para mitigar o al menos reducir los riesgos identificados; se comparan los riesgos de diferentes alternativas; y se valora la viabilidad técnica y las implicaciones socioeconómicas para tomar la decisión más adecuada.
4. **La comunicación de riesgos:** En la que se establecen los caminos de interacción e intercambio de información entre los diferentes grupos participantes (evaluadores, gestores, responsables políticos y ciudadanos) y se desarrolla una estrategia para informar sobre los riesgos y medidas adoptadas.

Las evaluaciones de riesgo se suelen realizar de forma escalonada, generando inicialmente una información simplificada que se va aumentando sólo cuando resulta necesario. Se consideran dos metodologías progresivas para la evaluación de los riesgos para la salud y el medio ambiente de las sustancias químicas: las evaluaciones simplificadas o de bajo nivel y las evaluaciones complejas o de alto nivel.

- I. **Evaluaciones de bajo nivel:** El modelo conceptual se sustituye por una serie de escenarios genéricos que relacionan las fuentes de emisión, los compartimentos afectados y los receptores ecológicos relevantes con las rutas de exposición. En los procesos reglados, se establecen escenarios normalizados y guías metodológicas para armonizar el proceso de evaluación:
 - a) **Para estimar la exposición**, se utilizan escenarios simplificados con valores por defecto para aquellas propiedades que no dependen de la sustancia en cuestión. Estos escenarios se basan generalmente en la aplicación del “*peor caso posible*” o de supuestos muy conservadores para cada parámetro y variable.
 - b) **La valoración de los efectos**, se realiza mediante ensayos estandarizados por la OECD o US EPA, eligiendo los valores obtenidos para el receptor más sensible dentro de cada escenario.
 - c) **La caracterización del riesgo**, suele realizarse mediante cocientes en los que se estima si el margen de seguridad existente entre las concentraciones estimadas o medidas y la toxicidad observada para los receptores más sensible es suficiente como para cubrir la incertidumbre de la estimación.

- II. **Las evaluaciones de alto nivel:** Utilizan metodologías más complejas, determinísticas o probabilísticas, y pretenden ofrecer la estimación de riesgo más ajustada a la realidad posible en función de la información disponible ya tamizada que se logra con modelos complejos de emisión o comportamiento ambiental, ensayos ecotoxicológicos más realistas, medidas reales de monitoreo, etc. Con este tipo de metodologías se pretende obtener estimaciones realistas de la probabilidad de que se produzcan efectos adversos sobre los receptores, con lo que se reducen los niveles de incertidumbre y se puede ir alejando del peor caso teórico para acercarse al peor caso real.

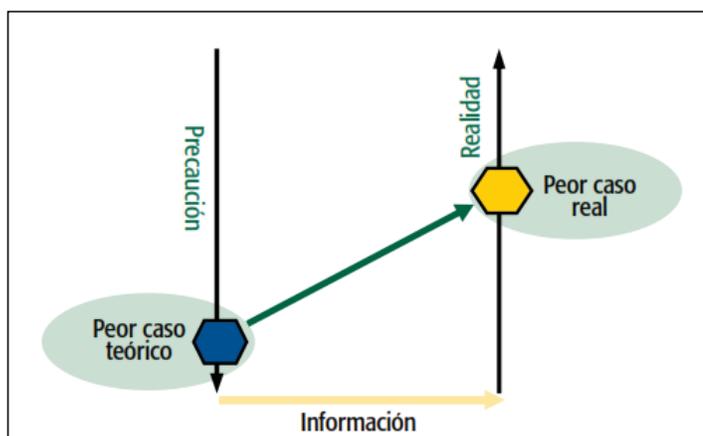


Figura 5. Niveles de evaluación de riesgo.
FUENTE: Tarazona, 2007

B. Evaluación de riesgo genotóxico

El riesgo genotóxico es estimado de forma similar al riesgo ecotoxicológico tomando en cuenta la generación de MN como expresión de daño al ADN, se determina el cociente de riesgo y se realiza la interpretación (U. S. Environmental Protection Agency, 1998).

2.5. LEGISLACIÓN AMBIENTAL EN EL PERÚ

La república del Perú considera que el suelo es uno de los recursos naturales más importantes con los que se cuenta, ya que este resulta ser esencial para la supervivencia de los seres humanos, animales y plantas. Que a pesar de ser un recurso natural renovable cuyo proceso de formación toma décadas y/o siglos, se considera que la capacidad para la renovación de un suelo es, a escala humana, muy limitada o casi no existente. Por todo lo mencionado, se considera el suelo como un recurso natural que requiere una alta protección, incluyendo el impedimento de alteraciones de su calidad por contaminantes (MINAM, 2015). Para cumplir con ese objetivo, en el país se ha implementado a lo largo de los últimos años normativa ambiental respecto a este recurso, así tenemos que:

- En el año 2013, mediante el *Decreto Supremo N°002-2013-MINAM* se establece los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para el recurso suelo, señalando como suelo contaminado a aquel cuyas características químicas han sido alteradas negativamente por la presencia de sustancias contaminantes depositadas por la actividad humana. Este D.S. contempla el ECA para ciertos plaguicidas OC (Aldrín, Endrín, DDT y Heptacloro), pero no para toda la gama de plaguicidas OC, OF y CA.

- En el año 2014, en el marco del D.S. N° 002-2013-MINAM, Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo; se publica la Guía para Muestreo de Suelos. Esta guía establece especificaciones determinar la existencia y dimensión de contaminación en el suelo y determinar las concentraciones de nivel de fondo. Se establecen los tipos de muestreo, técnicas de muestreo, criterios para la determinación del número de muestras, así como las medidas de calidad para la toma y manejo de muestras de suelo.

- En el año 2015, en el marco del D. S. N° 002-2013-MINAM, así como en el D. S. N° 002-2014-MINAM (Disposiciones complementarias para la aplicación de los Estándares de Calidad Ambiental - ECA para Suelo), se publica la “Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA)”, que es una herramienta práctica para la Evaluación de Riesgos. Estos se basan en los datos y resultados obtenidos en la fase de identificación y caracterización de un sitio contaminado con el fin de entender las relaciones y causalidades entre la presencia de los contaminantes, las distintas rutas y vías de exposición y los efectos adversos observados en el ambiente o los efectos potenciales que puedan presentarse.

Respecto a la regulación del uso de plaguicidas en el país, se cuenta con el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), creada por el Decreto de Ley N° 25902, siendo el ente responsable de vigilar la seguridad sanitaria del agro nacional. En el Perú se han restringido el uso de los plaguicidas agrícolas Paraquat y metamidofos (OF). Y se ha prohibido el uso de otros OC como Aldrín, Endrín, diendrín, Heptacloro, Canfecloro/Toxafeno, DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), Lindano, Endosulfan entre otros así como de algunos OF como Aldicarb, Parathion, Monocrotofos. y otros como Arseniato de plomo por el D.S. N° 037-91- AG, 1991.

En las últimas décadas el impacto del uso de plaguicidas de manera excesiva y sin control, ha provocado el deterioro de la salud y del ambiente, lo que ha conllevado que organismos internacionales y gobiernos como de E.E.U.U., Unión Europea y países Latinoamericanos (Colombia, Argentina, Chile entre otros) presten una mayor atención a estos problemas, contando con guías para la Estimación de Riesgos Ambientales (teniendo como uno de los puntos prioritarios la ERA del uso de plaguicidas), mucho antes que nuestro país implemente el suyo en el año 2015. Además el Perú aún no cuenta con una normativa sobre la inclusión de pruebas de toxicidad en los programas de monitoreo y evaluación de calidad ambiental, además de los parámetros físico-químicos tradicionales, como ya sucede en los países antes mencionados.

CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. AREA DE ESTUDIO

1.1. UBICACIÓN

Las muestras para la presente investigación fueron procedentes del distrito de Chinchero, ubicado a 3762 m.s.n.m. perteneciente a la provincia de Urubamba, Departamento del Cusco. Este distrito tiene una extensión de 96.4 km².y está compuesto de dieciséis comunidades indígenas. El acceso es por carretera asfaltada, y está ubicado estratégicamente en el cruce de tres caminos que conectan Pumamarca, Yucay y Cusco. Las muestras de suelo fueron colectadas en áreas de cultivo pertenecientes a 6 Sectores diferentes distribuidos en 3 comunidades (2 muestras por comunidad) en Setiembre del 2015. La parte experimental del trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, entre Setiembre del 2015 y Setiembre del 2016.

➤ **Ubicación política:**

Departamento: Cusco

Provincia : Urubamba

Distrito : Chinchero

➤ **Ubicación geográfica:**

El distrito de Chinchero está físicamente ubicado en las siguientes coordenadas geográficas:

Latitud Sur: 13°24'30''

Longitud oeste: 72°03'15''

(Fuente: Plan Maestro del parque arqueológico de Chinchero INC, 2005)

1.2. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

➤ **Hidrografía:**

Tomando en cuenta como criterio base las líneas divisorias de aguas, se pueden distinguir en Chinchero tres sub zonas: **La cuenca de Piuray** que se ubica a 3750 m.s.n.m. que converge en la laguna del mismo nombre. **La cuenca de Waypo**, que es una meseta con pendientes relativamente poco pronunciadas y **la cuenca del Cachimayo**, que desagua hacia el río Cachimayo. **(MVCS, 2006).**

- Los sectores de San José y Muyuri de la comunidad de Huaypo se encuentran hidrográficamente en la cuenca de Huaypo, el suelo agrícola muestreado en San José se encuentra muy cercano a la laguna de Huaypo.
- Los sectores de Piuray y K´jambu pertenecientes a la comunidad de Ayllopongo, se encuentran en la cuenca de Piuray, en alrededores a la laguna del mismo nombre.
- Los sectores de Q´uerapata y Huatata pertenecientes a la comunidad de Yanacona, hidrográficamente se ubican dentro de la cuenca de Cachimayo.

➤ **Ecología:**

Chincheró está rodeada de una fitocolocación homogénea que según la época es de tendencia predominantemente verde o amarilla. Es una zona de lagunas y con una formación relativamente plana que modela parte de las pampas de Anta. El poblado es de origen incaico que recibe la custodia del nevado Chicón y cuyo nombre se originaría en la voz quechua *sinchi*, que significa “hombre valiente”. Ecológicamente se encuentra en la región quechua y puna (MVCS, 2006; Valcárcel, 2005).

1.3. CLIMATOLOGÍA

En los meses de junio, julio y agosto la estación es seca y fría, con días claros y soleados; las noches son frías y en las madrugadas puede haber heladas. En setiembre, octubre y noviembre se producen lluvias cortas, generalmente en las tardes y hay más nubosidad, los días son menos secos. En diciembre aumenta la nubosidad y empieza la estación lluviosa de precipitaciones máximas que se extiende a los meses de enero, febrero, marzo y abril, decreciendo gradualmente. Su temperatura media anual es de 5°C, las temperaturas más altas se dan en los meses de diciembre y marzo, mientras que las más frías se manifiestan en los meses de junio y julio con temperaturas menores a 0°C. Estas diferencias extremas de temperatura contrastan con el inmediato valle de Urubamba, el cual es más templado (MVCS, 2006).

1.4. FLORA

Se observa escasa vegetación arbustiva y arbórea nativas, sobresalen las especies arbóreas introducidas, como el eucalipto. La vegetación arbustiva de la laguna de Piuray es relativamente escasa, pero con dominio de la especie *Scirpus totora*.

- Las especies de flora cultivadas son: papa, habas, arvejas, tarwi, maíz, avena, trigo, oca, quinua, ñu, rocoto, sauco, etc.
- Algunas especies se utilizan con fines medicinales como el eucalipto (*Eucalyptus sp*), ortiga (*Urtica urens*), Q'eto Q'eto (*spicatum de Gnaphalium*), panty (*Cosmos Peucedanifollius*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), chicchipa, sotoma, huila huila, maicha pampa anis, chiri chiri, diente de león, orégano, hierba buena, llantén, anís, camu camu, estrella quisca, ajo, capuli, jampi rosas, valeriana, altea, malva, Ocororu berro, Yawar chonca, Llantén, anís, paico y Mutuy.
- Entre las especies arbustivas y maderables se tiene: Tayanca, chilca, llulli, tancar, cheche, roq'ë, Q'ëlle, mutuy, capuli, queuna, chachacomo, tasta.

(Tomado de Valcárcel, 2005).

1.5. FAUNA

- Algunas especies registradas en pajonal de puna (3 900 a 4 500 m de altitud) son: Atoc, zorro, venado, gato montés, cuy silvestre, zorrino, y Aves como el alkamari piccholin, killichu, kechali, dormilona, canstero lluto.
- Las especies observadas en comunidades arbustivas (3 5000 a 4 000 m de altitud) son: reptiles como Machajhuay, Aves como el seshlio, kjallwa, checcollo, chayna, Jacachu, quellopesco, pichinco, chicherique, pitajo, chiguaco, canastero, huascar kente, ccullco, urpi, upapesko, etc.
- Entre las especies registradas en las comunidades arbóreas del lugar se tiene: Atoc (zorro andino), zorrino, paloma, utallaque, quellopesco seshilio, piccholin, pichinco, kechalli, aguilucho, canastero, sihuar kente, tuco, inchu, etc.
- Las especies observadas en campos cultivados (3 350 a 3 850 m de altitud) son los ratones y una vasta cantidad de aves: lequecho, paloma, killichu, jacachu, chiguaco, atallaque, pisaca, chayna, upapesco, alcamari, pichinco, seshlio, etc. Además de algunos ganados como vaca y ovejas.
- En el Hábitat acuático principalmente en la laguna de Piuray (3 790 m) se tiene la presencia de una diversa ornitofauna como el zambullidor, alkamari, cormoran, gallineta, polla de agua, Chocca (*Fulica ardesiaca*), diversos patos silvestres (*Anas flavirostris*, *Anas goorgica*), gaviota andina (*Larus serranus*), yanavico, garza blanca, garza, huallata, entre otros; también se encuentran peces como el carachi y anfibios como el sapo.

(Tomado de Valcárcel, 2005).

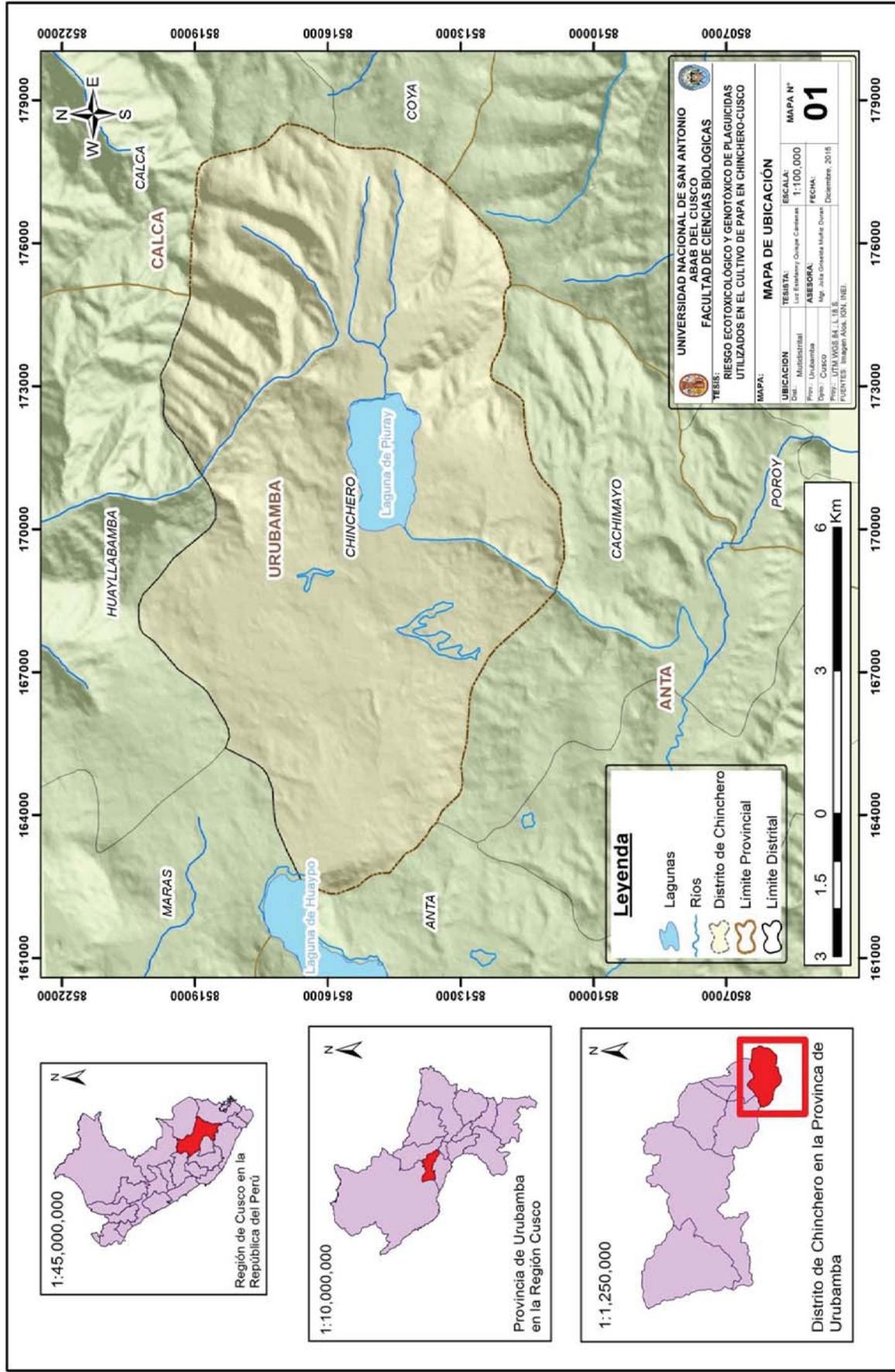


Figura 6. Mapa de ubicación del área de estudio

2. MATERIALES

2.1. MATERIALES DE CAMPO

- Libreta de apuntes
- Nevera cooler portátil.
- Bolsas plásticas
- Plumón indeleble
- Barbijos
- Badilejo
- Regla milimetrada
- Guantes estériles
- Bolsas ZIPLOC
- GPS
- Mapa Base de la Zona de estudio.
- Cámara fotográfica
- Balanza

2.2. MATERIALES DE GABINETE

2.2.1. Material biológico y muestra problema

- Muestras de suelos procedentes de las comunidades de Yanacóna, Huaypo y Ayllopongo.
- *Eisenia sp.*
Procedencia: Distrito de Yucay, Urubamba.
- *Vicia faba* - rojo chec'che (ecotipo).
Procedencia: Comunidad de Cuchuma, Distrito de San Pedro, Canchis.

2.2.2. Material de laboratorio

❖ *Materiales de vidrio*

- Probetas graduadas de 500, 100, 50 y 10 ml
- Matraz de 500ml, 100ml, 50ml
- Envases de 1 Lt.
- Pipetas graduadas (de 5ml, 10 ml)
- Pipetas de plástico de 5 ml
- 45 Placas Petri grandes
- Láminas porta y cubre objetos
- Placas Petri tamaño normal
- Lunas de reloj

❖ *Equipos:*

- Microscopio óptico
- Refrigeradora
- Laptop
- Cámara fotográfica
- Horno
- Balanza analítica

❖ *Reactivos:*

- Etanol de 96°
- Ácido acético glacial
- Solución Carnoy (etanol: ácido acético 3:1)
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Orceína acética clorhídrica al 1%
- Stermin (metamidofos)

❖ *Otros:*

- Cuaderno de apuntes
- Bandejas de plástico
- Parafilm
- Vasos grandes de polietileno
- Mortero
- Bisturí
- Cronómetro
- Cinta masking
- Algodón
- Papel aluminio
- Vasos descartables pequeños
- Vasos descartables medianos
- Envases rectangulares de plástico 23cm x 17cm x 8cm
- Suelo neutro (musgo, arena, arcilla y cal)
- Cintas para medir pH
- Plumón marcador
- 3 rollos de Papel toalla
- Vernier
- Guardapolvo
- Guantes
- Mascarilla con filtro
- Lentes de seguridad
- Balde de 10 Lt.
- Mechero
- Pinzas

3. METODOLOGÍA

3.1. DISEÑO METODOLÓGICO

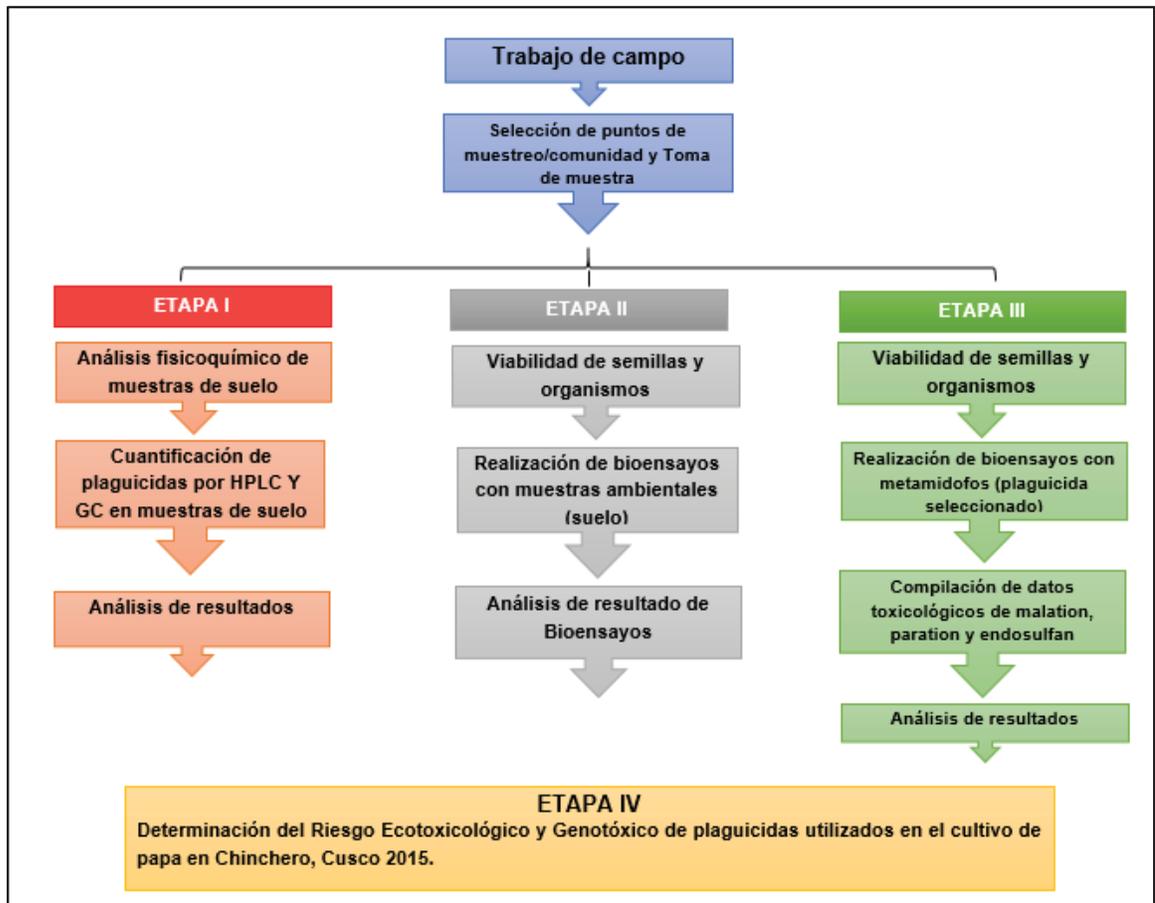


Figura 7. Flujograma de Estrategia Experimental.

Siguiendo el Flujograma presentado en la Figura 7, para cumplir con los objetivos de esta investigación el trabajo se organizó en 4 etapas:

- **I ETAPA:** Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo y cuantificación de plaguicidas (OC, OF y CBM) por análisis GC-FID de OF y OC, y análisis HPLC-DAD de CBM en las muestras de suelo colectadas en el área de estudio.
- **II ETAPA:** Se realizaron las pruebas de toxicidad con las muestras de suelo provenientes del distrito de Chinchero en 2 organismos de prueba *Eisenia sp.* y *Vicia faba*.

- **III ETAPA:** Se seleccionó 1 plaguicida de los encontrados en la evaluación de las muestras de suelo provenientes de Chinchero (metamidofos), y se procedió a realizar pruebas de toxicidad a diferentes concentraciones empleando como organismos de prueba a *Eisenia sp.* y *Vicia faba*. Así mismo se elaboraron tablas de resumen con los datos toxicológicos (NOEC, NOAEL) de Malation, Paration y Endosulfan en base a revisión bibliográfica de confiabilidad.
- **IV ETAPA:** Se determinó el riesgo ecotoxicológico y genotóxico, en base a los datos obtenidos en la etapa I y en la etapa III, mediante la determinación del Cociente de riesgo (CR) para los plaguicidas metamidofos, malation, paration y endosulfan.

3.2. VARIABLES

En la investigación se realizaron pruebas de toxicidad con las muestras de suelo y con el plaguicida metamidofos, siendo las variables las presentadas a continuación:

3.2.1. PRUEBA DE TOXICIDAD CON MUESTRAS DE SUELO:

Variables independientes:

- Muestras de suelo provenientes de 3 comunidades de Chinchero (Yanacona, Huaypo y Aylopongo).
- Concentración en ppm del plaguicida Metamidofos (14 concentraciones y 1 control).

Variables dependientes:

- Mortalidad en *Eisenia sp.*
- Pérdida de peso en *Eisenia sp.*
- Evasión en *Eisenia sp.*
- Inhibición en la germinación de *Vicia faba*
- Inhibición de la elongación radicular de *Vicia faba*
- Frecuencia de Micronúcleos (%MN) en *Vicia faba*

Constantes:

- N° de muestras ambientales (6 muestras de suelo)
- N° de individuos/semillas (10 por cada muestra y por réplica).
- N° de réplicas: 3

3.3. ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

Al seleccionar un sitio deben tomarse en cuenta los objetivos del estudio, datos requeridos y métodos de muestreo a utilizar. Por lo que, para este trabajo de investigación se realizó el *muestreo dirigido o selectivo* detallado en la Guía para muestreo de Suelos (MINAM, 2014), teniendo como base las observaciones y antecedentes de investigaciones realizadas en el mismo área de estudio, así como también información sobre las comunidades que cultivan mayormente papa, considerando además la ubicación, accesibilidad y colaboración voluntaria de los agricultores. Las áreas de muestreo seleccionadas en cada comunidad, se eligieron bajo los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:** Cultivos de papa, campaña 2015, producto para venta.
- **Criterios de exclusión:** Cultivos de otros productos, áreas de cultivos (chacras) pertenecientes a un mismo agricultor y producto para autoconsumo.

Este tipo de muestreo es recomendado por Mejías y Jerez (2006); pues además permite hacer un estudio detallado de las condiciones en las que se encuentran las áreas seleccionadas con un mínimo número de muestras.

Se consideraron 6 puntos de muestreo distribuidos en diferentes Sectores de 3 comunidades, los que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ubicación de puntos de muestreo en el distrito de Chinchero

CODIGO*	Comunidad	Sector	Coordenadas UTM (Punto central de parcela)	Altura (m.s.n.m.) ± 2m
SCHY01	Yanacona	Q´uerapata	8518193 N 819557 E	3785
SCHY02	Yanacona	Huatata	8519772 N 814779 E	3746
SCHH03	Huaypo	San Jose	8516779 N 813451 E	3569
SCHH04	Huaypo	Muyuri	8514285 N 817228 E	3777
SCHA05	Ayllopongo	Piuray	8514130 N 819421 E	3729
SCHA06	Ayllopongo	Kjamu	8516331 N 819803 E	3801

*Los códigos para las muestras se determinaron en base a su procedencia y número de muestra: SCHY01, donde (S) corresponde a muestra de suelo, (CH) procedente del distrito de Chinchero, (Y) proveniente de la comunidad de Yanacona y (01) correspondiente al número de muestra.

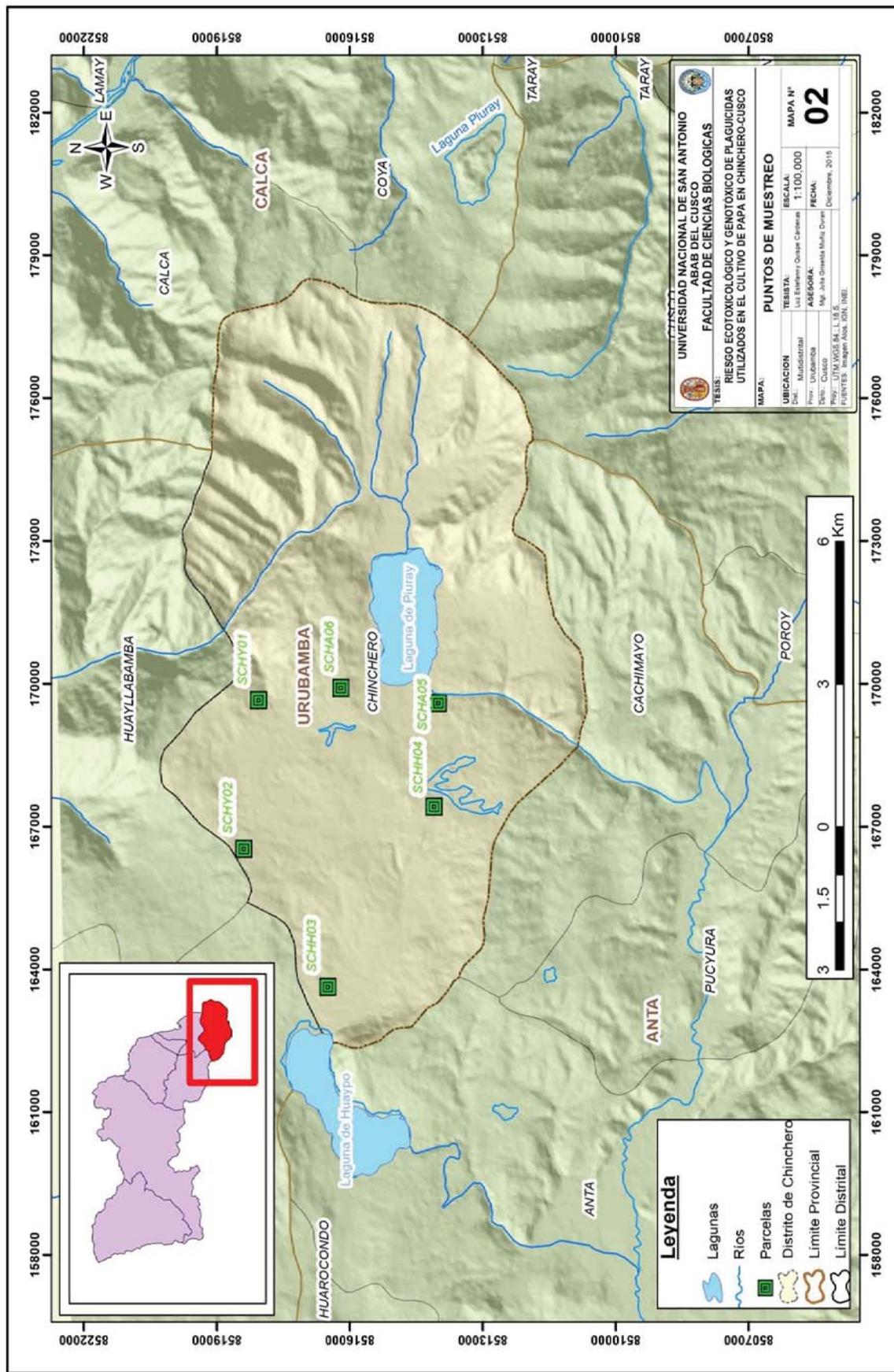


Figura 8. Mapa de ubicación geográfica de los puntos de muestreo

3.4. TIPO DE MUESTREO

El tipo de muestra que se tomó fue *superficial compuesta*, que es el tipo normal de muestra en estudios de contaminación y toxicidad por plaguicidas en matrices ambientales (Mejías y Jerez, 2006; MINAM, 2014). Siendo que la cantidad de suelo a extraer era mínima, se colectaron submuestras de 1 kg de los 30 cm superficiales (MINAM, 2014) (Anexo 3) en 8 puntos dentro de cada área seleccionada (chacra de aproximadamente de 0.5 ha). Al final se realizó el cuarteo para reducir y obtener una muestra compuesta representativa, siendo necesario 4.5 Kg. por muestra.

Las muestras se colectaron el 4 de Setiembre del 2015, siguiendo el procedimiento descrito en la Guía para muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente del Perú (2014); complementando con la información contemplada en la Guía para la toma de muestras de residuos de plaguicidas en Agua, Sedimento y Suelo del Gobierno de Chile (2006).

Las muestras compuestas después del cuarteo requerido, se trasladaron en bolsas teflón oscuro hasta el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNSAAC, para garantizar las condiciones de oscuridad y no exposición a la luz solar hasta su análisis químico y empleo en la realización de los bioensayos. En la Tabla 4 se observa la distribución de la muestra total.

Tabla 4. Distribución de muestras para los análisis/bioensayos respectivos

Análisis/Bioensayos	Cantidad de muestra (Kg.) por punto de muestreo
Plaguicidas por HPLC* y GC**	1
Análisis Físicoquímico (color, humedad, pH, Materia orgánica, textura y conductividad)	0.5
Bioensayo en <i>Vicia faba</i>	1.5
Bioensayo en <i>Eisenia sp.</i>	1
Ensayo de Micronúcleos en <i>Vicia faba</i>	0.5
TOTAL	4.5 kg

*HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia/resolución

**GC: Cromatografía de gases

3.5. ETAPA I: Análisis fisicoquímicos y cuantificación de plaguicidas en suelos

3.5.1. Análisis fisicoquímicos adicionales:

En las muestras de suelo se determinaron algunas características físicas (Color, Textura, conductividad eléctrica) y químicas (potencial de hidrogeniones pH y materia orgánica (M.O.)). Dichos análisis se realizaron en el Laboratorio “Prestación de servicios en Análisis Químico – UNSAAC”, a cargo del químico Melquiades Herrera de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, empleando la siguiente metodología:

- Color: Por observación directa en campo (realizada por el investigador).
- Potencial de hidrogeniones (pH): Método potenciométrico
- Materia orgánica (M.O.): Método de Valoración con dicromato de potasio.
- Conductividad: Método de conductímetro.
- Textura: Determinación de contenido de arena, arcilla y limo por el Método de Densidades de Bouyucus. En base a los cuales se procedió a determinar las clases texturales del suelo mediante el uso del Diagrama textural de la USDA, información requerida por la Guía de Evaluación de Riesgos en la Salud y Ambiente del Perú. Ver Anexo 3, para ver el proceso de determinación de clase textural.

