



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀) EN LA LOMBRIZ CALIFORNIANA, *Eisenia foetida* (LOMBRICIDAE) DE DOS FUNGICIDAS DE USO AGRÍCOLA CON EL MISMO PRINCIPIO ACTIVO (DIFENOCONAZOL)

**CARLOS DAVID GUINEA LEÓN
INGRY JOHANNA TORRES GUERRERO**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017**



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀) EN LA LOMBRIZ CALIFORNIANA, *Eisenia foetida* (LOMBRICIDAE) DE DOS FUNGICIDAS DE USO AGRÍCOLA CON EL MISMO PRINCIPIO ACTIVO (DIFENOCONAZOL)

**CARLOS DAVID GUINEA LEÓN
INGRY JOHANNA TORRES GUERRERO**

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**INGENIERO AMBIENTAL Y SANITARIO
JOHAN ALEXANDER ÁLVAREZ BERRIO
MSc. TOXICOLOGIA
(Director)**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017**



Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado



AGRADECIMIENTOS

Al ingeniero Johan Alexander Álvarez Berrio nuestro director de tesis, quien además de ilustrarnos con sus conocimientos, nos brindó permanente apoyo moral, comprensión y consejo para no rendirnos a lo largo de la realización de la tesis.

Al ingeniero Rafael Barragán, por su colaboración en el manejo del programa estadístico R-Project, para así realizar los análisis estadísticos correspondientes.

A los encargados del manejo de los laboratorios, por facilitarnos el acceso a los equipos e instalaciones para poder llevar acabo correctamente la realización del trabajo.



CONTENIDO

Resumen	13
Abstract	14
Introducción	15
1. Objetivos	16
1.1. General	16
1.2. Específicos	16
2. Marco teórico	17
2.1. Plaguicidas	17
2.1.1. Fungicidas	19
2.2. Difenoconazol	19
2.2.1. Mecanismo de acción	21
2.2.2. Persistencia	23
2.3. Estudios de toxicidad	23
2.4. Lombriz roja Californiana (<i>Eisenia foetida</i>)	24
2.4.1. Ciclo de vida	25
2.5. Cultivo del tomate en Colombia	25
2.5.1. Enfermedades en el cultivo del tomate	26
2.5.2. Fungicidas en el cultivo del tomate	26
2.6. Métodos de análisis	26
2.6.1. Método Probit	26
2.6.2. Análisis de varianza (ANOVA)	27
3. Metodología	28
3.1. Materiales y equipos de laboratorio	29
3.2. Diseño experimental	30
3.2. Recolección de suelo	30
3.3. Prueba de retención de agua	31
3.4. Preensayo	32
3.4.1. Cálculo de la concentración letal 50	32
3.5. Bioensayo	33
3.5.1. Condiciones de prueba	33
3.5.2. Organismos de prueba	34
3.5.3. Cálculo de las concentraciones	36
3.5.4. Aplicación del fungicida	37
3.5.5. Determinación de la concentración letal 50	37
3.5.6. Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA	38
4. Resultados	39
4.1. Pre ensayo	39
4.1.1. Prueba de retención de agua	39



4.1.2.	Cálculo concentración pre ensayo	39
4.2.	Bioensayo	40
4.2.1.	Prueba de retención de agua	40
4.2.2.	Cálculo de la concentración.	40
4.2.3.	Parámetros fisicoquímicos	42
4.2.4.	Determinación de la concentración letal 50.....	46
4.2.5.	Prueba estadística de Análisis de varianza (ANAVA).	47
5.	Análisis	48
5.1.	Pre ensayo.....	48
5.2.	Prueba de retención de agua.....	48
5.3.	Bioensayo	48
5.3.1.	Parámetros fisicoquímicos.	48
5.3.2.	Determinación de la concentración letal 50.....	53
5.3.3.	Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA.	56
6.	Impacto social	59
7.	Conclusiones	60
8.	Recomendaciones	61
9.	Bibliografía	62



LISTA DE TABLAS

Tabla 2-1. Clasificación de plaguicidas según su uso [5].....	17
Tabla 2-2. Clasificación según su toxicidad [6].	17
Tabla 2-3. Clasificación según su vida media [1].	18
Tabla 2-4. Clasificación según familia química [7].	18
Tabla 2-5. CL ₅₀ de algunos organismos [13].....	20
Tabla 2-6. Propiedades fisicoquímicas [15].	20
Tabla 2-7. Toxicidad agua del difenoconazol [21].....	24
Tabla 3-8. Materiales y equipos.	29
Tabla 4-9. Promedio de humedad del suelo con el plaguicida 1.....	42
Tabla 4-10. Promedio de humedad del suelo con el plaguicida 2.....	43
Tabla 4-11. Promedio del pH del suelo con el plaguicida 1	43
Tabla 4-12. Promedio del pH del suelo con el plaguicida 2	43
Tabla 4-13. Promedio de temperatura del suelo con elplaguicida 1	44
Tabla 4-14. Promedio de temperatura del suelo con el plaguicida 2	44
Tabla 4-15: Promedio de mortalidad (%) de las lombrices con el plaguicida 1	45
Tabla 4-16: Promedio de mortalidad (%) de las lombrices con el plaguicida 2	45
Tabla 4- 17: Promedio de la luminosidad (lux) para el plaguicida 1.....	45
Tabla4- 18: Promedio de la luminosidad (lux) para el plaguicida 2.....	46
Tabla 4-19. Peso (g) de las lombrices tratadas con el plaguicida 1	46
Tabla 4-20. Peso (g) de las lombrices tratadas con el plaguicida 2	46
Tabla E.2. Prueba de efectos inter-sujetos	74



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 4-1. Concentración vs mortalidad	40
Gráfica 5-2. Humedad relativa del suelo con el plaguicida 1	49
Gráfica 5-3. Humedad relativa del suelo con el plaguicida 2	49
Gráfica 5-4. Temperatura del suelo con el plaguicida 1	50
Gráfica 5-5. Temperatura del suelo con el plaguicida 2	50
Gráfica 5-6. pH del suelo con el plaguicida 1	51
Gráfica 5-7. pH del suelo con el plaguicida 2	51
Gráfica 5-8. Luminosidad para el plaguicida 1	52
Gráfica 5-9. Luminosidad para el plaguicida 2	52
Gráfica 5-10. Peso de las lombrices tratadas con el plaguicida 1	53
Gráfica 5-11. Peso de las lombrices tratadas con el plaguicida 2	53
Gráfica 5-12. Porcentaje de mortalidad de las lombrices con el plaguicida 1	54
Gráfica 5-13. Porcentaje de mortalidad de las lombrices con el plaguicida 2	55



LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1. Estructura química del difenoconazol [13].....	20
Ilustración 2-2. Ruta de la biosíntesis del ergosterol [16].....	22
Ilustración 3-3. Diagrama de flujo del ensayo toxicológico con la lombriz californiana (Eisenia foetida).....	28
Ilustración 3-4. Montaje experimental de los fungicidas.....	30



LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 3-1. Lugar de recolección del sustrato	30
Fotografía 3- 2. Prueba de retención de agua	31
Fotografía 3- 3. Parámetros fisicoquímicos.....	34
Fotografía 3- 4. Organismos de prueba	34
Fotografía 3- 5. Adaptación de lombrices	35
Fotografía 3- 6. Limpieza de lombrices.....	35
Fotografía 3- 7. Aplicación superficial del fungicida	37



LISTA DE ANEXOS

A. Anexo. Análisis con el método Probit para la determinación de la concentración letal 50	65
B. Anexo. Diagrama de caja de los plaguicidas	67
C. Anexo. Área bajo la curva de cada replica de los dos plaguicidas	69
D. Anexo. Análisis de varianza de parámetros fisicoquímicos	70
E. Anexo. Análisis de varianza ANAVA Univariable	74



LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

DCA	Diseño completamente aleatorio
FAO	Food and Agriculture Organization
Na ⁺	Iones de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Concentración de Ións hidrogeno
ml	Mililitros
H_2O	Agua
DL50	Dosis letal 50
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
EC	Concentración emocionable
°	Grados
C	Celsius
mmHg	Milímetros de Mercurio
g	Gramos
Kg	Kilogramo
cm ³	Centímetros cúbicos
mPas	Mega Pascales
DT50	Tiempo de dispersión
Koc	Coeficiente de adsorción de carbono orgánico
Hg	Hectogramo
Ha	Hectárea



Resumen

Mediante pruebas de toxicidad aguda se evaluó la CL_{50} del fungicida Difenconazol 250 EC en la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), siendo este ampliamente usado en el campo de la agricultura para controlar enfermedades en cultivos de cereales, hortalizas, vegetales, entre otros; donde su aplicación extensa puede causar efectos en organismos no objetivo. Para llevar a cabo el estudio se tomó como referencia la metodología de la EPA (OPPTS 850.6200), con un diseño experimental completamente aleatorio, en el cual se tuvo un control y cinco concentraciones por cada fungicida, cada uno con 4 réplicas, para un total de 44 unidades experimentales, con 10 individuos cada una.

Las unidades experimentales estaban conformadas por envases PET con una capacidad volumétrica de 1 litro, los cuales contenían 500 g de suelo proveniente de un cultivo de tomate de la vereda Gaunza del municipio de Guateque, Boyacá; este recipiente se encontraba cubierto con tela de lino para evitar el contacto directo con la luz y el intercambio de oxígeno. Tanto para el preensayo como para el bioensayo se calculó la capacidad de retención de agua del suelo, para obtener un porcentaje de humedad del 70%. Para las concentraciones usadas en el preensayo se tomó como base un dictamen técnico y de esta manera obtener una concentración de referencia para el ensayo final. Luego, se determinó las concentraciones finales (0,04, 0,128, 0,217, 0,306 y $0,395 \frac{ml}{0,5kg}$), una vez terminado el monitoreo se determinó la concentración letal 50 de los dos plaguicidas, obteniendo una concentración de $0,3911 \frac{ml}{0,5kg}$ para el plaguicida 1, mientras que para el 2 $0,3647 \frac{ml}{0,5kg}$.

Para verificar que los parámetros fisicoquímicos no incidirán en la mortalidad de las lombrices se realizó una correlación entre estas variables obteniendo que no existe relación entre ellas. Por otro lado, se calculó el área bajo la curva para todas réplicas, y se realizó un análisis de varianza concluyendo que el plaguicida 2 es más tóxico que el plaguicida 1, ya que requiere de menos concentración para llegar a la misma mortalidad y el peso en el plaguicida 2 se ve más afectado a concentraciones más bajas.

Palabras claves: Bioensayo, Concentración letal 50, Difenconazol, *Eisenia foetida*, plaguicidas.



Abstract

Through acute toxicity tests are evaluated the CL50 of the fungicide Difenoconazole 250 EC in the californian red worm (*Eisenia foetida*), which is widely used in the field of agriculture to control diseases in cereal crops, vegetables, vegetables, among others; where your application can cause effects on organisms not targets. To carry out the study was taken as reference the methodology of the EPA (OPPTS 850.6200), with a completely randomized experimental design, in which there was a control and five concentrations for each fungicide, each with 4 replicas, for a total of 44 experimental units, with 10 individuals each.

The experimental units were made up of PET containers with a volumetric capacity of 1 liter, which contained 500 g of soil from a tomato crop Gaunza in the village of the municipality of Guateque, Boyacá; this container was covered with linen cloth to avoid direct contact with the light and the exchange of oxygen. For both the preensayo as for the bioassay was calculated the water retention capacity of the soil, to obtain a percentage moisture content of 70%. For the concentrations used in the preensayo was taken as the basis of a technical opinion and in this way obtain a reference concentration for the final trial. Then, it was determined the final concentrations ($0,04$, $0,128$, $0,217$, $0,306$ y $0,395 \frac{ml}{0,5kg}$), once the monitoring was completed, the lethal concentration 50 of the two pesticides was determined, obtaining a concentration of $0.3911 \frac{ml}{0,5kg}$ for the pesticide 1, while for the 2 $0,3647 \frac{ml}{0,5kg}$.

To verify that the physico-chemical parameters do not affect the mortality of the worms there was a correlation between these variables getting that there is no relationship between them. On the other hand, we calculated the area under the curve for all replicas, and an analysis of variance 2 concluding that the pesticide is more toxic than the pesticide 1, because it requires less concentration to get to the same mortality and weight in the pesticide 2 is most affected at lower concentrations.

Keywords: Bioassay, Lethal Concentration 50, Difenoconazole, *Eisenia Foetida*, Pesticides



Introducción

Los plaguicidas son ampliamente usados para controlar las plagas que afectan la calidad de los alimentos, siendo la agricultura la actividad que mayor emplea estos productos, representan el 85% de la producción mundial. Su uso excesivo se da por la gran cantidad de alimentos que requieren ser cultivados, lo que da lugar a las afectaciones en el ambiente y en la salud de las personas [1].

El transporte y destino de este contaminante en el ambiente puede realizarse en aire, agua o suelo; dependiendo del medio en el que se encuentre y en cada uno de estos medios de exposición, su dispersión y concentración es diferente. Por otro lado, la afectación en la salud de las personas depende de las vías de exposición; ya sea vía digestiva, dérmica o respiratoria. Los efectos pueden ser agudos o crónicos, y ser subsecuentes a una exposición a corto plazo y con efectos sistémicos, o exposiciones a largo tiempo, pero a bajas concentraciones [2].

Estudios de toxicidad en plaguicidas evidencian lo anterior, sirviendo como herramienta para observar los efectos tóxicos presentados en el ambiente y en la salud de la población. La concentración letal 50 (CL₅₀) es uno de estos estudios, permite conocer el grado de toxicidad de un compuesto, tomando como indicador la mortalidad de la población expuesta al plaguicida. En este caso se tiene como organismo de prueba la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), esta permite adaptarse a varias condiciones y resistir diferentes concentraciones de compuestos, haciéndola ideal para someterse a pruebas de toxicidad [3].

En este trabajo se determinó la CL₅₀ mediante la comparación de dos plaguicidas con el mismo principio activo (difenoconazol), tomando como guía la metodología de la EPA (OPPTS 850.6200) y usando como sustrato biológico la lombriz roja californiana (*Eisenia Foetida*). Para llevar a cabo este experimento se hizo uso del diseño experimental completamente aleatorio, el cual sirvió para disminuir el error experimental y evidenciar los efectos que ocasionó el plaguicida en las lombrices. Además, se tuvo en cuenta únicamente el peso de las lombrices para determinar la incidencia de los plaguicidas sobre ellas, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones. Cabe resaltar que se controló los parámetros de humedad, temperatura, pH y luminosidad, con el fin de que todas tuvieran las mismas condiciones. Los datos obtenidos fueron analizados en SPSS por el método de ANOVA obteniendo una significancia entre las concentraciones y las mortalidades; en el plaguicida 2 se registró mayor mortalidad que el plaguicida 1, donde posiblemente los coadyuvantes y excipientes pudieron incidir en la toxicidad del producto.