Adicionalmente se evaluó otro parámetro físico en las muestras de suelo, realizadas por el LABORATORIO FRAQTAL QUÍMICOS en la ciudad de Lima.

- Humedad: Método gravimétrico.

3.5.2. Cuantificación de plaguicidas residuales en muestras de suelo

Para la cuantificación de plaguicidas en las muestras de suelo (plaguicidas seleccionados en base a estudios realizados en la zona), se realizó mediante la prueba de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC - DAD) para la determinación de 3 CBM (Carbofuran, Metomilo y Aldicarb), y mediante la técnica de Cromatografía de Gases (GC – FID) para cuantificar 4 plaguicidas OC (Clorotalonil, Endosulfan b, DDT y Heptacloro) y 4 OF (Clorpirifos, Metamidofos, Malation y Paration). La identificación y determinación de estos plaguicidas fue realizada por el LABORATORIO FRAQTAL QUÍMICOS en la Ciudad de Lima.

3.6. ETAPA II: Estimación de la toxicidad de las muestras de suelo

Los bioensayos para esta prueba de toxicidad se realizaron en condiciones de laboratorio en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Profesional de Biología - Facultad de Ciencias de la UNSAAC.

3.6.1. Prueba de toxicidad directa con *Eisenia sp.*

La realización del bioensayo con este anélido siguió el método descrito por Cuevas *et al.* (2008) en el libro Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, con algunas adaptaciones debido a las características y condiciones del Laboratorio. Se utilizaron lombrices adultas, con el clitelo desarrollado de al menos tres meses de edad, procedentes del distrito de Yucay (Proveedor: Sr. Vidal Oscar Fernandez Baca). En las Figuras 9 y 10, se observa el esquema y procedimiento seguido para la evaluación de la toxicidad de las muestras de suelo con este organismo de prueba.

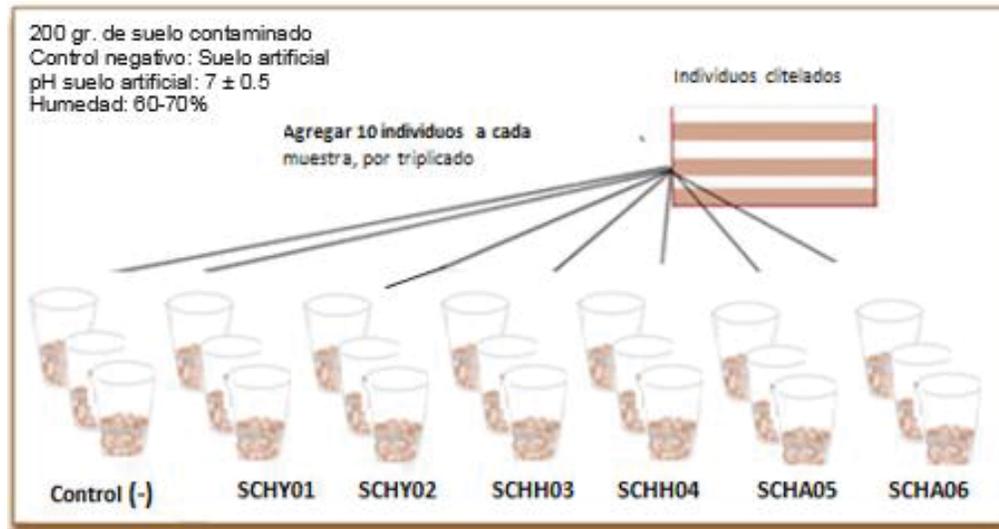


Figura 9. Esquema de Prueba de Toxicidad con *Eisenia sp.* para muestras de suelo.

*Control (-): Control negativo

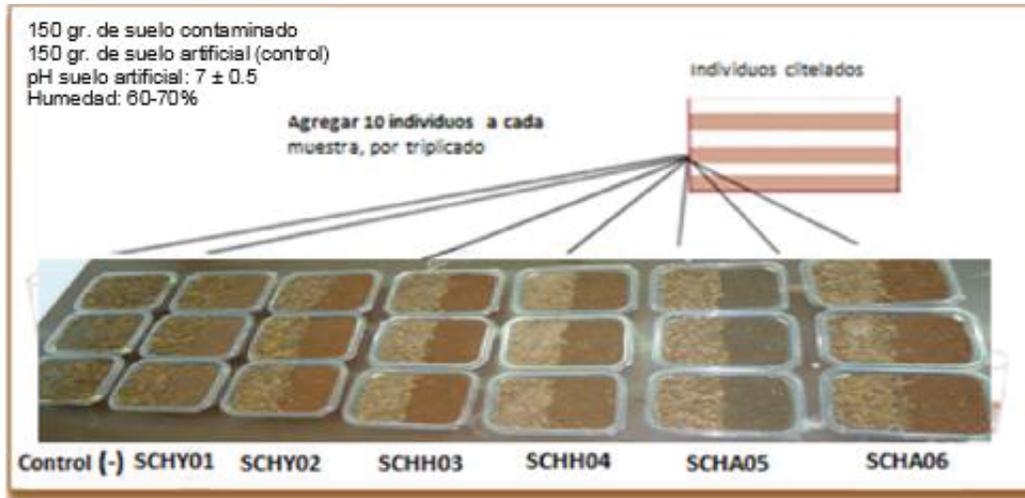


Figura 10. Esquema de Prueba de Evasión con *Eisenia sp.* para muestras de suelo.

*Control (-): Control negativo

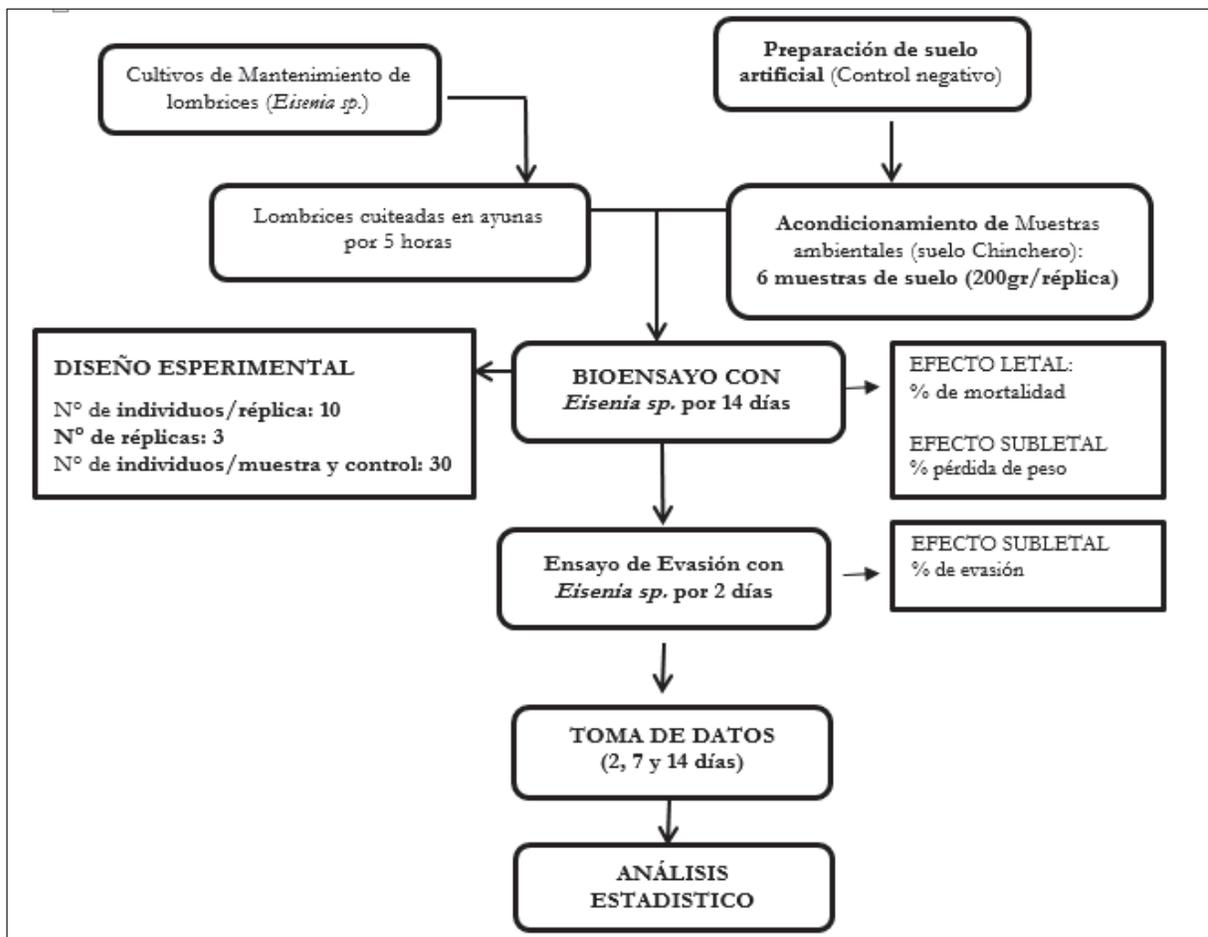


Figura 11. Flujograma de prueba de toxicidad directa en *Eisenia sp.* en muestras de suelo

Siguiendo el flujograma descrito en la Figura 11, se tiene:

➤ **Preparación del suelo artificial:**

Se siguió el protocolo descrito por Cuevas *et al.* (2008). Se empleó 10% de musgo, 20% de arcilla y 70% de arena y un poco de CaCO_3 para regular el pH a 7 ± 5 , se preparó 1.8 kg. de suelo artificial para esta prueba: 1200 gr. para la prueba de evasión y 600 gr. utilizados como Control negativo: C(-) en la prueba de toxicidad con *Eisenia sp* para evaluar mortalidad y % de pérdida de peso con las muestras provenientes del distrito de Chinchero.

➤ **Evaluación del efecto letal y subletal (Biomarcador de pérdida de peso).**

De acuerdo a lo descrito por Cuevas *et al.* (2008):

1. Se mantuvo las lombrices lavadas por 5 hrs. sobre papel toalla húmedo, para permitirles evacuar su contenido intestinal.
2. Se seleccionaron 10 lombrices cliteladas, lavadas y pesadas por réplica (3 réplicas para cada muestra de suelo).
3. En las muestras de suelo de cada punto de muestreo se retiró impurezas (restos vegetales y piedras).
4. Se depositó 10 lombrices pesadas en conjunto en vasos de polietileno conteniendo 200 gr. de la muestra ambiental (suelo) previamente hidratada al 60 a 70%, se cubrió con parafilm haciendo orificios pequeños para la adecuada oxigenación y para evitar la pérdida de la humedad.
5. Una vez iniciada la prueba, el contenido de humedad del suelo se mantuvo constante mediante el agregado de agua destilada (3ml cada 2 días).
6. Esta prueba se llevó a cabo a temperatura ambiental.
7. Transcurridos los primeros 7 días, se vació el contenido de cada recipiente en las bandejas y se registró la muerte de algún individuo y/o algún comportamiento extraño.
8. Al término de la prueba (14 días), se extrajo las lombrices de los recipientes y se registró el número de muertes.
9. Los resultados se consideran aceptables si en el control negativo la supervivencia es mayor del 90 %.

10. Para evaluar el Biomarcador de Actividad Biológica manifestado en el porcentaje de pérdida de peso, se lavaron y pesaron los 10 individuos por réplica y muestra de *Eisenia sp.* al finalizar el ensayo, se expresó en porcentaje con la siguiente fórmula:

$$\%P \text{ variación} = \Delta P_x \times 100 / P_{i_x}$$

Donde:

%P = Porcentaje de pérdida de peso
P_i = Peso inicial de 10 lombrices/réplica
P_f = Peso final de 10 lombrices/réplica
ΔP = Diferencia de peso= P_f – P_i

➤ **Evaluación del efecto subletal (Biomarcador de comportamiento - Evasión)**

Para la evaluación del biomarcador de actividad biológica manifestado por el comportamiento de evasión de las lombrices para evitar suelos contaminados se siguió el procedimiento descrito por Piola (2011):

1. Los recipientes de plástico de 10cm x 15cm x 7cm, fueron divididos en dos secciones utilizando un tabique de plástico; se colocaron 150 g de suelo control (que viene a ser el suelo artificial) en una sección y 150 g de cada muestra de suelo en la otra sección. En el experimento se incluyeron recipientes con el mismo suelo control en ambas secciones (control dual) para validar el ensayo.
2. El tabique fue posteriormente removido y se colocan 10 lombrices adultas en la línea central de la superficie de los suelos, dejando que penetren en el suelo. Los contenedores fueron cubiertos con parafilm con pequeños agujeros, permitiendo una suficiente oxigenación.
3. Al cabo de 2 días, los tabiques fueron reinsertados en el suelo en la parte central y se contó la cantidad de lombrices en cada compartimiento. En todos los casos se realizaron 3 réplicas, tanto de las pruebas control-suelo problema como del control-control (control dual).
4. Se halló el porcentaje de evasión (%E) con la siguiente fórmula:

$$\%E = (C - P) / (L \times 100)$$

Donde:

- **C:** N° lombrices en el control
- **P:** N° de lombrices en el suelo problema
- **L:** Total de lombrices expuestas

3.6.2. Prueba de Toxicidad directa con *Vicia faba*

Esta prueba de toxicidad directa con *Vicia faba* siguió el protocolo descrito por la EPA (Environmental Protection Agency), protocolo OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth (2012), con algunas adaptaciones debido a las características y condiciones del Laboratorio. Las pruebas se hicieron por triplicado para cada muestra y para cada control. Se utilizaron semillas de *Vicia faba* rojo chec´che (ecotipo) en óptimas condiciones y cultivadas de manera orgánica, procedente de la Comunidad de Cuchuma, Distrito de San Pedro, Canchis (Proveedor: Sr. Froilan Cumpa Conchacalla). En la Figura 12, se observa el esquema de esta prueba, en la que cada réplica constaba de 5 envases de análisis.

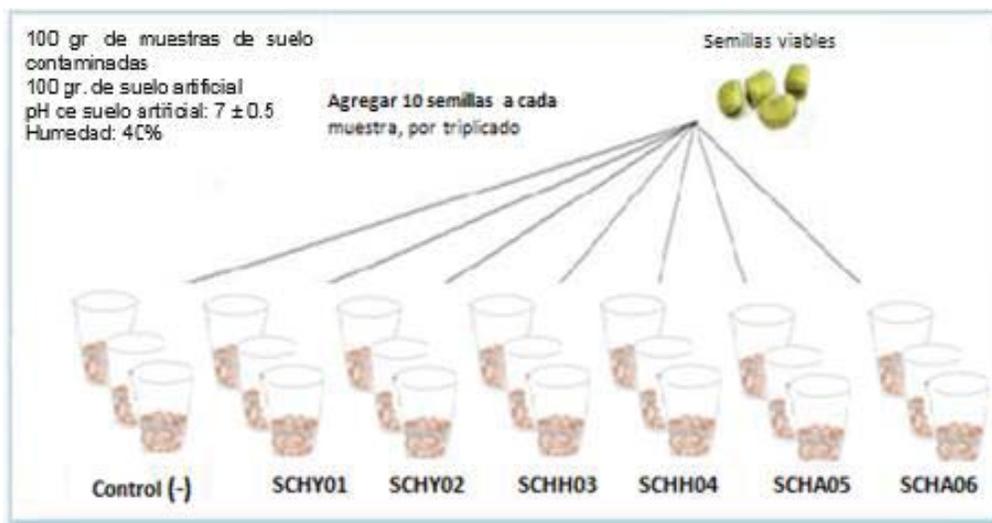


Figura 12. Esquema de la Prueba de toxicidad directa en *Vicia faba* para muestra de suelo.

Siguiendo el flujograma descrito en la Figura 13 que resume el procedimiento para esta prueba de toxicidad, se tiene:

➤ **Obtención de la semilla y viabilidad**

Las semillas de *Vicia faba* rojo chec´che (ecotipo), se compraron a un agricultor del Distrito de San Pedro, Canchis; puesto que para la realización de esta investigación era necesario emplear semillas orgánicas (sin empleo de agroquímicos durante su producción).

Previo a la prueba de toxicidad, se verificó la viabilidad de las semillas a utilizar con una prueba sencilla, colocando semillas de *Vicia faba* en agua, descartándose las que permanecían flotando en la superficie, y las que presentaban magulladuras.

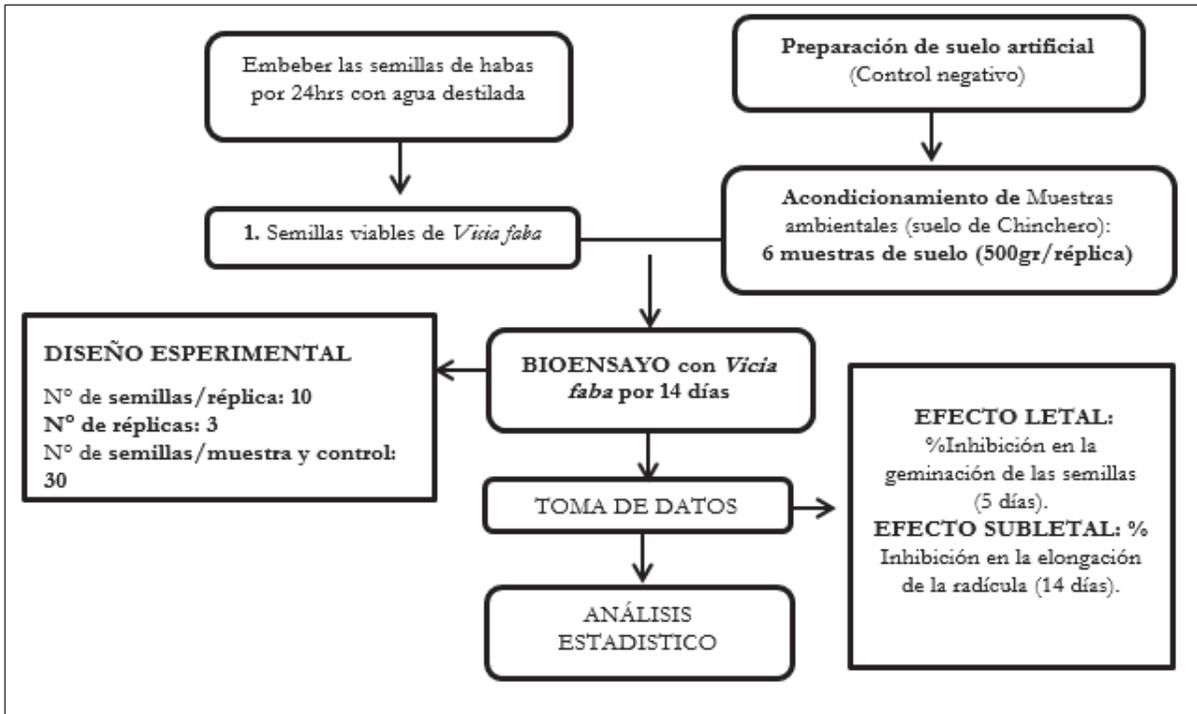


Figura 13. Flujograma de la prueba de toxicidad directa en *Vicia faba* en muestras de suelo.

➤ Evaluación del efecto letal (%IG) y subletal (%ICR)

1. Se escogieron las semillas de buen tamaño, sin ninguna magulladura o mancha procurando que tengan el mismo tamaño, se hidrató con agua destilada por 24 hrs., desinfectándolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min, para posteriormente lavarlas con agua destilada para eliminar los residuos del hipoclorito.
2. Se colocó 100gr. de cada muestra de suelo previamente hidratado al 40% con agua destilada en vasos medianos de polietileno, se repitió el procedimiento en 5 envases que conformaban una réplica en este estudio (total 15 envases por muestra). Se realizó por triplicado.
3. Se depositaron 2 semillas de haba hidratada y desinfectada en cada envase de polietileno, teniendo un total de 30 semillas por prueba.
4. Posteriormente se colocó en la cámara oscura a temperatura ambiente hasta que se observó un 65 % de germinación de las semillas del control negativo (5 días).

Después de este periodo, las plántulas se mantuvieron bajo un régimen de 16 h de luz y 8 de oscuridad.

5. Un crecimiento de la radícula mayor a 5 mm se consideró como indicador de la germinación. Diariamente se observaron las semillas germinadas y se anotó cualquier cambio visible como cambios en la coloración o necrosis de las hojas.
6. Al quinto día se evaluó la germinación de las semillas, tomando datos para determinar el porcentaje de Inhibición en la germinación (%IG) en *Vicia faba*, y se continuó con la prueba.
7. Durante toda la prueba se mantuvo un contenido de 40% de humedad del suelo. Para ello, cada 2 días se adicionaron 2 ml de agua destilada.
8. Los resultados se consideran aceptables si en el control negativo, la germinación era mayor del 90 %.
9. Para la evaluación del efecto subletal: biomarcador de actividad biológica manifestado en la inhibición del crecimiento radicular (%ICR) en *Vicia faba*, se midieron las radículas de las semillas al finalizar la prueba (a los 14 días), se halló el promedio de elongación por muestra de suelo y se comparó con el control negativo, de esta manera se obtuvo el %ICR con la siguiente fórmula:

$$\%ICR = (C - P) \times 100 / C$$

Donde:

- **%ICR:** Porcentaje de inhibición en el crecimiento radicular
- **C:** Elongación promedio en el Control(-)
- **P:** Elongación promedio en la muestra problema.

3.6.3. Estimación de genotoxicidad de muestras de suelo mediante el Test de Micronúcleos (MN) en *Vicia faba*.

El análisis genotóxico se realizó mediante el test de Micronúcleos siguiendo el protocolo para micronúcleos en raíces de *Vicia faba* y *Allium cepa* que fue establecido como un ensayo estándar internacional de acuerdo a la Guía para la evaluación genotóxica (MMAyA, 2014). Se empleó el mismo lote de semillas de *Vicia faba* adquirido al inicio de la investigación.

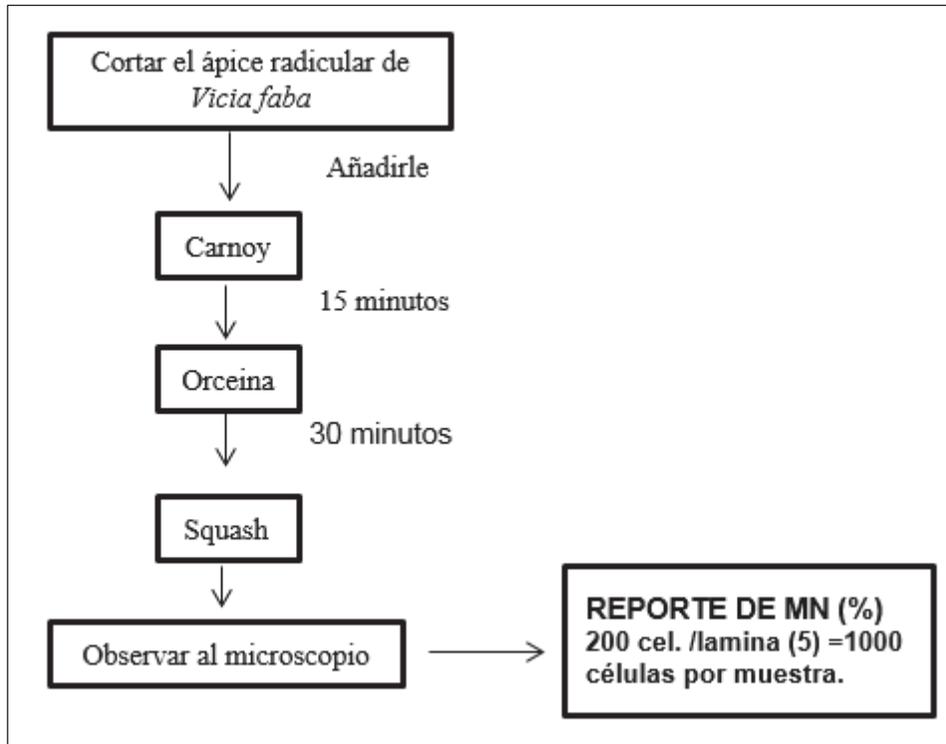


Figura 14. Flujograma del Test de Micronúcleos en *Vicia faba*

Siguiendo el flujograma descrito en la Figura 14, se tiene:

➤ **Obtención de semillas germinadas**

Se siguió el mismo procedimiento que en la prueba de toxicidad directa hasta la obtención de semillas germinadas en el quinto día, contando con 6 semillas por muestra de suelo y por control.

➤ **Preparación de la prueba**

1. Se cortó 5mm del ápice radicular en una luna de reloj.
2. Se fijó en Carnoy por 15 minutos.
3. Se coloreó con Orceína acética clorhídrica al 1% por 30 minutos. Durante este tiempo se sometió a calor hasta la expulsión de vapores cada 8 minutos.
4. Se cortó 2 mm del ápice y se colocó en un porta objetos.
5. Se realizó un squash colocando el cubreobjetos encima, y con la ayuda de la mano y un papel secante se ejerció presión, luego se hizo suaves golpeteos para obtener células dispersas.
6. Se observó al microscopio a un aumento de 100X en campos al azar.

➤ **Reporte de Micronúcleos (Daño al ADN)**

La presencia de Micronúcleos en las células se interpreta como la ocurrencia de daño al ADN como manifestación de un efecto subletal del organismo de prueba. Se contaron 200 células por lámina (5 láminas) haciendo así un total de 1000 células por cada muestra de suelo agrícola. Para la identificación de micronúcleos, se tomaron en cuenta aquellos con estructura redondeada, diámetro notoriamente inferior al núcleo principal, con una coloración similar y separación del núcleo principal (Zalacain, Sierrasesúmaga, y Patiño, 2005). La frecuencia de MN se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\%MN = (MN/ T) \times 100$$

Donde:

- **%MN:** Frecuencia de Micronúcleos
- **MN:** Número total de Micronúcleos
- **T:** # Total de células observadas (1000)

3.6.4. Análisis de datos

Con los datos obtenidos de efectos letales en los organismos de prueba: % de mortalidad y %IG (Inhibición en la germinación), así como de los efectos subletales: %pérdida de peso, %Evasión, %ICR (Inhibición en el crecimiento radicular) y %MN (Micronúcleos) producidas por las muestras de suelo, se analizó si existe o no diferencia en el nivel de toxicidad (ecotoxicidad y genotoxicidad) de cada muestra mediante el análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Duncan que agrupa las muestras de acuerdo a su nivel de toxicidad. Este análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS Statistics 22.

3.7. ETAPA III: Selección de plaguicida, realización de pruebas de toxicidad, y colección de datos ecotoxicológicos y genotóxicos

3.7.1. Selección de plaguicida:

El plaguicida fue seleccionado en base a los resultados de la determinación de plaguicidas en las muestras de suelo y a su categoría toxicológica. El plaguicida seleccionado fue el Metamidofos (Insecticida organofosforado), el obtenido comercialmente presenta las siguientes características tomadas de la etiqueta de venta:

- Nombre comercial: STERMIN 600
- Nombre común del ingrediente activo (ISO): Metamidofos 600 g/L
- Categoría: Altamente peligroso - tóxico
- Otros componentes: Dietilenglicol
- Nombre químico (IUPAC): O,S – dimethyl phosphoramidothioate
- Clase: Insecticida agrícola
- Grupo Químico: Organofosforado
- Fórmula empírica: $C_2H_8NO_2PS$
- Tipo de Concentración: Concentrado Soluble SL
- Color: Incoloro a ligeramente ambar
- Olor: Pungente
- Densidad: 1.2 – 1.3 g/ml
- pH: 2 – 4.5
- Estabilidad de almacenamiento: El producto es estable como mínimo 24 meses
- Registro Nacional: Registro N°321 – 96 – AG SENASA
- Titular del registro: Tecnología Química y Comercio (TQC)
- Importado y Distribuido por: Talex Perú S.A.C.

3.7.2. Determinación de concentraciones de Metamidofos para la prueba de toxicidad

Las concentraciones del plaguicida Metamidofos se seleccionaron con un factor de diferencia entre ellas de 2, partió desde la solución patrón del mismo plaguicida en cuya preparación se empleó 8.3 ml del plaguicida Stermin (conteniendo 4.98 gr de ingrediente activo) que se aforo con agua destilada hasta

1200 ml, obteniendo la mayor concentración de 5000 ppm. Se prepararon en total 14 concentraciones del plaguicida: 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1, 39.1, 19.53, 10, 5, 2, 1 y 0.5 ppm. Se contó además con un control negativo: Control (-) de agua destilada.

Los valores de referencia o “endpoints” importantes para la determinación del Riesgo ecológico se obtuvieron para el caso del metamidofos de manera experimental. Y para malation, paration y endosulfan de manera teórica.

3.7.3. Estimación de la ecotoxicidad y genotoxicidad del Metamidofos

Para la evaluación de los riesgos ecológicos, se llevó a cabo las pruebas de toxicidad con organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos, en este caso con *Vicia faba* (productor) y *Eisenia sp.* (Descomponedor) pertenecientes al mismo lote de semillas y al mismo cultivo de lombrices utilizados en la etapa II. El efecto buscado es la mortalidad y el parámetro ecotoxicológico es la concentración letal para el 50% de organismos (CL50), NOEC (*No Observed Effect Concentration*) y LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*). Se evaluaron además efectos subletales de pérdida de peso y evasión en *Eisenia sp.* y de Inhibición en el crecimiento radicular en *Vicia faba* con los cuales se halló el NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) y el LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) de acuerdo a lo señalado por Díaz *et. al.* (2004).

A. Prueba de toxicidad en *Eisenia sp.*

Cuando se realizan bioensayos se pueden realizar dos pruebas de toxicidad: Prueba de toxicidad directa con la muestra de suelo del área de estudio y la Prueba de toxicidad con diferentes concentraciones de la sustancia o xenobiótico a evaluar. Esta prueba de toxicidad con el xenobiótico, al igual que en la Prueba de toxicidad directa con *Eisenia sp.*, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Cuevas *et al.* (2008), con algunas adaptaciones debido a las características y condiciones del Laboratorio que fueron presentados en el ítem 3.6.1. de la ETAPA II. Se prepararon 22.5 kg de suelo neutro que se empleó en la realización de esta prueba de toxicidad.

➤ **Evaluación del efecto letal: Porcentaje de mortalidad**

Se empleó 200 gr. de suelo artificial por réplica, se utilizó cada concentración de plaguicida para hidratar las muestras al 60% (añadiendo 15 ml). Los experimentos se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo: Control (-) (agua destilada). Los valores de porcentaje de mortalidad permitieron hallar la Concentración a la cual muere el 50% de los organismos de prueba (CL50), NOEC y LOEC.

➤ **Evaluación del efecto subletal**

Los efectos subletales fueron evaluados para estimar los valores de NOAEL y LOAEL:

- Para el biomarcador de Actividad Biológica de Pérdida de peso, se tomaron los datos de peso inicial y final de las lombrices por réplica, comparando con el control negativo, valor que se expresó en porcentaje de acuerdo a la fórmula presentada en el ítem 3.6.1. Prueba de toxicidad directa con *Eisenia sp.* de este capítulo
- Para el biomarcador de comportamiento donde se evalúa la evasión, los resultados obtenidos se expresaron en % siguiendo la fórmula descrita en el ítem 3.6.1. Prueba de toxicidad directa con *Eisenia sp.* de este capítulo.

B. Prueba de toxicidad en *Vicia faba*

En esta prueba de toxicidad en la que se emplearon las diferentes concentraciones del plaguicida Metamidofos, se siguió el protocolo OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth (EPA, 2012), con algunas adaptaciones debido a las características y condiciones del Laboratorio. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada concentración y para el control. Se utilizaron semillas de *Vicia faba* en óptimas condiciones y cultivadas de manera orgánica.

➤ **Evaluación del efecto letal: Porcentaje de inhibición en la germinación (%IG)**

En la Figura 15 se observa la prueba de toxicidad realizada con el plaguicida metamidofos en las 14 diferentes concentraciones y control negativo con este organismo de prueba en base al protocolo descrito en el ítem 3.6.2 de este capítulo.

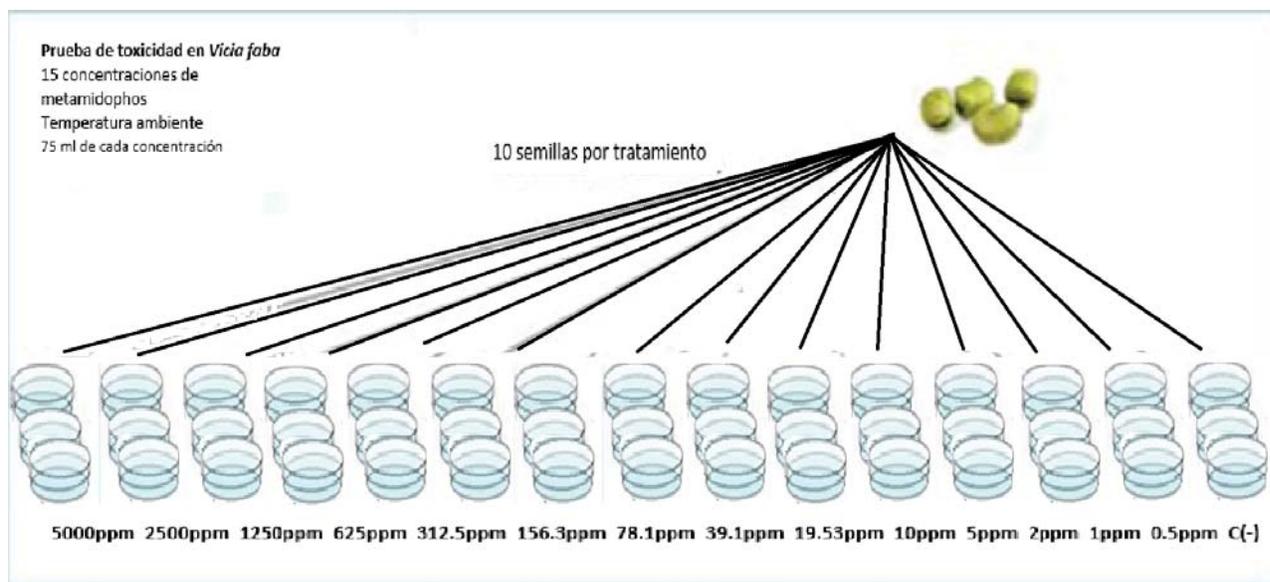


Figura 15. Esquema de la Prueba de toxicidad de metamidofos en *Vicia faba*

1. Se escogieron las semillas con buen tamaño, sin ninguna magulladura o mancha procurando que tengan el mismo tamaño y se hidrató por 1 día en agua destilada.
2. En cada placa Petri se colocaron discos de papel absorbente. Cada placa fue rotulada con la concentración de plaguicida correspondiente.
3. Se saturó el papel absorbente con 75 ml de cada concentración de metamidofos (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1, 39.1, 19.53, 10, 5, 2, 1 y 0.5 ppm).
4. Se colocó 10 semillas hidratadas en cada placa y se procedió a cerrarla y colocarla dentro de una bolsa plástica. Se realizó por triplicado.
5. Posteriormente se colocó en la cámara oscura a temperatura ambiente hasta que se observa un 65 % de germinación de las semillas del control negativo (5 días).
6. Un crecimiento de la radícula mayor a 5 mm se consideró como indicador de la germinación. Diariamente se observaron las semillas germinadas y se anotó cualquier cambio visible como cambios en la coloración o necrosis.
7. A los 5 días se evaluó el porcentaje de Inhibición de la germinación (%IG) para cada concentración de plaguicida, y se continúa la prueba hasta los 14 días.
8. Los resultados se consideraron aceptables si en el control negativo, la supervivencia era mayor del 90 %.

Con los datos de IG, se procedió a hallar los siguientes “endpoints” de acuerdo a Díaz *et. al.* (2004):

- CL50, que cuando se trata de semillas se habla de CI50 (Concentración que produce una inhibición en la germinación en el 50% de semillas sometidas a un tratamiento).
- NOEC (Concentración más alta a la que no se observan efectos).
- LOEC (Concentración más baja a la que se observan efectos).

➤ **Evaluación del efecto subletal en *Vicia faba*: Biomarcador de Actividad Biológica - Porcentaje de Inhibición en el crecimiento radicular (%ICR)**

Se continuó con la prueba luego de la evaluación de la germinación a los 5 días hasta los 14 días, donde se midieron las radículas por réplica y concentración de metamidofos. Con estos datos se halló el promedio de elongación radicular por concentración de plaguicida y se comparó con el control negativo, de esta manera se halla el %ICR con la fórmula descrita para este biomarcador en el ítem 3.6.2. Prueba de toxicidad con *Vicia faba* descrita en la ETAPA II del capítulo de Metodología.

Los valores de %ICR permitieron hallar la NOAEL (Nivel o concentración a la que no se observan efectos adversos) y LOAEL (Nivel o concentración a la que se observan efectos adversos), al compararlos con los valores de %ICR obtenidos en el control negativo de acuerdo a lo establecido por Díaz *et. al.* (2004).

C. Estimación de genotoxicidad del plaguicida metamidofos mediante el Test de Micronúcleos (MN) en *Vicia faba*.

El test de MN en *Vicia faba* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Gaytán J. (2006) para tratar las raíces de *Vicia faba* en las concentraciones del plaguicida; y el protocolo para micronúcleos en raíces de *Vicia faba* y *Allium cepa* descrito en la Guía para la evaluación genotóxica (MMAyA, 2014) para la coloración y observación de MN.

1. Se hidrataron 100 semillas en buen estado, sin magulladura del lote inicial (de semillas utilizadas en todos los bioensayos) por 24 hrs, y se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, enjuagando a chorro para quitar residuos del mismo.

2. Se colocaron las semillas entre 2 capas de algodón hidratadas con agua destilada en las placas Petri, se llevó a la cámara oscura para favorecer su germinación por 7 días.
3. Cuando las raíces alcanzaron una longitud de 2 – 4 cm de longitud (7 días) se separaron en 15 grupos: 1 tratamiento control y 14 tratamientos problema con las concentraciones del plaguicida.
4. Se escogieron las semillas con raíces largas, se colocaron en la superficie de vasos descartables pequeños que contenían la solución de plaguicida cubierta con papel aluminio en el que se hicieron pequeños agujeros que permitieron la entrada de la radícula de *Vicia faba*.
5. Se dejaron en reposo por 6 horas y se procedió a la coloración y preparación de las laminillas para observación de MN conforme a lo descrito en el ítem 3.6.3. Estimación de la genotoxicidad de las muestras de suelo mediante el Test de MN de la ETAPA II de este capítulo.
6. Con las concentraciones de plaguicidas siguientes: 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1 y 39.1ppm en las que se observó generación de MN se realizó una prueba adicional, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero prolongando la exposición por 48 hrs. de las raicillas de *Vicia faba* a las concentraciones de metamidofos antes mencionadas, al término del cual se procedió a colorear y preparar las láminas.
7. El reporte de Micronúcleos se expresó en %MN por concentración de plaguicida, de acuerdo a la fórmula descrita en el ítem 3.6.3. Estimación de la genotoxicidad de las muestras de suelo mediante el Test de MN de la ETAPA II de este capítulo.

D. Análisis de datos

- A partir de los datos obtenidos sobre efectos letales (% de mortalidad y %IG) en los organismos de prueba se determinaron la CL50 y CI50. Estos valores finales o “endpoints” se determinaron mediante el *software* suministrado por la US Environmental Protection Agency (US EPA): *Probit Analysis Program, version 1.5*, que analiza el porcentaje de efectos versus la dosis dentro del marco de la regresión.

- Así mismo, de acuerdo a lo señalado por Díaz *et. al.* (2004), se determinó la NOEC (Concentración más alta a la que no se observa efecto) y LOEC (Concentración más baja a la que se observa efecto) a partir de los datos de % de mortalidad y %IG mediante la prueba post hoc de Dunnet posterior a un análisis de varianza (ANOVA). Se halló además la NOAEL (nivel de concentración más alta a la que no se observa ningún efecto adverso sobre la población de estudio) y LOAEL (nivel de concentración más baja a la que se observa efecto adverso sobre la población de estudio) a partir de los datos de %MN (Micronúcleos) y %ICR (Inhibición en el crecimiento radicular) en *Vicia faba*, y de % Evasión y % pérdida de peso en *Eisenia sp.* La obtención de dichos valores se logra al comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control negativo (0 ppm), ello implica pruebas de hipótesis y se realizó mediante el Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por la prueba a posteriori o post hoc de Dunnet. Este análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS Statistics 22. Donde el máximo valor de significancia al comparar las concentraciones con el control negativo (0ppm) que es menor a 0.05, representa la LOEC/LOAEL; y el mínimo valor de significancia que es mayor a 0.05 representa la NOEC/NOAEL.

3.7.4. Compilación bibliográfica de datos de importancia ecotoxicológica y genotóxica de otros plaguicidas detectados en las muestras de suelo.

Para poder determinar el riesgo ecológico de otros plaguicidas presentes en las muestras de suelos de Chinchero además del metamidofos, se recurrieron a investigaciones en Bases de datos internacionales y a investigaciones extranjeras de confianza, de acuerdo a lo recomendado en la Guía de Evaluación de Riesgo a la Salud y al Ambiente (ERSA) del Perú. Se elaboró una tabla de resumen con los valores de referencia o “endpoints” de importancia como NOEC y LOAEL para la estimación teórica del riesgo final con los plaguicidas paration, malation y Endosulfan.

3.8. ETAPA IV: Estimación del Riesgo Ecotoxicológico y Genotóxico

Para la estimación del riesgo ecotoxicológico, se siguió el procedimiento detallado en la Guía para la evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) del estado Peruano (MINAM, 2015), la misma que menciona que el contenido de la ERSA puede ser adaptado dando mayor énfasis a los ítems de interés de acuerdo a la investigación realizada, lo descrito en la Guía de Evaluación y Gestión del riesgo (Tarazona, 2007) permitió adaptar el trabajo. En la Figura 16 se observa los pasos seguidos para la evaluación del riesgo.



Figura 16. Pasos básicos para la evaluación de riesgos a la Salud y el ambiente. Fuente: Guía ERSA – Perú, 2015

3.8.1. Definición del problema

En este paso se estableció relaciones entre diferentes parámetros observados en campo y con el análisis de información histórica del sitio, identificando la actividad que produce la contaminación del recurso suelo del área de estudio e identificando los contaminantes de preocupación (plaguicidas). Se desarrolló un modelo conceptual breve conteniendo información sobre: la evaluación cualitativa de la fuente, transporte (vía por la que se eliminan las sustancias químicas) y destino de los contaminantes en el ambiente y la identificación de las rutas y vías de exposición, con una descripción gráfica de los mismos, puesto que no es parte de los objetivos de la presente investigación.

3.8.2. Evaluación de la toxicidad

La evaluación de los posibles efectos adversos de los plaguicidas presentes en mayor concentración en las muestras de suelo de Chinchero sobre los organismos vivos se realizó mediante el análisis de los resultados de ensayos ecotoxicológicos realizados en el laboratorio para el caso de metamidofos, mediante el estudio de las relaciones entre los niveles de exposición y la respuesta esperada, para ello se utilizó los resultados de los bioensayos realizados en *Eisenia sp.* y *Vicia faba* obtenido en la ETAPA III, siendo estos: CL50, NOEC, LOEC, NOAEL y LOAEL.

Además, para el caso de malation, paration y endosulfan se utilizaron los valores de CL50, NOEC, LOEC, NOAEL y LOAEL recopilados de una revisión bibliográfica acorde a lo estipulado en la Guía ERSA del Perú (MINAM, 2015).

3.8.3. Evaluación de la exposición

La cuantificación de la exposición puede realizarse mediante la estimación del “peor caso teórico” donde se considera generalmente el caso extremo de liberación de un contaminante, y la del “peor caso real” donde la exposición es cuantificada por la estimación de las concentraciones del contaminante en el compartimento ambiental. En la presente investigación, se consideraron ambos supuestos: para el “peor caso teórico” se consideró una exposición igual a la dosis empleada en campo para el caso del metamidofos. Y para el “peor caso real”, se emplearon los datos obtenidos en la ETAPA I del diseño metodológico de la presente investigación sobre la concentración de estos plaguicidas presentes en las muestras de suelo del distrito de Chinchero, que expresan de forma precisa la concentración a la cual los organismos están expuestos en el medio después de las aplicaciones en campo. Estos valores permitieron comparar el Riesgo Ecotoxicológico y Genotóxico que la presencia de los plaguicidas metamidofos, malation, paration y endosulfan representan para la salud humana y el ecosistema en Chinchero al momento de ser liberado al ambiente en el caso de metamidofos, y 2 meses después de su última aplicación en campo para los cuatro plaguicidas en mención.

3.8.4. Caracterización del riesgo

Para la evaluación del riesgo se utilizó el Método de los Cocientes de Riesgos (CR) para identificar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos y la magnitud de los mismos, en el que se comparan concentraciones ambientales o de exposición al contaminante (plaguicida) con las concentraciones o niveles que originan efectos adversos lo suficientemente bajos como para proteger la salud humana y el medio ambiente (denominados “parámetros ecotoxicológicos” o “endpoints” según Tarazona (2007)); es decir se comparó los resultados obtenidos en la ETAPA I y la ETAPA III en el marco del diseño metodológico. En donde:

$$\text{CR} = \text{PEC} / \text{PNEC}$$

Donde:

- **PEC = Predicted Environmental Concentration:** Concentración ambiental del plaguicida (al momento de la aplicación en cultivo y 2 meses después de la última aplicación).
- **PNEC = Predicted Non Effect Concentration:** NOEC, NOAEL del organismo más sensible, se considera el NOAEL como criterio de mayor protección, en los casos de no contar con este valor se empleó la NOEC (valor menos sensible para la protección de la salud humana y medio ambiente).

Para la interpretación de los CR, de acuerdo a Sánchez (2008) se tiene que:

- **CR ≤ 1**, nivel a los que no se esperan efectos y se asume un riesgo suficientemente bajo como para ser aceptable.
- **CR (1-10)**, nivel a los que se esperan toxicológicos adversos, representa un riesgo moderado.
- **CR ≥ 10**, los niveles de exposición son mayores a los de efecto, lo que significa niveles que generan daños adversos sobre los organismos expuestos, representa un Riesgo alto.

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

1. ETAPA I: ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS

Las cuantiosas cantidades de plaguicidas utilizados primordialmente en la actividad agrícola para combatir plagas quedan distribuidos en el ambiente, estudios realizados en los Estados Unidos demostraron que el 99% de las cantidades aplicadas no alcanzaron los organismos que se desean combatir (García, 1997). Los residuales de plaguicidas en diferentes compartimentos pueden manifestar sus efectos toxicos de acuerdo a circunstancias específicas; por lo tanto, es de suma importancia la evaluación de la presencia y cantidad de plaguicidas en el suelo agrícola de Chinchero.

1.1. CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Los mecanismos que influyen en la persistencia y evolución de plaguicidas en el suelo pueden actuar solos o en combinación sobre la estructura de los diferentes productos específicos y dependen de otras variables, como humedad, temperatura, materia orgánica, tipo de arcilla, pH, así como de las características fisicoquímicas del compuesto de que se trate. (Sánchez y Sánchez,1984). Los parámetros evaluados fueron escogidos en función a su influencia con la biodisponibilidad y persistencia de los plaguicidas en los suelos, y fueron realizadas por el laboratorio de la Escuela Profesional de Química, la Tabla 5 muestra un resumen de la misma (Anexo 2 y 3).

Tabla 5. Características fisicoquímicas de suelos agrícolas procedentes de Chinchero

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS						
Parámetro/Muestra	SCHY01	SCHY02	SCHH03	SCHH04	SCHA05	SCHA06
Color*	Pardo	Pardo	Rojiza	Pardo	Oscuro	Rojiza
Textura						
Arena (%)	57	58	69	67	60	58
Limo (%)	35	38	25	29	33	38
Arcilla (%)	8	4	6	4	7	4
Humedad (%p/p)**	2,36	3,63	3,04	3,03	5,1	2,65
Materia orgánica (%)	3.60	3.92	3.70	4.20	2.80	3.40
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS						
pH	6.67	5.75	7.05	6.70	7.82	6.70
C.E. (mmhos/cm)	0.68	0.76	0.98	0.78	1.09	0.64

*Color: Observación directa en campo por el investigador

**Humedad (%p/p): Determinado por el Laboratorio FRAQTAL QUÍMICOS

Los resultados muestran que la coloración de los suelos provenientes de la comunidad de Yanacona (Quérapata y Huatata) y del sector de Muyuri en la comunidad de Huaypo son parduzcos. Los suelos del sector de San José de la comunidad de Huaypo y del sector de Kjamu perteneciente a la comunidad de Ayllopongo presentan una coloración rojiza, mientras que el suelo del Sector de Piuray de la comunidad de Ayllopongo presenta una coloración oscura con restos de caliza.

En cuanto a la textura del suelo, esta propiedad establece la capacidad del suelo para retener o liberar elementos a las fuentes de agua, ya sea por la escorrentía o por las aguas de drenaje interno (Ramírez D. H. *et. al.*, 2008). De acuerdo al diagrama textural de la USDA todos los suelos muestreados están dentro de la clase textural Franco arenosa, caracterizada por su alto contenido de arena (57 a 69%), y Limo (25 a 38%) y bajo contenido de Arcilla (4 a 8%). Este tipo de suelo no sería el más óptimo para la agricultura ya que los suelos arenosos no retienen la materia orgánica ni la humedad, y en épocas de lluvias puede dar lugar a la formación de charcos y escorrentías, transportando así con facilidad cualquier plaguicida contenido en dichos suelos hacia cuerpos de agua superficial y/o subterránea. En la Guía técnica de orientación al productor (MINAG) se reporta que los suelos franco arcillosos son los más óptimos para la mayoría de cultivos.

En lo referente a materia orgánica en las muestras de suelo, solo la muestra proveniente de Muyuri (SCHH04) se encuentra en el rango ideal de 4 a 6% (MINAG, 2011) con un valor de 4.20%. Las demás muestras se encuentran por debajo de este rango, donde la muestra de Piuray (SCHA05) tenía el más bajo contenido de materia orgánica con un 2.80%. Es importante considerar que las arcillas y materia orgánica son compuestos coloidales que tienen altas cantidades de intercambio catiónico, por lo que influyen sobre el equilibrio de adsorción de los plaguicidas en los suelos, se ha reportado que en suelos con abundante materia orgánica los plaguicidas no se descomponen fácilmente; la textura del suelo es otro factor importante, puesto que en suelos arcillosos los plaguicidas quedan atrapados entre las partículas, y en ambos casos se favorece su retención (Sánchez y Sánchez, 1984).

Respecto a la humedad relativa de las muestras, como era de esperarse debido a la clase textural de los mismos, todas eran bajas con un valor mínimo de 2.36% en Quérapata (SCHY01) y un valor máximo de 5.1% en Piuray (SCHA05). Las muestras con alto contenido de arena no retienen muy bien el agua, por lo que la presencia de plaguicidas en el mismo podría alcanzar las aguas subterráneas por filtración.

En cuanto al pH, la mayoría de las muestras presenta un valor de pH dentro del rango óptimo reportado por el MINAG (2011) de 5.5. – 7, rescatando que la muestra con pH más bajo es la procedente de Huatata (SCHY02) con 5.75. La muestra proveniente de Piuray (SCHA05) presentaba un pH ligeramente alcalino de 7.82 siendo el único valor encontrado fuera del rango ideal.

La conductividad eléctrica es un parámetro relacionado a la presencia de electrolitos (iones) que son capaces de conducir electricidad, en las muestras procedentes del distrito de Chinchero se observaron valores que van desde 0.64 mmhos/cm en el sector de Kjamu (SCHA06), a valores de 1.09 mmhos/cm en Piuray (SCHA05).

1.2. CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS RESIDUALES EN MUESTRAS DE SUELO

En base a los resultados obtenidos en la determinación de los plaguicidas en las muestras de suelo provenientes del distrito de Chinchero (Anexo 1), se elaboró la Tabla 6, en el que se observa que de los 11 plaguicidas analizados 7 fueron detectados, siendo estos los organoclorados (OC) DDT, heptacloro, clorotalonil y endosulfan b, y los organofosforados (OF) malation, metamidofos y paration; quedando demostrado así el poder persistente de los OC que a pesar de que su uso fue prohibido hace más de una década en el país se encuentran aún residuos de los mismo, así como la persistencia de algunos OF no tan corta como se presume. Además de no encontrarse ningún plaguicida del grupo carbamato, los cuales según Pauta (2014) no tienden a adsorberse en suelos y sedimentos, y son menos persistentes que los OC y OF y fácilmente biodegradables por microorganismos.

El término “persistencia” ha sido empleado para definir el tiempo que permanece un plaguicida en el suelo manteniendo su actividad biológica. Las consecuencias de la persistencia pueden ser muy importantes, dependiendo de la toxicidad del plaguicida y de su biodisponibilidad (Sánchez y Sánchez, 1984).

Tabla 6. Determinación de plaguicidas residuales en muestras de suelo de Chinchero.

N°	Componente activo del plaguicida	Clasf.	Muestras de suelo						ECA (ppm) *	Stand. (ppm) **
			SCHY01	SCHY02	SCHH03	SCHH04	SCHA05	SCHA06		
1	Paration	OF	1.2	3.02	2.41	0.68	1.83	0.92	0.37	
2	Metamidofos	OF	1.15	ND	1.9	1.3	ND	ND	0.003	
3	Malation	OF	5.33	3.96	2.62	4.5	6.25	3.73	1.2	
4	Clorpirifos	OF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.18	
5	Clorotalonil	OC	0.124	0.281	<0.06	0.243	<0.06	<0.06	0.44	
6	Heptacloro	OC	ND	0.042	0.055	0.014	0.03	0.018	0.01	
7	DDT (Diclorodifenil tricloetano)	OC	0.56	0.28	0.04	ND	0.01	ND	0.7	
8	Endosulfan-b	OC	ND	0.374	ND	0.412	ND	ND	0.37	
9	Metomilo	CBM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.044	
10	Aldicarb	CBM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.061	
11	Carbofuran	CBM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.31	

OF: Organofosforado, OC: Organoclorado, CBM: Carbamato,

*ECA Suelo para Perú.

** Estándar de suelos para Canadá (Agricultural, Urban Park, Residential Soil Standard)

Los plaguicidas que se encontraron en el 100% de las muestras de suelo son el paration, malatión y clorotalonil. El malation es el plaguicida con mayor cantidad residual en suelo, presente en relativa menor cantidad en el sector de San José (SCHH03) con 2.62 ppm, y en una mayor concentración en el sector de Piuray (SCHA05) con un valor de 6.25 ppm y un pH de 7.82, esta alcalinidad en la muestra no óptima para cultivos se debería primordialmente a la acumulación de plaguicidas como el malation presente en elevada concentración en esta muestra, puesto que los plaguicidas tienden a alcalinizar los suelos (Sánchez y Sánchez, 1984), además por la presencia de óxido de calcio (cal) en el mismo.

En cuanto al paration, está presente en mayor cantidad en el sector de Huatata (SCHY02) con un valor de 3.02 ppm y en menor cantidad en Muyuri (SCHH04) con 0.68 ppm, esta muestra posee un bajo contenido de arcilla (4%) y pH de 5.75 por lo que otros factores estarían favoreciendo la retención de plaguicidas OF como paration, malation y otros OC.

El metamidofos se detectó en el 50% de las muestras, se encontró 1.15 ppm en el sector de Querapata (SCHY01), mientras que en los sectores San José (SCHH03), y Muyuri (SCHH04), se encontraron 1.9 ppm y 1.3 ppm respectivamente. Muñiz (2012) reportó la presencia de este plaguicida en la papa cultivada en la comunidad de Yanacona entre 0.23 a 0.47 ppm, lo que evidentemente refleja una contaminación del recurso suelo por el mismo, demostrado en esta investigación.

Respecto al clorotalonil, herbicida encontrado en todas las muestras pero en menor concentración comparado a los organofosforados, se detectaron valores menores a 0.06 ppm en los sectores de San José (SCHH03), Piuray (SCHA05) y Kjamu (SCHA06), a un valor máximo de 0.281 ppm en Querapata (SCHY01). No se reportó presencia de residuos de este plaguicida en la papa cultivada en la comunidad de Yanacona por Muñiz (2012), debido probablemente al uso no tan intensivo de este plaguicida que es reflejado en la poca concentración residual del mismo en el suelo agrícola. El plaguicida endosulfan en su isómero β fue detectado en los suelos del sector Huatata - SCHY02 (0.374 ppm) y en el sector de Muyuri -SCHH04 (0.412 ppm). Así mismo, aun se encontraron residuos de los plaguicidas organoclorados heptacloro y DDT, en el rango de 0 a 0.055 ppm, y de 0 a 0.56 ppm respectivamente.

La Tabla 7 se elaboró en base al tipo de plaguicidas determinados en las muestras de suelo. En base a estos resultados, se deriva la siguiente información:

El malation es el plaguicida presente en mayor concentración en la totalidad de muestras. Es un insecticida acaricida calificado como moderadamente tóxico de amplio uso, cuya venta en el país es legal. Este plaguicida es poco persistente en suelo con una vida media de 1 a 25 días, siendo su velocidad de degradación dependiente del contenido de materia orgánica y del grado de adsorción a las partículas y puede constituir un riesgo de contaminación para las aguas subterráneas en sitios donde las condiciones no favorezcan su degradación (Bianchi, 2015). El paration, es un insecticida calificado como extremadamente tóxico, de venta prohibida en el Perú por R.J. N° 131-98-AG-SENASA, se mezcla fuertemente a las partículas del suelo y normalmente quedan en los últimos 15 cm superficiales del mismo, el tiempo de vida media del paration oscila entre 3-6 semanas pero sus residuos son detectables hasta 16 años después de su aplicación (Silva *et. al.*, s/f).

En el caso de los suelos franco arenosos de Chinchero, el muestreo fue realizado aproximadamente 1 mes posterior a la cosecha de papa y aun así se detectaron concentraciones relativamente altas de estos plaguicidas (malation y paration). Los valores elevados pueden ser resultado de una aplicación frecuente y en mayor dosis de estos plaguicidas lo que facilita su acumulación en el recurso suelo, además de que la textura de los suelos del lugar favorecen su adherencia a partículas del suelo y su persistencia en el ambiente. A pesar de la prohibición de venta del paration, su uso fue reportado por Marthos (2014) a través de encuestas en varias comunidades del distrito de Chinchero.

Respecto al plaguicida metamidofos presente en las muestras analizadas, de acuerdo a lo reportado por Marthos (2014) este plaguicida en sus formulaciones comerciales Lasser y Stermin, calificados como extremadamente tóxicos, son utilizados por agricultores de Chinchero en menor cantidad (8 a 17%) en comparación con el uso de otros plaguicidas. Por lo que se esperaría encontrarlo en mediana concentración, sin embargo es reportado por Ramírez *et. al.* (2008) que el Metamidofos en el suelo es poco persistente y es altamente móvil, ya que es adsorbido por el suelo en pequeñas cantidades y que además dada la rapidez de la degradación de la sustancia y alta movilidad, se lixivia en las capas del suelo, teniendo un valor de vida de 1.9 días en limo, hasta 10 a 12 días en suelo franco arenoso, lo que queda comprobado en este trabajo de investigación, pues pese a su aplicación continua por parte de los agricultores y de la textura franco arenosa de los suelos no existe acumulación del mismo, encontrándose cantidades no tan elevadas en los suelos analizados. Y en el caso de lixiviación facilitada por la textura de los suelos principalmente en época de lluvias, el metamidofos estaría alcanzando fuentes subterráneas de agua, o cuerpos de agua superficiales por escorrentía, lo que quedó demostrado por Tecuapetla (2014), donde se indica que existe movilidad de plaguicidas entre los compartimentos suelo y agua.

El Metamidofos es un plaguicida prohibido en muchos países bajo todas sus formulaciones y usos pues es nocivo para la salud humana y el medio ambiente, sin embargo en el Perú y algunos pocos países como México, Argentina, Bolivia entre otros es de venta Restringida, por lo que aún es utilizado ampliamente. La adsorción de plaguicidas por los coloides del suelo pueden modificar su actividad (inactivandolos, no pudiendo ejercer su efecto tóxico), persistencia (la aumenta cuando estas partes son desadsorbidas, entran de alguna forma en la cadena trófica y pueden ser nocivos a organismos diferentes a aquellos

para los que había sido destinado) y degradación (en algunos casos impidiéndola o retrasándola); además, las fracciones de plaguicidas que son adsorbidas o retenidas por los coloides presentes en el suelo (arcilla y materia orgánica) disminuyen su concentración en el mismo, estableciéndose un equilibrio entre las concentraciones de materia activa disuelta y adsorbida (Sánchez y Sánchez, 1984). Esta sería la razón por la cual el malation, paration y metamidofos (OF) fueron encontrados en mayor concentración en los suelos agrícolas de Chinchero, lo que además hace presumir de una cantidad igualitaria y/o mayor que pudo haber sido adsorbida por los coloides del suelo.

Así mismo, el Endosulfan es un plaguicida cuya venta está prohibida en el país desde el año 2001. Es categorizado como un insecticida altamente tóxico. El α -Endosulfán es menos persistente que el β -Endosulfán, esto justifica los resultados encontrados donde el isómero beta del endosulfan estaba presente en 2 de las muestras (SCHY02 – Huatata y SCHH04 - Muyuri). En el suelo es moderadamente persistente (vida media de 50 días), sobre todo a pH ácido, y la fracción adsorbida a las partículas puede persistir por años y es poco propensa a lixiviarse hasta las aguas subterráneas, además que si se adhiere a partículas en el suelo puede demorarse años en degradarse completamente (Yuquan *et. al.*, 2000), ésta sería la razón por la cual aún se encontró residuos de este insecticida, pues en el 2012 el SENASA prohibió la comercialización del mismo mediante la R.J. 013-2012-AG-SENASA, esto además indicaría que se utilizó Endosulfan, calificado como un Compuesto Orgánico Persistente (COP).

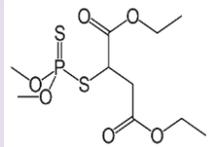
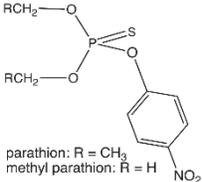
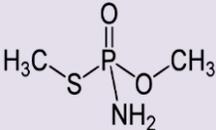
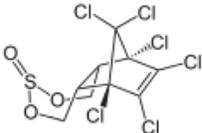
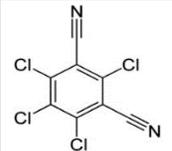
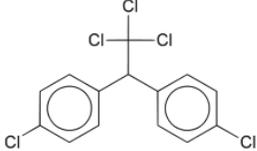
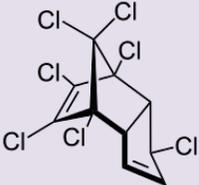
En cuanto al Clorotalonil, es un fungicida organoclorado moderadamente tóxico usado para combatir la racha de la papa (causado por el hongo *Phytophthora infestans*), se encontró presente en todas las muestras de suelo analizadas pero en bajas cantidades < a 0.28 ppm.

El dicloro difenil tricloroetano conocido como DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) y el heptacloro son insecticidas organoclorados clasificados como extremadamente tóxicos, que están prohibidos en el Perú por D.S. N° 037-91-AG (1991). El DDT y heptacloro se identifican como insecticidas de alta persistencia, en esta investigación se detectaron aún residuos de estos plaguicidas en los suelos después de 24 años de su prohibición.

Los plaguicidas carbamatos (aldicarb, metomilo y carbofuran) no fueron detectados en muestras de suelo. Según lo reportado por Marthos (2014), aldicarb y carbofuran son plaguicidas ampliamente usados en las diferentes comunidades de Chinchero en la producción de papa, por lo que estos resultados evidenciarían la rápida degradación de estos plaguicidas carbamatos y por ende baja persistencia de estos plaguicidas en los diferentes compartimentos ambientales, similar a lo encontrado por Pauta (2014).

En años recientes en el Perú se empezó a dar importancia a la protección y conservación del recurso suelo, es así que partir del año 2013 se publicaron los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelos, sin embargo dicha Resolución Ministerial contempla ECAs para 4 plaguicidas organoclorados como son: DDT, Heptacloro, Endrín y Aldrín, pero no se cuenta con ECAs para los demás plaguicidas OF y OC evaluados y detectados en las muestras. Por ello se recurrió a los estándares de calidad de suelo agrícola de Canadá para obtener valores referenciales en los casos donde no se conto con ECA del Perú (Tabla 6). En base a dicha información se elaboró las Figuras 17 y 18.

Tabla 7. Tabla de Característica de los plaguicidas cuantificados en las muestras de suelo del distrito de Chinchero

Principio Activo	Clase	Estructura	Categoría toxicológica
Malation	Insecticida		Moderadamente tóxico
Paration	Insecticida		Extremadamente tóxico
Metamidofos	Insecticida		Extremadamente tóxico
Endosulfan	Insecticida		Altamente tóxico
Clorotalonil	Fungicida		Muy tóxico
DDT	Insecticida		Extremadamente tóxico
Heptacloro	Insecticida		Extremadamente tóxico

Fuente: OMS (2010)

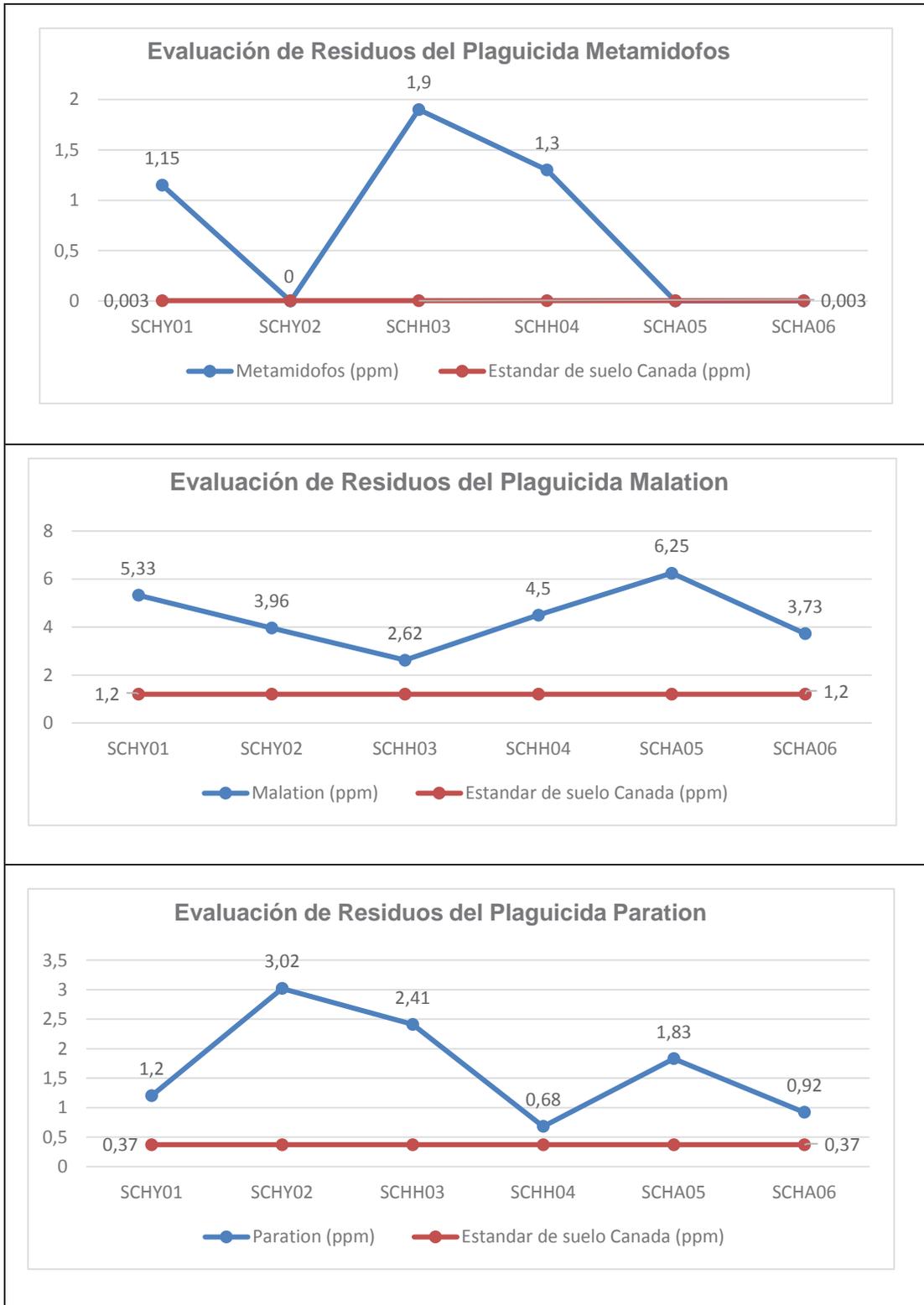


Figura 17. Evaluación de la contaminación por plaguicidas OF en suelos y estándares ambientales de plaguicidas en suelos

En la Figura 17 se observa el contraste entre los plaguicidas OF y sus respectivos estándares ambientales obtenidos de la normativa Canadiense. En el caso del metamidofos, se observa que de las 6 muestras de suelo analizadas 3 sobrepasaron los valores referenciales, muestras provenientes de Qúerapata (SCHY01), San José (SCHH03) y Muyuri (SCHH04). Debido al bajo valor del estándar en suelo de este plaguicida (0.003 ppm), se puede notar que la muestra de San José es superior en más de 600 veces al valor referencial ambiental. Respecto al malation, las 6 muestras analizadas superan el valor del estándar ambiental de 1.2 ppm, siendo la muestra de Piuray (SCHA05) con 6.25 ppm de malation la que excede en poco más de 5 veces el valor referencial. En cuanto al paration, las 6 muestras analizadas contienen residuales de este plaguicida y en todos los casos se supera el estándar ambiental de suelo (0.37 ppm), siendo la muestra de Huatata (SCHY02) con 3.02 ppm de este plaguicida la que excede en 8 veces el valor de referencia ambiental.