1. Objetivos

1.1. General

Determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) de dos fungicidas con el mismo principio activo, mediante un bioensayo basado en la metodología de la EPA (OPPTS 850.6200) usando como sustrato biológico la lombriz californiana (*Eisenia foetida*).

1.2. Específicos

- Plantear un diseño experimental que permita el desarrollo del bioensayo.
- Reconocer cuál de los dos fungicidas presenta un mayor riesgo toxicológico en la lombriz californiana.
- Definir el efecto que ejerce los fungicidas sobre el peso de las lombrices.



2. Marco teórico

2.1. Plaguicidas.

Según la FAO en el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas es definido el plaguicida como: “cualquier sustancia o mezcla destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plagas incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los amínales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas. El termino incluye sustancias destinadas a utilizar como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte” [4]. Los plaguicidas tienen diferentes clasificaciones, las cuales dependen de su uso, toxicidad, vida media o familias químicas, a continuación, se muestra cómo es su clasificación:

Existe diferentes tipos de plaguicidas que se clasifican dependiendo del tipo de plaga a la que atacan (Tabla 2-1);

Tabla 2-1. Clasificación de plaguicidas según su uso [5].

Tipo de plaguicida	Plaga que ataca
Insecticida	Insectos
Herbicida	Hierbas
Rodenticidas	Roedores
Funguicida	Hongos
Acaricidas	Ácaros
Bactericidas	Bacterias
Alguicidas	Algas
Molusquicidas	Moluscos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) es quien plantea esta clasificación, teniendo en cuenta el valor de la dosis letal 50 (DL₅₀), basándose en estudios toxicológicos por distintas vías de exposición y diversos sustratos biológicos. La clasificación incluye categorías que van desde las sustancias ligeramente peligrosas hasta extremadamente peligrosas (Tabla 2-2) [6].

Tabla 2-2. Clasificación según su toxicidad [6].

Clase	Toxicidad
IA	Extremadamente peligroso



IB	Altamente peligroso
II	Moderadamente peligroso
III	Ligeramente peligroso

Con la vida media de efectividad de los plaguicidas se puede saber el tiempo de duración que tienen en el ambiente, los cuales pueden ser persistentes hasta no persistentes (Tabla 2-3) [1].

Tabla 2-3. Clasificación según su vida media [1].

Persistencia	Vida Media
Permanentes	Indefinidamente
Persistentes	De meses hasta 20 años
Moderadamente persistentes	De 1 a 18 meses
No persistentes	De días hasta 12 semanas

Esta clasificación se da de acuerdo con la estructura química de los plaguicidas, permitiendo que se ordenen por familias químicas (Tabla 2-4) [7].

Tabla 2-4. Clasificación según familia química [7].

Familia	Descripción
Organoclorado	Son demasiado estables y se tienden a acumular en el tejido graso. Afectan el sistema nervioso central.
Organofosforados	Son esteres derivados del ácido fosfórico, afecta el sistema nervioso central mediante la inhibición del acetil colinesterasa.
Carbamatos	Son esteres derivados de ácidos o dimetil N-metil-carbámico. Son menos persistentes que los organoclorados y organofosforados, sin embargo, también inhibe al acetil colinesterasa



Piretroides	Se originan de insecticidas naturales o sintéticamente. Afectan el sistema nervioso central causando cambios en la dinámica de los canales de Na^+ en la membrana de la célula nerviosa.
-------------	--

2.1.1. Fungicidas.

Son sustancias químicas que sirven para impedir el crecimiento o eliminar los hongos y mohos. Son usados en la industria, la agricultura, el hogar y jardín para la protección de las semillas, flores y frutos; pueden penetrar el tejido vegetal y de esta forma atacan el hongo que está afectando el cultivo [8].

Los fungicidas presentan la siguiente clasificación según su grupo químico [9]:

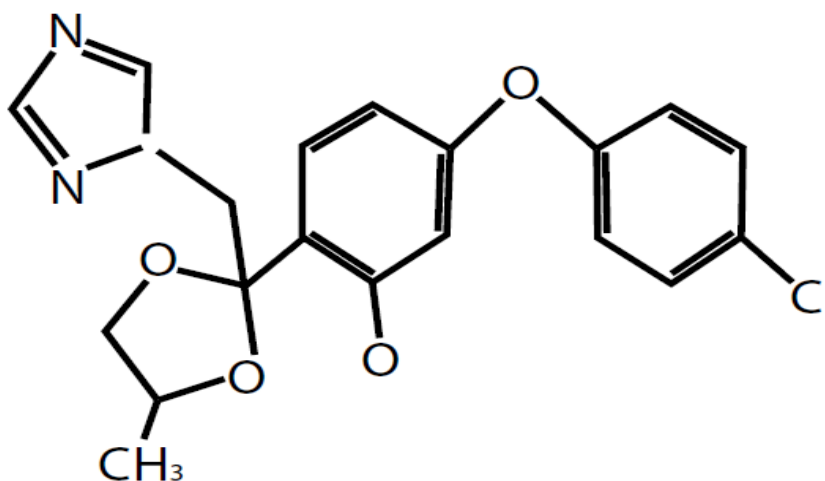
- Metoxiacrilatos (Estrubirulinas): es eficaz contra los hongos que afectan a los cereales. Se han presentado efectos colaterales como lo es la reducción de la respiración, retraso de la senescencia (consecuencia del estrés y daño en la célula), actividad del metabolismo del nitrógeno, entre otros [10].
- Triazoles: su modo de acción es específico ya que inhibe la biosíntesis de esterol, el cual es un componente crítico para la integridad de las membranas celulares de los hongos [11].
- Bencimidazoles
- Derivado del benceno
- Ditiocarbamato

2.2. Difenoconazol.

Nombrado por la IUPAC con el nombre de cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil-4-clorofenil éter [12]. Su nombre químico es 1-[2-[4-(4-clorofenoxil)-2-clorofenil]4-metil-1,3-dioxan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol [13]. Su estructura química se muestra en la Ilustración 2-1.



Ilustración 2-1. Estructura química del difenoconazol [13].



Es un fungicida del grupo triazol, su acción es de contacto y sistémico, con actividad de erradicar, prevenir y curar. Es adecuado para el control de enfermedades por complejos fúngicos [14].

Es considerado moderadamente peligroso (clase II), donde la CL₅₀ en los organismos tiene las siguientes concentraciones (Tabla 2-5):

Tabla 2-5. CL₅₀ de algunos organismos [13].

Organismo	CL ₅₀
Acuáticos	> 200 ^o mg/kg
Abejas (96 horas)	375,13 µg/abeja
Lombriz de tierra (14 días)	610 mg/kg

Este fungicida es toxico para los organismos acuáticos, y a largo plazo pueden provocar efectos negativos. Además, la exposición repetida de este elemento puede provocar sequedad y formación de grietas de la piel [15].

Las propiedades fisicoquímicas del difenoconazol de muestran en la Tabla 2-6:

Tabla 2-6. Propiedades fisicoquímicas [15].

Color	Amarillo a marrón
-------	-------------------



pH	4 a 8
Punto de ebullición	220 °C
Punto de inflamación	63 °C a 770 mmHg
Densidad	1,04 – 1,08 g/cm ³
Viscosidad	A 20 °C de 35 a 40 mPas
Solubilidad en agua	Insoluble

2.2.1. Mecanismo de acción.

El difenoconazol es absorbido rápidamente por las partes verdes de la planta, su movimiento en el interior de ella es translaminar con translocación acrópeta¹. Su modo de acción consiste en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, actuando principalmente en la desmetilación del C14. No actúa sobre la germinación de esporas, ni sobre las hifas del hongo. Impide el crecimiento subcuticular del micelio y el desarrollo de los síntomas de enfermedades. [14].

La ruta de la biosíntesis del ergosterol inicia en la conversión de Acetil-CoA a mevalonato, esta reacción es catalizada por la tiolasa, que consiste en la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA. Luego esta reacciona con otra molécula de acetil-CoA para producir el 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La enzima HMG-CoA reductasa, depende de NADPH, reduce al HMG-CoA hasta mevalonato [16].

Posteriormente el mevalonato es transformado a escualeno, donde el mevalonato sufre una serie de reacciones hasta convertirse en isopentenil pirofosfato, que se transforma en su isómero dimetilalil pirofosfato. Ambas moléculas, con 5 carbonos cada una, se condensa y produce geranil pirofosfato, que reacciona con otra molécula de isopentenil pirofosfato generando el farnesil pirofosfato, mediante la acción de la escualeno sintasa (SQS) dando lugar a escualeno. Dentro de las proteínas involucradas en las transformaciones se encuentra la proteína ras, las proteínas G heterotriméricas y la lámina nuclear [16].

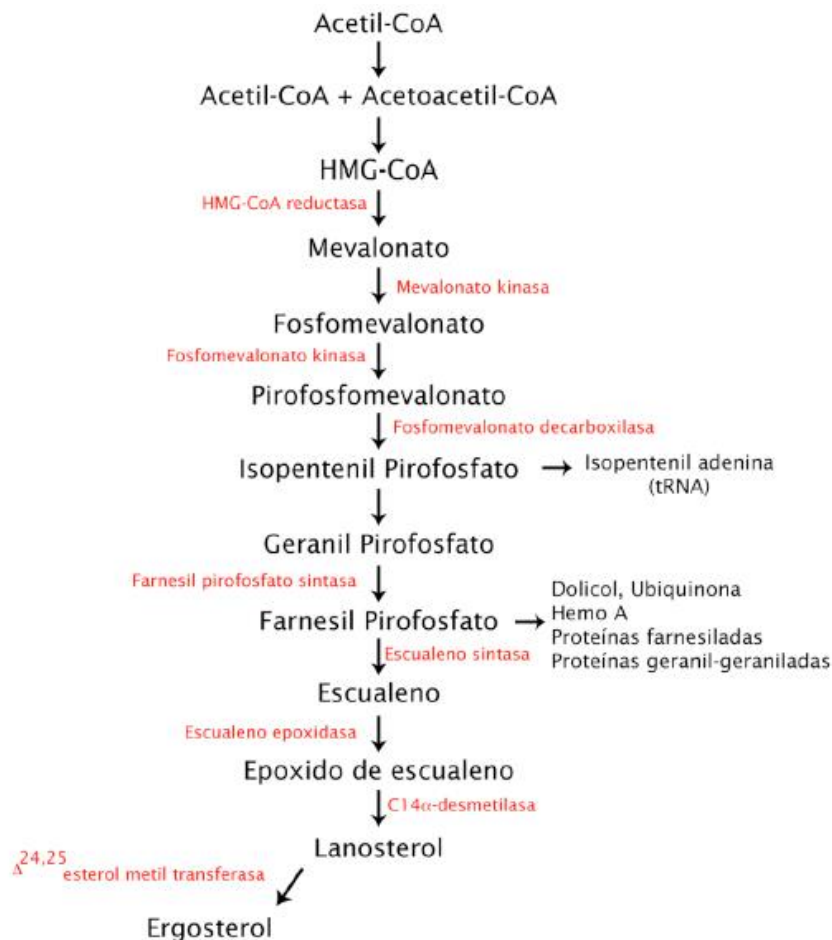
Las etapas tardías implican la conversión del escualeno a ergosterol. El escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol, molécula de 30 carbonos. El lanosterol es desmetilado en posición 4 y 14 y es metilado en la posición 24. La desmetilación en la posición 14 es catalizada por la C14 α -desmetilasa, enzima dependiente del citocromo P-450. La metilación en la posición 24 esta catalizada por la enzima $\Delta^{24,25}$ esterol metiltransferasa (SMT), que es dependiente de S-

¹ Movimiento dentro de la planta de abajo hacia arriba, es decir desde la raíz hasta el extremo superior de ella (ápices).



adenosil-L-metionina (AdoMet), y es característica de tripanosomatidos, hongos y plantas [16] (Ilustración 2-2).

Ilustración 2-2. Ruta de la biosíntesis del ergosterol [16].



Las exposiciones continuas y prolongadas pueden causar diferentes trastornos dependiendo de la vía por la que es absorbido. Por inhalación puede causar irritación respiratoria, laringitis y dolores en el pecho. El contacto del plaguicida con la piel produce irritación, sequedad y resequead en la piel, mientras que el contacto con los ojos causa irritación, dolos, lagrimeo, sensación de ardor, visión borrosa y riesgo de serio daño ocular. Por último, la intoxicación por ingestión provoca dolor abdominal y nauseas [17].

Según Capps *et al*-1990 los niveles más altos de residuos tóxicos totales se localizan en el hígado y en los tejidos de las ratas y en los tejidos y leche de cabras lactantes. Y la mayor cantidad de los residuos se excretan rápidamente [17].



2.2.2. Persistencia.

El comportamiento en el suelo es el más persistente, ya que su degradación es lenta y puede tener una vida media de 21 días. Son estables a la fotólisis en suelo y se adhiere fuertemente a las partículas de este. Este fungicida presenta bajos niveles de lixiviación [13].

En los sistemas acuáticos su degradación es rápida (< 1 día), ya sea en condiciones anaerobias o aerobias.

2.3. Estudios de toxicidad.

La Universidad Agrícola de China realizó un estudio sobre los efectos agudos y el desarrollo del pez cebra por el difenoconazol a través de ensayos en etapa de larvas y adultos, se observó el potencial de riesgo del ambiente y la toxicidad acuática del fungicida. Para el desarrollo de este estudio se analizó los puntos finales de desarrollo del embrión, la mortalidad, los efectos teratógenos y el comportamiento. Finalmente se obtuvo la toxicidad aguda de las tres etapas larvas ($1,17 \frac{mg}{L}$), peces adultos ($1,45 \frac{mg}{L}$) y embrión ($2,34 \frac{mg}{L}$), se observó la inhibición de eclosión del embrión, movimientos espontáneos anormales, frecuencia cardíaca lenta y deformidades morfológicas. Además, con $0,5 \text{ mg/L}$ de difenoconazol causa un ennegrecimiento en las larvas y disminución de frecuencia cardíaca, y a $0,25 \frac{mg}{L}$ inhibió en el peso del crecimiento del pez adulto a una exposición de 14 días [18].

La Universidad Agrícola de China, observó el efecto de difenoconazol en el contenido de colesterol y el mecanismo relacionado teniendo en cuenta si es macho o hembra. Se tuvo en cuenta el peso corporal y el nivel de colesterol hepática (TCHO), poniendo a prueba las especies a los 7, 15 y 30 días después de la exposición, observando la disminución del nivel TCHO en el hígado del pez cebra macho. Mientras que el pez cebra hembra mostró modificaciones en los genes, y el contenido de colesterol presentó niveles normales durante toda la exposición [19].