En la Figura 18, se observa el contraste entre los plaguicidas OC detectados y sus respectivos estándares ambientales del Perú para heptacloro y DDT, y de Canadá para clorotalonil y endosulfan. El clorotalonil fue detectado en las 6 muestras analizadas, sin embargo los valores son bajos y no superan el estándar ambiental para este plaguicida (0.44 ppm). En cuanto al endosulfan, dos de las seis muestras analizadas superan levemente los valores de referencia ambiental para el mismo (0.37 ppm), la muestra de Muyuri (SCHH04) presenta una mayor concentración de endosulfan- β con 0.412 ppm. Así mismo, el DDT está presente en cuatro de las muestras analizadas, pero en ningún caso sobrepasa los ECAs (0.7 ppm). En cuanto al heptacloro, este plaguicida estaba presente en 5 de las 6 muestras analizadas, aunque los valores detectados eran relativamente bajos, en todos los casos superó el ECA de 0.01 ppm, en la muestra proveniente de San José (SCHH03) el valor fue de 0.055, superando en al menos 5 veces dicho valor de referencia.

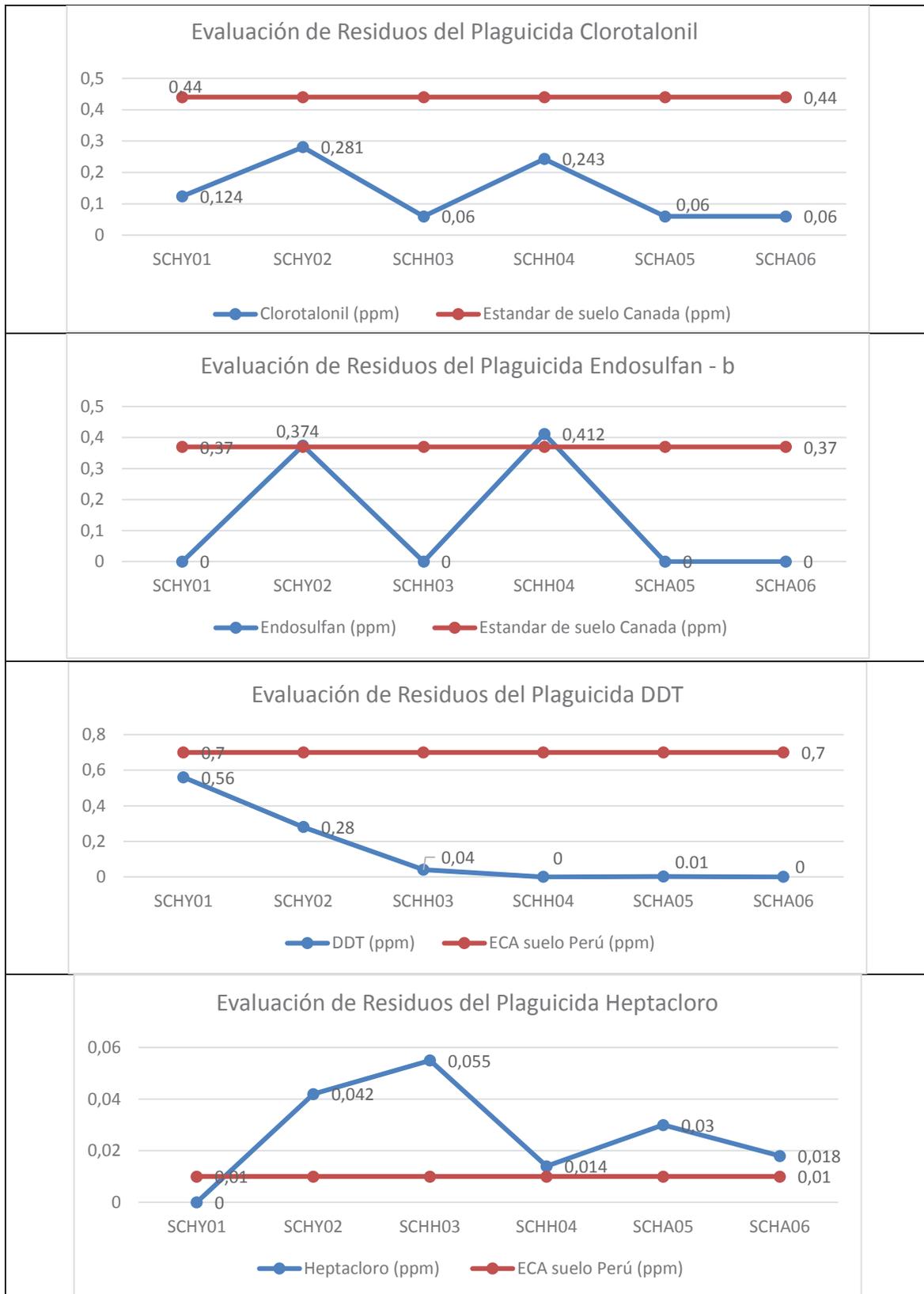


Figura 18. Evaluación de la contaminación por plaguicidas OC y estándares ambientales de plaguicidas en suelos

Además es importante mencionar que los suelos procedentes de los sectores Q´uerapata (SCHY01), Muyuri (SCHH04) y Kjamu (SCHA06) pasaron por un Maway, que es una práctica agrícola en algunos lugares de la zona, donde se rotan los cultivos y permiten que el suelo pueda descansar, por lo que después de 5 años se cultivó papa en esos lugares en el año 2015. Los suelos de los sectores de Huatata (SCHY02), San José (SCHH03) y Piuray (SCHA05) son suelos donde se cultiva continuamente papa, son suelos muy degradados y compactados, donde se sospecha un uso continuo de agroquímicos.

Además de los plaguicidas analizados y detectados en las muestras de suelo del distrito de Chinchero, existe un cantidad enorme de otros plaguicidas OF, CBM y Piretroides que fueron reportados por los agricultores de papa a través de encuestas realizadas por Marthos (2014) teniendo entre los más usados en el siguiente orden: Karate (lambdacialotrina) que es un Piretroide, Ridomil y Curzate (Mancozeb y otros) que son Ditiocarbamatos y finalmente Ciclon (Dimetoato) pertenecientes al grupo de los OF. Así mismo, es reportado por Muñiz (2012) la presencia de plaguicidas como Folpet, Tetrahidroftalimida, Metalaxil, Triadimefon e Imazalil en papa cultivada en Chinchero, lo que podría significar una posible presencia de residuales de estos plaguicidas en el suelo del lugar.

2. ETAPA II: ESTIMACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE SUELO

La estimación de la toxicidad de las muestras de suelo del distrito de Chinchero viene a ser de suma importancia, puesto que las poblaciones de organismos vivos están expuestas a mezclas complejas de sustancias tóxicas, entre ellas la aplicación de distintos plaguicidas en simultáneo y la presencia de aditivos en las formulaciones comerciales, en estas mezclas no se conoce las interacciones que puede existir entre cada uno de los mismos y las consecuencias en los efectos sobre los organismos. El efecto tóxico sobre los sistemas biológicos es ejercido por la acción combinada de dichas sustancias presentes en el suelo que afectan las condiciones de vida de los organismos, y la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico o prueba de toxicidad es el resultado de la interacción entre la sustancia o mezcla compleja y el sistema biológico (Ronco *et. al.*, 2004). Los efectos tóxicos producidos por la concentración residual de plaguicidas en suelo fueron evaluados mediante bioensayos con *Eisenia sp.* y *Vicia faba*. La combinación de las dos especies fue seleccionada para incluir diferentes grupos tróficos: un desintegrador y un productor.

2.1. PRUEBA DE TOXICIDAD DIRECTA CON *Eisenia sp.*

La lombriz de tierra *Eisenia sp.* es considerada un bioindicador de la calidad de suelo, y ha sido utilizada en bioensayos ecotoxicológicos para evaluar plaguicidas debido a que son fáciles de cultivar en el laboratorio, presentan tiempos generacionales relativamente más cortos en comparación a otros oligoquetos y son ecológicamente más representativos en el ambiente terrestre (Iannacone *et. al.*, 2008). Para esta prueba de toxicidad se expuso *Eisenia sp.* directamente a las muestras de suelo.

2.1.1. Evaluación del efecto letal

En la Tabla 8, se muestra el efecto letal en *Eisenia sp.* a consecuencia de su exposición a las muestras de suelo de Chinchero. Como se observa, las muestras no ocasionaron la muerte de los organismos en ninguno de los casos, por lo que se anuncia que la toxicidad inherente a las mismas no fue tan alta como para producir la muerte de los mismos.

Tabla 8. Efecto de las muestras de suelo en la mortalidad de *Eisenia sp.*

MUESTRA AMBIENTAL		Vivos	Muertos	TOTAL
Control (-)	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHY01	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHY02	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHH03	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHH04	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHA05	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHA06	N	30	0	30
	%	100%	0%	

2.1.2. Evaluación del efecto subletal

La importancia de la evaluación de los efectos subletales radica en que se mide y observa los efectos que aun cantidades mínimas de un contaminante ocasiona sobre los organismos expuestos.

A. Biomarcador de Actividad Biológica: Pérdida de peso

Los parámetros de reproducción y crecimiento de lombrices de tierra expuestas a plaguicidas son indicadores de contaminación de suelos muy útiles. Estos estudios son fáciles de realizar y no requieren de gran experticia técnica (Shahla y D'Souza, 2010). Así tenemos que en la Tabla 9 se muestra el efecto en el peso de los organismos expuestos a las muestras de suelo, en base a dichos datos se elaboró la Figura 19, que permite visualizar de mejor manera el efecto tóxico subletal en el crecimiento y desarrollo de *Eisenia sp.*

Se observa que las muestras SCHY02 y SCHH03 correspondientes a los sectores de Huatata y San José presentaron un 15.85% de pérdida del peso inicial representando el mayor efecto subletal tóxico. Al comparar las medias de las respuestas de *Eisenia sp.* en las muestras de suelo realizadas por triplicado, se encontró que existe diferencia estadística significativa al 95% de confianza ($p < 0.05$) (Tabla 10), entendiéndose que el nivel de toxicidad de al menos dos de las muestras de suelo es diferente en grado.

Tabla 9. Efecto de las muestras de suelo en la variación de peso en gr. de *Eisenia sp.*

Muestra	Total	Pi	Pf	$\Delta P = Pf - Pi$	%P
Control (-)	30	6.8	7.5	0.7	10.3
SCHY01	30	9.1	8.4	-0.7	-10.3
SCHY02	30	8.2	6.9	-1.3	-15.85
SCHH03	30	7.7	6.4	-1.3	-15.85
SCHH04	30	7.7	7.6	-0.1	-1.32
SCHA05	30	7.6	6.7	-0.9	-11.84
SCHA06	30	7	7.1	0.1	1.32

Figura 19. Efecto de las muestras de suelo en la variación de peso en *Eisenia sp.*

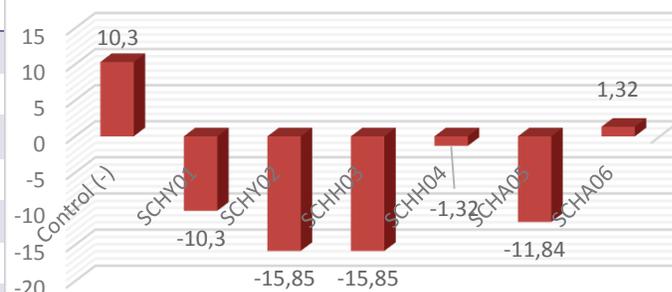


Tabla 10. Prueba de ANOVA-Influencia de las muestras de suelo en la variación del peso en *Eisenia sp.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	768,306 ^a	5	153,661	9,153	,001
Interceptación	1320,021	1	1320,021	78,628	,000
Muestra	768,306	5	153,661	9,153	,001
Error	201,458	12	16,788		
Total	2289,785	18			
Total corregido	969,764	17			

a. R al cuadrado = ,792 (R al cuadrado ajustada = ,706)

Muestras = 6; Observaciones = 30

H₀: Las diferentes muestras producen el mismo efecto en *Eisenia sp.*

H_a: Las diferentes muestras producen un diferente efecto en *Eisenia sp.*

Si p<0.05 se rechaza H₀ y se acepta H_a.

En base a la prueba post hoc de DUNCAN (Tabla 11), se observa que se formaron 2 grupos homogéneos, entendiendo que la muestra de suelo de San José (SCHH03), Huatata (SCHY02), Piuray (SCHA05) y de Q´uerapata (SCHY01) son las que ejercen mayor influencia en la reducción del peso (desarrollo) de *Eisenia sp.*, indicando una mayor toxicidad para dicho organismo; por otro lado, las muestras de suelo de Muyuri (SCHH04) y Kjamu (SCHA06) ejercen poca o nula influencia en la reducción de peso de *Eisenia sp.* reflejando su baja y/o nula toxicidad para el organismo de prueba.

En base a ello se determina la tendencia en el grado de toxicidad de las muestras de suelo, observando dos grupos diferenciados, el primero formado por los sectores de San José (SCHH03), Huatata (SCHY02), Piuray (SCHA05), Q´uerapata (SCHY01) que presentan mayor toxicidad frente al Segundo grupo formado por Muyuri (SCHH04) y Kjamu (SCHA06).

Tabla 11. Resumen de la prueba Duncan para variación en el peso en *Eisenia sp.*

Duncan ^{a,b}	Muestra de suelos	N	Subconjunto	
			1	2
	SCHH03	3	-15,8467	
	SCHY02	3	-14,8450	
	SCHA05	3	-11,8400	
	SCHY01	3	-10,3200	
	SCHH04	3		-1,3233
	SCHA06	3		1,3237
	Sig.		,116	,395

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 16,788.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000; b. Alfa = .05.

B. Biomarcador de comportamiento: Evasión

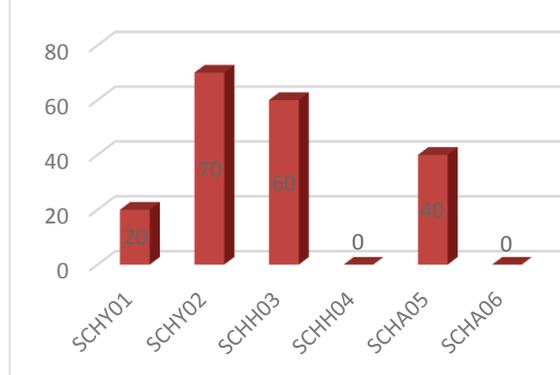
Este biomarcador mide la capacidad de la lombriz de tierra para evadir suelos contaminados y ha sido usado en años recientes para evaluar la toxicidad de plaguicidas (García y Keller, 2011; Alves *et. al.*, 2013), en la Tabla 12 se observa el porcentaje de evasión (%E) que *Eisenia sp.* muestra para cada suelo evaluado. Una diferencia mínima de dos individuos entre el Control (-) y la muestra se consideró como un porcentaje de evasión igual a cero.

Tabla 12. Biomarcador de comportamiento: Evasión de *Eisenia sp.* en las muestras de suelo del distrito de Chinchero.

REPLICAS/ MUESTRAS	I		II		III		TOTAL		%E
	X	C(-)	X	C(-)	X	C(-)	X	C(-)	
SCHY01	3	7	4	6	5	5	12	18	20
SCHY02	1	9	1	9	2	7	4	25	70
SCHH03	3	7	1	9	2	8	6	24	60
SCHH04	4	6	5	5	5	5	14	16	0
SCHA05	2	8	4	6	3	7	9	21	40
SCHA06	5	5	4	6	5	5	14	16	0

X=muestra de suelo; C(-)=control negativo

Figura 20. Evasión de *Eisenia sp.* en las muestras de suelo del distrito de Chinchero



La Figura 20 se elaboró en base a los datos de la Tabla 12, donde se puede apreciar de mejor manera la preferencia de *Eisenia sp.* por suelos no contaminados. Considerando que este organismo tiende a evadir enérgicamente las muestras de los suelos procedentes de Huatata (SCHY02) y San José (SCHH03).

En la prueba de ANOVA, a un nivel de confianza del 95% se encontró un valor de significancia $p(0.001) < 0.05$, indicando que la respuesta de evasión mostrada por *Eisenia sp.* es diferente en al menos dos de las muestra (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de ANOVA - Influencia de las muestras de suelo en la evasión mostrada por *Eisenia sp.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	11844,444 ^a	5	2368,889	8,883	,001
Interceptación	21355,556	1	21355,556	80,083	,000
Muestra	11844,444	5	2368,889	8,883	,001
Error	3200,000	12	266,667		
Total	36400,000	18			
Total corregido	15044,444	17			

a. R al cuadrado = ,787 (R al cuadrado ajustada = ,699)

Muestras = 6; Observaciones = 30

H₀: Las diferentes muestras producen el mismo efecto en *Eisenia sp.*

H_a: Las diferentes muestras producen un diferente efecto en *Eisenia sp.*

Si $p < 0.05$ se rechaza H₀ y se acepta H_a.

Una vez determinada la diferencia existente entre las medias de cada muestra, es decir de las respuestas, se realizó la prueba de Duncan como prueba posterior al ANOVA (Tabla 14). Se formaron cuatro subconjuntos homogéneos, demostrando que *Eisenia sp.* no tiende a evadir las muestras de suelo procedentes de Muyuri (SCHH04) y Kjamu (SCHA06).

Así mismo, este organismo muestra una evasión en diferente grado por los suelos de Qúerapata (SCHY01), Piuray (SCHA05), San José (SCHH03) y Huatata (SCHY02), siendo estos dos últimas muestras más tóxicas para estos organismos resultando en una alteración del comportamiento. En base al efecto que cada muestra genera en *Eisenia sp.* se determinó la tendencia en el grado de toxicidad de mayor a menor de las muestras de suelo, siendo como sigue:

SCHY02 > SCHH03 > SCHA05 > SCHY01 > SCHH04, SCHA06

Tabla 14. Resumen de la prueba de Duncan para el porcentaje de evasión en *Eisenia sp.*

Muestras de suelo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
SCHH04	3	0			
SCHA06	3	0			
SCHY01	3		20,0000		
SCHA05	3			40,0000	
SCHH03	3				60,0000
SCHY02	3				70,3333
Sig.		,360	,159	,159	,337

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 266,667.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000; y b. Alfa = .05

2.2. PRUEBA DE TOXICIDAD DIRECTA CON *Vicia faba*

Las plantas son esenciales en los ecosistemas porque son las responsables de transformar la energía solar en energía química, al tiempo que absorben dióxido de carbono. De esta manera proveen de alimento y oxígeno al resto de los organismos. El daño a las plantas por los contaminantes puede afectar directamente a la estructura y la función de un ecosistema, al reducir la producción primaria, incrementar el lavado y erosión del suelo y degradar el hábitat de la vida silvestre (Cuevas *et. al.*, 2012). En esta prueba se evaluó la inhibición en la germinación (IG) de *Vicia faba* a los 5 días, se registró como germinadas (G) aquellas que tuvieron una radícula ≥ 5 mm y como IG cuando hubo una inhibición en la germinación. *Vicia faba* es un organismo empleado ampliamente en el análisis de toxicidad de muestras contaminadas por plaguicidas (Cuevas *et. al.*, 2012). Para esta prueba de toxicidad se expuso semillas de *Vicia faba* directamente en las muestras de suelo.

2.2.1. Evaluación del efecto letal: Inhibición en la germinación (IG)

En la Tabla 15 se presenta los datos correspondientes al efecto letal observado en *Vicia faba* a consecuencia de su exposición a las muestras de suelo de Chinchero. Se observa que las muestras de Huatata (SCHY02) y San José (SCHH03) ocasionaron la inhibición en la germinación en un 6.67%, en la muestra de Piuray (SCHA05) se observó un 3.33% de IG mientras que en las demás muestras no se observó efecto letal por lo que se afirma que los residuales de plaguicidas en las muestras no fueron tan altas como para producir una inhibición en la germinación de este organismo.

Tabla 15. Efecto de las muestras de suelo en la IG en *Vicia faba*

MUESTRA AMBIENTAL		G	NG	TOTAL
Control (-)	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHY01	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHY02	N	28	2	30
	%	93.33%	6.67%	
SCHH03	N	28	2	30
	%	93.33%	6.67%	
SCHH04	N	30	0	30
	%	100%	0%	
SCHA05	N	29	1	30
	%	96.67%	3.33%	
SCHA06	N	30	0	30
	%	100%	0%	

G: semillas germinadas; NG: semillas no germinadas

Probablemente la muerte de un organismo como de la IG en semillas, en la escala de las poblaciones significa nada, pero el problema de interés está relacionado con la evaluación de los efectos sobre la abundancia, producción y persistencia de las poblaciones y ecosistemas (Ronco *et. al.*, 2004). Entendiendo que una especie cumple un rol importante dentro del ecosistema al que pertenece, y si extrapolamos los datos aquí obtenidos a otras especies de plantas (productores) se puede afirmar que podría estar ocasionando efectos nocivos en especies de plantas no resistentes. Para las muestras de Huatata (SCHY02) y San José (SCHH03) que produjeron una IG en un 6.67%, se reportaron los plaguicidas Clorotalonil (0.281 ppm), Malatión (3.96 ppm), paration (3.02 ppm), DDT (0.28 ppm), heptacloro (0.042 ppm) y Endosulfan β (0.374 ppm); y Metamidofos (1.9 ppm), Clorotalonil (<0.06 ppm), Malation (2.62 ppm), paration (2.41 ppm), DDT (0.04 ppm), heptacloro (0.055 ppm) respectivamente. Estos plaguicidas encontrados en las muestras de suelo podrían ser los responsables del efecto causado en *Vicia faba*, así mismo no se descarta la presencia de otros plaguicidas no cuantificados y otras sustancias químicas.

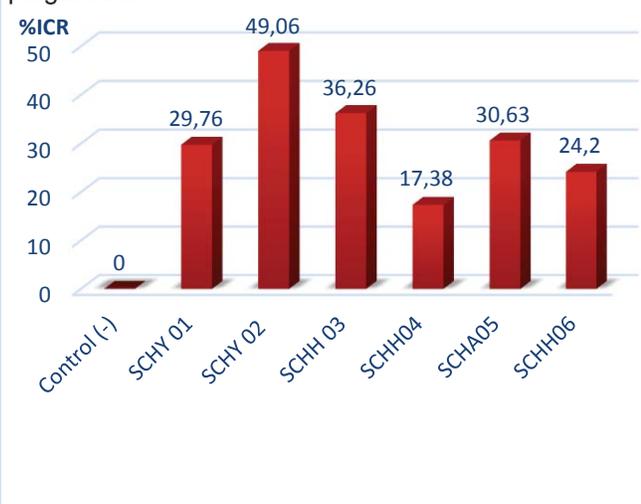
2.2.2. Evaluación del efecto subletal: Biomarcador de Actividad Biológica - Inhibición en el crecimiento radicular (ICR)

En la Tabla 16 se muestra los datos promedios del crecimiento radicular alcanzado por las semillas de *Vicia faba* debido a la influencia y/o efecto tóxico de las muestras de suelo de Chinchero. La Figura 21 evidencia de mejor manera la ICR que mostraron las semillas expuestas a las muestras problema respecto a la elongación alcanzada en el control negativo. Se observa que el 100% de las muestras mostraron en mayor o menor grado una inhibición en el crecimiento radicular, lo que indica que las concentraciones de plaguicidas presentes en las muestras de suelo aun en bajas concentraciones son capaces de causar un daño en las primeras etapas del desarrollo de la plántula, siendo el desarrollo de la radícula de suma importancia para el éxito y perpetuación de las diferentes especies en el grupo de los productores.

Tabla 16. Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento radicular (%ICR) de *Vicia faba* expuestos a muestras de suelo de Chinchero.

Muestras de suelo	% ICR
Control (-)	0
SCHY 01	29.76
SCHY 02	49.06
SCHH 03	36.26
SCHH 04	17.38
SCHA 05	30.63
SCHH 06	24.2

Figura 21. Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento radicular de *Vicia faba* expuestos a residuales de plaguicidas.



Se encontró un valor de $p < 0.05$ en el análisis de ANOVA (Tabla 17), entendiéndose que la toxicidad inherente a cada muestra de suelo para este organismo es diferente en nivel. Por lo que se realizó una prueba posterior al análisis de ANOVA que permite organizar las respuestas en grupos homogéneos. Por lo que en la Tabla 18 se observa la formación de 4 subconjuntos homogéneos, siendo SCHY02 (Huatata) la que representa un mayor peligro para esta especie encontrándose un valor de 49%ICR, siendo la tendencia en grado de toxicidad de mayor a menor encontrada mediante este biomarcador como sigue:

SCHY02 > SCHH03, SCHA05 > SCHY01, SCHA06 > SCHH04

Tabla 17. Prueba de ANOVA - Influencia de las muestras de suelo en la Inhibición del Crecimiento Radicular (%ICR) en *Vicia faba*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	1789,685 ^a	5	357,937	16,358	,000
Interceptación	17460,821	1	17460,821	797,991	,000
Muestras	1789,685	5	357,937	16,358	,000
Error	262,572	12	21,881		
Total	19513,078	18			
Total corregido	2052,257	17			

a. R al cuadrado = ,872 (R al cuadrado ajustada = ,819)

Muestras = 6; Observaciones = 30

H₀: Las diferentes muestras producen el mismo efecto en *Vicia faba*

H_a: Las diferentes muestras producen un diferente efecto en *Vicia faba*

Si p<0.05 se rechaza H₀ y se acepta H_a.

Tabla 18. Resumen de la prueba de Duncan para el % ICR en *Vicia faba*

Duncan ^{a,b}					
Muestras	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
SCHH04	3	17,0900			
SCHA06	3		24,0833		
SCHY01	3		29,8333		
SCHA05	3			30,6500	
SCHH03	3			36,1133	
SCHY02	3				49,1033
Sig.		,092	,127	,143	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 21,881.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = 0.05.

2.3. TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) EN *Vicia faba*: Estimación de la genotóxicidad

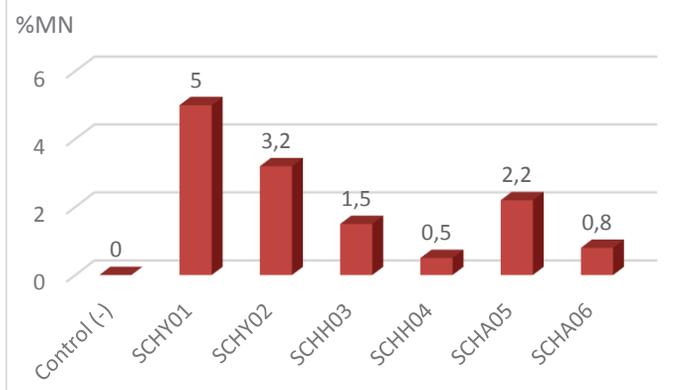
Para la observación de MN se empleó *Vicia faba* debido a que es un organismo ampliamente usado para evaluaciones genotóxicas por las características citogenéticas que presenta (Loza *et.al.*, 2005). En la Tabla 19 se presentan los datos correspondientes a la frecuencia de MN observados en las muestras de suelo del distrito de Chinchero.

La Figura 22 permite apreciar de mejor manera el efecto genotóxico que las muestras de suelo provocan en *Vicia faba* respecto al control (-) donde no se observa la generación de MN, la muestra SCHY01 procedente de Q´uerapata resultó ser la más genotóxica para este organismo, siendo SCHH04 procedente de Muyuri la menos genotóxica.

Tabla 19. Frecuencia de MN observados en ápice radicular de *Vicia faba*

Muestras	MN/1000	%MN
Control (-)	0	0
SCHY01	50	5
SCHY02	32	3.2
SCHH03	15	1.5
SCHH04	5	0.5
SCHA05	22	2.2
SCHA06	8	0.8

Figura 22. Frecuencia de MN observados en el ápice radicular de *Vicia faba*



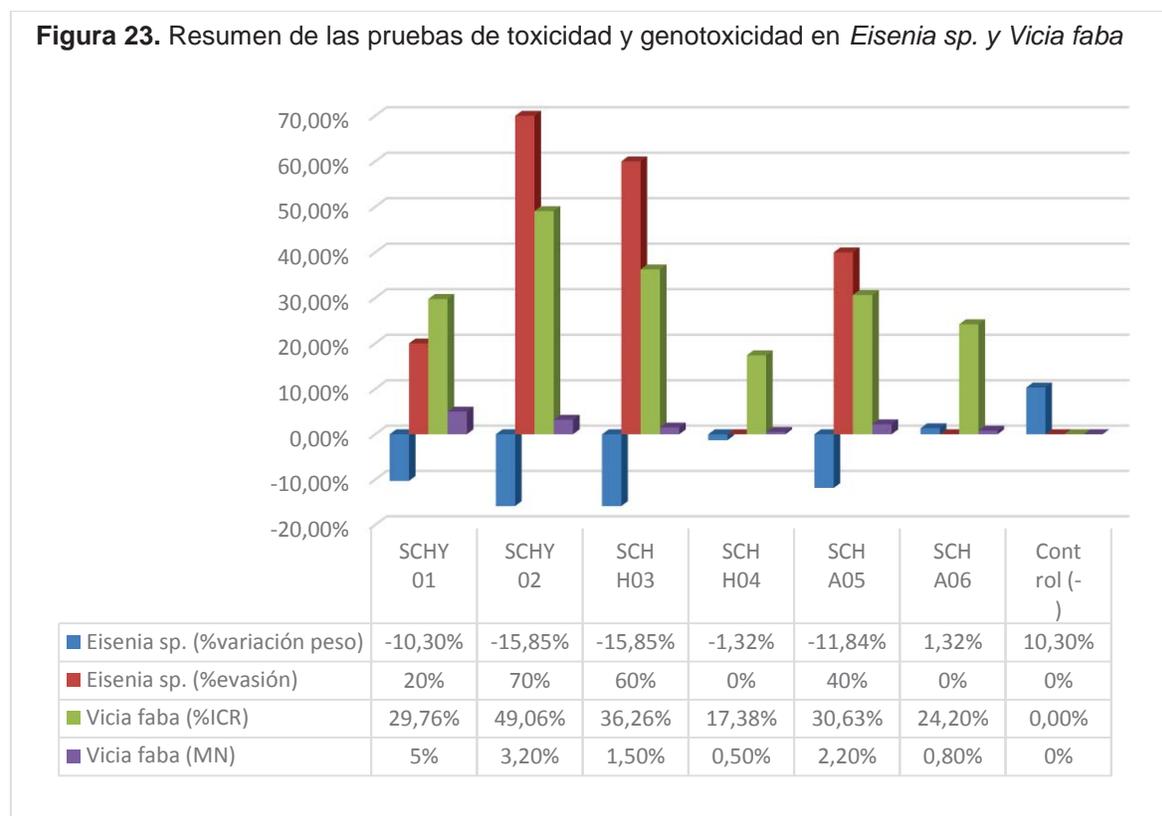
Loza *et.al.*, 2005 menciona en su estudio que la muestra de suelo más genotóxica se corresponde con la que posee mayor cantidad de materia orgánica y arcilla que además de facilitar el desarrollo radicular y del hipocótilo, también tiene la capacidad de adsorber plaguicidas y provocar su persistencia. Similar a lo encontrado en esta investigación, donde la muestra con mayor genotoxicidad - Huatata (SCHY01) es la que posee mayor cantidad de arcilla (8%) y considerable contenido de materia orgánica (3.60%).

En resumen, el potencial genotóxico de las muestras de suelo procedentes de Chinchero de mayor a menor grado es como sigue:

SCHY01 > SCHY02 > SCHA05 > SCHH03 > SCHA06 > SCHH04

2.4. ANALISIS INTEGRADO DE ENSAYOS DE TOXICIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS

Las muestras de suelo procedentes del distrito de Chinchero no causaron la muerte a ningún individuo de *Eisenia sp.*, sin embargo la disminución del peso húmedo de las mismas fue elevada en la mayoría de las muestras, al igual que la inhibición en el crecimiento radicular y generación de Micronúcleos en *Vicia faba*.



En la Figura 23, se observa un resumen de los resultados obtenidos en cada prueba; siguiendo la misma, se evidencia que la muestra procedente de Q´uerapata (SCHY01) en cuanto a ecotoxicidad ocupa el cuarto puesto entre todas las muestras analizadas con los diferentes biomarcadores, generando una disminución del 10.3% del peso húmedo en *Eisenia sp.*, de igual forma favorece en un 20% la evasión de esta especie, en *Vicia faba* se generó un 29.8% de ICR, muestra que a su vez contenía 5 de los plaguicidas analizados como son metamidofos (1.15 ppm), malation (5.33 ppm), paration (1.2 ppm), Clorotalonil (0.124 ppm) y DDT (0.56 ppm), los que podrían ser los responsables de la toxicidad inherente a la muestra, así como otros plaguicidas que no pudieron ser analizados en este estudio.

Por otro lado, de las seis muestras estudiadas, el más alto potencial genotóxico fue encontrado en esta muestra, con un 5% de generación de MN en comparación con la muestra de Huatata (SCHY02) que presenta la mayor ecotoxicidad, esto podría deberse a la presencia en mayor cantidad de plaguicidas reportados como genotóxicos como el DDT y de otros plaguicidas con un poder genotóxico, así como a la posible interacción sinérgica entre los mismos.