La Biblioteca Nacional de Medicina en Estados Unidos realizó un estudio para determinar los riesgos de toxicidad aguda por el herbicida diclofop-metilo y el fungicida difenoconazol. Ambos fueron administrados vía oral a ratas durante 28 días. En los grupos tratados, la alanina aminotransferasa (ALT), la urea y la creatinina de plasma fueron mayores que en el grupo control, también, se observó inhibición en gamma glutamiltransferasa (γ GT) y en la enzima acetilcolinesterasa plasma (AChE), sin diferencias en el nivel de glucosa, pero sí en el malondialdehído (MDA) y el superóxido dismutasa (SOD) (un biomarcador de estrés oxidativo) que aumentó en los grupos tratados. Se concluyó que estos dos plaguicidas pueden tener efectos potencialmente nocivos sobre los seres humanos y el ambiente [20].

En el Dictamen Técnico Ambiental, para el producto Zoldifen 250 EC a partir del ingrediente activo Difenoconazole, para ser utilizado como fungicida en el control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella Fijensis*) en el cultivo de plátano y Tizón Temprano (*Alternaria Solanii*) en el cultivo de Tomate, expedido por el Ministerio de Ambiente,

Vivienda y Desarrollo Territorial, obtuvo la CL50 en las siguientes especies (Tabla 2-7) [21]:

Tabla 2-7. Toxicidad agua del difenoconazol [21].

Especie	Toxicidad	CL50
Patos silvestres	Oral	5000 mg/kg
Codorniz	Oral	4760 mg/kg
Tucha arcoíris	96 horas	0,81 mg/l
Pez dorado de agallas azules	96 horas	1,2 mg/l
Sheepshead minnow	96 horas	0,82 mg/l
Daphia magna	48 horas	0,77 mg/l
Abejas	Contacto	>100 µg/abeja
Abejas	Oral	>187 µg/abeja
Lombriz de tierra	14 días	>610 ml/kg

Además, el destino y comportamiento del difenoconazol en el suelo es persistente bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, su tiempo de disipación en campo es de $DT_{50} = 35$ a 63 días y el coeficiente de adsorción de carbono orgánico Koc de 3470,89. Mientras que en agua depende del medio, es decir, en agua subterránea se calcula el potencial de lixiviación con la ecuación de Gustafson obteniendo un valor de GUS de 0,82, por lo que se considera que el difenoconazol no presenta una tendencia a lixiviar, lo que reduce la contaminación en aguas subterráneas. En el agua superficial la vida media de degradación acuática es de 307 – 324 días, por lo que se considera persistente en este medio. Finalmente, en el aire se considera que no se encuentre presente, debido a su baja presión de vapor [21].

2.4. Lombriz roja Californiana (*Eisenia foetida*)

La lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) pertenece al grupo de los anélidos y a la familia Lumbricidae. Estas lombrices son capaces de adaptarse a diferentes sustratos, temperaturas, pH y humedad [22].; mejora la estructura del suelo, ya que contribuye a la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de los nutrientes, tiene la capacidad de asimilar elevadas concentraciones de diferentes compuestos, es por eso que es usada para la evaluación de riesgos toxicológicos [3].

Estas lombrices tienen la capacidad de vivir aproximadamente 4,5 años a la intemperie y medir de 3 a 7 cm de longitud, con un peso corporal entre 0,8 y 1,4



gramos. Carecen de ojos, pero las células de su piel poseen receptores que les permiten percibir la luz y la presencia de sustancias químicas, esta percepción también funciona a modo de olfato, lo que les ayuda a buscar la humedad y el alimento. Cabe resaltar que las lombrices únicamente respiran por la piel, si hay exceso de humedad el sistema respiratorio se vuelve inoperante [22].

2.4.1. Ciclo de vida.

Las lombrices son hermafroditas, cada una posee gónadas de ambos sexos desarrolladas dentro de una estructura mucosa llamada clitelo, donde primero se desarrollan las gónadas masculinas conformadas por paredes (una a cuatro) de testículos y posteriormente las femeninas quienes poseen un par de ovarios. Para poder fecundar requieren del contacto con otra lombriz adulta, las cuales intercambian espermatozoides y segregan una sustancia mucilaginosa compuesta por albúmina que lleva los óvulos no fecundados, esta sustancia se endurece, convirtiéndose en un capullo, dentro del cual se desarrollan los embriones [23].

La cópula de dos lombrices genera de 2 a 9 cocones, de cada cocón o capullo nacen de 2 a 4 lombrices, la frecuencia de apareamiento es de 2 a 3 veces por semana. Las juveniles eclosionan después de la incubación promedio de 23 días a 25 °C y entre los 50 a 65 días alcanzan su madurez sexual. El tránsito de premadurez a madurez se presenta cuando alcanzan 0.24 g y una longitud de 2.5 cm [22].

2.5. Cultivo del tomate en Colombia.

El tomate es una hortaliza de clima cálido y moderado, susceptible a heladas y temperaturas bajas. Crece entre los 20 a 25°C diurnos y los 15 a 20 °C nocturnos, favoreciendo así el desarrollo normal de los procesos bioquímicos, el crecimiento vegetativo, la floración y la fructificación. Temperaturas inferiores y prolongadas debilitan la planta generando progresiva decadencia o muerte [24].

La altura adecuada para la producción del tomate es de 900 a 1800 m.s.n.m., su crecimiento se da en suelos franco o franco-arenosos, con pH entre 6,5 y 7,9; buena capacidad de drenado y retención de humedad; además, el cultivo debe presentar alta luminosidad con radiaciones mayores a 5000 lux durante más de 6 horas [25].

En el año 2016, Colombia registro una superficie cosechada de tomate de 26,929.1 hectáreas, con un rendimiento de los tomates de 317,878 Hg/Ha y una producción de 856 toneladas. El consumo de tomate ha aumentado ya que estos indicadores en años anteriores eran menores y han venido aumentando considerablemente [26].

Por ejemplo, el departamento de Boyacá, el área sembrada ha disminuido en los últimos años, presentando una reducción del 48,5 %, con un registro para el 2013 de 2.444 ha y en el 2014 de 1259 ha.; no obstante, en el 2015 este cultivo representaba el 5,98% de los cultivos transitorios [27,28].



2.5.1. Enfermedades en el cultivo del tomate.

El cultivo del tomate puede presentar diferentes enfermedades, las cuales dependen si son causadas por hongos, bacterias o virus. Las plantas son más susceptibles cuando presentan exceso de fertilización, suelos salinos, alto contenido de agua entre otros [27].

Dentro de las enfermedades más comunes se encuentra [27]:

- Tizón temprano (*Alternaria solanii*), el cual afecta el tallo, la hoja y el fruto, esta enfermedad produce la disminución de la masa florar y la pérdida de los frutos enfermos
- Polvillo o cenicilla (*Oidium lycopersici* y *Oidium silicua*), esta enfermedad afecta a el tallo y la hoja, principalmente se da por las altas temperaturas y baja humedad relativa.
- Moho de la hoja (*Fluvia fulva* o *Cladosporium fulvum*), afecta únicamente a la hoja, sin embargo, puede causar defoliación por registros altos de humedad (mayor a 85%)
- Tizón tardío (*Phytophthora infestans*), es similar al Tizón temprano, sin embargo, produce grandes pérdidas o puede presentar el deterioro total del cultivo.
- Mancha bacteriana (*Xanthomonas spp*), afecta el tallo, la hoja y el fruto, en épocas de alta humedad se pueden registrar grandes pérdidas.

2.5.2. Fungicidas en el cultivo del tomate.

Los fungicidas controlan las enfermedades generadas por los hongos. La mayoría de estos atacan la planta de tomate foliarmente, provocando defoliación en la planta, dejando expuestos los frutos. Algunos hongos también pueden atacar otras partes de la planta, como: tallo, flor, peciolo, raíz, fruto [28].

Por su dinámica en la planta los tratamientos son de tipo preventivo, curativo y erradicante. Generalmente los fungicidas de superficie dan un control preventivo, y por tanto deben ser aplicados antes de que se presente la enfermedad o al presentarse los síntomas iniciales. Los fungicidas translaminares y sistémicos pueden penetrar el tejido de las plantas y matar al hongo que ha invadido el tejido, por esto se denominan “curativos”. Además, pueden evitar la formación de esporas, lo cual constituye una acción erradicante. Su aplicación, entonces, puede ser preventiva, antes de que se presenten los síntomas de la enfermedad, o curativa, cuando ya se han presentado [28].

2.6. Métodos de análisis

2.6.1. Método Probit

Este método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar la CL_{50} del plaguicida, tomando como base el porcentaje de organismos muertos por la acción tóxica de la sustancia a la que estén expuestos, para luego transformar en unidades de desviación de la media o probits (unidades de probabilidad) [29].



La mortalidad debe estar en intervalos de 0 a 100%, ya que este parámetro es una de las restricciones para el cálculo de la CL_{50} [29]. Creo que hay un error en la cita (no creo que corresponda con el tema, sugiero revisar)

2.6.2. Análisis de varianza (ANOVA).

Es un método que permite construir modelos estadísticos, cuyo objeto es comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores del otro o más conjuntos de datos. Para poder realizar este tipo de análisis se requiere que el número de réplicas por tratamiento sea mayor a tres y que todos los tratamientos tenga el mismo número de réplicas. De igual manera, se puede determinar si la hipótesis sobre un experimento aleatorio se puede aceptar o rechazar, esto mediante el planteamiento de la hipótesis nula y alternativa [29]. La hipótesis nula se refiere a que todas las medias poblacionales que provienen de las muestras son iguales [29].

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \quad (2-1)$$

Lo que significa que las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos. Por otro lado, la hipótesis alternativa establece que no todas las medias son iguales [29].

$$H_1 = \text{Las medidas no son iguales} \quad (2-2)$$

A lo que se refiere es que las diferentes concentraciones producen un efecto diferente en todos los organismos [29].

Además, en la prueba de varianza se debe calcular el coeficiente de las varianzas muestrales y se verifica con el arreglo a la distribución F. Con este parámetro también se aprueba o rechaza la hipótesis nula. Sin embargo, se debe tener en cuenta los siguientes supuestos [29]:

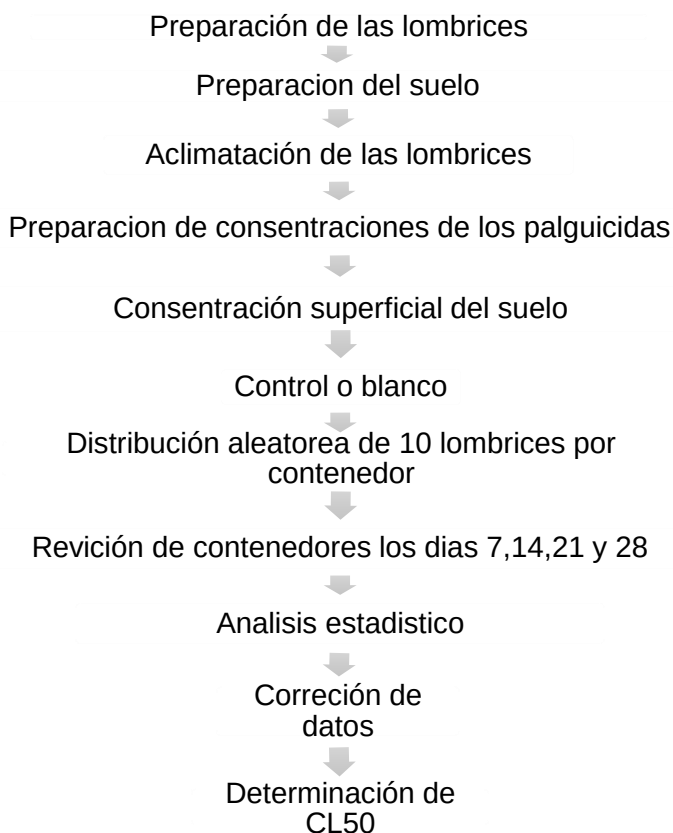
- La variable dependiente debe medirse al menos al nivel de intervalo.
- Independencia de las observaciones
- La distribución de los residuos debe ser normal
- Homocedasticidad: homogeneidad de las varianzas.



3. Metodología

La metodología usada en el ensayo toxicológico se basa en el método EPA OPPS 850.6200, el cual utilizo la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) adulta, para examinar suelos contaminados con dos marcas de fungicidas diferentes pero con el mismo principio activo (difenoconazol), Las lombrices estuvieron expuestas a diferentes concentraciones por un tiempo estimado de 28 días con revisiones periódicas cada 7 días, por último se tuvo un cultivo control con el cual se logró comparar presencia de efectos tóxicos letales o no (ilustración 3-3).

Ilustración 3-3. Diagrama de flujo del ensayo toxicológico con la lombriz californiana (*Eisenia foetida*)



Fuente: autores



3.1. Materiales y equipos de laboratorio

Para realizar el bioensayo se contó con una serie de materiales y equipos que se muestra en la tabla 3-5.

Tabla 3-8. Materiales y equipos.

Elementos	Características
Contenedor	Debe ser de cualquier material que impida el contacto de luz directa con los cultivos.
Termómetro	Contar con un rango de medición de -10°C a 100°C
Balanza analítica	Con al menos 3 décimas de precisión.
Jeringas	Con capacidad de 1 ml.
Beaker	Capacidad de 300 ml.
Higrómetro	Específico para medición en suelos.
pH metro	Específico para medición en suelos.
Tela (Lino)	Permite el intercambio gaseoso con el bioensayo
Caja de Petri	Capacidad para 10 unidades de lombriz.
Soporte universal	Contar con brazo.
Papel filtro	Poseer un diámetro igual al diámetro de la base de las cajas de Petri.
Guantes	Protección ante cualquier evento generado por los plaguicidas.
Agua destilada	
Ligas de caucho	
Atomizador	Capacidad de 330 ml
Tapabocas	De tipo industrial.
Rótulos	Dar correcta identificación a cada contenedor
Bata de laboratorio	Blanca.
Frascos de plástico tipo PET.	Contenedor plástico con capacidad para 500 gramos de sustrato.

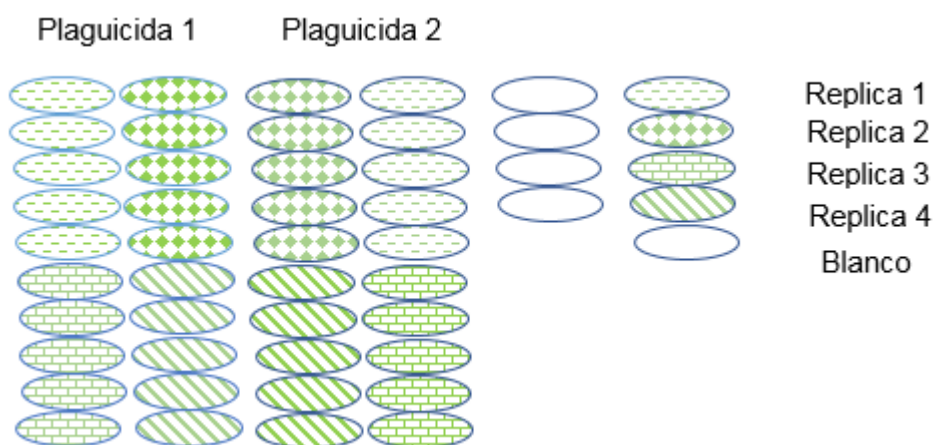
Fuente: Autores.



3.2. Diseño experimental.

Para el diseño experimental se tomó un diseño completamente aleatorio (DCA), ya que se asume que las unidades experimentales son iguales, donde se tuvo un grupo de control y dos grupos con diferente plaguicida, los cuales contaban con cuatro replicas por cada grupo, los cuales fueron sometidos a cinco concentraciones como se explica en la ilustración 3-4, según lo recomienda la EPA.

Ilustración 3-4. Montaje experimental de los fungicidas



Para las unidades experimentales se utilizaron recipientes Pet agregándoles 500 g de suelo y diez organismos en cada uno, los cuales fueron escogidos al azar. Cada organismo contaba con su respectivo clítel, de igual manera cada unidad experimental fue cubierta con lino negro, manteniendo un óptimo intercambio gaseoso y evita el contacto directo de la luz solar, además de la temperatura a niveles aceptables.

Además, durante la realización del experimento se controlaron parámetros fisicoquímicos (luminosidad, humedad relativa, temperatura y pH) que pudieron haber influido directamente en el óptimo desarrollo del preensayo y bioensayo.

3.2. Recolección de suelo

El suelo utilizado en el bioensayo fue recolectado de una finca dedicada al cultivo de tomate ubicada en la vereda Gaunza (fotografía 3-1), del municipio de Guateque, Boyaca. El suelo fue tamizado para remover impurezas de este. De igual forma, fue indispensable que el lugar de la recolección de suelo estuviera libre de plaguicida con el fin de contar con un suelo limpio y que no influyera en las pruebas experimentales.

Fotografía 3-1. Lugar de recolección del sustrato



3.3. Prueba de retención de agua

La realización de la prueba de retención o saturación de agua fue fundamental para el desarrollo del pre ensayo y bioensayo ya que permitió conocer la cantidad de agua con la que el suelo se satura y así poder calcular el porcentaje agua necesario para llegar a un 70% de humedad, donde se tomaron 100 g de suelo en un recipiente de plástico sujeto a un soporte universal, posteriormente se adiciono agua desde una probeta aforada de 200 ml, esto permitió medir el volumen vertido hasta que cae la primera gota (Fotografía 3-2).

Fotografía 3- 2. Prueba de retención de agua



Conociendo el volumen que satura el 100% del suelo, se realizó una regla de tres para calcular el volumen necesario para una humectación del 70%, en este paso se utilizaron una serie de ecuaciones (3-3, 34), lo anterior se debió realizar dos veces,



una para el pre ensayo y otra para el bioensayo final ya que el suelo utilizado en los experimentos poseía una humedad inicial diferente.

$$X \text{ ml } H_2O = \frac{(ml \text{ } H_2O * 70)}{100\%} \quad (3-3)$$

Donde:

- $ml \text{ de } H_2O \rightarrow 100 \%$
- $X \text{ ml de } H_2O \rightarrow 70 \%$

$$X_2 \text{ ml } H_2O = \frac{(X \text{ ml } H_2O * 500 \text{ g})}{100 \text{ g}} \quad (3-4)$$

Donde:

- $X \text{ ml de } H_2O \rightarrow 100 \text{ g}$
- $X_2 \text{ ml de } H_2O \rightarrow 500 \text{ g}$

3.4. Preensayo

Antes de realizar el montaje experimental final, fue necesario realizar un preensayo para conocer la concentración letal media de referencia, se simuló entonces el montaje experimental final, exponiéndose un total de seis unidades (cinco concentraciones y un blanco) para cada fungicida; bajo las mismas condiciones del experimento principal: sustrato biológico (lombriz roja californiana), tipo de suelo, vaciado de estómagos, etc. No se realizó la adaptación de la lombriz al suelo.

3.4.1. Cálculo de la concentración letal 50

Para el cálculo de las concentraciones se utilizó el dictamen técnico ambiental para el zoldifen 250 EC, a partir del ingrediente activo difenoconazol en el cual determina la CL_{50} ($610 \frac{ml}{0.5 \text{ kg}}$) para la lombriz (*Eisenia foetia*) [21]. Esta concentración se calculó para 500 g de tierra, con esta concentración de referencia se tomaron intervalos valores máximos y mínimos usando un factor multiplicativo de 2 y de 3 (ecuaciones 3-5, 3-6).

$$X_1 = 610 \frac{ml}{kg} * (0,5 \text{ kg} + X_2 \text{ kg de } H_2O) \quad (3-5)$$

Donde:

- X_1 es la concentración de referencia

$$X_{2n} = X_{2.1} \left(\frac{X_1}{2} \right) X_{2.2} \left(\frac{X_1}{3} \right) X_{2.3} (X_1) X_{2.4} (X_1 * 2) X_{2.5} (X_1 * 3) \quad (3-6)$$

Donde:



- X_{2n} son las concentraciones por utilizar en cada repetición del pre-ensayo

Esta prueba tuvo una duración de 28 días en el que se evaluó principalmente la mortalidad y el peso de las lombrices. Concluidos estos días se realizó una regresión lineal con los resultados de mortalidad, proporcionando de esta forma la ecuación de la recta (3-7) y hallando con esta la concentración letal media a tomar como referencia en el ensayo final (3-8).

$$y = 84,561x + 16,589 \quad (3-7)$$

$$CL_{50} = \frac{y-16,589}{84,561} \quad (3-8)$$

3.5. Bioensayo.

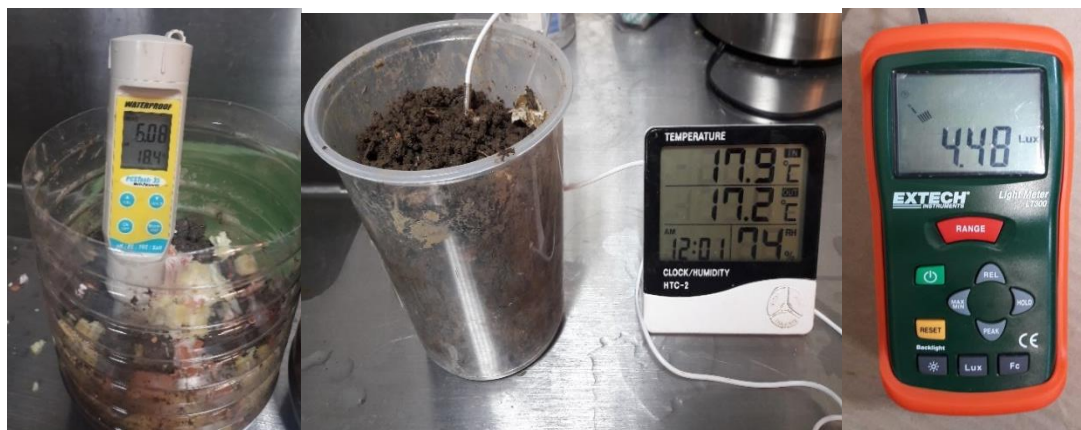
Se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) en donde los tratamientos a aplicar se determinaron en el pre ensayo anteriormente descrito. Se montó un experimento de 4x5 para cada plaguicida, lo que quiere decir que se hicieron 4 réplicas con 5 concentraciones cada uno, para un total de 80 unidades experimentales; estos comparados con 4 controles.

3.5.1. Condiciones de prueba

El bioensayo fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomás, sede central. Cada unidad experimental contenía 10 lombrices, que fueron cubiertas con tela (lino) negra, para asegurar el intercambio gaseoso y protegerlas de luz directa del sol. Para el óptimo desarrollo de la prueba se mantuvo una temperatura de adecuada, así mismo se controló el pH con el fin de mantenerlo en un rango de 6.5 ± 0.5 , este siempre estuvo en el margen estipulado por lo que no fue necesario utilizar carbonato de calcio para estabilizarlo. También, se verificó semanalmente que el porcentaje de humedad relativa (70%) de la unidad no tuviera pérdidas mayores al 10% y que la luminosidad no superara los 400 Lux (fotografía 3-3). Para verificar que los parámetros fisicoquímicos no incidieran en el resultado de mortalidad, se procedió a ingresar los datos en el programa R-Project, para realizar un análisis de varianza, relacionando cada parámetro con la mortalidad, usando el método de Tukey se obtuvieron las significancias de estas correlaciones.



Fotografía 3- 3. Parámetros fisicoquímicos



3.5.2. Organismos de prueba.

Para la prueba experimental se utilizó como organismo de prueba la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), de mínimo dos meses de edad y no mayores de un año, con clitelo y cuya población no difería en edad, tamaño y masa (fotografía 3-4).

Fotografía 3- 4. Organismos de prueba





Las lombrices fueron acondicionadas 15 días antes de la prueba de toxicidad dentro de las unidades experimentales, adicionando aproximadamente 75 g de alimento ($0.5\text{g } \frac{\text{Lombriz}}{\text{día}}$), donde se les suministraba cáscaras de fruta, para que no alterara el pH. Este proceso fue necesario para que asimilaran las características y la condiciones en las que vivieron (fotografía 3-5).

Fotografía 3- 5. Adaptación de lombrices



Una vez concluidos los 15 días de adaptación, las lombrices fueron retiradas de las unidades experimentales para vaciar sus estómagos con agua destilada en cajas Petri sobre papel filtro (fotografía 3-6). Se dejaron durante un periodo de 24 horas y una vez concluido el procedimiento se dio inicio a la prueba de toxicidad, pesando en grupos de a 10 lombrices e introduciéndolas en los tarros.

Fotografía 3- 6. Limpieza de lombrices





3.5.3. Cálculo de las concentraciones

Al obtener la CL_{50} ($0,395 \frac{ml}{g}$) de la regresión lineal graficada en el preensayo, se realizó un estudio con $\frac{1}{10}$ de la CL_{50} , debido a que la pendiente es elevada, por lo que con pequeñas variaciones en la toxicidad generan grandes cambios en el resultado. Luego se calcularon los valores máximos, mínimos y medios a partir de la CL_{50} (ecuaciones 3-9, 3-10, 3-11). Con estos valores se aplicó las ecuaciones 3-12 y 3-13 y así se obtuvieron las cinco concentraciones, finalmente, dado que las concentraciones se encuentran en estado líquido para mayor facilidad a la hora de aplicar el plaguicida se hizo necesario calcular la cantidad de este para mezclar con el solvente (agua) (ecuaciones 3-14 y 3-15).

$$\frac{CL_{50} * 1000 \text{ ml}}{\text{ml de } H_2O} = MaxC \quad (3-9)$$

Donde:

- $MaxC$: es la concentración máxima para el plaguicida
- $ml \text{ de } H_2O$: Cantidad de agua para llegar a un 70% de humedad relativa en el suelo.

$$\frac{1}{10} * MaxC = MinC \quad (3-10)$$

Donde:

- $MinC$: es la concentración mínima para el plaguicida

$$\frac{MaxC - MinC}{4} = MedC \quad (3-11)$$

Donde:

- $MedC$: es la concentración media para el plaguicida.

$$C_1 = MinC \quad (3-12)$$

Donde:

- C_1 : Es la primera concentración de plaguicida a ser administrado en las unidades experimentales.

$$C_n = MinC + MedC \quad (3-13)$$

Donde:

- C_n : Es la segunda concentración de plaguicida antes de ser administrado en las unidades experimentales.

$$C_{n+1} = C_n + MedC \quad (3-14)$$

Donde:



- C_{n+1} : Son las demás concentraciones de plaguicida antes ser administradas en las unidades experimentales.

$$C_{Fn} = \frac{C_{n+1} * ml \text{ de } H_2O}{1000 \text{ ml}} \quad (3-15)$$

Donde:

- C_{Fn} : Concentración final para ser administrada en las unidades experimentales.

3.5.4. Aplicación del fungicida

Una vez calculadas las cinco concentraciones a utilizar, en una pipeta de 200 ml se agregó las diferentes concentraciones de los fungicidas 1 y 2 mezclados con un solvente (agua) que a la vez se utilizó para obtener una humedad relativa en el suelo del 70%, posteriormente fueron aplicados de modo artificial sobre cada una de las unidades experimentales, con un atomizador (fotografía 3-7) exceptuando los controles, los cuales estuvieron libres de fungicida en su totalidad solamente se les agregó agua. Finalmente, cuando se tuvieron los medios preparados, se ingresaron en grupos de a 10 los organismos dentro de las unidades, todos los ensayos fueron realizados bajo las normas de bioseguridad requeridos.

Fotografía 3- 7. Aplicación superficial del fungicida



3.5.5. Determinación de la concentración letal 50.

Una vez culminadas las 4 semanas se ingresan los datos de mortalidad en el programa ProStat-Statistical Analysis and Data Presentation, por medio del método Probit, para obtener la concentración letal 50 de los dos plaguicidas.

En el programa R-Project se ingresaron los datos de mortalidad y las concentraciones, para obtener los diagramas de cajas de los dos plaguicidas.

Adicionalmente, en el programa OriginPro se ingresaron las semanas, las concentraciones y los datos de mortalidad de cada unidad experimental, con el fin de obtener el área bajo la curva de cada uno.



3.5.6. Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA.

Para verificar que los parámetros fisicoquímicos no incidieran en el resultado de mortalidad, se procedió a ingresar los datos en el programa R-Project, para realizar un análisis de varianza, relacionando cada parámetro con la mortalidad, además, por el método de Tukey se obtuvieron las significancias de estas correlaciones.

Por otro lado, con el área bajo la curva de cada tratamiento de los dos plaguicidas y del control se procedió a ingresar los datos en SPSS para realizar un análisis de varianza univariante, donde se obtuvieron las similitudes y diferencias entre estas variables. Para determinar las significancias de las comparaciones se utilizaron los métodos de Tukey, DMS y Dunnet.