Las muestras procedentes de Huatata (SCHY02), San José (SCHH03) y Piuray (SCHA05), resultaron ser las que mayor daño generaron en el desarrollo y crecimiento de estas especies, ocasionando una disminución del peso de *Eisenia sp.* en un 15.9% para las dos primeras y 11.84% para la última así como propiciando la evasión de esta especie en un 70 %, 60 % y 40% respectivamente. Así mismo, causó una IG en *Vicia faba* en un 6.67% para las dos primeras y 3.3% para la última, y una ICR de 49.1%, 36.3% y 30.6% respectivamente, desprendiéndose que son las muestras con mayor ecotoxicidad de acuerdo a los biomarcadores evaluados. En cuanto a su potencial genotóxico, estas muestras favorecieron la formación de MN en un 3.2%, 1.5% y 2.2% respectivamente. De acuerdo a Tecuapetla (2014), las muestras más tóxicas no siempre son en las que se aplican mayor cantidad de plaguicidas, pero sí las que emplean plaguicidas más tóxicos. Parte de la toxicidad en estas muestras podría atribuirse a la presencia de los plaguicidas encontrados en esta investigación, así como a otros plaguicidas y compuestos químicos no identificados.

Finalmente, las muestras procedente de Muyuri (SCHH04) y Kjamu (SCHA06) son las muestras de suelo menos tóxicas generando una reducción y/o aumento de peso en *Eisenia sp.* casi imperceptible, y una migración nula de la misma. En cuanto a *Vicia faba*, se observa una ICR del 17.38% y 24.2% respectivamente, que a pesar de tener un contenido de materia orgánica del 4.2% y 3.4% respectivamente no ayudaron en el mayor crecimiento de la radícula, por lo que se afirma que aun concentraciones bajas de los plaguicidas presentes en esas muestras entre ellos clorotalonil, malation, paration, heptacloro y endosulfan- β si tienen un efecto ecotóxico sobre *Vicia faba*. En cuanto a la genotoxicidad se generaron MN en 0.5% y 0.8%, correspondiendo a las muestras con menor formación de MN, por ende su baja genotoxicidad.

Los efectos letales de los contaminantes sobre las plantas pueden significar pérdidas ecológicas y económicas muy importantes; incluso los efectos subletales tienen un impacto significativo sobre la producción de alimentos y el desarrollo de la vegetación natural, e implicaciones adversas para los organismos pertenecientes a niveles superiores en la cadena alimenticia (Wang y Freemark, 1995 citado en Cuevas *et. al.*, 2012). Los resultados de los bioensayos se refieren en primer lugar a los organismos usados en el ensayo; pero también un efecto nocivo o no, evaluado por medio de ensayos biológicos puede indicar niveles de peligrosidad trasladables a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis (Ronco *et. al.*, 2004).

Considerando además lo encontrado por Piola (2011), donde se demostró que los ensayos realizados en laboratorio son representativos de lo que acontece en campo, los efectos encontrados con estas dos especies indicarían que especies pertenecientes principalmente a los grupos de descomponedores como *Eisenia sp.* y productores como *Vicia faba* podrían desarrollarse y sobrevivir en dichos lugares, pero el desarrollo que alcanzarían no sería el óptimo, además del daño genético que se causa en ellos, a largo plazo se podría causar su muerte, además de estar constantemente sometidos a este estrés ambiental.

3. ETAPA III. Estimación de la toxicidad bajo condiciones de Laboratorio del plaguicida seleccionado: Metamidofos

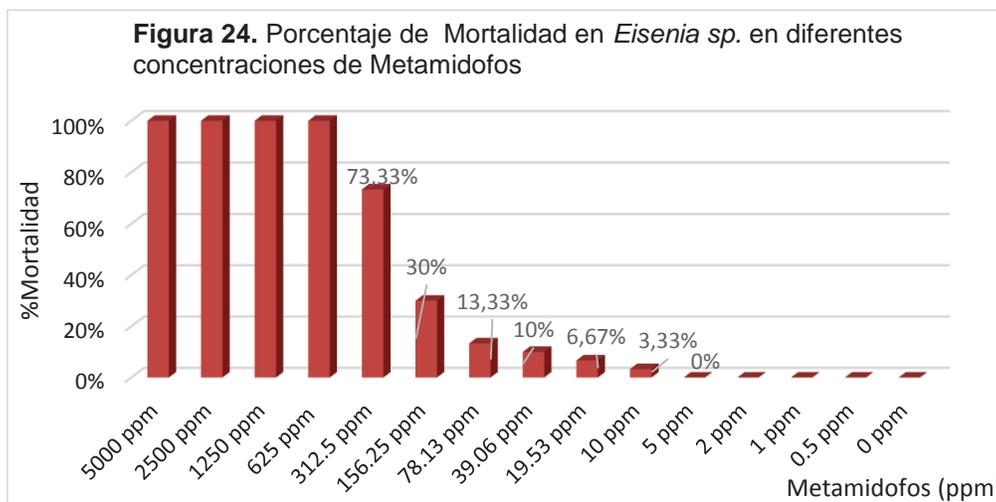
La toxicidad es la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto medible sobre un organismo o la biocenosis, y depende tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración (Ronco *et. al.*, 2004). Para la determinación de la toxicidad de este plaguicida se evaluaron 15 concentraciones progresivas del mismo con un máximo de 5000 ppm incluyendo el control negativo (0ppm).

3.1. PRUEBA DE TOXICIDAD EN *Eisenia sp.*

Eisenia se caracteriza por ser un organismo sensible a la presencia de compuestos tóxicos y ha sido ampliamente usado en evaluaciones con plaguicidas. En la prueba de toxicidad con este organismo con sustancias puras se puede hallar las siguientes concentraciones ambientales de referencia (Benchmark) o conocidos como “endpoints”, respecto a los efectos letales: CL50, LOEC, NOEC; y respecto a los efectos subletales: NOAEL y LOAEL, estos últimos importantes para la estimación del riesgo ambiental que implica la presencia de este plaguicida en el ambiente para los organismos vivos que forman parte de dicho ecosistema, con este objetivo se utilizó suelo artificial donde fueron añadidas las concentraciones de metamidofos evaluadas.

3.1.1. Evaluación del efecto letal

La Figura 24 se elaboró en base a los valores de mortalidad en *Eisenia sp.* sometidos a diferentes concentraciones del plaguicidas metamidofos mostrados en la Tabla 45 (Anexo 8).



En la Figura 24 se observa que a partir de la concentración de 625 ppm se causó la muerte del 100% de individuos de *Eisenia sp.* En las concentraciones menores a 5 ppm no se observa mortalidad de este organismo, sin embargo una baja movilidad y falta de coordinación fueron observadas en los individuos de prueba. En general, se encontró un incremento en la mortalidad de *Eisenia sp.* correspondiente a concentraciones crecientes de metamidofos (en el rango de 5 ppm a 625 ppm), lo que quedó demostrado al realizar el análisis de varianza (Tabla 20) donde se estableció que existen diferencias significativas entre las concentraciones con un valor $p(0,00) < 0.05$, entendiéndose que dichas diferencias se deben a las concentraciones usadas en esta prueba de toxicidad.

Tabla 20. Análisis de ANOVA para el efecto de metamidofos en la mortalidad de *Eisenia sp.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	821,467 ^a	14	58,676	240,039	,000
Interceptación	583,200	1	583,200	2385,818	,000
Concentracion	821,467	14	58,676	240,039	,000
Error	7,333	30	,244		
Total	1412,000	45			
Total corregido	828,800	44			

a. R al cuadrado = ,991 (R al cuadrado ajustada = ,987)

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en *Eisenia sp.*

H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en *Eisenia sp.*

Si $p < 0.05$ se rechaza H₀ y se acepta H_a.

De igual forma, Iannacone *et. al.* (2008) menciona que hubo un aumento de la mortalidad de *Eisenia foetida* de 50.2% entre las concentraciones 3.56 ppm a 56.96 ppm de metamidofos en la formulación de Tamaron (Ib altamente tóxico), quien además realizó bioensayos con otros 8 organismos, de los que *Eisenia foetida* resulto ser el segundo más sensible a este plaguicida.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia:**

- **Concentración Letal media (CL50)**

Para poder hallar este valor se analizó los datos de mortalidad mediante una regresión PROBIT, resultando que la concentración de metamidofos capaz de causar la muerte a la mitad de la población de *Eisenia sp.* expuesta fue de 167.115 ppm (Tabla 21).

Tabla 21. CL50 de metamidofos para *Eisenia sp.* mediante PROBIT

CL 50 (Metamidofos ppm) <i>Eisenia sp.</i>	Límites de confianza al 95%	
	Límite inferior (ppm)	Límite superior (ppm)
167.115	92.073	305.123

Muñiz (2012) encontró un valor de CL50 para *Eisenia foetida* de 409.285 ppm para metamidofos en la formulación Lasser, siendo el valor encontrado en la presente investigación menor al mismo, debido probablemente a las diferentes formulaciones comerciales empleadas, lo que indicaría que los aditivos presentes en Stermin aumentarían su toxicidad.

- **NOEC y LOEC:**

Dado que en la mayoría de casos no es posible la eliminación de la toxicidad, las agencias encargadas de la protección ambiental deben definir la proporción de mortalidad o la reducción del crecimiento tolerable de las especies expuestas (Ronco *et. al.*, 2004). Con este objetivo, se determinaron otras concentraciones de referencia como son la NOEC (Concentración máxima a la que no se observan efectos en el organismo de prueba) y LOEC (Concentración mínima a la cual se observan efectos en el organismo de prueba) para lo cual es necesario realizar una prueba adicional post hoc de DUNNET (Tabla 22), que permite comparar la respuesta de *Eisenia sp.* en cada concentración del plaguicida en estudio respecto a una respuesta normal en el control negativo (0 ppm de metamidofos).

Tabla 22. Resumen de prueba de Dunnett para la mortalidad en Eisenia sp.

	(I) Concentración en ppm	(J) Concentración en ppm	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de	5000 ppm	Control (-)**	10,00*	,404	,000	8,79	11,21
Dunnett	2500 ppm	Control (-)**	10,00*	,404	,000	8,79	11,21
(bilateral) ^a	1250 ppm	Control (-)**	10,00*	,404	,000	8,79	11,21
	625 ppm	Control (-)**	10,00*	,404	,000	8,79	11,21
	312.5 ppm	Control (-)**	7,33*	,404	,000	6,12	8,54
	156.25 ppm	Control (-)**	3,33*	,404	,000	2,12	4,54
	78.13 ppm	Control (-)**	1,33*	,404	,024	,12	2,54
	39.1 ppm	Control (-)**	1,00	,404	,151	-,21	2,21
	19.53 ppm	Control (-)**	,67	,404	,581	-,54	1,88
	10 ppm	Control (-)**	,33	,404	,990	-,88	1,54
	5 ppm	Control (-)**	,00	,404	1,000	-1,21	1,21
	2 ppm	Control (-)**	,00	,404	1,000	-1,21	1,21
	1 ppm	Control (-)**	,00	,404	1,000	-1,21	1,21
	0.5 ppm	Control (-)**	,00	,404	1,000	-1,21	1,21
Se basa en las medias observadas.							
El término de error es la media cuadrática (Error) = ,244.							
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.							
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.							

Control (-)**: 0 ppm de metamidofos

De la tabla anterior, tenemos que:

H_a: Existe una diferencia significativa entre las medias de las concentraciones comparadas respecto al Control (-).

H₀: No existe diferencia significativa entre las medias de las concentraciones comparadas respecto al Control (-).

LOEC (Concentración más baja donde se observa efecto).

El valor de significancia cuando se compara la concentración 78.13 ppm con el Control (-) es equivalente a 0.024. Esta es la mínima concentración a la cual se cumple que el p-valor es menor a 0.05, aceptándose la H_a o del investigador que indica que existe una diferencia significativa entre las medias comparadas, es decir que la concentración de 78.13 ppm es la mínima concentración capaz de causar la muerte de organismos de esta especie en su ecosistema terrestre, por ende una posible reducción en su población en un futuro lejano, y posibles consecuencias en la calidad del recurso suelo y en la cadena trófica.

NOEC (Concentración en la que no se observa efecto letal alguno).

Para hallar la NOEC, se debe cumplir que el valor de significancia sea mayor a 0.05 cuando se compara una concentración respecto al control. En la concentración de 39.1 ppm se observa un p-valor mayor a 0.05, por lo que se acepta la H_0 , entendiéndose que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias comparadas de esta concentración respecto al control (-). En otras palabras, esta es la máxima concentración a la cual no se observarían efectos letales sobre la fauna expuesta, en este caso sobre la población de lombriz de tierra (*Eisenia sp.*) dentro de su ecosistema natural.

3.1.2. Evaluación del efecto subletal

La importancia de la evaluación de los efectos subletales radica en que se mide y observa los efectos que aun cantidades mínimas de un contaminante ocasiona sobre los organismos expuestos. Estos resultados son más reales en cuanto a su extrapolación en el medio ambiente, pues la CL50 es tan elevada que no se espera encontrar dicha concentración en los compartimentos ambientales, pero si resulta importante determinar las concentraciones relativamente bajas con más probabilidad de ser encontradas en los compartimentos ambientales capaces de causar un efecto esperado sobre la biota expuesta.

A. Biomarcador de Actividad Biológica: Pérdida de peso

La Figura 25 fue elaborada en base a los datos presentados en la Tabla 45 (Anexo 8) sobre la influencia de las diferentes concentraciones de metamidofos en la pérdida de peso mostrada por *Eisenia sp.*



Mediante el análisis de ANOVA se determinó que existe diferencia significativa entre las medias de las respuestas en cada concentración, teniendo un valor de $p(0.00) < 0.05$ (Tabla 23). Es decir, que la respuesta evaluada (pérdida de peso) en *Eisenia sp.* depende completamente de la concentración del plaguicida empleado. Observado la Figura 25, se puede notar que hubo una disminución en el peso total de las lombrices expuestas a cada tratamiento, incluyendo en el control negativo debido probablemente al estrés generado en dichos organismos. La pérdida de peso experimentada por este organismo es directamente proporcional a la concentración del plaguicida empleado, teniendo que a mayor concentración mayor será el estrés generado sobre la especie con una consecuente disminución en su peso. El mayor porcentaje de disminución de peso fue observado a partir de 625 ppm donde todas las lombrices murieron considerándose como una pérdida de peso del 100%, y el menor porcentaje de variación de peso en la concentración más baja de 0.05 ppm en un 25.5% que en comparación con la variación observada en el control negativo resulta significativa.

Tabla 23. Análisis de ANOVA para la variación en el peso de *Eisenia sp.* sometida a diferentes concentraciones del plaguicida metamidofos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	35625,461 ^a	14	2544,676	135,980	,000
Interceptación	186296,470	1	186296,470	9955,105	,000
Concentracion	35625,461	14	2544,676	135,980	,000
Error	561,410	30	18,714		
Total	222483,341	45			
Total corregido	36186,871	44			

a. R al cuadrado = ,984 (R al cuadrado ajustada = ,977)

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en *Eisenia sp.*

H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en *Eisenia sp.*

Si $p < 0.05$ se rechaza H₀ y se acepta H_a.

En el 2008, Iannacone *et. al.*, encontró similares resultados en este efecto subletal en *Eisenia foetida*, donde en la menor concentración de 3.56 ppm de metamidofos (Tamaron) se encontró un menor porcentaje de mortalidad y un mayor peso final en *Eisenia foetida* que a 28.48 ppm. Es decir, que a menor concentración de este plaguicida menor era la mortalidad de las mismas y mayor era el peso final, al igual que lo encontrado en este estudio.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia**

Con los efectos subletales producidos por una sustancia específica, es posible hallar concentraciones de referencia más adecuadas a la realidad con las que se puede estimar un posible efecto adverso esperado en las poblaciones expuestas al mismo dentro de su ambiente natural. Estos valores son: la concentración máxima a la cual no se observan efectos adversos en el organismo de prueba (NOAEL) y la concentración mínima a la cual se observan efectos adversos en el organismo de prueba (LOAEL). Para este objetivo se procede a realizar una prueba posterior al ANOVA, Prueba de Dunnett (Tabla 24).

Para este efecto subletal, no fue posible determinar el NOAEL, puesto que al comparar las medias de las concentraciones respecto al Control (-) todas resultaron ser diferentes con un p-valor menor a 0.05, por lo que se esperaría valores de NOAEL menor a 0.05 ppm. Pero se tiene un LOAEL de 0.05 ppm con un p valor < a 0.05, esta es la concentración mínima a la cual se generan efectos adversos sobre las lombrices expuestas.

Tabla 24. Resumen de la prueba de Dunnett para la variación de peso en *Eisenia sp.*

	(I) Concentración ppm	(J) Concentración ppm	Diferencia de medias (I- J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de	5000 ppm	Control (-)**	91,8533 [†]	3,53211	,000	81,2667	102,4399
Dunnett	2500 ppm	Control (-)**	91,8533 [†]	3,53211	,000	81,2667	102,4399
(bilateral) ^a	1250 ppm	Control (-)**	91,8533 [†]	3,53211	,000	81,2667	102,4399
	625 ppm	Control (-)**	91,8533 [†]	3,53211	,000	81,2667	102,4399
	312.5 ppm	Control (-)**	78,1067 [†]	3,53211	,000	67,5201	88,6933
	156.25 ppm	Control (-)**	68,1533 [†]	3,53211	,000	57,5667	78,7399
	78.13 ppm	Control (-)**	61,5900 [†]	3,53211	,000	51,0034	72,1766
	39.1 ppm	Control (-)**	51,8933 [†]	3,53211	,000	41,3067	62,4799
	19.53 ppm	Control (-)**	46,0933 [†]	3,53211	,000	35,5067	56,6799
	10 ppm	Control (-)**	44,2567 [†]	3,53211	,000	33,6701	54,8433
	5 ppm	Control (-)**	39,9633 [†]	3,53211	,000	29,3767	50,5499
	2 ppm	Control (-)**	34,8400 [†]	3,53211	,000	24,2534	45,4266
	1 ppm	Control (-)**	31,9767 [†]	3,53211	,000	21,3901	42,5633
	0.5 ppm	Control (-)**	18,6467 [†]	3,53211	,000	8,0601	29,2333

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 18,714.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Control (-)**: 0 ppm de metamidofos

B. Biomarcador de comportamiento: Evasión

La Figura 26 fue elaborada en base a los datos presentados en la Tabla 46 (Anexo 8) sobre la influencia de las diferentes concentraciones de metamidofos en el comportamiento mostrado por *Eisenia sp.*, este efecto subletal permite evaluar la capacidad de estos organismos de evadir suelos contaminados. Las diferentes concentraciones de metamidofos producen un efecto diferente en los organismos expuestos ($p < 0,05$; Tabla 25). Se observa que *Eisenia sp.* evade en un 100% concentraciones del plaguicida mayores a 625 ppm, puesto que causan la muerte de los organismos expuestos. Así mismo, concentraciones menores o iguales a 2 ppm de metamidofos no causan ninguna alteración en el comportamiento de este organismo, entendiendo que en condiciones ambientales naturales esta especie no tendría ningún problema en vivir bajo dichas condiciones, a pesar de que su desarrollo normal se vería afectado.



Estos resultados, son similares a lo encontrado por García y Keller (2011), en su estudio realizado en laboratorio, *Eisenia foetida* mostró una evasión promedio más alta con elevadas concentraciones (56ppm en adelante), y de 4 a 14 ppm fue percibida una evasión insignificante. Sin embargo en el estudio realizado en campo encontraron que *Eisenia foetida* mostró mayor sensibilidad con una evasión significativa a 14 ppm de metamidofos. De igual forma De Silva y Van Gestel (2009), encontraron una alteración en el comportamiento de *Eisenia andrei* significativa desde la concentración 1 ppm a 12.1 ppm de metamidofos, lo que se podría explicar por la mayor sensibilidad de esta última especie.

Tabla 25. Análisis de ANOVA para Evasión en *Eisenia sp.* expuesta a metamidofos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	79786,667 ^a	14	5699,048	128,229	,000
Interceptación	103680,000	1	103680,000	2332,800	,000
Concentración	79786,667	14	5699,048	128,229	,000
Error	1333,333	30	44,444		
Total	184800,000	45			
Total corregido	81120,000	44			

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto de evasión en *Eisenia sp.*

H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto de evasión en *Eisenia sp.*

Si $p < 0.05$ se rechaza H₀ y se acepta H_a.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia**

Para poder determinar la NOAEL y LOAEL, se realizó la prueba posterior al ANOVA de Dunnet que permite comparar las medias de cada concentración respecto al control (-). Se plantean las siguientes hipótesis:

H₀: No existe diferencia significativa entre las medias de la concentración del plaguicida comparada con el Control (-), es decir dichas concentraciones producen el mismo efecto en los organismos expuestos.

H_a: Existe diferencia significativa entre las medias de la concentración de metamidofos comparada con el control (-), es decir dichas concentraciones producen un efecto diferente en los organismos expuestos.

LOAEL (Concentración mínima a la cual se observan efectos adversos en el organismo de prueba)

En la Tabla 26, los resultados de esta prueba muestran que la concentración de 10 ppm es la mínima concentración cuyo valor de significancia (0.01) es menor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis alterna (H_a) que indica que el efecto producido en dicha concentración es diferente al producido en el control (-). Es decir, la concentración de 10 ppm de metamidofos es la mínima concentración en la que se observan efectos adversos en la población expuesta, entendiéndose que la presencia de este plaguicida en dicha concentración (10 ppm) conduciría a una disminución de la población de lombrices de tierra que migrarían a lugares menos contaminados.

NOAEL (concentración máxima a la cual no se observan efectos adversos en el organismo de prueba)

De igual manera, se observa en la Tabla 26 un p-valor de 0.159 para la concentración de 5 ppm, que resulta ser mayor a 0.05 por lo que se acepta la H_0 que indica que el efecto observado en dicha concentración respecto a lo observado en el control (-) resulta ser igual. Es decir, 5 ppm es la máxima concentración de metamidofos a la que no se observa efectos adversos en el organismo de prueba. Entendiéndose que en condiciones naturales dicha concentración no sería capaz de generar ninguna alteración en el comportamiento de *Eisenia sp.* y los procesos inherente a un ecosistema se llevarían con normalidad.

Tabla 26. Resumen de la prueba de Dunnett para la respuesta de Evasión en *Eisenia sp.* expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos

	(I) Concentración de metamidofos ppm	(J) Concentración de metamidofos ppm	Diferencia de medias (I- J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de	5000 ppm	Control (-)**	100,0000 [†]	5,44331	,000	83,6850	116,3150
Dunnett	2500 ppm	Control (-)**	100,0000 [†]	5,44331	,000	83,6850	116,3150
(bilateral) ^a	1250 ppm	Control (-)**	100,0000 [†]	5,44331	,000	83,6850	116,3150
	625 ppm	Control (-)**	100,0000 [†]	5,44331	,000	83,6850	116,3150
	312.5 ppm	Control (-)**	93,3333 [†]	5,44331	,000	77,0184	109,6483
	156.25 ppm	Control (-)**	73,3333 [†]	5,44331	,000	57,0184	89,6483
	78.13 ppm	Control (-)**	73,3333 [†]	5,44331	,000	57,0184	89,6483
	39.1 ppm	Control (-)**	26,6667 [†]	5,44331	,000	10,3517	42,9816
	19.53 ppm	Control (-)**	20,0000 [†]	5,44331	,010	3,6850	36,3150
	10 ppm	Control (-)**	20,0000 [†]	5,44331	,010	3,6850	36,3150
	5 ppm	Control (-)**	13,3333	5,44331	,159	-2,9816	29,6483
	2 ppm	Control (-)**	,0000	5,44331	1,000	-16,315	16,3150
	1 ppm	Control (-)**	,0000	5,44331	1,000	-16,315	16,3150
	0.5 ppm	Control (-)**	,0000	5,44331	1,000	-16,315	16,3150

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 44,444.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

3.2. PRUEBA DE TOXICIDAD EN *Vicia faba*

Vicia faba es un organismo versátil para la realización de pruebas de toxicidad tanto con muestras ambientales como con sustancias tóxicas como los plaguicidas. La activación de la semilla es inhibida ante la presencia de sustancias tóxicas en elevada concentración que afectan su germinación. Además la división de los meristemos radiculares puede afectarse ya sea por retardo del proceso de mitosis o alteración en el proceso de alargamiento radicular (USEPA, 1998). Para esta prueba o ensayo, se determinó las siguientes concentraciones ambientales de referencia respecto a los efectos letales: CL50, LOEC, NOEC; y respecto a los efectos subletales: NOAEL y LOAEL.

3.2.1. Evaluación del efecto letal: Porcentaje de inhibición en la germinación (%IG)

La Figura 27 fue elaborada en base a los datos de Inhibición en la germinación de *Vicia faba* presentados en la Tabla 47 (Anexo 9), expuestos a las diferentes concentraciones de metamidofos.



Se observa un incremento en la inhibición de la germinación (IG) de *Vicia faba* en concentraciones crecientes de metamidofos. Evidenciándose que el mayor %IG se dio en la concentración de 5000 ppm (70%) y la menor %IG en la concentración de 1 ppm (3.33%). En el análisis de varianza - ANOVA (Tabla 27) se encontró un valor de significancia (0.00) menor a 0.05 a un nivel de confianza del 95%, por lo que se establece que las concentraciones crecientes de metamidofos ejercen un efecto diferente en la IG.

Tabla 27. Análisis de ANOVA para el efecto de metamidofos inhibición de la germinación en *Vicia faba*.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	17857,778 ^a	14	1275,556	38,267	,000
Interceptación	21342,222	1	21342,222	640,267	,000
Concentración	17857,778	14	1275,556	38,267	,000
Error	1000,000	30	33,333		
Total	40200,000	45			
Total corregido	18857,778	44			

a. R al cuadrado = ,947 (R al cuadrado ajustada = ,922)

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en *Vicia faba*.

H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en *Vicia faba*.

Si $p < 0.05$ se rechaza H₀ y se acepta H_a.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia**

- **CI50 (Concentración Inhibitoria media):**

Para poder hallar este valor se analizó los datos de inhibición en la germinación en *Vicia faba* mediante una regresión PROBIT, resultando que la concentración de 1911 ppm de metamidofos es capaz de producir la inhibición de la germinación en el 50% de las semillas expuestas (Tabla 28).

Tabla 28. Estimación de la concentración inhibitoria media (CL50) de metamidofos para *Vicia faba* mediante PROBIT.

CI 50 (Metamidofos ppm) <i>Vicia faba</i>	Límites de confianza al 95%	
	Límite inferior (ppm)	Límite superior (ppm)
1910.915	953.867	5045.849

Muñiz (2012), realizó pruebas de toxicidad en *Vicia faba* con metamidofos (formulación comercial: Lasser), encontrando una CI50 de 787.133 ppm, valor menor al encontrado en esta investigación, debido probablemente a una diferente variedad de habas usada en la misma, y una posible mayor sensibilidad de este especie a los aditivos presentes en la formulación comercial de Lasser.

Tabla 29. Resumen de la prueba de Dunnett para el %IG en *Vicia faba* a efecto del Metamidofos

	(I) Concentración de metamidofos ppm	(J) Concentración de metamidofos ppm	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de	5000 ppm	Control (-)**	70,0000*	4,71405	,000	55,8708	84,1292
Dunnett	2500 ppm	Control (-)**	53,3333*	4,71405	,000	39,2042	67,4625
(bilateral) ^a	1250 ppm	Control (-)**	43,3333*	4,71405	,000	29,2042	57,4625
	625 ppm	Control (-)**	36,6667*	4,71405	,000	22,5375	50,7958
	312.5 ppm	Control (-)**	26,6667*	4,71405	,000	12,5375	40,7958
	156.25 ppm	Control (-)**	20,0000*	4,71405	,002	5,8708	34,1292
	78.13 ppm	Control (-)**	16,6667*	4,71405	,014	2,5375	30,7958
	39.1 ppm	Control (-)**	16,6667*	4,71405	,014	2,5375	30,7958
	19.53 ppm	Control (-)**	13,3333	4,71405	,073	-,7958	27,4625
	10 ppm	Control (-)**	10,0000	4,71405	,290	-4,1292	24,1292
	5 ppm	Control (-)**	10,0000	4,71405	,290	-4,1292	24,1292
	2 ppm	Control (-)**	6,6667	4,71405	,751	-7,4625	20,7958
	1 ppm	Control (-)**	3,3333	4,71405	,998	-	17,4625
						10,7958	
	0.5 ppm	Control (-)**	,0000	4,71405	1,000	-14,129	14,1292

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 33,333.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Control (-)**: 0 ppm de metamidofos

De la Tabla 29, se plantea:

H₀: No existe diferencia significativa entre las medias de la concentración del metamidofos comparada con el Control (-).

H_a: Existe diferencia significativa entre las medias de la concentración de metamidofos comparada con el control (-).

- LOEC (Concentración más baja donde se observa efecto)

El valor de significancia al comparar la concentración 39.1 ppm con el Control (-) es 0.014 menor a 0.05, por lo que se acepta la H_a que indica que existe una diferencia significativa entre las medias comparadas, es decir que 78.13 ppm es la mínima concentración capaz de producir un efecto diferente en las semillas expuestas a metamidofos. Extrapolando a un ecosistema natural, la presencia de esta concentración en el medio ambiente puede resultar en la inhibición de la germinación de esta especie y probablemente de otros productores equivalentes en dicho ecosistema.

- **NOEC (Concentración en la que no se observa efecto letal alguno)**

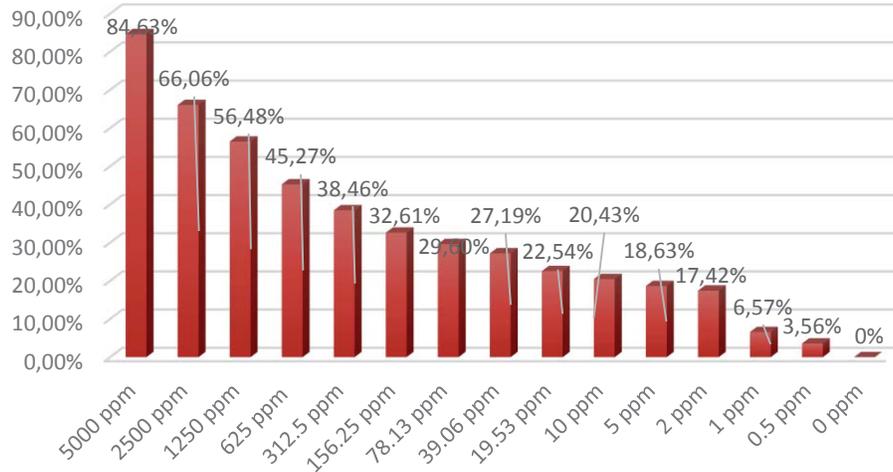
Se tiene que la concentración de 19.53 ppm fue la máxima concentración de metamidofos cuyo p-valor es mayor al mismo, por lo que se acepta la H_0 , que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias comparadas de esta concentración respecto al control (-) en cuanto a efectos. En otras palabras, esta es la máxima concentración a la cual no se observarían efectos letales o de inhibición en la germinación de *Vicia faba* y otros organismos productores de la zona.

3.2.2. Evaluación del efecto subletal en *Vicia faba*: Biomarcador de Actividad Biológica - Porcentaje de Inhibición en el crecimiento radicular (%ICR)

Como ya se mencionó, la evaluación de los efectos subletales son de mucha importancia para la ecología, puesto que las concentraciones reales encontradas en los diferentes compartimentos ambientales no son tan elevadas como para generar la muerte o en este caso la inhibición en la germinación de semillas, si no son más bien lo suficientemente cuantificables como para causar un efecto adverso en la biota con la que entra en contacto.

La Figura 28 fue elaborada en base a los datos presentados en la Tabla 48 (Anexo 9) sobre la influencia de las diferentes concentraciones de metamidofos en el crecimiento radicular de semillas de *Vicia faba*. Se observa que el mayor %ICR se da en la concentración de 5000 ppm (84.63%) donde la mayoría de las semillas no germinaron y el crecimiento radicular de las que si germinaron apenas sobrepasó los 5 mm. En síntesis, a altas concentraciones de plaguicida se produce una mayor inhibición en el crecimiento radicular. Así mismo el menor %ICR fue observado en la concentración más baja de 0.05 ppm en un 3.56%, evidenciando que aún bajas concentraciones de este plaguicida en el ambiente sería capaz de reducir el desarrollo óptimo de *Vicia faba* así como también de otros productores importantes en un ecosistema puesto que son la base de la cadena alimenticia.

Figura 28. Inhibición en el crecimiento radicular de *Vicia faba* (%ICR) a efecto de las diferentes concentraciones de metamidofos.



Mediante el análisis de ANOVA se determinó que existe diferencia estadística significativa entre las medias de las respuestas en cada concentración, teniendo un valor de p (0.00) menor a 0.05 (Tabla 30), lo que indica que la respuesta evaluada (%ICR) en *Vicia faba* y el grado de la misma depende plenamente de la concentración del plaguicida empleado.

Tabla 30. Prueba de ANOVA para el %ICR de *Vicia faba* como consecuencia de su exposición a metamidofos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	23166,707 ^a	14	1654,765	257,935	,000
Interceptación	43894,702	1	43894,702	6842,055	,000
Concentracion	23166,707	14	1654,765	257,935	,000
Error	192,463	30	6,415		
Total	67253,871	45			
Total corregido	23359,169	44			

a. R al cuadrado = ,992 (R al cuadrado ajustada = ,988)

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en *Vicia faba*.

H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en *Vicia faba*.

Si p<0.05 se rechaza H₀ y se acepta H_a.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia**

Para poder determinar la NOAEC y LOAEC, se realizó la prueba posterior al ANOVA de Dunnet (Tabla 31) que permite realizar comparaciones múltiples de las medias de cada concentración con el control (-). Se plantean las siguientes hipótesis:

H₀: No existe diferencia significativa entre las medias de la concentración del metamidofos comparada con el Control (-).

H_a: Existe diferencia significativa entre las medias de la concentración de metamidofos comparada con el control (-).

- **LOAEL (concentración mínima a la cual se observan efectos adversos en el organismo de prueba)**

En la Tabla 31, se observa que la concentración de 1 ppm tiene un p-valor (0.024) < 0.05, por lo que se acepta la hipótesis alterna (H_a) que indica que el efecto producido en dicha concentración es diferente al producido en el control (-), es decir que la inhibición en el crecimiento radicular de las semillas expuestas a dicha concentración es lo suficientemente diferente estadísticamente en contraste a su desarrollo en condiciones óptimas de un ambiente no contaminado.

- **NOAEL (concentración máxima a la cual no se observan efectos adversos en el organismo de prueba)**

En la Tabla 31, se observa un p-valor de 0.588 para la concentración de 0.5 ppm, que resulta ser mayor a 0.05 por lo que se acepta la H₀ indicando que la ICR observado en dicha concentración no es lo suficientemente relevante como para causar un efecto adverso en la población de *Vicia faba*, resultando estadísticamente iguales.

Es decir, 0.5 ppm es la máxima concentración de metamidofos a la que no se observa efectos adversos en el organismo de prueba. Específicamente, esta es la máxima concentración que no sería capaz de disminuir el rendimiento de este vegetal en su cultivo o desarrollo natural.

Tabla 31. Resumen de prueba de Dunnett para la inhibición en el crecimiento radicular (%ICR) de *Vicia faba*.

	(I) Concentración de metamidofos ppm	(J) Concentración de metamidofos ppm	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral) ^a	5000 ppm	Control (-)**	83,6300*	2,06808	,000	77,4315	89,8285
	2500 ppm	Control (-)**	65,4000*	2,06808	,000	59,2015	71,5985
	1250 ppm	Control (-)**	56,3767*	2,06808	,000	50,1781	62,5752
	625 ppm	Control (-)**	45,9967*	2,06808	,000	39,7981	52,1952
	312.5 ppm	Control (-)**	38,4667*	2,06808	,000	32,2681	44,6652
	156.25 ppm	Control (-)**	32,5200*	2,06808	,000	26,3215	38,7185
	78.13 ppm	Control (-)**	29,5533*	2,06808	,000	23,3548	35,7519
	39.1 ppm	Control (-)**	27,2400*	2,06808	,000	21,0415	33,4385
	19.53 ppm	Control (-)**	22,4933*	2,06808	,000	16,2948	28,6919
	10 ppm	Control (-)**	20,4067*	2,06808	,000	14,2081	26,6052
	5 ppm	Control (-)**	18,9300*	2,06808	,000	12,7315	25,1285
	2 ppm	Control (-)**	17,2333*	2,06808	,000	11,0348	23,4319
	1 ppm	Control (-)**	6,8367*	2,06808	,024	,6381	13,0352
	0.5 ppm	Control (-)**	3,3967	2,06808	,588	-2,8019	9,5952

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 6,415.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este. Control (-)**: 0 ppm de metamidofos

3.3. ESTIMACIÓN DE GENOTÓXICIDAD DE PLAGUICIDA METAMIDOFOS MEDIANTE EL TEST DE MICRÓNÚCLEOS (MN) EN *Vicia faba*.

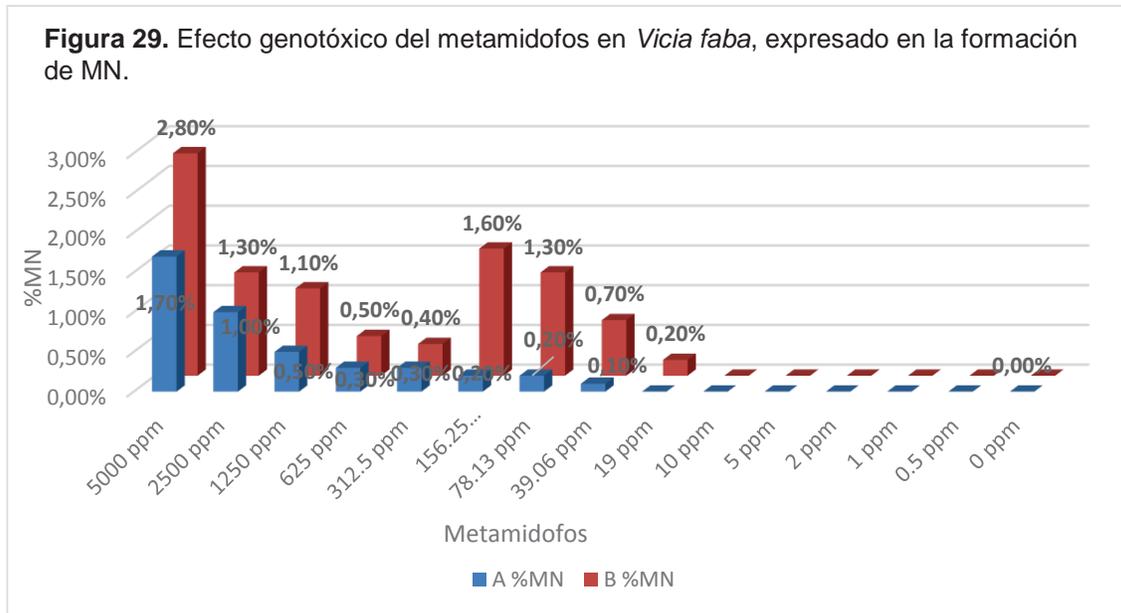
El test de MN resulta ser una prueba sencilla para la evaluación de la genotoxicidad de sustancias tóxicas, la generación de MN fue evaluada en 2 tratamientos:

A: Semillas a los 7 días de germinadas y sometidas a 6h de tratamiento con cada concentración de metamidofos.

B: Semillas a los 7 días de germinadas y sometidas a 48h de tratamiento con cada concentración de metamidofos.

Tabla 32. Efecto genotóxico del metamidofos en *Vicia faba* mediante el Test de Micronúcleos (MN).

Metamidofos (ppm)	A		B		Observaciones
	MN/1000	%MN	MN/1000	%MN	
5000	17	1.70%	28	2.80%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
2500	10	1.00%	13	1.30%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
1250	5	0.50%	11	1.10%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
625	3	0.30%	5	0.50%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
312.5	3	0.30%	4	0.40%	Algunas células en Profase y Metafase (poca división celular)
156.25	2	0.20%	16	1.60%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
78.13	2	0.20%	13	1.30%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
39.06	1	0.10%	7	0.70%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
19	0	0.00%	2	0.20%	División celular normal
10	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
5	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
2	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
1	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
0.5	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
0	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal



Tratamiento A: 6 hrs. de exposición a metamidofos
 Tratamiento B: 48 hrs. de exposición a metamidofos

La Figura 29 se obtuvo en base a los datos presentados en la Tabla 32 para poder evidenciar de mejor manera el comportamiento de la genotoxicidad de este plaguicida. Los resultados obtenidos en esta prueba evidencian que una exposición prolongada del metamidofos resulta aumentar la genotoxicidad del mismo, generando más daños al ADN. En las concentraciones de 1250 ppm a 5000 ppm se observa un incremento significativo en los MN, sin embargo se puede afirmar que estos valores podrían ser mayores si el metamidofos en elevadas concentraciones no ejerciera un efecto inhibitorio en la división celular que es fundamental para la expresión de MN.

Resulta muy importante, el incremento en la formación de MN observados en el rango de las concentraciones 156.25 ppm y 39.06 ppm de metamidofos que a pesar de no ser tan elevadas resulta en un efecto genotóxico creciente cuando se extiende la exposición de la radícula de semillas de *Vicia faba*, en dichas concentraciones no se observa una notable inhibición de la división celular por lo que probablemente ese sería el factor que favoreció la expresión de los MN, que se evidencia por la observación en el microscopio de células en diferentes etapas del ciclo celular como Profases, Metafases y Anafases. La Figura 30, evidencia el comportamiento de la generación de MN: a mayor concentración mayor inducción de MN; sin embargo, se encontró 2 puntos altos con mayor inducción de MN a 5000 ppm y 78.13 ppm.

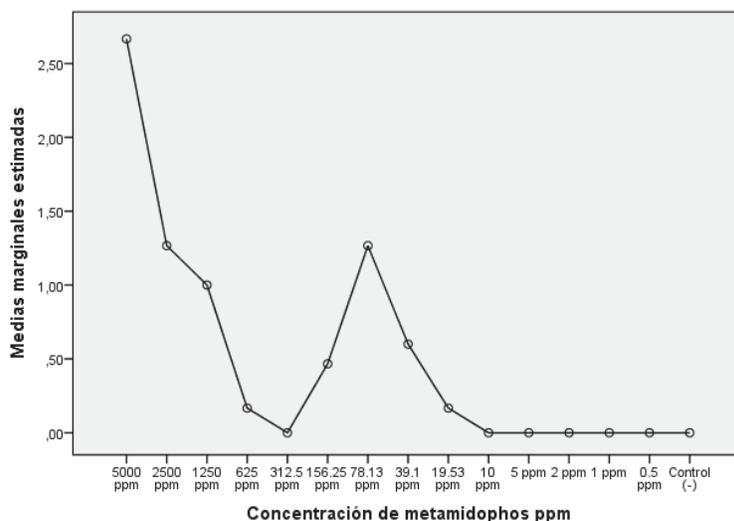


Figura 30. Comportamiento de la generación de MN en *Vicia faba* en el tratamiento B.

Según el estudio realizado por Silva *et. al.* (s/f), el Metamidofos es el plaguicida con mayor índice de genotoxicidad en comparación con Clorpirifos, Mancozeb y Paration metílico, los mismos que encontraron un comportamiento en la generación de Micronúcleos en *Tradescantia* similar al encontrado en este estudio, con dos puntos altos a concentraciones de 543 ppm (7.39% de MN) y 3065 ppm (8.47% de MN) y 2 puntos bajos a 127 ppm (3.43% de MN) y 1355ppm (3.59% de MN).

Al realizar el análisis de varianzas (ANOVA) se obtuvo un p-valor menor a 0.05 (Tabla 33), indicando que las medias observadas en la mayoría de concentraciones en cuanto a generación de MN resulta ser diferente.

Tabla 33. ANOVA para la generación de MN en *Vicia faba* expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	24,308 ^a	14	1,736	30,640	,000
Interceptación	11,552	1	11,552	203,859	,000
Concentración	24,308	14	1,736	30,640	,000
Error	1,700	30	,057		
Total	37,560	45			
Total corregido	26,008	44			

a. R al cuadrado = ,935 (R al cuadrado ajustada = ,904)

Concentraciones de metamidofos usadas: 14 más 1 Control (0ppm); Observaciones = 30
H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto genotóxico en *Vicia faba*.
H_a: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto genotóxico en *Vicia faba*.
Si p<0.05 se rechaza H₀ y se acepta H_a.

➤ **Determinación de las concentraciones de referencia**

Para poder determinar el Riesgo genotóxico, es importante el cálculo de la NOAEL y LOAEL teniendo como efecto adverso la expresión de MN, para ello se realizó la prueba post hoc de Dunnett (Tabla 34).

Tabla 34. Resumen de la prueba de Dunnett para la generación de MN en *Vicia faba* expuesta a metamidofos

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
	Concentración de metamidofos ppm	Concentración de metamidofos ppm				Límite inferior	Límite superior
T de Dunnett (bilateral) ^a	5000 ppm	Control (-)**	2,6667*	,19437	,000	2,0841	3,2492
	2500 ppm	Control (-)**	1,2667*	,19437	,000	,6841	1,8492
	1250 ppm	Control (-)**	1,0000*	,19437	,000	,4174	1,5826
	625 ppm	Control (-)**	,1667	,19437	,987	-,4159	,7492
	312.5 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826
	156.25 ppm	Control (-)**	,4667	,19437	,175	-,1159	1,0492
	78.13 ppm	Control (-)**	1,2667*	,19437	,000	,6841	1,8492
	39.1 ppm	Control (-)**	,6000*	,19437	,041	,0174	1,1826
	19.53 ppm	Control (-)**	,1667	,19437	,987	-,4159	,7492
	10 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826
	5 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826
	2 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826
	1 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826
	0.5 ppm	Control (-)**	,0000	,19437	1,000	-,5826	,5826

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,057.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este. Control (-)**: 0 ppm de metamidofos

En base a la Tabla 34, se plantean las siguientes hipótesis:

H₀: La generación de MN en la concentración analizada respecto al control resulta ser estadísticamente misma.

H_a: La generación de MN en la concentración analizada respecto al control resulta ser diferente estadísticamente.

- **NOAEL (concentración máxima a la cual no se observan efectos adversos en el organismo de prueba)**

La concentración de 19.53 ppm de metamidofos presenta un p-valor > 0.05 , por lo que se acepta la H_0 . Esta es la máxima concentración del plaguicida que no genera efectos genotóxicos en los organismos expuestos expresado por la inducción de Micronúcleos y cuyo efecto no es estadísticamente diferente al del observado en el Control negativo (0 ppm de metamidofos), en este caso específico efectos genotóxicos en *Vicia faba*.

- **LOAEL (concentración mínima a la cual se observan efectos adversos en el organismo de prueba)**

El p-valor en la concentración 39.1 ppm de metamidofos es menor a 0.05, por lo que se acepta la H_a o la del investigador, indicando que esta es la mínima concentración del plaguicida capaz de causar efectos genotóxicos manifestados en la generación de MN que además es estadísticamente diferente a las observadas en el control.

3.4. COMPILACIÓN DE DATOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA MALATION, PARATION Y ENDOSULFAN POR REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una revisión teórica de estudios toxicológicos en estos plaguicidas, realizados en los organismos de prueba utilizados en esta investigación y en otros comparables a los mismos. Los parámetros ecotoxicológicos para NOEC, LOAEC para estos plaguicidas se detallan en la tabla 36.

3.5. ANÁLISIS INTEGRADO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD

Los resultados obtenidos en los bioensayos o pruebas de toxicidad realizadas en *Eisenia sp.* y *Vicia faba* demostraron que a mayor concentración del metamidofos mayor será la toxicidad; sin embargo la genotoxicidad no cumple este patrón, teniendo dos puntos altos de inducción de MN a las concentraciones de 5000 ppm y 78.13 ppm.

Además se corroboró lo encontrado por Piola (2011), en el que se encontró un estrés tóxico producido por plaguicidas a concentraciones en las que no se observó mortalidad, evidenciado por la ICR en *Vicia faba*, y pérdida de peso y evasión en *Eisenia sp.*, indicando su utilidad para detección temprana de efectos adversos de agroquímicos sobre las poblaciones de un ecosistema.

3.6. ANÁLISIS INTEGRADO DE DOSIS APLICADA EN CAMPO, RESIDUALES EN SUELOS AGRÍCOLAS DE CHINCHERO Y CONSECUENCIAS EN EL AMBIENTE

La dosis de aplicación en campo recomendada por el proveedor para el plaguicida STERMIN (metamidofos como principio activo) es de 80 ml del concentrado soluble por cada 20 litros de agua, que es un equivalente a una solución de 2400 ppm de metamidofos que se encuentra más cercana a la concentración de 2500 ppm ensayada en la presente investigación, para la cual se encontró una mortalidad del 100% en *Eisenia sp.* y una Inhibición en la germinación (IG) de *Vicia faba* del 53.33%, y con una consecuente Inhibición en el crecimiento radicular (ICR) del 66.06%, estos datos por una parte confirman el poder nocivo de esta sustancia no solo para plagas objetivo, sino también para flora y fauna importante para el equilibrio del ecosistema terrestre del lugar, conclusión a la que se llega a partir de los resultados obtenidos con las pruebas de toxicidad o bioensayos que permiten extrapolar los resultados a otros seres vivos.

Además, el total de plaguicida empleado en dicha concentración o mayor en el cultivo de papa queda distribuida en los diferentes compartimentos ambientales y buena parte del mismo se descompone en otros componentes menos nocivos a través del tiempo.

Sin embargo el uso intenso y continuo de los mismos, no permite una recuperación completa de los recursos contaminados en el tiempo, como es el caso de los suelos agrícolas de Chinchero donde se encontró hasta 1.9 ppm de metamidofos en las muestras analizadas, que podría incrementar en el tiempo si no se mejoran las prácticas agrícolas en el lugar. Asimismo, mientras que diferentes plaguicidas incluyendo el metamidofos permanecen en elevadas concentraciones en el suelo posterior a su aplicación, causan la muerte de diferentes animales domésticos, que según lo afirmado por Marthos (2014) un 23% de los pobladores afirmaba haber observado animales muertos en sus terrenos de cultivo posterior a la aplicación de plaguicidas; así como también la muerte de otros animales silvestres como aves y abejas que generalmente rodean dichas áreas.

Siendo importante además mencionar que el empleo indiscriminado y excesivo de estos plaguicidas genera la contaminación de los recursos suelo, agua (superficial y subterránea) y aire, daño a la capa de ozono, destrucción de hábitats silvestres y la pérdida de la biodiversidad de los agroecosistemas favoreciendo la presencia de cultivos, especies de flora y fauna capaces de resistir el efecto de las aplicaciones de los mismos (Croft, 1990; Perfecto, 1995 citados en García, 1997).

4. ETAPA IV. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE PLAGUICIDAS USADOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN CHINCHERO

La Evaluación del Riesgo ha sido definida como el proceso de caracterización y estimación de la probabilidad que hayan ocurrido, estén ocurriendo o vayan a ocurrir efectos adversos en especies expuestas dentro de sistemas ecológicos debido a las actividades humanas (USEPA, 1998; Sutter, 1993). Para poder realizar la Estimación del Riesgo Ecotoxicológico en esta etapa, se compiló la información generada en etapas anteriores y de revisión bibliográfica.

4.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El problema de contaminación ambiental por plaguicidas liberados principalmente por la actividad agrícola ha sido objeto de estudio desde décadas atrás, debido a los casos de intoxicación y aun muerte humana, así como también por su contribución en el daño ecológico sobre especies no objetivo como diferentes especies de aves y muy recientemente la preocupación que se genera por la disminución en la población de abejas.

En el distrito de Chinchero se emplean una gama de plaguicidas principalmente de organoclorados, organofosforados y carbamatos para contrarrestar el efecto producido por plagas como gorgojo de los andes (*Premnotrypes latithorax*), la polilla de la papa (*Phthorimea operculella*, *Scrobipalpula absoluta*) y mildium (*Phytophthora infestans*), los plaguicidas empleados se caracterizan por su elevada toxicidad, los que son utilizados de manera intensa e incorrecta que no va en concordancia con las dosis y frecuencias recomendadas.

De la investigación realizada por Marthos (2014) se sabe que los pobladores dedicados a la producción de papa, aproximadamente el 60% de la población total, la frecuencia de la aplicación del plaguicida se dá del 37 al 53 % de los agricultores realiza la fumigación de manera quincenal, del 35 al 56% mensualmente y del 2 a 9% semanalmente, factor importante para la permanencia y adsorción de los plaguicidas en el recurso suelo, en contraste a la frecuencia de aplicación recomendada que es de 1 vez al mes.

En el caso del metamidofos, la dosis recomendada es de 80 ml del concentrado soluble de Stermin en 20 L de agua, equivalente a una concentración de 2400 ppm, sin embargo según lo manifestado por algunos pobladores de Chinchero, se emplea un mayor dosis para asegurar la muerte de las plagas y evitar que la producción de papa sea diezmada.

4.2. EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO

Esta fase incluye el desarrollo de 3 pasos importantes que llevan a la caracterización del riesgo ecotoxicológico:

4.2.1. Evaluación de la toxicidad

Se realizó la estimación de los posibles efectos adversos del metamidofos sobre los organismos expuestos *Eisenia sp.* y *Vicia faba*. Así mismo, del análisis de literatura realizado para malation, paration y endosulfan en diferentes organismos de ensayo se elaboró una tabla con los valores CL50, NOEC, NOEC, NOAEL y/o LOAEL.

Tabla 35. Resumen de Concentraciones de referencia para *Eisenia sp.* y *Vicia faba*

Organismo de prueba	Concentraciones de referencia	Metamidofos
<i>Eisenia sp.</i>	CL50	167.115 ppm
	NOEC	39.1 ppm
	LOEC	78.13 ppm
	NOAEL (Evasión)	5 ppm
	LOAEL (Evasión)	10 ppm
	LOAEL (Pérdida de peso)	0.5 ppm
	NOAEL (Pérdida de peso)	No Determinado
<i>Vicia faba</i>	CL50	1910.9 ppm
	NOEC	19.53 ppm
	LOEC	39.1 ppm
	NOAEL	0.5 ppm
	LOAEL	1 ppm
<i>Vicia faba (MN)</i>	NOAEL	19.53 ppm
	LOAEL	39.1 ppm

En la Tabla 35 se muestra un resumen de los “endpoints” para cada organismo en la ETAPA III del capítulo de resultados que son utilizados en la determinación del riesgo. El PNEC que se requiere en el Cociente de riesgo, es la concentración prevista sin efecto, que corresponde normalmente al valor NOAEL de la especie más sensible para este plaguicida, pues son datos sensibles al daño que puede generarse a la salud humana y el ecosistema.

La concentración de referencia a usar para la estimación del riesgo ecotoxicológico como valor PNEC para el metamidofos es 0.5 ppm y para la estimación del riesgo genotóxico se tiene como valor PNEC a 19.53 ppm, ello de acuerdo a la Tabla 35.

La Tabla 36 se elaboró en base a una revisión bibliográfica colectando los valores de referencia o “endpoints” en organismos equivalentes o al menos relativos a los usados en esta investigación. Para la determinación del Riesgo Ecotoxicológico y genotóxico se utilizaran los valores de NOEC y NOAEL como valores de PNEC; para hallar el riesgo genotóxico se utilizaran como valores PNEC las concentraciones que no causaban un efecto genotóxico diferente al del observado en el control.

Tabla 36. Valores de referencia relevantes en ecotoxicología a partir de revisión bibliográfica

Plaguicidas	Características de estudio	Autor(es)	Concentraciones de referencia	Valores de referencia
Malation	Ensayo de toxicidad aguda en <i>Enchytraeus albidus</i> (lombriz blanca) por 14 días.	Durkin P., 2008	NOEC	4.74 ppm
	Ensayo de genotoxicidad mediante el Test de Micronucleos en <i>Allium cepa</i> de malation, radículas sometidas a 48 hrs. de tratamiento	Bianchi J., 2008	PNEC	180 ppm
Paration	Ensayo de toxicidad en <i>Allolobophora caliginosa</i> (lombriz de tierra), por 14 días, el biomarcador evaluado es la inhibición de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa y en la pérdida de biomasa.	Olivera A., Barriuso B., Ortiz L., Capo Y., S/F	NOAEL (enzima) NOAEL (biomasa)	1 ppm 10 ppm
	Genotoxicidad evaluada mediante el ensayo de micronúcleos en tétradas de <i>Tradescantia</i> (MCN-TRAD) en 30 hrs. de tratamiento con Paration.	Silva A., García A., Rodríguez M., Cabrera G., S/F	PNEC	357 ppm
Endosulfan	Ensayo de toxicidad en <i>Eisenia foetida</i> por 14 días con endosulfan en suelo neutro.	Sowing, 2001 citado en INIA, 2003	NOEC	1 ppm
	Genotoxicidad de endosulfan-β en células humanas HepG2 in vitro tratadas por 48 hrs. se considera como NOAEL que es estadísticamente igual al observado en el control	Yuguan L., Kanehisa M., Tatsuya T., Toru T., Takeshi S., 2000	PNEC	4 ppm

4.2.2. Evaluación de la exposición

La cuantificación de la exposición se determinó por la estimación de las concentraciones de los contaminantes en el recurso suelo, que resultan ser valores más precisos en comparación a las concentraciones estimadas con el peor caso teórico en donde se emplean las concentraciones que son liberadas al ambiente, es decir las dosis de aplicación de los plaguicidas. Los valores de concentración de los plaguicidas metamidofos, malation, paration y endosulfan en las muestras de suelo de Chinchero se detallan en la ETAPA I del capítulo de resultados. Como valor PEC (concentración ambiental prevista) en esta investigación se asumen las máximas concentraciones de los plaguicidas halladas en las muestras de suelo de los que se estimará el Riesgo (Tabla 37), así como las dosis de aplicación en campo del metamidofos, lo que permitió evidenciar el riesgo ecotoxicológico y genotóxico al momento de la aplicación de este plaguicida en campo (peor caso teórico) y un mes después de la cosecha de la papa (peor caso real).

Tabla 37. Concentración ambiental de plaguicidas en muestras de suelo evaluadas

Muestras de suelo	Metamidofos* (ppm)	Paration** (ppm)	Malation** (ppm)	Endosulfan** (ppm)
SCHY01	1.15	1.2	5.33	ND
SCHY02	ND	3.02	3.96	0.374
SCHH03	1.9	2.41	2.62	ND
SCHH04	1.3	0.68	4.5	0.412
SCHA05	ND	1.83	6.25	ND
SCHA06	ND	0.92	3.73	ND

*: Datos experimentales (Tabla 35)

**Datos teóricos (Tabla 36)

Para la identificación de las rutas de emisión o liberación de las sustancias, del comportamiento de las mismas en el medio ambiente y la identificación de las vías por las que estos plaguicidas pueden ponerse en contacto con los seres vivos, se emplearon figuras que representan de manera general las características de los plaguicidas cuando entran al ambiente así como información de acuerdo a lo observado en el lugar:

En la Figura 31 se muestra un resumen de los compartimentos y receptores relevantes de estos plaguicidas, que fueron unidos mediante flechas de exposición cuyo grosor viene dado por la intensidad de tonos de los compartimentos y receptores. En la parte superior se muestran las emisiones, es decir los procesos por los que se produce la liberación de

los mismos al medio ambiente. En el centro, se encuentran los compartimentos ambientales que pueden generar exposiciones a los seres vivos. En la parte baja de la figura se encuentran los receptores ecológicos distribuidos por grupos taxonómicos y características que definen su exposición.

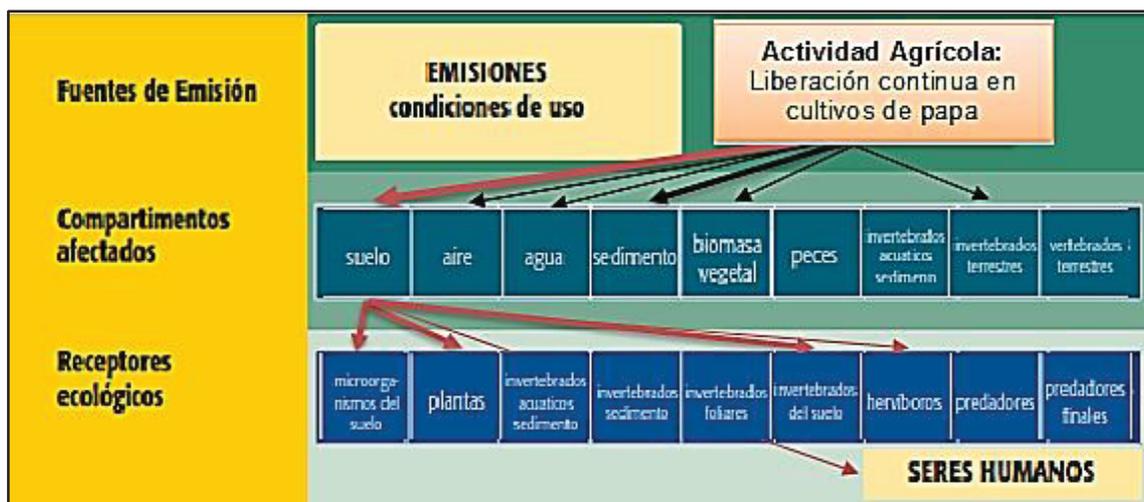


Figura 31. Tomada y adaptada de la Guía para la gestión y evaluación de riesgos de Colombia, 2007

Es importante mencionar que estos plaguicidas son compuestos de triple acción: sistémico, contacto dérmico e ingestión, siendo esas las vías por las que los mismos entran en contacto con los seres vivos que incluyen sus organismos objetivos. En la Tabla 38, se muestra un resumen de las vías potenciales de exposición para seres humanos que también resultan ser las mismas vías por las que *Eisenia sp* (Ingestión y por contacto dérmico) y *Vicia faba* (Absorción radicular) entraron en contacto con el metamidofos en la estimación de su ecotoxicidad y genotoxicidad.

Tabla 38. Resumen de las vías potenciales de exposición para los distintos medios de contacto

Medio de contacto	Vías potenciales de exposición (para seres humanos)
Suelo, polvo	Ingestión, Inhalación, Contacto dérmico
Residuos	Ingestión, Inhalación, Contacto dérmico
Aire	Inhalación
Aguas superficiales	Ingestión, Inhalación, Contacto dérmico
Aguas subterráneas (puntos de surgencia, pozos de extracción)	Ingestión, Inhalación, Contacto dérmico
Abastamiento de agua potable	Ingestión, Inhalación, Contacto dérmico
Alimentos	Ingestión

Recuperado de Guía ERSa del Perú (2015).

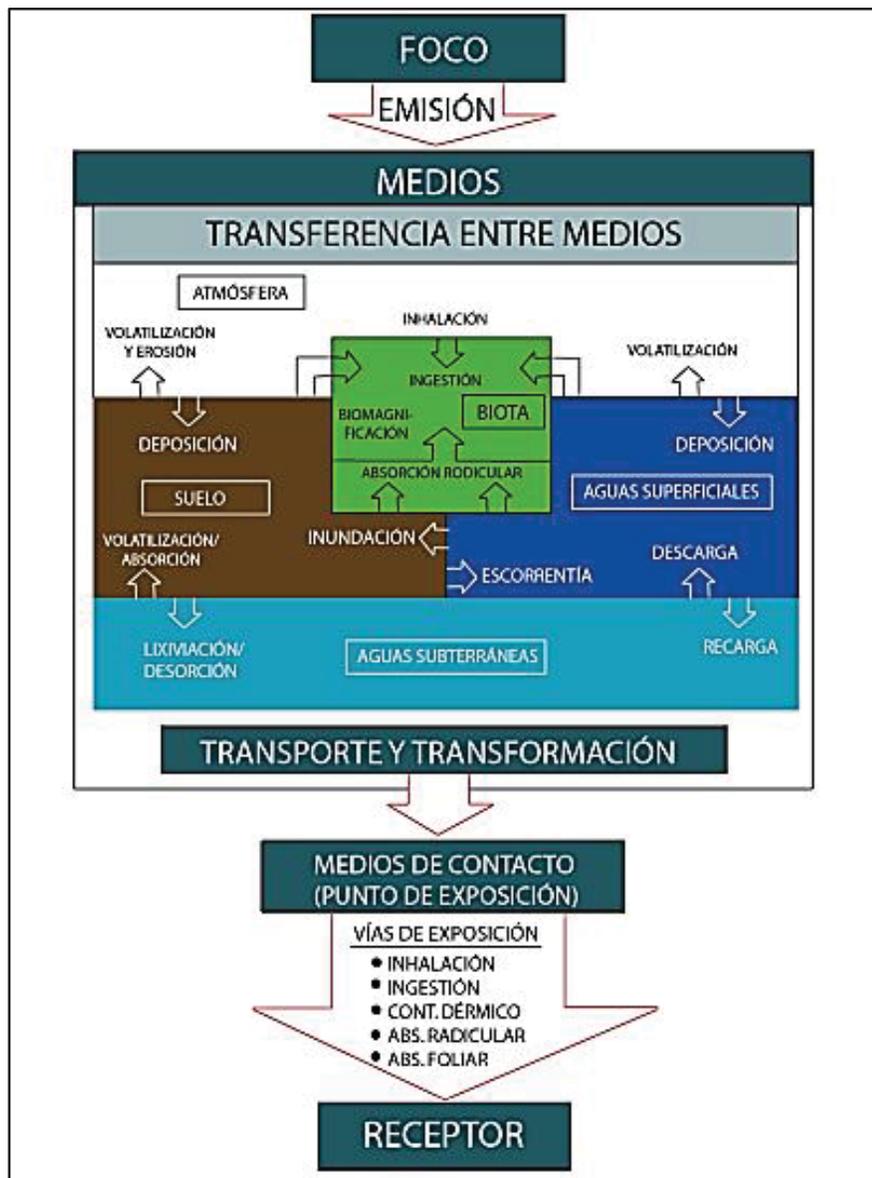


Figura 32. Tomado de la Guía ERSA, 2015. Muestra el esquema genérico y conceptual de las rutas de exposición. Que cualquier sustancia tóxica liberada al ambiente sigue, incluyendo plaguicidas como el metamidofos, malation, paration y endosulfan.

4.2.3. Caracterización del riesgo ecotoxicológico

Para la determinación del riesgo ecotoxicológico que los plaguicidas encontrados en las muestras de suelo representan para el ecosistema y la salud humana en el distrito de Chinchero, se consideran simultáneamente los resultados de la evaluación de la exposición y de los efectos, para estimar cuál es la probabilidad de que se produzcan efectos adversos y cuál será la magnitud de los mismos.

La caracterización del riesgo ecotoxicológico se realizó por una comparación de los valores de PEC, con los valores PNEC, calculando la relación PEC/PNEC, también llamada “Cociente de Riesgo” (*CR, Risk Quotient*). Para facilitar la interpretación de resultados, se tomó la tabla elaborada por Sánchez, 2008 (Tabla 39).

Tabla 39. Clasificación del riesgo ambiental según el CR

Riesgo	CR (PEC/PNEC)
Alto	≥ 10
Moderado	1-10
Bajo	≤ 1

A. Estimación del Cociente de Riesgo (CR) para el metamidofos

Se tiene como valor PEC: 1.9 ppm y como valor PNEC tenemos el NOAEL más sensible (0.05 ppm) obtenido en ambos bioensayos, es empleado para estimar el riesgo ecológico y riesgo a la salud humana.

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 1.9 \text{ ppm}/0.5\text{ppm} = 3.8$$

Se obtiene un valor de CR de 3.8, que representa un riesgo moderado para el ambiente y para el hombre como integrante del ecosistema, por lo que sería necesario recabar más información para la correcta valoración del riesgo ambiental de este plaguicida en el agroecosistema de Chinchero.

Adicionalmente, para el caso del metamidofos se estimó el Riesgo ecotoxicológico en el marco del peor caso teórico, considerando la dosis de 2400 ppm (dosis recomendada en campo) como valor PEC.

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 2400 \text{ ppm}/0.5\text{ppm} = 4800$$

El valor elevado del CR, indica un alto riesgo ecotoxicológico al momento de la liberación del plaguicida en el ambiente, que se ve notablemente reducido después de 2 meses de la última aplicación del mismo en campo.

En la investigación realizada por Iannacone *et.al.* (2008) utilizando 8 organismos no destinatarios incluyendo *Eisenia foetida* expuestas a metamidofos en su formulación de Tamaron (Ib), encontró la siguiente secuencia relativa de mayor a menor cocientes de riesgo (CR): L. abnormis > E. foetida > O. insidiosus > C. koehleri > P. laevis > C. externa > P. nigripinus. Los que mencionan que se mostró un alto riesgo para todas las especies, pues los cocientes de riesgo (CR) fluctuaron entre 3.7 y 313. Por lo cual, es importante considerar que los CR encontrados por Iannacone *et. al.* fueron halladas considerando el peor caso teórico, por lo que el elevado riesgo hallado es concordante con lo encontrado en la presente investigación tomando en cuenta el peor caso teórico. Siendo importante resaltar que la concentración biológicamente activa del metamidofos queda reducida en el tiempo, lo que se demostró en esta investigación, pues se trabajó además con “el peor caso real”, observándose una disminución del riesgo que representa el metamidofos, pero que igual resulta ser moderado a pesar del tiempo transcurrido.