4. Resultados

4.1. Pre ensayo

4.1.1. Prueba de retención de agua

La prueba de retención de agua se realizó siguiendo las pautas establecidas en la metodología obteniendo como resultado 73,5 ml de agua para llegar a un 70% de humedad en 500 g de suelo, como se puede observar en los siguientes cálculos:

- $21 \rightarrow 100\%$
- $X \rightarrow 70\%$
- $X = \frac{31,5ml \cdot 70\%}{100\%} = 14,7 \text{ ml}$
- $100 \text{ g} \rightarrow 14,7 \text{ ml}$
- $500 \text{ g} \rightarrow X$
- $X_2 = \frac{14,7 \text{ ml} \cdot 500 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 73,5 \text{ ml}$

4.1.2. Cálculo concentración pre ensayo

Para el cómputo de esta serie de concentraciones se utilizó como base de cálculo información obtenida de la Resolución 0545 de 2008 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial donde indica que el CL₅₀ en lombrices de tierra es de $0,610 \frac{\text{ml}}{\text{kg}}$ [21], la cual fue multiplicada por la masa de tierra en kg a utilizar más la masa de agua en kg agregada para que esta tenga una humedad relativa del 70%.

$$X_1 = 0,610 \frac{\text{ml}}{\text{kg}} * (0, \text{kg} + 0,0735 \text{kg de } H_2O) = 0,349 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{kg}}$$

Con este valor se tomaron intervalos valores máximos y mínimos usando un factor multiplicativo de 2 y de 3 con se evidencia a continuación:

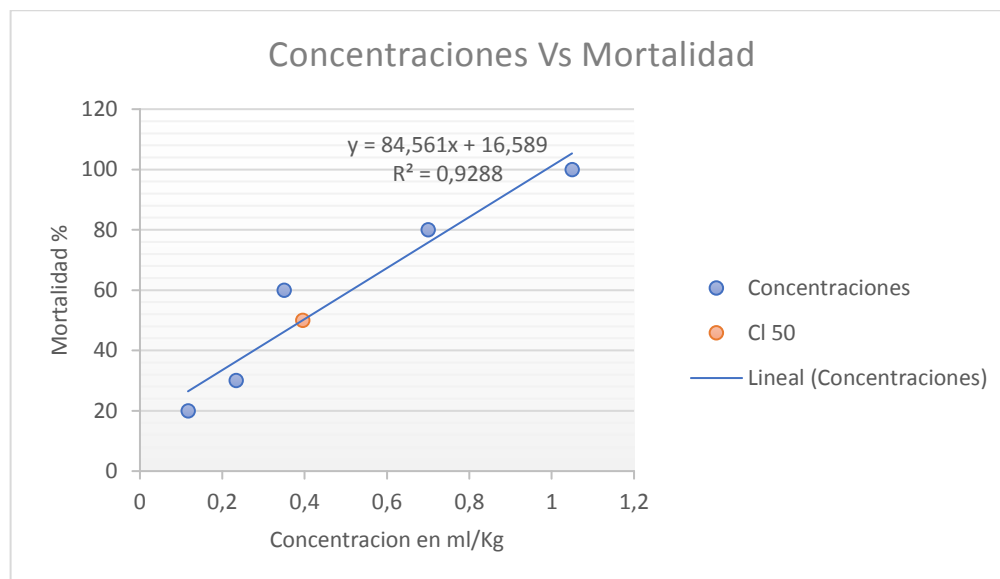
- $0,349 \frac{\text{ml}}{500 \text{ g}} * 2 = 0,6996 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{ kg}}$
- $0,349 \frac{\text{ml}}{500 \text{ g}} * 3 = 1,0495 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{ kg}}$
- $\frac{0,349 \frac{\text{ml}}{500 \text{ g}}}{2} = 0,1749 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{ kg}}$
- $\frac{0,349 \frac{\text{ml}}{500 \text{ g}}}{3} = 0,1166 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{ kg}}$

Al finalizar el preensayo se graficó las concentraciones vs las mortalidades (gráfica 4-1), obteniendo el error cuadrático (0.9288) y la ecuación de la recta ($y = 84,561x + 16,589$), y con esta se calculó la CL₅₀ de referencia para el bioensayo ($0,3951 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{Kg}}$).

- $CL_{50} = \frac{50 - 16,589}{84,561}$
- $CL_{50} = 0,3951 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{Kg}}$



Gráfica 4-1. Concentración vs mortalidad



4.2. Bioensayo

4.2.1. Prueba de retención de agua

Como en el pre ensayo la prueba de retención de agua se realizó siguiendo las pautas establecidas en la metodología obteniendo como resultado 180 ml de agua para llegar a un 70% de humedad, como se puede observar en los siguientes cálculos:

- $51,4 \text{ ml} \rightarrow 100\%$
- $X \rightarrow 70\%$
- $X = \frac{51,4 \text{ ml} \cdot 70\%}{100\%} = 36 \text{ ml}$
- $100 \text{ g} \rightarrow 36 \text{ ml}$
- $500 \rightarrow X$
- $X = \frac{36 \text{ ml} \cdot 500 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 180 \text{ ml}$

4.2.2. Cálculo de la concentración.

La prueba de retención del agua en el bioensayo nos dio de 180 ml, ya que el suelo a utilizar se encontraba más seco, sin embargo, no fue necesario reajustar la concentración ya que esta fue calculada a partir de la masa del suelo a utilizar.

Según lo calculado en el pre ensayo la CL_{50} de referencia del bioensayo es de $0,3951 \frac{\text{ml}}{0,5 \text{ kg}}$, teniendo esta como base para hallar la concentración media, mínima y máxima.

Así que la concentración máxima se calculó tomando la CL_{50} y multiplicarla por 1000 ml y dividirlo en la cantidad de agua que se agregó (180 ml):



$$\frac{0,3951 \frac{ml}{0,5 kg} * 1000ml}{180 ml} = 2,1950 \frac{ml}{0,5 kg}$$

Luego, para hallar la concentración mínima, se divide la máxima en 10, ya que la gráfica de la recta arroja una pendiente elevada, por lo que con pequeñas variaciones en la dosis provocarían grandes cambios en los resultados.

$$\frac{2,1950 \frac{ml}{0,5 kg}}{10} = 0,2195 \frac{ml}{0,5 kg}$$

Con relación a la concentración media se toma la máxima y la mínima, realizando una resta y dividiendo en 4, con el fin de hallar las concentraciones restantes.

$$\frac{2,1950 \frac{ml}{0,5 kg} - 0,2195 \frac{ml}{0,5 kg}}{4} = 0,4938 \frac{ml}{0,5 kg}$$

La primera concentración fue la mínima ($0,2195 \frac{ml}{kg}$), y aparte de esta se le fue sumando la concentración media ($0,4938 \frac{ml}{kg}$) al resultado anteriormente obtenido, hasta obtener las 5 concentraciones a utilizar.

- $[]_1 = 0,2195 \frac{ml}{0,5 kg}$
- $[]_2 = 0,2195 \frac{ml}{0,5 kg} + 0,4938 \frac{ml}{0,5 kg} = 0,7133 \frac{ml}{0,5 kg}$
- $[]_3 = 0,7133 \frac{ml}{0,5 kg} + 0,4938 \frac{ml}{0,5 kg} = 1,2071 \frac{ml}{0,5 kg}$
- $[]_4 = 1,2071 \frac{ml}{0,5 kg} + 0,4938 \frac{ml}{0,5 kg} = 1,7011 \frac{ml}{0,5 kg}$
- $[]_5 = 1,7011 \frac{ml}{0,5 kg} + 0,4938 \frac{ml}{0,5 kg} = 2,1950 \frac{ml}{0,5 kg}$

Posteriormente dado que las presentaciones de los fungicidas utilizados están en suspensión concentrada, para mayor facilidad al momento de mezclar el producto con agua, se realiza una operación más con el fin de calcular la cantidad de producto a utilizar de la siguiente forma:

- $[]_1 = 0,2195 \frac{ml}{0,5 kg}$



$$\begin{aligned} & \circ \frac{0,2195 \frac{ml}{0,5 kg} * 180 ml}{1000ml} = 0,040 \frac{ml}{0,5 kg} \\ \blacksquare []_2 &= 0,7133 \frac{ml}{kg} \\ & \circ \frac{0,7133 \frac{ml}{0,5 kg} * 180 ml}{1000ml} = 0,128 \frac{ml}{0,5 kg} \\ \blacksquare []_3 &= 1,2017 \frac{ml}{0,5 kg} \\ & \circ \frac{1,2017 \frac{ml}{0,5 kg} * 180 ml}{1000ml} = 0,217 \frac{ml}{0,5 kg} \\ \blacksquare []_4 &= 1,7011 \frac{ml}{0,5 kg} \\ & \circ \frac{1,7011 \frac{ml}{0,5 kg} * 180 ml}{1000ml} = 0,306 \frac{ml}{0,5 kg} \\ \blacksquare []_5 &= 2,1911 \frac{ml}{0,5 kg} \\ & \circ \frac{2,1911 \frac{ml}{0,5 kg} * 180 ml}{1000ml} = 0,395 \frac{ml}{0,5 kg} \end{aligned}$$

4.2.3. Parámetros fisicoquímicos

Con los datos obtenidos por cada replica de los dos plaguicidas y el control, se realizaron gráficas de los parámetros fisicoquímicos controlados en el transcurso de las cuatro semanas.

- Humedad del suelo

Se denomina humedad del suelo a la cantidad de agua por volumen de tierra que hay en un terreno. Establecer el índice de humedad del suelo es de vital importancia para las actividades agrícolas, las relaciones celulares, soporte y solvente de nutrientes, a su vez permite que la materia orgánica sea fácilmente biodegradable, por esta razón es necesario establecer la cantidad necesaria de agua para un óptimo desarrollo del experimento (70 %), en las tablas 4-9 y 4-10 se observa el comportamiento de la humedad a través de las semanas el cual se mantuvo por encima del 70 % [4].

Tabla 4-9. Promedio de humedad del suelo con el plaguicida 1

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/kg	70	72	72,5	72,25	72,5
0,128 ml/kg	70	71,75	72,75	71,25	71,5
0,217 ml/kg	70	72	70,75	72	71,25
0,306 ml/kg	70	72,25	72,5	72	72



0,395 ml/kg	70	70,5	71,5	71,5	72,25
Control	70	70	70,5	71,75	71,9

Tabla 4-10. Promedio de humedad del suelo con el plaguicida 2

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/kg	70	72	72,25	71,25	71,25
0,128 ml/kg	70	71,25	72	71,5	71,75
0,217 ml/kg	70	72	71,5	71,25	70,75
0,306 ml/kg	70	70,25	70,75	71,75	70,75
0,395 ml/kg	70	71,5	71,25	71,5	71,75
Control	70	70	70,5	71,75	71,9

- pH: acidez del suelo

Existen varios procesos en los suelos que promueven la alteración del pH. Todos estos ocurren naturalmente dependiendo del tipo de suelo, del tipo de cultivo y de las condiciones de manejo. Un conocimiento adecuado de estos procesos en el suelo permite un mejor control de los parámetros que cambian las condiciones del suelo [31]. Por lo tanto, fue un factor esencial a tener en cuenta en el control de las condiciones necesarias para que el experimento no se viera afectado por lo que se debía mantener un nivel de pH entre 6.5 y 7, en las tablas 4-11 y 4-12 se puede observar el comportamiento de este durante las 4 semanas del ensayo.

Tabla 4-11. Promedio del pH del suelo con el plaguicida 1

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/kg	6,8075	6,4375	6,47	6,57	6,6375
0,128 ml/kg	6,81	6,4025	6,355	6,3625	6,585
0,217 ml/kg	6,79	6,485	6,505	6,33	6,69
0,306 ml/kg	6,8075	6,325	6,515	6,465	6,58
0,395 ml/kg	6,7925	6,2625	6,47	6,5425	6,645
Control	6,8015	6,3825	6,463	6,454	6,6275

Tabla 4-12. Promedio del pH del suelo con el plaguicida 2

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/kg	6,7575	6,5775	6,55	6,6575	6,6025



0,128 ml/kg	6,7875	6,185	6,46	6,6325	6,6775
0,217 ml/kg	6,785	6,4625	6,605	6,8525	6,635
0,306 ml/kg	6,7625	6,62	6,6125	6,6725	6,6025
0,395 ml/kg	6,7775	6,665	6,7025	6,655	6,635
Control	6,8015	6,3825	6,463	6,454	6,6275

- Temperatura

La temperatura del suelo es primordial a que influye sobre el crecimiento de las plantas, el desarrollo de los microorganismos, las reacciones químicas procesos biológicos y crecimiento de organismos [32], por esta razón fue esencial mantener la temperatura monitoreada para evitar sesgos en la información final, estos promedios los podemos ver en las tablas 4-13 y 4-14:

Tabla 4-13. Promedio de temperatura del suelo con elplaguicida 1

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/Kg	17,6	17,875	17,575	17,575	17,725
0,128 ml/Kg	17,525	17,975	17,55	17,65	17,6
0,217 ml/Kg	17,575	18,125	17,25	17,85	17,65
0,306 ml/Kg	17,45	18,325	17,175	17,75	17,8
0,395 ml/Kg	17,4	18,2	16,975	17,55	17,625
Control	17,51	18,1	17,305	17,675	17,68

Fuente: Autores

Tabla 4-14. Promedio de temperatura del suelo con el plaguicida 2

Concentración	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,04 ml/Kg	17,525	17,75	16,625	17,675	17,575
0,128 ml/Kg	17,725	17,4775	16,65	17,625	17,6
0,217 ml/Kg	17,5	17,5	16,725	17,75	17,675
0,306 ml/Kg	17,575	17,525	16,55	17,575	17,725
0,395 ml/Kg	17,475	17,725	16,575	17,6	17,525
Control	17,51	18,1	17,305	17,675	17,68

- Mortalidad (%)

Para el caso del bioensayo es el porcentaje de individuos que han muerto a causa de una perturbación al medio en que se desarrolla determinada especie. La mortalidad dentro del experimento es factor más importante debido a que con esta información se calcula el CL₅₀ final, si estos datos presentan alguna inconsistencia



el resultado final será erróneo, los resultados de la mortalidad se pueden ver en las tablas 4-15 y 4-16.

Tabla 4-15: Promedio de mortalidad (%) de las lombrices con el plaguicida 1

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/kg	0	7,5	7,5	7,50	7,5
0,128 ml/kg	0	0	10	12,50	12,5
0,217 ml/kg	0	0	7,5	10	10
0,306 ml/kg	0	27,5	32,5	37,5	42,5
0,395 ml/kg	0	60	65	65	67,5
Control	0	0	0	0	0

Tabla 4-16: Promedio de mortalidad (%) de las lombrices con el plaguicida 2

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/kg	0	10	17,5	20	22,5
0,128 ml/kg	0	5	22,5	27,5	35
0,217 ml/kg	0	25	37,5	40	42
0,306 ml/kg	0	30	37,5	50	52
0,395 ml/kg	0	47	57,5	60	67
Control	0	0	0	0	0

- Luminosidad

Para el caso del bioensayo la luminosidad jugó un papel importante en el correcto desarrollo de este, ya que los sujetos de ensayo (lombrices) son susceptibles a la luz, esta las afecta desfavorablemente y si no se controla puede aumentar la mortalidad en los tratamientos obteniendo sesgos en los resultados, esto llevo a tener un estricto control de esta variable (tablas 4-17 y 4-18).

Tabla 4- 17: Promedio de la luminosidad (lux) para el plaguicida 1

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,128 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,217 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,306 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,395 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
Control	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3



Tabla4- 18: Promedio de la luminosidad (lux) para el plaguicida 2

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,128 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,217 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,346 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
0,395 ml/Kg	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3
Control	4,2	4,3	4,2	4,4	4,3

- Peso

Se siguió estrictamente el comportamiento de este ya que es uno de los parámetros más importantes en la consecución de los objetivos planteados para el trabajo, estos registros se pueden observar en las tablas 4-19 y 4-20.

Tabla 4-19. Peso (g) de las lombrices tratadas con el plaguicida 1

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/Kg	0,38	0,30	0,32	0,31	0,29
0,128 ml/Kg	0,41	0,33	0,35	0,35	0,33
0,217 ml/Kg	0,43	0,32	0,32	0,31	0,29
0,306 ml/Kg	0,41	0,40	0,39	0,44	0,51
0,395 ml/Kg	0,41	0,36	0,34	0,34	0,31
Control	0,37	0,40	0,40	0,43	0,45

Tabla 4-20. Peso (g) de las lombrices tratadas con el plaguicida 2

Concentración	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,04 ml/Kg	0,42	0,43	0,44	0,42	0,40
0,128 ml/Kg	0,45	0,41	0,48	0,46	0,48
0,217 ml/Kg	0,39	0,47	0,52	0,49	0,47
0,306 ml/Kg	0,39	0,49	0,49	0,52	0,48
0,395 ml/Kg	0,39	0,42	0,39	0,40	0,41
Control	0,37	0,40	0,40	0,43	0,45

4.2.4. Determinación de la concentración letal 50.

Para obtener la CL₅₀ de los plaguicidas se tomaron las variables de concentración, mortalidad, total de organismos en cada unidad experimental y el grupo control,



estos se ingresaron al programa ProStat, obteniendo concentraciones de $0,391 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,365 \frac{ml}{0,5 kg}$ para los plaguicidas 1 y 2 respectivamente (Anexo A).

Además, los datos de concentración y mortalidad se ingresaron al programa R-Project para obtener los diagramas de cajas en los dos plaguicidas (Anexo B).

Finalmente, en el programa OriginPro se ingresaron las semanas, las concentraciones y el porcentaje de mortalidad de cada plaguicida para obtener el área bajo la curva de cada replica y cada concentración (Anexo C).

4.2.5. Prueba estadística de Análisis de varianza (ANAVA).

Con el fin de ver la correlación entre de la mortalidad y el peso con los tratamientos, se realizó un análisis de varianza en el programa R-Project. Además, con se verifico la significancia entre los parámetros fisicoquímicos con la mortalidad, para ver que estos no incidieron en los resultados finales (Anexo D).

Por otro lado, con el área bajo la curva de cada replica se realizó el análisis de varianza univariado en el programa SPSS, y se hizo la correlación con los métodos de Tukey, DMS y Dunnet.



5. Análisis

5.1. Pre ensayo

El pre ensayo sirvió para obtener la concentración de referencia con los valores de concentraciones que se le aplicaron a cada tratamiento, lo que sirvió para disminuir el porcentaje de error, logrando resultados más confiables y certeros. Sin embargo, en la teoría se encontraba la CL₅₀ del difenoconazol para la lombriz, pero esto no aseguraría que la mortalidad de la mitad de la población expuesta diera igual con la concentración ya establecida.

5.2. Prueba de retención de agua

La determinación de la saturación del agua permitió que las lombrices tuvieran una adaptación adecuada al suelo y evitó que el desarrollo de ellas se viera afectado por este parámetro, debido a que si el suelo se encuentra muy seco no podrían desarrollar sus procesos de descomposición de la materia orgánica o por el contrario saturado el paso de oxígeno sería mínimo, lo que generaría la mortalidad de ellas y el nivel de incertidumbre del experimento sería muy alto. Por otro lado, esta prueba fue fundamental para establecer la mezcla del agua con el fungicida, con el fin de que el porcentaje de humedad en el suelo no se viera afectado.

5.3. Bioensayo

El ensayo final permitió conocer la mortalidad de las lombrices en un periodo de tiempo, donde se controló los parámetros fisicoquímicos, logrando que estos no influyeran en los resultados de mortalidad y peso. De igual manera, se pudo determinar la CL₅₀ de los fungicidas y observar la incidencia de estos sobre el peso de las lombrices, para finalmente identificar cuál de los dos productos bajo el mismo principio activo es más tóxico.

5.3.1. Parámetros fisicoquímicos.

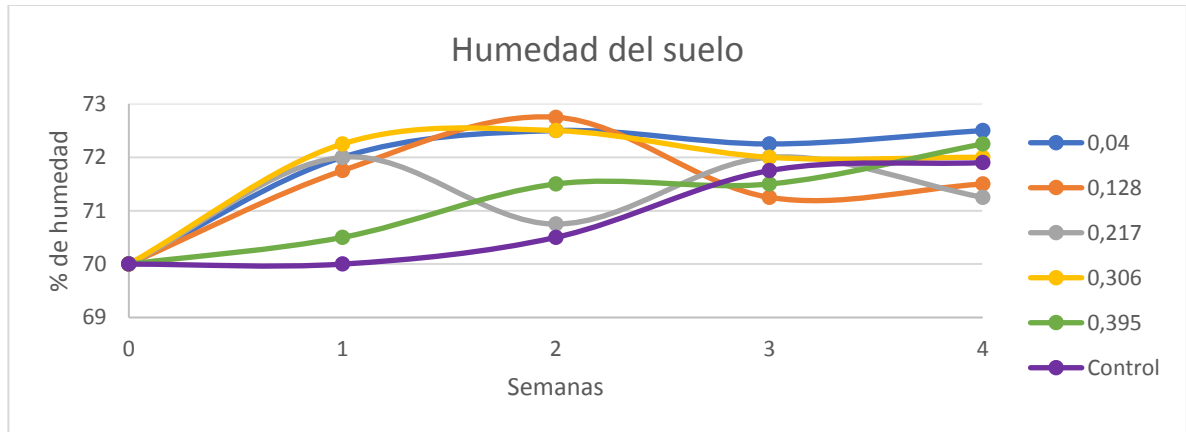
- Humedad relativa.

En las gráficas 5-2 y 5-3 se evidencia el comportamiento de la humedad relativa promedio de cada concentración durante las 4 semanas que duró el ensayo. Tanto para el plaguicida 1 como el 2 se les controló el % de humedad según el rango que se estipula para esta metodología ($70\% \pm 10$). Con relación al plaguicida 1 los rangos oscilaron entre el 70% y 73%. Mientras que para el plaguicida 2 el rango fue de 70% a 72%, y en los controles la humedad cada semana iba aumentando. Sin embargo, estos porcentajes se controlaron ya que cada semana se les agregaba la cantidad de agua que necesitaba cada tarro, con el fin de que este parámetro no incidiera en la mortalidad de las lombrices, ya que ellas deben mantener una alta humedad en el suelo. Cabe resaltar que la cantidad de agua que le suministro a cada tarro fue de máximo 5 ml, esto con el fin de evitar que durante la semana el porcentaje de humedad disminuyera ya que posiblemente la cantidad de organismos vivos cada vez fueran menos, lo que se vería afectado en el proceso de descomposición de la materia orgánica y por ende la capacidad de almacenamiento de agua del suelo sería cada vez menor. Ojo el título tiene que explicar el contenido del gráfico. Aquí hay varios errores, no se trata de la humedad relativa (que se mide

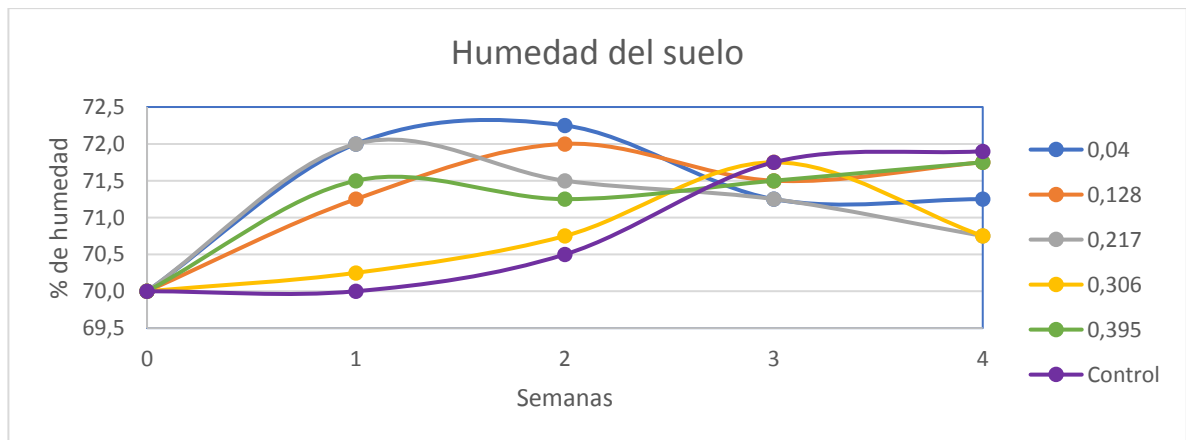


en el aire), sino de la humedad del suelo. Suena a que está midiendo la humedad del plaguicida y esto no tiene sentido.

Gráfica 5-2. Humedad relativa del suelo con el plaguicida 1



Gráfica 5-3. Humedad relativa del suelo con el plaguicida 2



- Temperatura.

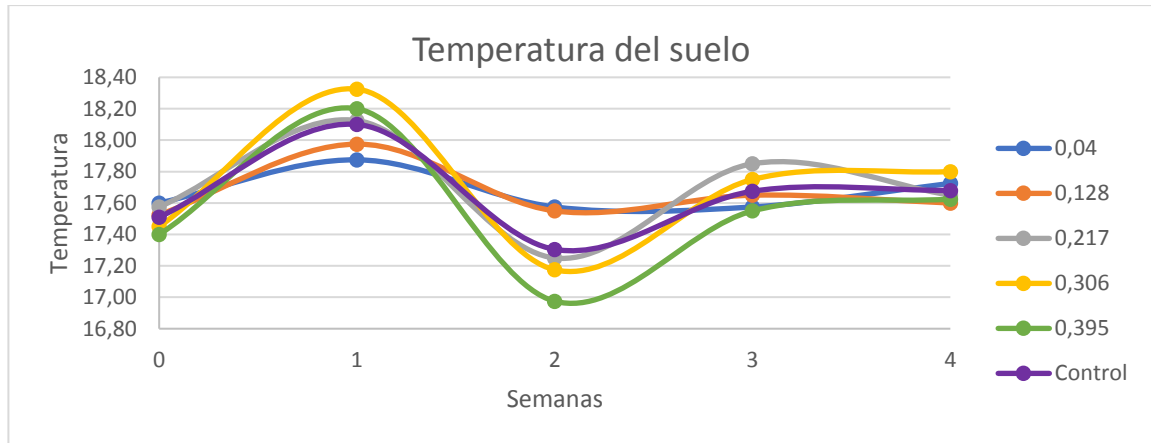
Como se muestra en las gráficas 5-4 los valores obtenidos para el plaguicida 1 oscilan entre 18,33 °C (semana 1, concentración 0,306 $\frac{ml}{0,5 kg}$) y 16,98°C (semana 2, concentración 0,395 $\frac{ml}{0,5 kg}$), sin embargo, desde la semana 3 la temperatura de todos los tratamientos se empezó a estabilizar obteniendo valores entre 17,55 y 17,85 °C.

Por otro lado, la temperatura del plaguicida 2 (gráfica 5-5) tuvo una disminución de casi un 1° C de la semana 1 a la semana 1, mientras que de la semana 2 a la semana 3 volvió a estabilizarse la temperatura, esto se pudo deber a que la temperatura ambiente en Bogotá estaba aproximadamente en 17°C.

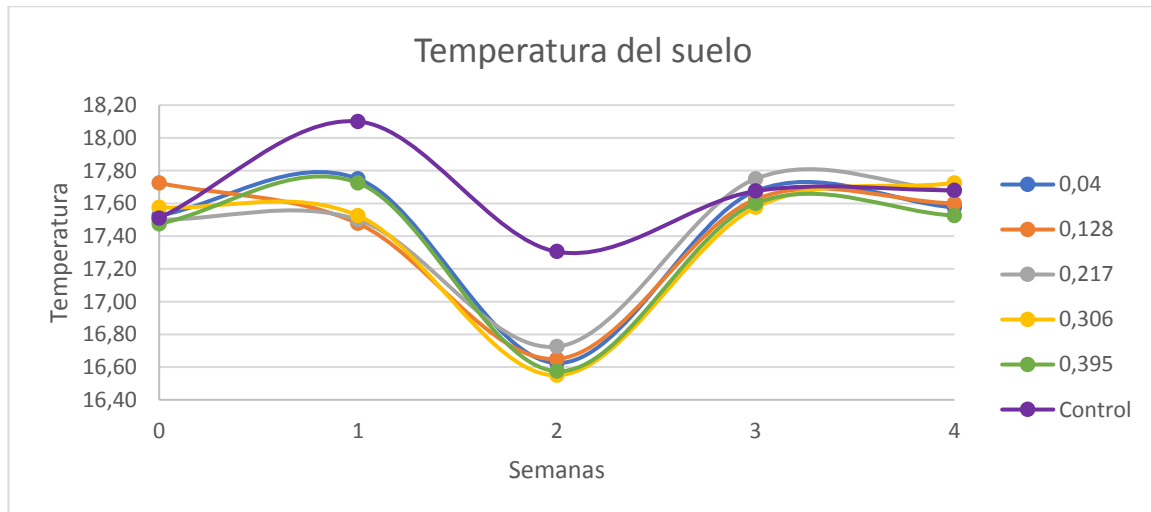


El funcionamiento de las lombrices no se vio afectado por este parámetro, ya que los controles no tuvieron ningún cambio, además, ellas se ven afectadas a temperaturas por debajo de los 15°C, por lo que lo lograron adaptasen a las condiciones en las que se encontraban.

Gráfica 5-4. Temperatura del suelo con el plaguicida 1



Gráfica 5-5. Temperatura del suelo con el plaguicida 2



- pH

Como se observa en las gráficas 5-6 y 5-7 los niveles de pH iniciales (semana 0) de los tratamientos para los dos plaguicidas oscilaron entre 6,7 y 6,8.