B. Estimación del CR para el malation

Se tiene como valor PEC: 6.25 ppm y como valor PNEC tenemos el NOEC de 4.74 ppm:

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOEC)} = 6.25 \text{ ppm}/4.74 \text{ ppm} = 1.32$$

Este valor indica que el malation representa un riesgo moderado para el ambiente y el hombre, incluyendo los organismos que realizan sus actividades dentro del agroecosistema de Chinchero.

C. Estimación del CR para el paration

Se tiene como valor PEC: 3.02 ppm y como valor PNEC tenemos el NOAEL de 1 ppm:

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 3.02 \text{ ppm}/1 \text{ ppm} = 3.02$$

El valor de CR de 3.02 indica que el paration representa un riesgo moderado para el ambiente y el hombre en el distrito de Chinchero.

D. Estimación del CR para el endosulfan

Se tiene como valor PEC: 0.412 ppm y como valor PNEC tenemos el NOEC de 1 ppm:

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOEC)} = 0.412 \text{ ppm}/1 \text{ ppm} = 0.412$$

Este valor indica que el endosulfan representa un riesgo bajo para el ambiente, el hombre y los organismos que desempeñan un papel dentro del agroecosistema de Chinchero.

4.2.4. Caracterización del riesgo genotóxico

Para la determinación del riesgo genotóxico se procede de la misma forma para la estimación del riesgo ecotoxicológico, de hecho éste forma parte del mismo.

A. Estimación del CR para el metamidofos

Se empleó como valor PEC la mayor concentración de metamidofos encontrada en el suelo equivalente a 1.9 ppm, y como valor PNEC el valor NOEC para genotoxicidad (19.53 ppm)

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOEC)} = 1.9 \text{ ppm}/19.53 \text{ ppm} = 0.1$$

El CR es ≤ 1 , por lo que el metamidofos representa un riesgo genotóxico bajo para el recurso suelo en el distrito de Chinchero, entendiéndose que no se requieren más estudios sobre la genotoxicidad el compuesto.

B. Estimación del CR para el malation

Se empleó como valor PEC la mayor concentración de malation de 6.25 ppm, y como valor PNEC el valor NOAEL para genotoxicidad de 180 ppm.

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 6.25 \text{ ppm}/180 \text{ ppm} = 0.035$$

El CR es ≤ 1 , por lo que el malation también representa un riesgo genotóxico mínimo para el ecosistema y salud humana en las comunidades evaluadas del distrito de Chinchero, evidenciándose su reducido poder genotóxico.

C. Estimación del CR para el paration

Se empleó como valor PEC la mayor concentración de paration de 3.02 ppm, y como valor PNEC el valor NOAEL para genotoxicidad de 357 ppm.

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 3.02 \text{ ppm}/357 \text{ ppm} = 0.0085$$

El CR es ≤ 1 , por lo que el paration de igual modo representa un riesgo genotóxico trivial para el ecosistema y salud humana en las comunidades evaluadas del distrito de Chinchero, quedando expuesto su bajo potencial genotóxico.

D. Estimación del CR para el endosulfan

Se empleó como valor PEC la mayor concentración de endosulfan de 0.412 ppm, y como valor PNEC el valor NOAEL para genotoxicidad de 4 ppm.

$$\text{CR} = \text{PEC/PNEC (NOAEL)} = 0.412 \text{ ppm}/4 \text{ ppm} = 0.103$$

El CR es ≤ 1 , por lo que el endosulfan que es un plaguicida organoclorado representa un riesgo genotóxico muy bajo para el ecosistema y salud humana en las comunidades evaluadas del distrito de Chinchero, que aunque está comprobado que el endosulfan es altamente genotóxico, este plaguicida está presente en concentraciones lo suficientemente bajas para no representar ningún riesgo genotóxico.

En la Tabla 40, se presenta un resumen de los valores de CR encontrados en la presente investigación, considerando que la relación PEC/PNEC juzga si un compuesto es compatible ambientalmente, en función de que PNEC sea mayor o menor que la PEC, se observa que metamidofos, malation y paration representan un riesgo ecotoxicológico más no genotóxico para el lugar. Por lo que viene a ser necesario estudios profundos con información adicional sobre persistencia de dichos compuestos, bioconcentración y estudios en campo o mesocosmos, de tal manera que el riesgo total pueda ser caracterizado y determinado de manera precisa.

Actualmente, la capacidad de predecir y estimar la probabilidad y magnitud de un evento, hace que la ERA sea una herramienta esencial para respaldar científicamente la toma de decisiones en un amplio rango de disciplinas incluyendo la regulación de sustancias químicas (SSC, 2003; Villa et al., 2003 citado en Sánchez, 2008).

Tabla 40. Tabla resumen de los CR para el suelo agrícola del distrito de Chinchero

Tóxico	PEC (ppm)	PNEC	PNEC	CR ecotoxicológico	CR genotóxico
		Ecotoxicológico (ppm)	Genotóxico (ppm)		
Metamidofos	1.9	0.5	19.53	3.8	0.1
Malation	6.25	4.74	180	1.32	0.035
Paration	3.02	1	357	3.02	0.0085
Endosulfan	0.412	1	4	0.412	0.103

Teniendo en consideración que el objetivo de la Evaluación del Riesgo Ecológico es estimar la probabilidad y el grado de ocurrencia de efectos adversos en humanos y sistemas ecológicos a causa de la exposición a sustancias (Sánchez y Sánchez, 1984), y que el Riesgo Ecotoxicológico que representan los plaguicidas metamidofos, malation y paration es moderado, la presencia de una mezcla compleja de otros plaguicidas en el recurso suelo podría aumentar el mismo. Además, ninguno de estos 4 plaguicidas representa un riesgo genotóxico para el lugar. Es necesario considerar que es difícil estimar el riesgo que representan todos los plaguicidas presentes en el recurso suelo en conjunto para la biota del lugar incluyendo el hombre, pues los plaguicidas no interactúan con los organismos vivos individualmente sino como mezclas complejas, pudiendo ocurrir interacciones antagónicas o sinérgicas. Además, que sería muy importante la determinación de las especies sensibles en el ecosistema agrícola de Chinchero para promover su protección, que desde un punto de vista proteccionista del medio ambiente, se asume que la sensibilidad e integridad del ecosistema depende de las especies más sensibles, y que la protección de la estructura del ecosistema protege las funciones de la comunidad biológica (Sánchez, 2008).

Por lo que una de las consecuencias del empleo indiscriminado y excesivo de los plaguicidas resultaría a largo plazo en la pérdida de la biodiversidad de los agroecosistemas, donde solo se favorece la presencia del cultivo y las especies de flora y fauna capaces de resistir el efecto de las aplicaciones de estos productos, además de otros efectos como: Contaminación de varios sustratos, contaminación de aguas superficiales y subterráneas, destrucción de hábitats silvestres, biomagnificación y bioconcentración y daño a la capa de ozono (Croft, 1990; Perfecto, 1995 citados en García, 1997).

Por otro lado, en el Perú, son muy comunes las aplicaciones del metamidofos al doble de las concentraciones recomendadas y de dos a nueve aplicaciones continuas para el control de las plagas en una sola campaña por el agricultor (USEPA, 1998). Comportamiento que se repite con el uso del malation. Endosulfan y Paration están prohibidos en el Perú, pero los residuales encontrados en los mismos indicarían que en el pasado se dio una mala práctica con los mismos, y que en su momento pudieron haber representado un elevado riesgo. Este hecho originaría un mayor impacto en la fauna benéfica presentes en el suelo y entorno en general, al incrementar los niveles de exposición a las mismas.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron 7 plaguicidas de los 11 analizados por cromatografía de gases y por HPLC; metamidofos, malation, paration, endosulfan y heptacloro exceden los estándares ambientales para suelo agrícola, mientras que DDT y clorotalonil se encuentran en niveles más bajos que sus estándares. El contenido de materia orgánica y arcilla estaría favoreciendo la adsorción y retención de plaguicidas en las muestras analizadas.
2. El efecto ecotóxico de las muestras de suelo en *Eisenia sp.* no fue tan elevado como para ocasionar la muerte de los mismos. Sin embargo, las muestras de Huatata y San José mostraron un marcado favorecimiento en la pérdida de peso y evasión de esta especie en un 15.85% y 70% respectivamente, siendo en las muestras de Muyuri y Kjamu las menos ecotoxicas. El efecto tóxico evaluado en *Vicia faba* evidenció que las muestras de Huatata y San José son las más tóxicas generando la inhibición de la germinación (IG) de *Vicia faba* en un 2.67% y una ICR de 49.06% y 36.26% respectivamente. La muestra de Muyuri fue la menos ecotóxica.
3. La evaluación genotóxica por la presencia de Micronúcleos (MN) en *Vicia faba*, evidenció que la muestra procedente de Q´uerapata fue la más genotóxica pues induce la formación de MN en un 5%, y la muestra procedente de Muyuri es la menos genotóxica con 0.5% de MN.
4. El efecto tóxico del metamidofos en *Eisenia sp.* evidenció que la mayor mortalidad se obtuvo en concentraciones mayores a 625 ppm (100%), y el menor en 5 ppm (0%). Se observó un incremento significativo en la pérdida de peso y mayor evasión conforme la concentración del plaguicida aumentaba. El efecto tóxico en *Vicia faba*, mostró una marcada inhibición en la germinación (IG) e inhibición en el crecimiento radicular (ICR) directamente proporcional a la concentración.
5. El efecto genotóxico evaluado por la inducción de Micronúcleos (MN) en *Vicia faba*, evidenció que mientras más prolongada sea la exposición al metamidofos mayor será el efecto genotóxico en el organismo.

6. La especies ensayadas en la presente investigación presentaron diferentes grado de sensibilidad, siendo *Eisenia sp.* la especie más sensible al metamidofos con una CL50 de 167.115 ppm; y *Vicia faba* con una CL50 de 1910.9 ppm que mostró mayor sensibilidad a bajas concentraciones. Además, la concentración recomendada en campo de STERMIN equivalente a 2400 ppm de metamidofos, representa un riesgo ecotóxicológico y genotóxico elevado, afectando otras especies diferentes a las especies blanco que no son resistentes al mismo, el cual fue evidenciado por los efectos observados en *Eisenia sp.* y *Vicia faba*, y CR>10.

7. Los niveles residuales de metamidofos, malation y paration encontrados en los suelos de Chinchero son superiores a las concentraciones consideradas tóxicas para *Eisenia sp.*, *Vicia faba* y otros organismos. El riesgo ecotoxicológico obtenido indica que estos son compuestos peligrosos para el medio ambiente y para la biota asociada incluyendo al hombre, representando un riesgo moderado (CR>1). A diferencia del endosulfan que no representa un riesgo por encontrarse en bajas concentraciones. Así mismo, estos 4 plaguicidas no representan un riesgo genotóxico para el medio ambiente ni para los organismos vivos asociados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda:

1. La introducción de prácticas agrícolas que reduzcan la utilización de plaguicidas. Es fundamental también intensificar esfuerzos en la capacitación y la actualización permanente de los agricultores, así como fortalecer acciones de prevención y educación hacia la comunidad.
2. Realizar una Evaluación del Riesgo Ecotoxicológico y Genotóxico en el recurso agua del distrito de Chinchero donde se lleva a cabo actividad agrícola, evaluando fuentes hídricas superficiales (Huaypo y Piuray) así como subterráneas, que podrían estar siendo contaminadas por las altas concentraciones de plaguicidas, pues además la toxicidad de los mismos es mucho mayor para organismos acuáticos.
3. Realizar Evaluación del Riesgo Ecotoxicológico y Genotóxico en el recurso suelo para el plaguicida Malation de manera experimental, ya que este fue encontrado en mayor concentración, y según bibliografía es un potente biocida.
4. Identificar las especies sensibles del lugar, que podrían ser las más perjudicadas a causa de la presencia de estos plaguicidas, desarrollando la red trófica del distrito de Chinchero.
5. El presente estudio sugiere que los bioensayos son métodos adecuados para monitorear los efectos ecotóxicos y genotóxicos de suelos contaminados por plaguicidas *in situ* y un suplemento importante al método tradicional analítico para el análisis de suelos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, P. R., Cardoso, E., Martines, A. M., Sousa, J. P., & Pasini, A. (2013). Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere*, 2674-2682. Obtenido de:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512014518>
- Bianchi, J. (2015). *Análisis de efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos del insecticida malathion, utilizando el test de Allium cepa y células de mamíferos*. Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho. Instituto de Biociencias. Obtenido de:
http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87716/bianchi_j_me_rcla.pdf?sequence=1
- Bruno, A. (2016). *Estimación de los efectos ambientales y socioeconómicos del uso de plaguicidas en sistemas de producción fruti-vitícola del departamento de Canelones*. Uruguay. Disponible en:
<http://www.rapaluguay.org/agrotoxicos/Uruguay/TesisAB.pdf>.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). Obtenido de:
<https://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/26391/106/IDL-26391.pdf>
- Cuevas Días, M. d., Ferrera Cerrato, R., & Rodríguez Vázquez, R. (2008). Ensayo de Toxicidad aguda con la lombriz de tierra Eisenia andrei. En P. Ramírez Romero, & A. Mendoza Cantú, *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Cuevas Díaz, M. d., Rosaldo Santiago, J. d., & López Luna, J. (2012). Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas. En M. d. Cuevas Díaz, G. Espinosa Reyes, C. A. Ilizaliturri Hernández, & A. Mendoza Cantú, *Metodos ecotoxicologicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- De Silva, P., & Van Gestel, C. (2009). Comparative sensitivity of Eisenia andrei. *Chemosphere*, 77, 1609-1613.
- Díaz Báez, M. C., Bulus Rossini, G. D., & Pica Granados, Y. (2004). Método estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En G. Castillo Morales, *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (pág. 189). México: IMTA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua).
- Durkin, P. (2008). *Malathion. Human Health and Ecological Risk Assessment*. Atlanta: Syracuse Environmental Research Associates, Inc. Obtenido de:
https://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/0520202c_Malathion.pdf
- ESdat. (2 de Diciembre de 2016). *ESdat*. Obtenido de Environmental Management Act. Contaminated sites regulation:
<http://www.esdat.net/Environmental%20Standards/Canada/BC/Sch10.htm>

- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2008). *Assessing soil contamination. A reference manual. Pesticide Disposal Series N. 8*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/003/X2570E/X2570E00.HTM>
- Fernández, N., Pujol, E., & Maher, E. (2012). *Los plaguicidas: Aquí y ahora*. Ministerio de la Educación (1ra edición ed.). Buenos Aires, Argentina.
- Ferreros, A., Gutiérrez, M., & Cervellini, P. (2001). Evaluación en Laboratorio de la toxicidad aguda de los insecticidas malatión y deltametrina en *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *investigacion Marina Valparaiso*, 29(1), 107 - 110. Obtenido de: <http://www.scielo.cl/pdf/imar/v29n1/art09.pdf>
- Fuentes, A., Llorens, M., Saenz, J., Aguilar, M. I., Pérez Marín, A. B., Ortuño, J. F., & Meseguer, V. F. (2006). Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environmental Pollution*, 355-360.
- García Santos, G., & Keller Forrer, K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from de highlands of Colombia. *Chemosphere*, 651-656.
- García, J. E. (1997). Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. *Agronomía mesoamericana* 8(1):119-135.
- García, S., & Pérez, R. (2012). *Aplicaciones de la Cromatografía Líquida con Detector de Diodos y Fluorescencia al Análisis de Contaminantes Medioambientales. Informe Técnico 1247*. España: CIEMAT.
- Gaytán Oyarzún, J. C. (2006). *Evaluación Ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera*. Hidalgo, México: Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Obtenido de: https://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icbi/doctorado/documentos/Evaluacion%20ecotoxicologica.pdf
- Guachalla, L., & Ascarrunz, M. (Diciembre de 2003). La Genética Toxicológica: Una ciencia en constante desarrollo. *BIOFARBO*, 11.
- Hoffman, D., Rattner, B., Burton, G., & Cairns, J. (2003). *Handbook of Ecotoxicology*. Florida USA: Boca Raton.
- Iannacone, J., Onofre, R., Huanqui, O., Giraldo Gorge, Mamani, N., Miglio, M., & Alvaríño, L. (2007). Evaluación del riesgo ambiental del insecticida metamidofos en bioensayos con cuatro organismos acuáticos no destinatarios. *Agricultura Técnica*, 67(2). Obtenido de: <http://www.scielo.cl/pdf/agrtec/v67n2/at02.pdf>
- Iannacone, J., Alvaríño, L., Murrugarra, Y., Arrascué, A., Alayo, M., & Salazar, N. (2008). Selectividad del Insecticida Metamidofos en Ocho Organismos Terrestres no destinatarios. *Journal Sociedad Ecotoxicológica de Brazil (JBSE)*, 3(1), 23-34.
- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). (2003). *Endosulfan. Addendum Volume III*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Peca y Alimentación. Obtenido de: http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/submissions/Endosulfan_2008/Endosulfan_EU_ADDENDUM_B9_ECOTOX_DEC2003-san.pdf
- Katnoria, J. K., Arora, S., & Nagpal, A. (2008). Genotoxic Potential of Agricultural Soils of Amritsar. *Asian Journal of Scientific Research*, 1(2), 122 - 129. Obtenido de: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajsr/2008/122-129.pdf>

- Klassen, C., & Watkins III, J. (2001). *Manual de Toxicología*. México: McGraw Hill edit.
- Loza, I., Amurrio, P., & Rodrigo, G. (Diciembre de 2005). Evaluación Genotóxica de suelos expuestos a plaguicidas por el test de micronúcleos. *BIOFARBO*, 13.
- Marthos Queria, L. L. (2014). *Uso de plaguicidas en el cultivo de papa en cuatro comunidades del distrito de Chicnhero - Cusco*. Cusco: Seminario de Investigación. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Martínez Valenzuela, C., & Gómez Arroyo, S. (2007). Riesgo Genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23(4) 185-200, 185-200. Obtenido de:
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v23n4/v23n4a4.pdf>
- Medina, M., & Encina Montoya, F. (2003). Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el Sistema de Evaluación del Impacto Ambiental para ecosistemas acuáticos de Chile. *Revista Ambiente y Desarrollo de CIPMA*, 9(3 y 4).
- Mejías, J., & Jerez, J. (2006). *Guía para la Toma de Muestras de Residuos de Plaguicidas: Agua, Sedimento y Suelo*. Temuco, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias(INIA). Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile (ISSN0717-4829). Obtenido de:
<http://www.sag.cl/sites/default/files/GUIA%2520TOMA%2520MUESTRAS%2520PLAGUICIDAS.pdf>
- Ministerio de Agricultura (MINAG). (2011). *Cadena productiva de papa. Manejo y fertilidad de suelos. Guía Técnica de orientación al productor*. Lima. Obtenido de:
<http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/corregidopapa.pdf>
- Ministerio de Medio ambiente y Agua (MMAyA) del Estado de Bolivia. (2014). *Guía para la evaluación genotóxica de cuerpos de agua utilizando células de raíces de cebollines*. La Paz, Bolivia.
- Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS). (2006). *Diagnóstico y propuesta de ordenamiento urbano rural participativo del centro poblado de Chinchero*. Cusco.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2014). *Guía para muestreo de suelos*. Lima, Peru: En el marco del D.S. N° 002-2013-MINAM, Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo.
- Ministerio del Ambiente del Perú (MINAM). (2015). *Guía para la elaboración de estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en sitios contaminados*. Lima: En el marco del D.S. N°002-2013-MINAM, que aprueba los ECAs para Suelo. Anexo-R.M. N° 034-2015 - Guía ERSA. Obtenido de:
<http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2015/02/Anexo-R.M.-N%C2%B0-034-2015-Guia-ERSA.pdf>
- Muñiz Durán, J. G. (2012). *Valoración Toxicológica de Plaguicidas Residuales en papa cultivada: Zonas productoras de Chinchero (Cusco) y Andahuaylas (Apurímac)*. Cusco: Tesis para optar al grado de Magister. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Newman, M. C., & Zhao, Y. (2008). Ecotoxicology Nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. *Ecotoxicology*, 1187 - 1193.

- Olivera, A., Benoit, P., Barriuso, E., Ortíz, L., & Capo, Y. (S/F). *EFFECTOS DEL PLAGUICIDA OLEOBLEDANE (PARATIÓN) SOBRE LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA (AChE) Y PERDIDA DE BIOMASA EN LOMBRICES DE TIERRA*. Obtenido de: http://web.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Resumen/TS/RO/TSO-03.pdf
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). *Código Internacional de Conducta sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas*.
- Pastor, S. (2002). *Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas Europeas expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronucleos*. Tesis doctoral. Barcelona, España.
- Pauta Calle, G. (2014). *Estudio Integral de la calidad del agua del río Burgay y Evaluación del riesgo toxicológico por la probable presencia de plaguicidas*. Universidad de Cuenca. Tesis de maestría. Obtenido de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/19831>
- Piola, L. (2011). *Ensayos Ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina*. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires. Obtenido de: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4887_Piola.pdf
- Poletta, G. L. (2011). *Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en Caiman latirostris (Yacare overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis doctoral. Buenos Aires.
- Prieto García, F., Gaytán Oyarzún, J. C., Barrado Esteban, E., & del Razo Jiménez, L. M. (2003). Estudio de Acumulación y Daños Genotóxicos en Tejido celulares Sensibles por Presencia de Arsénico en Aguas y Suelos de Zimapan, Hidalgo, México. *BioPress.net*. Obtenido de <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28855.pdf>
- Pulgarín Urbina, E., & Martínez Valencia, J. A. (2010). *Estado ecotoxicológico actual en la cuenca alta del río Bogotá mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia pulex*. Tesis de grado. Bogotá: Universidad de la Salle. Obtenido de: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/13966/T41.10%20P966e.pdf?sequence=1>
- Raldúa, D. (1995). *Estudio de la Contaminación por plaguicidas organoclorados y mercurio en la ictiofauna de los ríos altoaragones Gállego y Cinca*. España: Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Ramírez, D. H., Zuluaga, A. M., & Gómez, E. d. (Diciembre de 2008). Evaluación del riesgo de contaminación por metamidfos en la microcuenca el salto del Municipio de el Santuario, Antioquía. *Revista EIA(8)*, 165-180.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). *Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. *Archivos de prevención de Riesgos Laborales 4(2):67-75*.
- Ronco, A., Díaz Báez, M. C., & Pica Granados, Y. (2004). Capítulo 1. Conceptos generales. En G. Castillo Morales, *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

- Sabroso Gonzáles , M. d., & Pastor Eix, A. (2004). *Guía sobre suelos contaminados*. Zaragoza: CEPYME - Gobierno de Aragón.
- Sadeghi, A., & Imanpoor, M. (2015). Investigation of LC50, NOEC, and LOEC of Oxadiazon, Deltamethrin,. *Iranian Journal of Toxicology*, 9(28), 1271-1276. Obtenido de: http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/1013520152808.pdf
- Sánchez Martín, M. J., & Sánchez Camazano, M. (1984). *Los plaguicidas. Adsorción y Evolución en el Suelo*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Obtenido de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>
- Sánchez Martín, M. J., & Sánchez Camazano, M. (1984). *Los plaguicidas. Adsorción y Evolución en el suelo*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Salamanca: Primera edición.
- Sánchez, O. A. (2008). *Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo de arroz en el Parque Natural de la Albufera de Valencia. Tesis para optar al grado de doctor*. Valencia: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Obtenido de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2342/tesisUPV2815.pdf>
- Shahla, Y., & D'Souza, D. (2010). Effects of pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A review. *Hindawi Publishing corporation*.
- Silva Sánchez, A., García Hernández, A. L., Rodríguez Durán, M. G., & Cabrera López , G. (s.f.). *Evaluación de la genotoxicidad potencial de suelos y agua expuestos a concentraciones elevadas de plaguicidas*. Universidad Autónoma de Queretaro.
- Sparling , D. W. (2016). Chapter 1. An introduction to Ecotoxicology. En *Ecotoxicology Essentials. Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants*. USA: ELSEVIER.
- Stachenko, E., & Martínez, J. R. (2009). *Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación* (3 ed., Vol. 1). Bucaramanga, Colombia: Scientia Chromatographica.
- Suquilanda Valdivieso, M. (S/F). *Producción orgánica de cultivos andinos (Manual técnico)*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Ecuador. Obtenido de http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
- Sutter, G. (1993). *Ecological Risk Assessment*. Florida, USA: Boca Raton.
- Tarazona Lafarga, J. V. (2007). *Manual de Evaluación y Gestión del Riesgo asociado a los COP. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. República de Colombia*. Colombia. Obtenido de: http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/pnis/colombia_evaluacion_y_gestion_del_riego.pdf
- Tecuapetla Vargas, M. G. (2014). *Ecotoxicidad producida por agroquímicos empleados en cultivo de Gebera jamensonii en invernadero, en Villa Guerrero, Estado de Mexico. Tesis para optar al grado de Maestra*. Toluca, Estado de Mexico.: Universidad Autónoma del Estado de México. Obtenido de: <https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14895/Tesis.417957.pdf?sequence=1>

- U. S. Environmental Protection Agency. (1998). *Guidelines for ecological risk assessment. Risk assessment forum*. Washington, Estados Unidos. Obtenido de:
https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/eco_risk_assessment1998.pdf
- Uribe Hernández, R. (2008). Ensayo de Inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en semillas de cebolla *Allium cepa* y Soya *Glycine max*. En P. Ramírez Romero, & A. Mendoza Cantú, *Libro Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. México: Secretaria del MEDio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Valcárcel Manga, L. R. (2005). *Percepciones, actores locales y el servicio ambiental que presta la alguna de Piuray (Chincho, Cusco)*. Lima: Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Sociales con mención en: Gestión Ambiental y Desarrollo.
- Veleminsky, J., & Gichner, T. (1992). Methods to assess adverse effects on plants. En R. G. Tardiff, *SCOPE 49 - Methods to Assess Adverse Effects of Pesticides on Non-target Organisms*. Scientific Committee On Problems of the Environment. Obtenido de: <http://www.scopenvironment.org/downloadpubs/scope49/chapter14.html>
- Yuquan, L., Kanehisa, M., Tatsuya, T., Toru, T., & Takeshi, S. (2000). Genotoxic effects of a-Endosulfan and f3-Endosulfan on Human HepG2 Cells. *Environmental Health Perspectives*, 8(6), 559-561. Obtenido de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1638147/pdf/envhper00307-0125.pdf>
- Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida d inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An Sist Sanit Navarvol*, 28(2), 227-236. Obtenido de:
<http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v28n2/revision2.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de plaguicidas en muestras de suelo procedentes de Chinchero.



FRACTAL QUÍMICOS

RUC 10238708947 - Mansel Luzuriaga 345 int 1
 Jesús María (Lima 11) - PERU - Tlf 4231669

E-mail: fractalquimicos@fractalquimicos.com

■ INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO - ASesoría CIENTÍFICA - LABORATORIOS, APARATOS CIENTÍFICOS Y REACTIVOS ■

RESUMEN DE RESULTADOS - SUELOS

ORGANO CLORADOS-OCL Y ORGANO FOSFORADOS-OP (GC-FID) Y CARBAMATOS (HPLC-DAD)
 (mg/kg = ppm)

MUESTRA SUELOS	Organoclorados (ppm)				Organofosforados (ppm)				Carbamatos (ppm)		
	End-b	Clorotalo nil	Heptacl oro	DDT	Metamidofos	Malation	Paration	Clorpirifos	Metomilo	Carbofuran	Aldicarb
SCHY01	ND	0,281 ± 0,010	ND	0,56 ± 0,025	1,15 ± 0,05	5,33 ± 0,27	1,2 ± 0,11	ND	ND'	ND'	ND'
SCHY02	0,374 ± 0,02	0,114 ± 0,006	0,042 ± 0,019	0,28 ± 0,020	ND	3,96 ± 0,20	3,02 ± 0,24	ND	ND'	ND'	ND'
SCHH03	ND	<0,060	0,055 ± 0,021	0,04 ± 0,020	1,90 ± 0,10	2,62 ± 0,13	2,41 ± 0,20	ND	ND'	ND'	ND'
SCHH04	0,412 ± 0,021	0,243 ± 0,013	0,014 ± 0,008	ND	1,30 ± 0,06	4,50 ± 0,23	0,68 ± 0,01	ND	ND'	ND'	ND'
SCHA05	ND	<0,060	0,03 ± 0,023	0,01 ± 0,006	ND	6,25 ± 0,31	1,83 ± 0,13	ND	ND'	ND'	ND'
SCHA06	ND	<0,060	0,018 ± 0,005	ND	ND	3,73 ± 0,20	0,92 ± 0,17	ND	ND'	ND'	ND'

mg/kg: miligramos por kilogramo de muestra original

ppm: partes por millón en masa

ND: no detectable-inferior a 0,002 mg/kg en la muestra original (GC-FID)

ND': no-detectable-inferior a 0,010mg/kg en la muestra original (HPLC-DAD)

* código de muestras establecido por solicitante.

Lima, 31 de agosto 2016


 Dr. JESÚS AMÉRICO CJUNCHI
 QUÍMICO
 No. Reg. C.Q.P. 452



Anexo 2. Análisis de la Humedad de muestras de suelo procedentes de Chinchero

Tabla 41. Profundidad del muestreo según el uso del suelo

MUESTRA SUELOS	COMUNIDAD	HUMEDAD^a (%p/p)
SCHY01	Yanacona-Chinchero	2,36
SCHY02	Yanacona-Chinchero	3,63
SCHH03	Huaypo-Chinchero	3,04
SCHH04	Huayco-Chinchero	3,03
SCHA05	Aylopongo-Chinchero	5,10
SCHA06	Aylopongo-Chinchero	2,65

^a Gravimétrico

Anexo 3. Análisis Físicoquímico de muestras de suelo procedentes de Chinchero.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Av. de la Cultura 733 - Pabellón "C" Of. 106 1er. piso - Telefax: 224831 - Apartado Postal 921 - Cusco Perú



UNIDAD DE PRESTACIONES DE SERVICIO DE ANÁLISIS QUÍMICO
 DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE QUÍMICA

INFORME DE ANÁLISIS

Nº0582-15-LAQ

SOLICITANTE:

MUESTRA : SUELOS

- 1.- S CHY 01
- 2.- S CHY 02
- 3.- S CHH 03
- 4.- S CHH 04
- 5.- S CHA 05
- 6.- S CHA 06

FECHA : 07/09/2015

RESULTADO ANALISIS FISICOQUIMICO:

	1	2	3	4	5	6
pH	6.67	5.75	7.05	6.70	7.82	6.70
C.E. mmhos/cm	0.68	0.76	0.98	0.78	1.09	0.64
Materia Orgánica %	3.60	3.92	3.70	4.20	2.80	3.40
Textura:						
Arena %	57	58	69	67	60	58
Limo %	35	38	25	29	33	38
Arcilla %	8	4	6	4	7	4

Cusco, 15 de Setiembre 2015


 Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
 Unidad de Prestación de Servicios Químicos
Melquides Herrera Arivica
 RESPONSABLE DEL LABORATORIO
 DE ANÁLISIS QUÍMICO

Anexo 4. Diagrama textural de la USDA y profundidad de muestreo

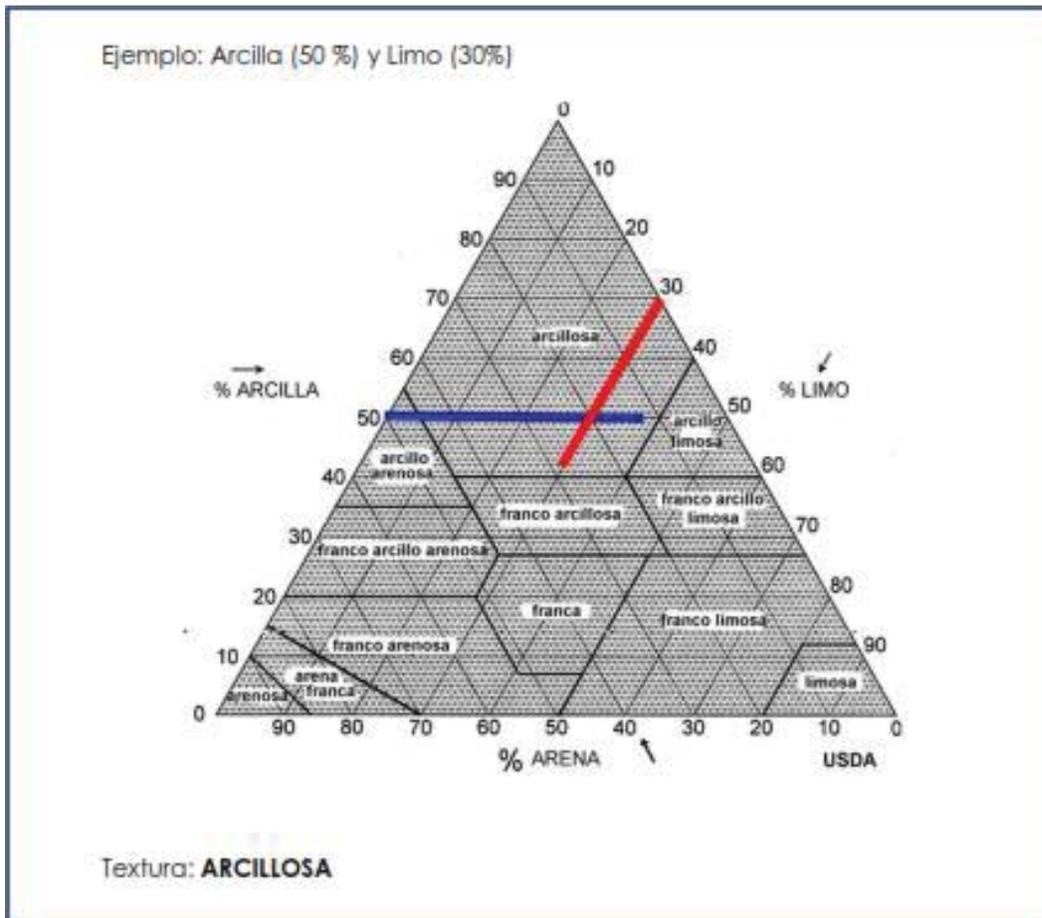


Figura 33. Diagrama Textural de la USDA

Tabla 42. Profundidad del muestreo según el uso del suelo

Usos del suelo	Profundidad del muestreo (capas)
Suelo Agrícola	0 – 30 cm (1) 30 – 60 cm
Suelo Residencial/Parques	0 – 10 cm (2) 10 – 30 cm (3)
Suelo Comercial/Industrial/Extractivo	0 – 10 cm (2)

- 1) Profundidad de aradura
- 2) Capa de contacto oral o dermal de contaminantes
- 3) Profundidad máxima alcanzable por niños

Fuente. Guía de muestreo de suelos MINAM (2014).

Anexo 5. Bioensayo con *Eisenia sp.* en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero

Tabla 43. Efecto de las muestras de suelo en la pérdida (variación) de peso de *Eisenia sp.*

M. suelo	Réplicas	Total	Vivos	Muertos	Pi (gr.)	Pf (gr.)	Pi Total (gr.)	Pf total (gr.)	$\Delta P = Pf - Pi$
Control (-)	1	10	10	0	2.4	2.6	6.8	7.5	0.7
	2	10	10	0	2.4	2.6			
	3	10	10	0	2	2.3			
SCHY01	1	10	10	0	3.1	2.8	9.1	8.4	-0.7
	2	10	10	0	2.8	2.6			
	3	10	10	0	3.2	3			
SCHY02	1	10	10	0	2.8	2.2	8.2	6.9	-1.3
	2	10	10	0	2.7	2.3			
	3	10	10	0	2.7	2.4			
SCHH03	1	10	10	0	2.6	2.1	7.7	6.4	-1.3
	2	10	10	0	2.5	2.1			
	3	10	10	0	2.6	2.2			
SCHH04	1	10	10	0	2.7	2.6	7.7	7.6	-0.1
	2	10	10	0	2.6	2.6			
	3	10	10	0	2.4	2.4			
SCHA05	1	10	10	0	2.6	2.4	7.6	6.7	-0.9
	2	10	10	0	2.7	2.4			
	3	10	10	0	2.3	1.9			
SCHA06	1	10	10	0	2.6	2.6	7	7.1	0.1
	2	10	10	0	2.5	2.4			
	3	10	10	0	1.9	2.1			

Donde:

M. suelo.: Muestra de suelo procedente del área de estudio

Pi: Peso inicial de *Eisenia sp.* por réplica (10 individuos)

Pf: Peso final de *Eisenia sp.* por réplica (10 individuos)

ΔP : Diferencia de peso

Figura 34. Bioensayo con *Eisenia sp.* con muestras de suelo

<p>Suelo neutro para Control (-)</p>	<p>Muestras de suelo agrícola</p>	<p>200 gr. de muestra para Bioensayo</p>
		
<p>Selección de Eisenias (ayunas 5hrs)</p>	<p>Cada muestra por triplicado</p>	<p>Evaluación a los 14 días</p>
		
<p>Registro de muertos y peso por tratamiento y réplica</p>		<p>Para Prueba de evasión</p>
		
<p>Prueba de evasión en <i>Eisenia sp.</i> por 48 hrs.</p>		<p>Individuos al centro de muestra problema y suelo control</p>
		

Anexo 6. Bioensayo con *Vicia faba* en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero
Tabla 44. Bioensayo en *Vicia faba* – Germinación y crecimiento radicular registrados en muestras de suelo (mm)

N°	Control (-)		SCHY 01		SCHY 02		SCHH 03		SCHH04		SCHA05		SCHH06	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
1	17.6	23.962	11.18	7.564	8	6.95	13.878	10.33	13.252	13.648	5.256	7.158	6.088	7.1
2	13.958	18.136	6.95	6.124	12.12	6.608	12.096	13.292	13.054	12.334	9.402	15.012	11.502	9.75
3	17.756	22.692	12.274	8.552	9.12	6.562	7.558	5.64	17.328	13.27	12.1	19.64	14.998	13.85
4	15.744	15.968	15.332	10.5	7.15	5.106	8.266	5.9	15.232	16.774	10.608	18.452	14.258	12.56
5	18.924	22.3	13.352	9.65	7.052	6.694	11.22	11.22	11.198	14.21	7.126	10.39	8.102	4.576
6	14.95	16.634	9.75	10.44	10.892	6.998	12.448	6.65	6.492	4.49	13.302	16.558	11.898	7.954
7	15.566	19.564	8.996	8.452	4.952	1.89	6.498	9.91	14.994	16.388	9.08	15.1	9.35	10.724
8	14.814	12.198	8.33	5.432	10.9	10.772	8.5	12.358	16.798	19.658	10.676	14.88	6.054	3.68
9	10.3	13.238	12.704	8.712	9.822	5.71	7.41	8	15.552	18.956	9.54	14.12	12.186	9.956
10	14.55	16.098	7.55	5.1	8.85	7.022	11.854	13.884	12.588	17.426	8.726	13.046	5.98	5.252
11	11.705	14.759	9.108	10.342	7.1	5.216	3.65	0	8.338	10.472	13.2	19.812	12.65	7.004
12	18.3	22.068	9.782	11.25	8.966	5.28	9.752	13	17.084	20.682	8.904	13.9	10.2	13.89
13	17.676	20.842	15.15	9.332	8.6	5.652	9.33	7.098	15.664	18.958	12	15.702	14.602	15.702
14	11.202	15.348	13.638	9.648	12.398	6.89	12.256	12.664	13.788	18.68	13.006	15.332	15.6	11.374
15	14.174	17.936	9.66	6.156	7	4.866	7.966	6.554	11.302	10.49	8.992	17.978	7.208	8.23
16	14.436	17	10.102	7.51	10.63	6.8	10.82	7.58	12	10.262	12.18	12.052	12.448	9.188
17	19.4	15.798	8.5	6.194	9.352	6.38	6.33	5.098	15.032	18.598	10.602	14.5	12.304	9.658
18	16.082	19.484	12.982	7.428	9.098	5.522	12	9.23	15.3	18	12.752	16.62	11.57	11.296
19	12.874	18.464	7.12	6.12	3.356	4.032	11.1	7.228	9.95	13.098	7.156	6.408	15.05	11
20	15.536	16.778	13.448	7.946	5.68	4.16	14.192	12.772	15.05	17.182	9.882	14.118	6.908	8.522
21	12.654	15.988	8.188	9.094	6.122	4.45	13.224	15.012	7.5	10.378	8.854	10.75	12.906	9.184
22	17.35	15.53	10.5	7.596	11.668	8.258	12.954	10.454	12.372	13.39	11.306	21.076	14.728	15.67
23	15.95	17.06	10.758	7.002	12.576	12.098	8.996	9.934	12.892	15.004	13.194	16.2	13.5	9.78
24	14.112	14.978	10.058	4.492	3.116	6	10.1	11.532	12.95	14.7	13.506	18.22	9.474	9.2
25	14.536	16.99	8.508	6.2	6.19	4.882	12.85	14.7	6.078	7.998	14.8	15.198	15.188	15.098
26	12.51	15.95	11.65	8.656	13.25	10.602	10.2	11.108	9.332	12.256	12.374	13.208	11.37	9.021
27	18.05	19.544	7.694	6.996	0	3.65	12.802	12.55	10.9	12.89	8.696	12.58	8.4	11.192
28	10.084	16.758	13.448	9.946	4.15	2.35	6.996	4.934	9.154	9.406	10.7	18.544	13.956	21.852
29	15.425	17.562	11.188	9.094	0	0	0	0	12.1	13.4	12.45	14.972	12.21	10.5
30	11.226	15.79	6.12	3.25	0	0	0	0	7.436	8.552	0	0	8.65	6.004
Prom	14.915	17.514	10.467	7.8259	7.6037	5.71333	9.5082	8.9544	12.357	14.052	10.346	14.384	11.311	10.292
D.S.	2.5631	2.7773	2.4978	1.9647	3.7325	2.70221	3.6457	4.2212	3.2056	3.9824	2.9655	4.3364	3.0314	3.7589

Figura 35. Bioensayo en *Vicia faba* en muestras de suelo

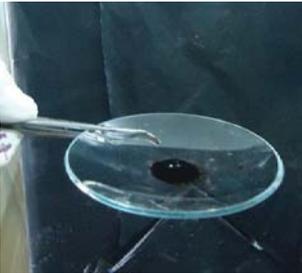
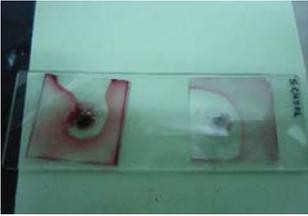
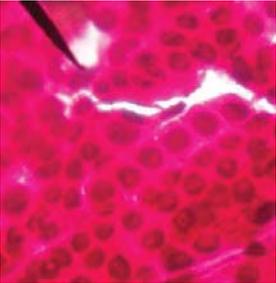
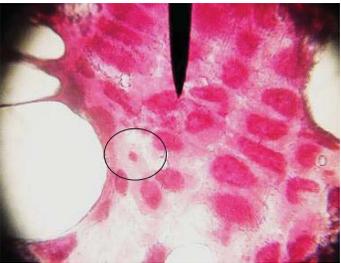
Suelo neutro para Control (-)	Muestras de suelo agrícola	100 gr. de muestra para Bioensayo
		
Hidratación de muestras	Pequeños orificios en envase para semillas	En cámara oscura hasta germinar
		
Germinación 7 días		Crecimiento radicular 14 días
		

Figura 36. Crecimiento Radicular en *Vicia faba* expuesta a suelos agrícolas procedentes del área de estudio



Anexo 7. Ensayo de Micronúcleos en radícula de *Vicia faba* expuestos a los suelos agrícolas de Chinchero

Figura 37. Ensayo de Micronúcleos en *Vicia faba*

<p>Muestras de suelo agrícola</p>	<p>200 gr. de muestra para Bioensayo</p>	<p>Germinación de semillas por 5 días</p>
		
<p>Preparación de radículas</p>	<p>Observación al microscopio</p>	<p>SCHY01 (Q'uerapata)</p>
		 <p>Observación a 400X</p>
<p>SCHY02 (Huatata)</p>	<p>SCHH03 (San José)</p>	<p>SCHH04 (Muyuri)</p>
 <p>Observación a 400X</p>	 <p>Observación a 400X</p>	 <p>Observación a 400X</p>
<p>SCHY05 (Piuray)</p>	<p>SCHY06 (Kjamu)</p>	<p>Control (-): Suelo neutro</p>
 <p>Observación a 400X</p>	 <p>Observación a 400X</p>	 <p>Observación a 400X</p>

Anexo 8. Bioensayo con *Eisenia sp.* en diferentes concentraciones de metamidofos (ppm).

Tabla 45. Efecto del metamidofos en la muerte y Pérdida de Peso en *Eisenia sp.*

Muestras (ppm)	Replicas	N° total	N° vivos	N° muertos	% Mortalidad	Pi	Pi total	Pf	Pf total	$\Delta P_{total} = Pf T - Pi T$	%Pérdida de peso
Control (-)	1	10	10	0	0%	3.6705	10.9976	3.5825	10.1023	0.89	8.10%
	2	10	10	0		3.665		3.3514			
	3	10	10	0		3.6621		3.1684			
5000	1	10	0	10	100%	4.0497	13.2251	0	0	13.23	100%
	2	10	0	10		3.8842		0			
	3	10	0	10		5.2912		0			
2500	1	10	0	10	100%	4.854	13.5716	0	0	13.57	100%
	2	10	0	10		4.4438		0			
	3	10	0	10		4.2738		0			
1250	1	10	0	10	100%	3.6715	13.0628	0	0	13.06	100%
	2	10	0	10		4.4272		0			
	3	10	0	10		4.9641		0			
625	1	10	0	10	100%	4.3788	13.5322	0	0	13.53	100%
	2	10	0	10		3.9718		0			
	3	10	0	10		5.1816		0			
312.5	1	10	2	8	73.33%	4.1376	12.0342	0.3677	1.5184	10.52	87.36%
	2	10	3	7		3.9981		0.51			
	3	10	3	7		3.8985		0.6407			
156.25	1	10	9	1	30%	5.4151	15.648	1.6661	3.6981	11.95	76.36%
	2	10	5	5		5.4696		0.9265			
	3	10	7	3		4.7633		1.1055			
78.125	1	10	9	1	13.33%	5.8824	15.8161	1.4962	4.6642	11.15	70.54%
	2	10	8	2		5.5963		1.4825			
	3	10	9	1		4.3374		1.6855			
39.0625	1	10	9	1	10%	3.4184	11.6404	1.3584	4.6336	7.01	60.22%
	2	10	9	1		3.766		1.6157			
	3	10	9	1		4.456		1.6595			
19.53	1	10	9	1	6.67%	4.3082	11.9225	2.0511	5.4601	6.46	54.19%
	2	10	9	1		3.9081		1.6562			
	3	10	10	0		3.7062		1.7528			
10	1	10	9	1	3.33%	3.8475	12.2026	1.9115	5.8114	6.39	52.38%
	2	10	10	0		4.0753		1.6995			
	3	10	10	0		4.2798		2.2004			
5	1	10	10	0	0%	3.6617	11.5427	1.968	5.9829	5.56	48.18%
	2	10	10	0		3.76		1.9309			
	3	10	10	0		4.121		2.084			
2	1	10	10	0	0%	3.4662	12.2756	2.2428	6.9223	5.35	43.65%
	2	10	10	0		4.7356		2.4875			
	3	10	10	0		4.0738		2.192			
1	1	10	10	0	0%	3.8552	13.1535	2.5537	7.8384	5.3151	40.38%
	2	10	10	0		4.2581		2.3428			
	3	10	10	0		5.0402		2.9419			
0.5	1	10	10	0	0%	3.984	12.5858	2.9519	9.3779	3.21	25.50%
	2	10	10	0		3.9943		2.986			
	3	10	10	0		4.6075		3.44			

Donde:
Muestras: Diferentes concentraciones de metamidofos en ppm
Pi: Peso inicial de *Eisenia sp.* por réplica (10 individuos)
Pf: Peso final de *Eisenia sp.* por réplica (10 individuos)
 ΔP : Diferencia de peso

Tabla 46. Ensayo de Evasión en *Eisenia sp.* expuestas a diferentes concentraciones de metamidofos

Metamidofos / Réplicas	I		II		III		TOTAL		% de evasión
	X	C(-)	X	C(-)	X	C(-)	X	C(-)	
0	6	4	5	5	5	5	16	14	100%
5000	0	10	0	10	0	10	0	30	100%
2500	0	10	0	10	0	10	0	30	100%
1250	0	10	0	10	0	10	0	30	100%
625	0	10	0	10	0	10	0	30	100%
312.5	0	10	1	9	0	10	1	29	93.33%
156.25	1	9	2	8	1	9	4	26	73.33%
78.125	2	8	1	9	1	9	4	26	73.33%
39.0625	4	6	4	6	3	7	11	19	26.67%
19.53	4	6	4	6	4	6	12	18	20%
10	4	6	4	6	5	5	13	17	13.33%
5	5	5	4	6	4	6	13	17	13.33%
2	4	6	5	5	6	4	15	15	no hay diferencia
1	5	5	6	4	4	6	15	15	no hay diferencia
0.5	4	6	6	4	6	4	16	14	no hay diferencia

Figura 38. Bioensayo en *Eisenia sp.* y Ensayo de Evasión

14 concentraciones + Control (-)	Colocar en ayunas por 5hrs	Selección de <i>Eisenias</i> para bioensayo
		
Peso antes y después de <i>Eisenias</i>	Cada muestra por triplicado	Evaluación a los 7 y 14 días
		
Desarrollo de bioensayo por 14 días		Evaluación a los 14 días (muerte y peso)
		
Prueba de evasión en <i>Eisenia sp.</i>		Desarrollo de prueba por 48 hrs.
		

Anexo 9. Bioensayo con *Vicia faba* en muestras de suelo agrícola precedentes de Chinchero

Tabla 47. Bioensayo en *Vicia faba* – Germinación de semillas expuestas a diferentes concentraciones de metamidofos

Metamidofos (ppm)		5 días		7 días		TOTAL
		G	NG	G	NG	
Control (-)	N	28	2	30	0	30
	%	95.33%	4.67%	100.00%	0.00%	
5000	N	5	25	9	21	30
	%	16.67%	83.33%	30.00%	70.00%	
2500	N	6	24	14	16	30
	%	20.00%	80.00%	46.67%	53.33%	
1250	N	7	23	17	13	30
	%	23.33%	76.67%	56.67%	43.33%	
625	N	9	21	19	11	30
	%	30.00%	70.00%	63.33%	36.67%	
312.5	N	10	20	22	8	30
	%	33.33%	66.67%	73.33%	26.67%	
156.25	N	11	19	24	6	30
	%	36.67%	63.23%	80.00%	20.00%	
78.13	N	12	18	25	5	30
	%	40.00%	60.00%	83.33%	16.67%	
39.07	N	12	18	25	5	30
	%	40.00%	60.00%	83.33%	16.67%	
19.53	N	13	17	26	4	30
	%	43.33%	56.67%	80.00%	13.33%	
10	N	15	15	27	3	30
	%	50.00%	50.00%	90.00%	10.00%	
5	N	21	9	27	3	30
	%	70.00%	30.00%	90.00%	10.00%	
2	N	22	8	28	2	30
	%	73.33%	26.67%	95.33%	4.67%	
1	N	24	6	29	1	30
	%	80.00%	20.00%	96.67%	3.33%	
0.5	N	25	5	30	0	30
	%	83.33%	16.67%	100.00%	0.00%	

Tabla 48. Bioensayo en *Vicia faba* – Crecimiento radicular (mm) en diferentes concentraciones de metamidofos – I Parte

N°	Metamidofos (ppm)																			
	5000		2500		1250		625		312.5		156.25		78.125		39.0625		19.53		Control (-)	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
1	12.5	0	13.5	7	14.3	0	12.7	11.1	15.6	12.1	15.56	9.98	12.8	10	13.98	14.5	25	17	15.98	13.2
2	0	0	13	8.5	15.9	16.3	0	0	0	0	16.68	15.1	16.8	15.7	9.8	5.1	13.02	10.7	19.96	12.1
3	8.2	0	0	0	9.7	8.9	0	0	0	0	13.52	0	14	9.1	12.1	6.3	12.4	10.3	15.4	8.6
4	9.1	0	12.6	11	0	9.1	0	0	0	0	15.1	13.3	14.4	12.1	0	0	20	18.1	14.5	10
5	0	0	0	9.3	13.4	0	0	0	15.7	13.2	17.1	14	9.67	0	21.2	20	13.6	12.2	14	9.7
6	0	0	11	0	9.9	0	13.4	4.1	15.98	15.5	0	0	15.56	11.1	12.2	8.98	16.1	17.1	21.96	14.1
7	0	0	0	0	11.5	9.7	12.1	0	15.8	13.6	0	0	10.94	0	15.5	16.02	12.5	17	15.1	14.2
8	0	0	0	0	0	0	18.6	14.7	9.96	0	9.78	0	11.4	0	0	0	0	0	14.9	9.3
9	0	0	0	0	0	0	18.7	9.89	13.6	11.2	11.6	10.6	13.4	11.1	17.5	16.1	0	0	15.1	14.8
10	0	0	0	0	0	0	18.1	0	12.7	0	15.5	14.8	0	0	14	14	15	4.6	12.8	10
11	0	0	0	0	17.3	0	0	0	10	8.98	13.7	0	12.8	0	25	20	11.4	9.7	14.9	11.2
12	9.2	0	11.2	9	0	0	17.1	15.5	16.4	16.2	13.5	11.1	12.4	7.6	13	12.6	17.1	13.7	25.1	23
13	8.5	0	12.1	10	0	0	9.6	7.8	12.6	0	0	0	0	0	11.1	7.78	12.98	9.4	13.7	8
14	9.2	0	13.5	11.4	11.1	11.4	14.5	9.02	0	0	0	0	16.6	14.8	10.8	0	12.04	0	13.9	11.2
15	0	0	0	0	14.4	7.1	15.1	6.2	14	15.3	13.98	0	0	0	15	8.56	19.1	18.1	15.2	9.94
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.9	17.98	16.4	14.6	0	0	10.1	0	15	7
17	0	0	9.6	0	0	0	0	0	15.4	13.3	13.4	5.5	14.6	13.7	12.5	0	11.8	6.2	10.1	8.44
18	0	0	12.3	0	13.5	0	0	0	13.04	11.4	14.02	11	14.1	12.3	14.8	17.4	12	7.1	12.9	9.98
19	0	0	0	0	0	0	15.1	16.1	14.2	10.1	10	0	15	17.6	12.3	9.92	12.6	7.7	25	15.1
20	0	0	0	0	0	0	13.8	15.6	11.14	0	14.2	0	13.2	8.5	13	0	11.96	6.5	14.2	9.74
21	9.5	0	0	0	0	0	12.1	14.8	13.12	10	16.5	12.03	13.5	7.5	13.04	13.2	0	0	18.1	14.7
22	11.2	0	0	9	13.1	10.6	9.2	8.1	0	0	15	14.9	0	0	14.1	15.02	11.5	10.5	17	14.1
23	0	0	10.3	0	9.7	0	9.6	0	0	0	12.6	5	17.2	15.8	13.7	10.56	21.2	15.02	14.6	9.98
24	7.7	0	0	0	11.2	0	19.98	16.1	13.3	0	15.4	12.3	17.5	15.5	0	0	12.6	0	18.9	15.1
25	0	0	0	0	13.1	15.6	0	0	18.2	17.7	0	0	15.8	12.7	13.9	8.56	12	10.1	20.1	15.5
26	0	0	13.3	8.1	0	0	13.5	9.6	16.1	13.4	13.4	10.98	10	0	0	0	14.8	13.4	21.3	21.3
27	0	0	9.5	0	10.9	6.4	0	0	9.6	7.78	0	0	13.5	5.6	15.1	5.4	0	0	14.9	10
28	0	0	14.2	12.5	14.1	14.5	15.9	5.3	16.5	12.3	17.3	14.1	14.7	5.6	17.04	11.58	28.6	15.7	22	17.1
29	0	0	12.7	8.5	13.6	0	13.02	12.5	13.4	14	12.9	12.9	14	10.1	11.34	9	14.8	13	17	14.4
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	20.14	17.54	11.7	8.8	14.2	13.02
Prom	2.837	0	5.627	3.477	7.223	3.653	9.07	5.88	10.21	7.202	11.19	6.852	11.68	7.7	12.08	8.937	12.86	9.064	16.59	12.49
D.S.	4.478	0	6.2	4.742	6.626	5.598	7.453	6.326	6.571	6.7	5.996	6.565	5.652	6.233	6.335	6.702	6.63	6.221	3.651	3.729
%ICR	84.63		66.06		56.48		45.27		38.46		32.61		29.6		27.19		22.54		0	

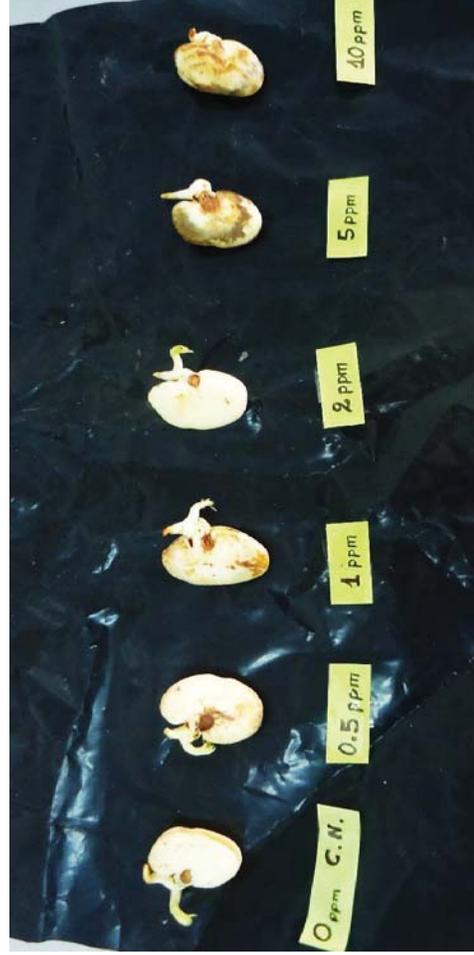
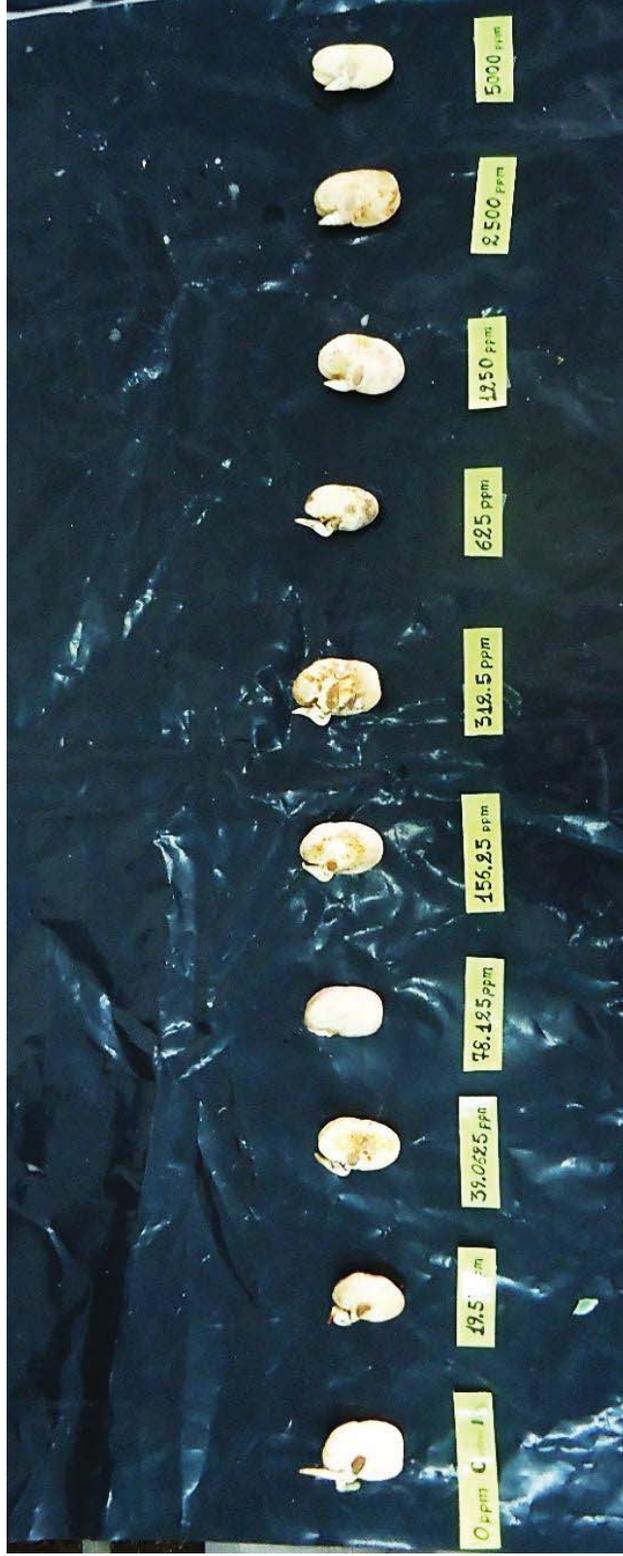
Tabla 49. Bioensayo en *Vicia faba* – Crecimiento radicular (mm) en diferentes concentraciones de metamidofos - II parte

N°	Metamidofos (ppm)											
	10		5		2		1		0.5		Control (-)	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
1	17.1	11.5	17.22	8.96	18.04	12.14	14.32	10.56	21.52	15.98	15.98	13.2
2	12.9	10	15.02	10.4	13.52	10.78	14.76	12.54	19.5	11.18	19.96	12.1
3	14.98	9.46	12.76	7.98	16	12.08	15	8.56	11.56	6.7	15.4	8.6
4	16.22	9.72	17.14	13.1	21.92	15.14	17.5	10.44	14.3	9.6	14.5	10
5	12.78	10	11.52	10	12.04	12	15.52	11.3	12.94	6.52	14	9.7
6	12.7	8	0	0	0	0	18.46	16.22	12.9	6	21.96	14.1
7	0	0	14.1	12.36	13.9	6.52	13.98	6	20.98	16.72	15.1	14.2
8	17.8	11.1	11.78	10.26	13.26	6.54	16	12.26	11.52	6.54	14.9	9.3
9	13.54	7	16.5	0	14.28	10.28	12.04	5.2	14.92	13.44	15.1	14.8
10	13	2.45	12.5	9.88	12.08	6.72	13.22	12.5	16.5	13.28	12.8	10
11	12.08	4.78	13.08	7.54	22.44	17.46	15.88	15.76	14.74	14.48	14.9	11.2
12	13.56	10	20.12	11.4	17.24	5.72	13.48	9.56	13.88	12.5	25.1	23
13	14.64	9.6	12.58	0	15.2	7.5	28	13.38	16.4	12.06	13.7	8
14	12.78	5.38	13.58	11.74	10.64	7.98	11.48	6.02	13.5	7.12	13.9	11.2
15	13.68	7.46	20	13.36	0	0	23.04	14.8	14.14	11.08	15.2	9.94
16	13.9	6.58	10.06	8.16	13.06	11.86	14.66	8.44	13.16	7.56	15	7
17	0	0	10.9	9.58	14.98	4.96	13.12	11.38	21.94	15.54	10.1	8.44
18	14.2	0	13.32	11.14	11.14	5.2	0	0	21.92	15.14	12.9	9.98
19	26.04	14.1	14.02	9.94	18.56	11.8	15.02	7.56	14.72	12.66	25	15.1
20	13.34	10.1	12.3	10.74	17.58	12.4	22.48	16.82	19.12	15.3	14.2	9.74
21	22.54	18.1	16.1	11.3	12.42	8.56	22.24	15.2	14.08	15.22	18.1	14.7
22	17.72	11	0	0	16.58	14.12	18.62	11.8	13.72	12.04	17	14.1
23	13	10.4	25.82	19.24	15.54	8.78	17.88	12.5	16	12.52	14.6	9.98
24	12.56	6.88	17.06	15.1	13	5.26	15	7.9	22.56	17.42	18.9	15.1
25	14.06	6.72	0	0	11.66	8.12	13.6	10.4	15.24	9.72	20.1	15.5
26	15	9.43	16.02	16.12	14.08	8.88	15.78	14.13	14	13.5	21.3	21.3
27	13.74	5.06	13.52	12.08	10.06	5.5	13.32	14.22	16.08	16.88	14.9	10
28	10	0	15.76	9	12.86	10.74	13.24	10.06	13	10.34	22	17.1
29	12.28	7.56	17.22	13.54	19.78	16.72	11.14	8.98	18.84	13.66	17	14.4
30	0	0	13.54	12.02	10.06	7.46	14.76	9.08	16.98	12.8	14.2	13.02
Prom	13.2	7.41	13.45	9.498	13.73	9.041	15.45	10.79	16.02	12.12	16.59	12.49
D.S.	5.464	4.46	5.564	4.959	4.924	4.204	4.763	3.712	3.274	3.392	3.651	3.729
%ICR	20.43		18.63		17.42		6.57		3.56		0	

Figura 39. Bioensayo en *Vicia faba* expuestos a metamidofos

Preparación de metamidofos (patrón)	Preparación de diluciones	14 concentraciones + Control (-)
		
Cada concentración por triplicado	En cámara oscura hasta germinar	Evaluación de la germinación 7 días
		
Germinación y elongación radicular por 14 días		Crecimiento radicular 14 días
		

Figura 40. Crecimiento Radicular en *Vicia faba* expuesta a diferentes concentraciones de metamidofos

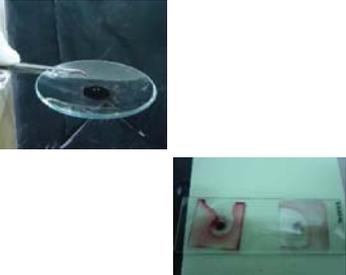
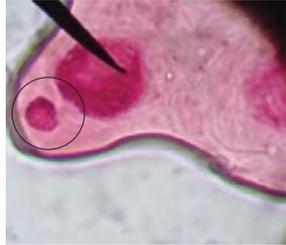
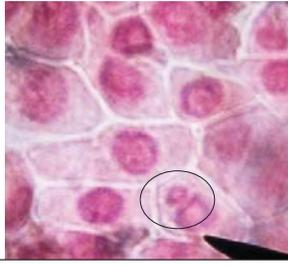
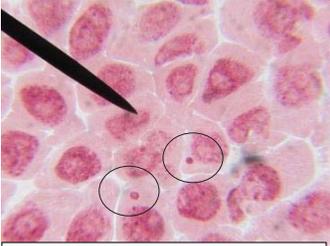
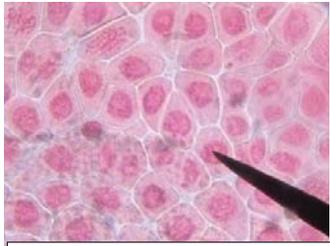


Anexo 10. Ensayo de Micronúcleos en radícula de *Vicia faba* expuestos a diferentes concentraciones de metamidfos

Tabla 50. Ensayo de Micronúcleos en *Vicia faba*

Metamidfos (ppm)	A		B		Observaciones
	MN/1000	%MN	MN/1000	%MN	
5000	17	1.70%	28	2.80%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
2500	10	1.00%	13	1.30%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
1250	5	0.50%	11	1.10%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
625	3	0.30%	5	0.50%	Muy poca división celular, algunas células en Profase
312.5	3	0.30%	4	0.40%	Algunas células en Profase y Metafase (poca división celular)
156.25	2	0.20%	16	1.60%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
78.13	2	0.20%	13	1.30%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
39.06	1	0.10%	7	0.70%	Se observa células en Profase, Metafase y Anafase (Mayor división celular)
19	0	0.00%	2	0.20%	División celular normal
10	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
5	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
2	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
1	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
0.5	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal
0	0	0.00%	0	0.00%	División celular normal

Figura 41. Bioensayo en *Vicia faba* - Metamidofos

Diferentes concentraciones de metamidofos (ppm)	Germinación de semillas por 7 días	Germinación en cámara oscura
		
Raicilla sometidas a de metamidofos por 6 hrs. Y 48 hrs.	Raicilla sometidas a cada concentración de metamidofos	Coloración con Orceína y observación a microscopio
		
Metamidofos 5000 ppm	Metamidofos 2500 ppm	Metamidofos 156.25 ppm
 <p data-bbox="256 1297 500 1325">Observación a 400X</p>	 <p data-bbox="678 1297 932 1325">Observación a 1000X</p>	 <p data-bbox="1073 1297 1312 1325">Observación a 400X</p>
Metamidofos 78.13 ppm	Metamidofos 39.06 ppm	Metamidofos 0 ppm (Control (-))
 <p data-bbox="272 1673 505 1701">Observación a 400X</p>	 <p data-bbox="683 1673 915 1701">Observación a 400X</p>	 <p data-bbox="1068 1673 1300 1701">Observación a 400X</p>

Anexo 11. Fotografías adicionales



Figura 42. Muestra compuesta y quarreo para la obtención de muestra final



Figura 43. Preparación de muestras para análisis de plaguicidas - Envío



Figura 44. Preparación de muestras para análisis fisicoquímico



Figura 45. Colección de muestras de suelos agrícola en Chinchero y entrevistas con agricultores