En relación con el plaguicida 1 los niveles de pH para la semana 1 disminuyeron, donde el menor valor se obtuvo en la concentración de $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ con un valor de 6,26, mientras que la concentración de $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ obtuvo el mayor valor con un pH

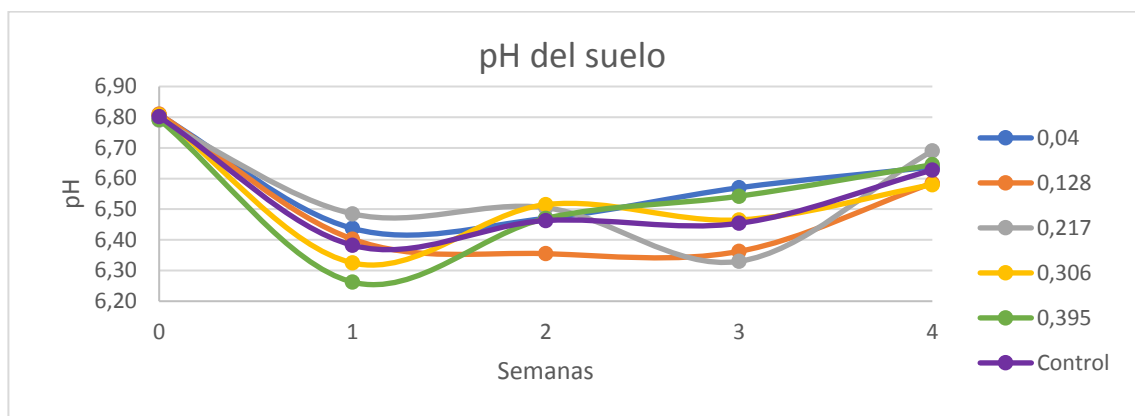


de 6,49. La disminución del pH se pudo presentar por la descomposición de materia orgánica que realizan las lombrices, hasta el punto en el que las lombrices que siguen vivas se adaptan al suelo y las variaciones de este no son tan significativas.

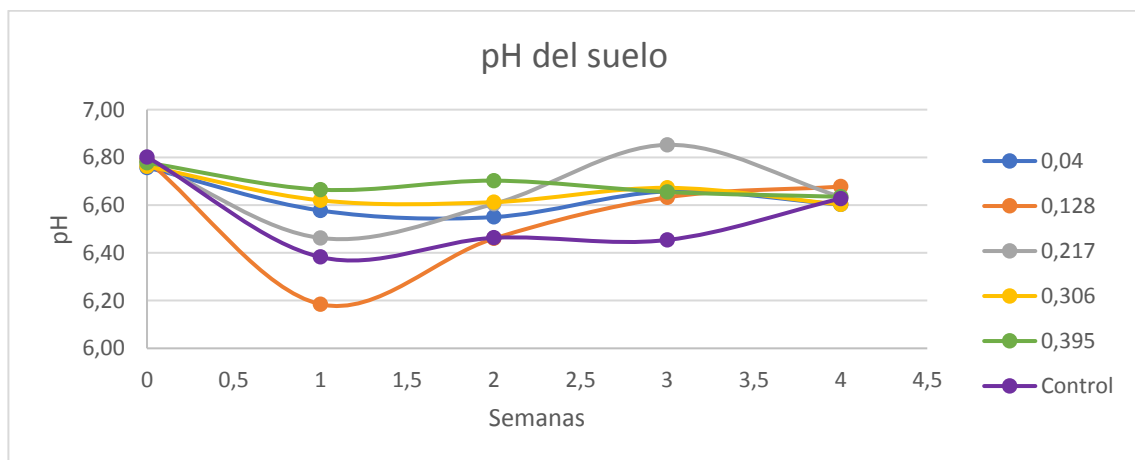
En el plaguicida 2 la concentración de 0,128 presentó una gran variación en la medición del pH, ya que el menor valor fue de 6,19 en la semana 1, mientras que los otros tratamientos tuvieron una variación entre 6,5 y 6,85. Esto pudo presentarse porque para el tratamiento 2 del plaguicida 2 el porcentaje de mortalidad en la primera semana fue de 5%, lo que pudo haber afectado la descomposición de la materia orgánica presente.

Sin embargo, cabe resaltar que durante todo el ensayo se cumplió el parámetro, ya que el pH no sobrepasó los límites ($6,5 \pm 0,5$). Lo que quiere decir que este parámetro no pudo afectar el funcionamiento que las lombrices tienen (descomposición de materia orgánica).

Gráfica 5-6. pH del suelo con el plaguicida 1



Gráfica 5-7. pH del suelo con el plaguicida 2



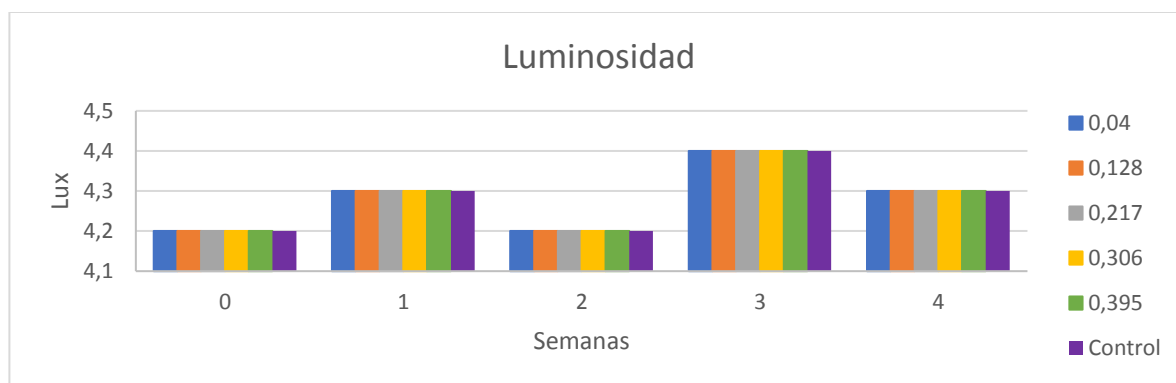
- Luminosidad.



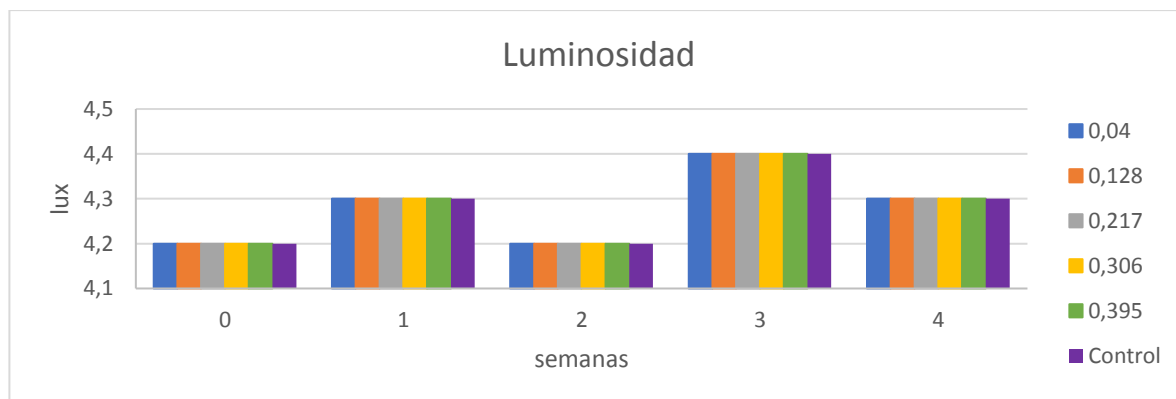
La cantidad de luz en las que se encontraban las lombrices son las mismas para ambos plaguicidas (ver grafica 5-8 y 5-9), ya que se encontraban en la misma habitación, pero en diferentes cajas, esto de igual manera para los controles. Por lo que los lux de los dos plaguicidas presentan el mismo comportamiento.

Este parámetro se cumplió en su totalidad, ya que las cajas donde se encontraban las lombrices se encontraban tapadas, con el fin de evitar que tuvieran contacto con los rayos ultravioleta porque son fotóforas, en caso de que no se hubiese cumplido este parámetro hubiera sido un factor en la mortalidad de las lombrices.

Gráfica 5-8. Luminosidad para el plaguicida 1



Gráfica 5-9. Luminosidad para el plaguicida 2



- Peso

En las gráficas 5-10 y 5-11 se observa que el peso por lombriz aumenta al ser exposición al plaguicida algo que no se esperaba que sucediera en un inicio, esto se debe a que las lombrices ganan peso como una medida de supervivencia, diferencia de los controles que aumentaron su peso simplemente porque crecieron.

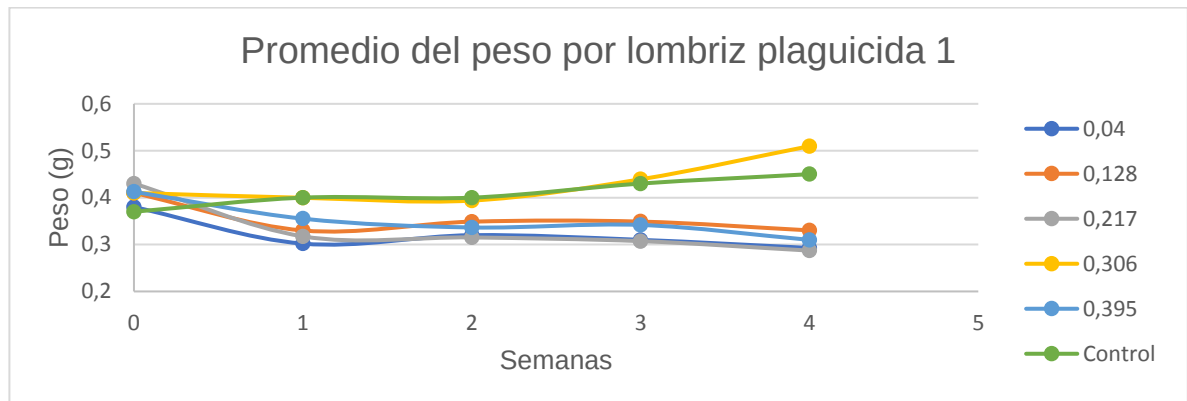
Con el plaguicida 1 se observa que las lombrices que estaban en las 4 primeras concentraciones fueron perdiendo de peso de una forma constante, en cambio la



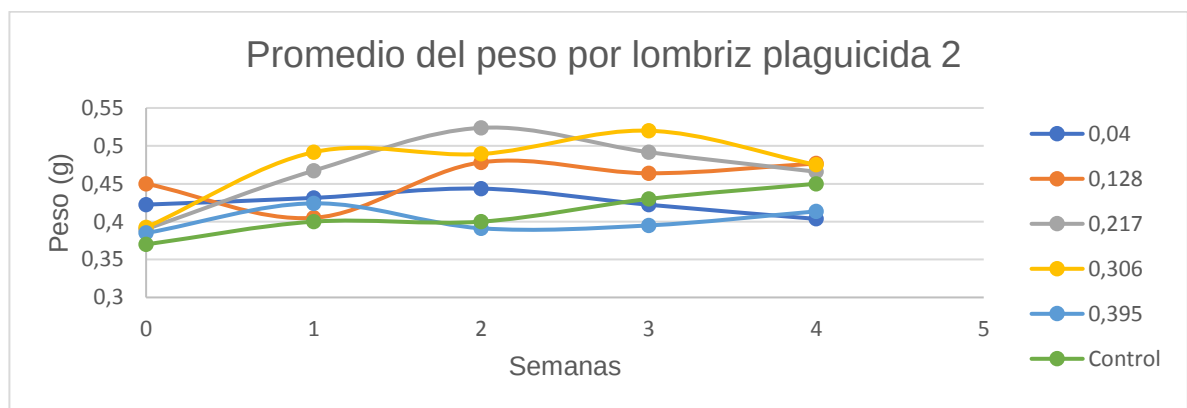
concentración más alta, las lombrices fueron ganando peso indicando que esta concentración si está afectando a los individuos.

Mientras que el plaguicida 2 el aumento del peso no se vio de manera tan evidente, pero en general el peso subió para algunas concentraciones pero manteniendo la misma tendencia del fungicida 1.

Gráfica 5-10. Peso de las lombrices tratadas con el plaguicida 1



Gráfica 5-11. Peso de las lombrices tratadas con el plaguicida 2



Al realizar el análisis de la correlación para las variables fisicoquímicas (anexo D.9-D10), los resultados obtenidos determinan que estas no afectan de manera negativa la mortalidad ya que no poseen relación alguna, con respecto al peso la cual era la otra variable a estudiar el análisis de correlación nos indicó que no posee relación con la mortalidad a pesar de lo visto en las gráficas anteriores

5.3.2. Determinación de la concentración letal 50.

El análisis estadístico para determinar la CL_{50} fue mediante el método probit en donde se observa que el plaguicida 2 ($0,365 \frac{ml}{0,5 kg}$) es más tóxico que el plaguicida 1 ($0,391 \frac{ml}{0,5 kg}$), ya que requiere de menos concentración para obtener la misma

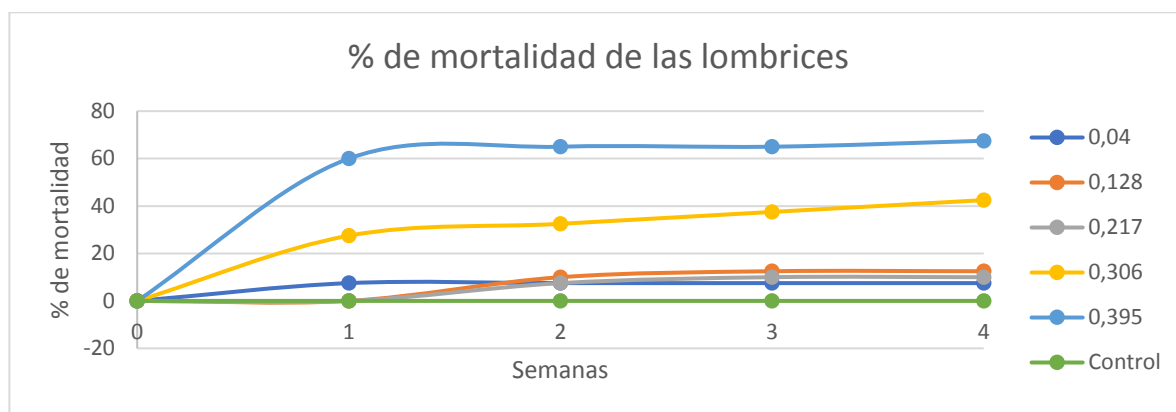


mortalidad, esto se puede deber a los insipientes y coadyuvantes que contiene cada plaguicida (anexo A).

Una vez se obtuvo las CL_{50} de los 2 plaguicidas se hallaron las concentraciones definitivas (0,04, 0,128, 0,217, 0,306, 0,395). En el ensayo final se obtienen los % de mortalidad de los plaguicidas durante las 4 semanas para cada concentración.

En la gráfica 5-12 se tiene que, para las concentraciones de 0,04, 0,128 y 0,217 ml/kg la mortalidad durante las 4 semanas tuvo un máximo de mortalidad del 10%. En la concentración 0,306 la mortalidad máxima obtenida fue a la 4 semana con un valor de 43%. Mientras que en la concentración de 0,395 la mortalidad a la primera semana llegó a 60% y con un máximo de mortalidad en la semana 4 del 68%.

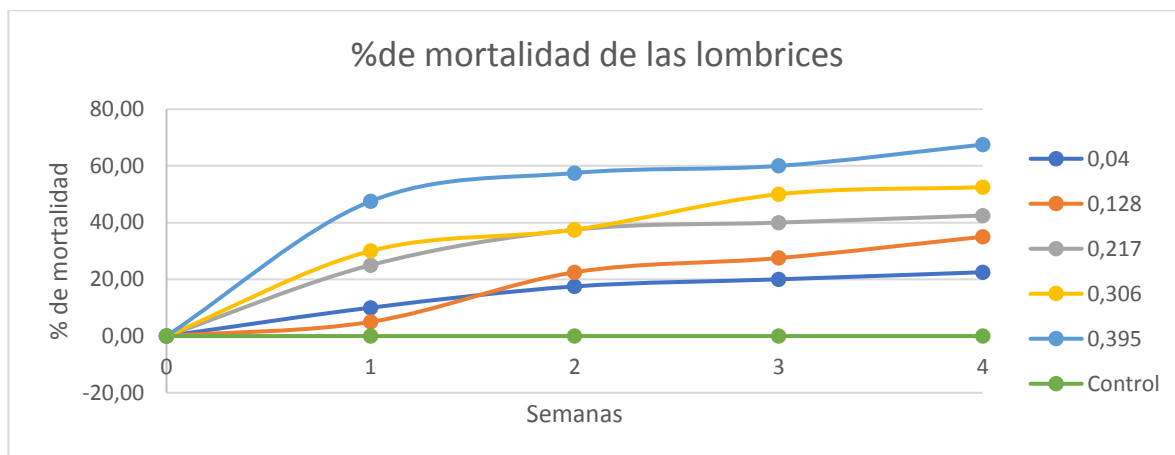
Gráfica 5-12. Porcentaje de mortalidad de las lombrices con el plaguicida 1



En la gráfica 5-13 los porcentajes de mortalidad si tuvieron un aumento considerado en comparación con el plaguicida 1. Donde las concentraciones de 0,04, 0,128 y $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ tuvieron un aumento de mortalidad progresivo durante todas las semanas, hasta llegar a un máximo de mortalidad del 42,5% en la semana 4 para la mayor concentración. En la concentración de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ en la semana 3 se registró una mortalidad del 50% y en la semana 4 llegó a un máximo de 52,5%. Finalmente, en la concentración de 0,395 en la semana 1 tuvo una mortalidad del 47,5%, en la semana 2 su mortalidad aumentó a 57,5% y su máxima mortalidad la obtuvo en la semana 4 con un valor de 67,5%.



Gráfica 5-13. Porcentaje de mortalidad de las lombrices con el plaguicida 2



Lo anterior evidencia que el plaguicida 2 es mucho más toxico ya que a las concentraciones menores la mortalidad aumento en comparación al plaguicida 1 y la CL₅₀ se obtuvo en concentraciones menores en el plaguicida 2 y a menos semanas en comparación con el plaguicida 1.

Para determinar la calidad de los datos se realizó una serie de pruebas estadísticas entre ellas la realización de diagramas de cajas (anexo B) para analizar la dispersión de los datos (concentración). El comportamiento de estos permitió observar que para el plaguicida 1 (anexo B.1), asimismo las concentraciones más bajas ($0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$) no tuvieron incidencia en la mortalidad, en la parte inferior es mayor que la superior indicándonos que las muertes comprendidas entre el 25% y el 50 % están más dispersas que entre el 50% y el 75%, para la concentración $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ su comportamiento es inverso a los dos primeros, y para las dos últimas ($0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$) sus cuartiles y bigotes nos indica que la dispersión de los datos es amplia pero su media en mortalidad aumenta indicándonos que estos tratamientos si tuvieron efecto sobre las lombrices; El plaguicida 2, las concentraciones más bajas ($0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$) tuvieron incidencia en la mortalidad además su dispersión es mayor a la del plaguicida 2 (anexo B.1), igualmente la parte inferior es mayor que la superior indicándonos que las muertes comprendidas entre el 25% y el 50 % están más dispersas que entre el 50% y el 75%, para la concentración $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ la media es más alta que de las dos anteriores evidenciando que este si tuvo influencia en la mortalidad pero no tanta como los dos siguientes ($0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$) en donde sus cuartiles y bigotes nos indica que la dispersión de los datos no es amplia incluso en el último tratamiento no se presenta un bigote en la parte inferior indicando que no hay datos fuera de los cuartiles, a su vez la media en mortalidad aumenta indicándonos que



estos tratamientos si tuvieron efecto sobre las lombrices, a pesar de que la dispersión de los datos entre plaguicidas es diferente la media y comportamiento son similares obteniendo cambios en la mortalidad de las lombrices en las mismas concentraciones para los dos plaguicidas.

Otra de las pruebas estadísticas realizadas fue el cálculo del área bajo la curva para evaluar la magnitud que tuvo cada tratamiento en la mortalidad, nos indica que con el aumento de la concentración los efectos (área) crecen, confirmando el comportamiento anteriormente evaluado.

5.3.3. Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA.

Con el análisis de varianza entre la mortalidad y los tratamientos se obtuvo el estadístico F y la significancia, donde el plaguicida 1 obtuvo valores de 52.427 y $1.07e^{-10}$ respectivamente, mientras que en el plaguicida 2 fue de 9.3408 y $2.07e^{-6}$, lo que indica que las variables de los dos plaguicidas están relacionadas ya que los valores del F se encuentran por encima de 0,05 y la significancia de los mismos por debajo de 0,05, por lo que se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la alternativa que es la que plantea que hay diferencia entre los tratamientos.

Con relación a la prueba de Tukey de la mortalidad entre los tratamientos, se obtuvo que para el plaguicida 1, que los únicos tratamientos que no tuvieron significancia fueron el 2-1, 3-1 y 3-2, ya que las tres primeras concentraciones presentaron mortalidades similares. Mientras que el plaguicida 2 los tratamientos que tuvieron significancia fueron los 4-1, 5-1, 5-2 y el 5-3, por lo que se puede decir que las demás comparaciones entre los tratamientos son estadísticamente iguales.

Para determinar la incidencia de los plaguicidas sobre el peso de las lombrices se realizó el análisis de varianza, obteniendo para el plaguicida 1 un F de 2.4262 y un nivel de significancia de 0,05, y para el plaguicida dos un F de 1,1712 y una significancia de 0,3285, lo que nos indica que en el plaguicida 1 por lo menos hay 2 tratamientos que tienen un comportamiento diferente, sin embargo en el plaguicida 2 al obtener un nivel de significancia mayor a 0,05 no dice que todos los tratamientos tienen el mismo comportamiento en el peso de las lombrices.

En la prueba de Tukey del peso entre los tratamientos para el plaguicida 1 se obtuvo solo una diferencia entre el tratamiento 4 y 1, lo que quiere decir que son estadísticamente diferentes, obteniendo un nivel de significancia de 0,045. Por otro lado, en el plaguicida 2 no se encuentra ninguna diferencia del peso sobre las diferentes concentraciones, haciéndolas estadísticamente iguales.

Por otro lado, se realizó el análisis de varianza univariado (anexo E), donde se obtiene los siguientes resultados:

- Factor inter-sujetos



En el anexo E.1 se relacionan las cantidades de los datos analizados, donde se evidencian los dos plaguicidas, el control y 6 concentraciones (0, 0.04, 0.128, 0.217, $0.306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0.395 \frac{ml}{0,5 kg}$), donde la concentración 0 hace referencia al control.

- Pruebas de efectos inter-sujetos

Al observar la significancia del plaguicida (0,006), la de la concentración (0,000) y la relación entre las dos variables (0,045), los valores son inferiores a 0,05, lo que quiere decir que se rechaza la hipótesis nula que dice que las variables no tienen diferencias significativas, y se acepta la hipótesis alternativa que dice que hay diferencias significativas entre las concentraciones y los plaguicidas (anexo E.2).

- Pruebas Post Hoc

Las pruebas Post Hoc se realizaron por tres métodos, Tukey, DMS y Dunnet, encontrando lo siguiente (Anexo E.3):

Con el método de Tukey al comparar el control con las 5 concentraciones se encontró que la concentración de 0,04 no presenta significancia, y por el contrario con las 4 concentraciones restantes presenta diferencias significativas. Con la concentración de $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ solo se presenta diferencias significativas con las concentraciones de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ con valores de 0,000.

Al ver la concentración de $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ se encuentra significancia con el control (0,032) y las concentraciones de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ (0,002) y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ (0,000), lo que quiere decir que son diferentes entre estos tratamientos. Para la concentración de $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$, solo se presenta igualdad con las concentraciones de $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ con significancias de 0,652 y 0,878 respectivamente, por lo que en estas concentraciones representa casi el mismo comportamiento.

Mientras que en las concentraciones de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ se observa que tienen diferencias significativas con el control y las concentraciones restantes.

Para el método DMS Al comparar el control con las 5 concentraciones de tiene que todas presentan significancia, ya que los valores dan por debajo de 0,05. Con relación a la concentración de $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$, solo presenta igualdad con las concentraciones de $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ con valores de 0,675 y 0,134, lo que representa un comportamiento similar entre estas concentraciones. En la concentración $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ la significancia con las concentraciones $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$ es mayor a 0,05, obteniendo valores de 0,675 y 0,276, haciéndolas



estadísticamente iguales. Para la concentración 0,217 mg/kg con relación a las concentraciones de $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ no son significantes ya que tienen valores de 0,134 y 0,276 representado una igualdad en el comportamiento de estas concentraciones. Mientras que para las concentraciones de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ al compararlas con el control y las otras concentraciones representan significancias, lo que quiere decir que el comportamiento de todos los tratamientos son diferentes al compararlos con estas dos concentraciones.

Con el método de Dunnet se observa que el control al compararlo con la concentración 0,04 son estadísticamente iguales, ya que la significancia fue de 0,052, valor mayor a 0,05. Mientras que la comparar el control con las demás concentraciones presentan diferencias entre sí, haciéndolas estadísticamente diferentes.

- Subconjuntos homogéneos

En cuanto a los subconjuntos homogéneos se puede observar que el control y las concentraciones de $0,04 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ se agrupan en un mismo subconjunto, por lo que hay homogeneidad entre las 3 variables, haciéndolas estadísticamente iguales con una significancia de 0,080. En el subconjunto 2 se agrupan las concentraciones 0,04, $0,128 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,217 \frac{ml}{0,5 kg}$, con una significancia de 0,599, lo que las hace estadísticamente iguales, mientras que las concentraciones de $0,306 \frac{ml}{0,5 kg}$ y $0,395 \frac{ml}{0,5 kg}$ presentan diferencias entre sí y se agrupan en subconjuntos diferentes, generando que estas concentraciones sean estadísticamente diferentes.

- Comparaciones múltiples entre plaguicidas

Para el análisis de varianza entre los plaguicidas y el control, se utilizó los métodos de Tukey, DMS y Dunnet, mostrando en los 3 métodos que hay diferencias significativas entre estas variables, además, se evidencia que no hay similitud entre el plaguicida 1 y 2, generando que se rechace la hipótesis nula que dice que estas 3 variables tienen un comportamiento igual, y aceptando la hipótesis alternativa que representa que hay diferencia entre el control y los plaguicidas aunque estos presenten una concentración de ingrediente activo de 250 EC cada uno, el efecto tóxico sobre las lombrices de tierra son diferentes, lo que se debe a los excipientes y coadyuvante que contiene cada producto.



6. Impacto social

Siendo Colombia un país en su mayoría agrícola, el consumo de productos enfocados al control de plagas en los cultivos ha aumentado de manera significativa. Sin embargo, en Colombia no existe un buen manejo de estos por parte de los agricultores, lo que genera la contaminación en el ambiente y los problemas en la salud de las poblaciones. Además, se debe resaltar que para la categorización toxicológica de estos productos solo se tiene en cuenta los principios activos y se excluye los coadyuvantes y excipientes, lo que genera una mala categorización, al mejorar esto se podría dar un uso adecuado de estos y de esta manera disminuir los problemas de salud de las personas que están en contacto con estos productos.



7. Conclusiones

- El fungicida de uso agrícola más tóxico para la lombriz californiana (*Eisenia foetida*), fue el plaguicida 2 ya que a menor concentración su tasa de mortalidad aumenta, a pesar de que contienen el mismo principio activo y la misma concentración (250 EC) suspendida. Lo anterior evidencia que los excipientes y coadyuvantes de cada uno son diferentes, generando que la toxicidad de cada uno sea distinta, lo cual se evidenció en el análisis de varianza, donde se comparó los dos plaguicidas obteniendo una diferencia significativa.
- El diseño experimental completamente aleatorio permitió tener unidades experimentales homogéneas, ya que no se conocía la incidencia que podría tener los plaguicidas sobre el sustrato biológico. Por lo que fue necesario determinar una concentración de referencia para poder disminuir el rango de concentraciones a utilizar y de esta manera se posibilitó detectar los efectos de cada tratamiento.
- Mediante el análisis estadístico se verificó que para los dos plaguicidas las concentraciones de 0,306 y 0,395 $\frac{ml}{0,5\ kg}$ representan diferencias significativas, debido a que el efecto letal sobre las lombrices fue diferente, mientras que para las concentraciones restantes su comportamiento fue similar creando dos subconjuntos, donde se relaciona el control y las concentraciones 0,04 y 0,128 $\frac{ml}{0,5\ kg}$ y para el otro subconjunto las concentraciones 0,04, 0,128 y 0,217 $\frac{ml}{0,5\ kg}$, lo que representa igualdad entre ellas.
- El análisis de varianza que se realizó a la variable de peso nos indica que la única diferencia se encuentra al comparar la concentración 1 con la 4, ya que se obtuvo un nivel de significancia de 0,045, mientras que en el plaguicida 2 las concentraciones no influyen en el peso de las lombrices ya que todas tienen el mismo comportamiento estadísticamente.
- Se determinó que los parámetros fisicoquímicos (luminosidad, pH, temperatura y humedad) esputando el peso no incidieron en la mortalidad del sustrato biológico, ya que sus niveles de correlación están por debajo de 0,5 los cuales son muy bajos como para determinar una correlación con la mortalidad, por otro lado, la variable peso, su correlación nos indica que no es afectado por la mortalidad ya que se observó que se mantuvo estable durante las 4 semanas de estudio.



8. Recomendaciones

- Realizar un estudio con diferentes especies para así evaluar que tan agresivo es el plaguicida con cada especie diferente bajo las mismas condiciones.
- De forma complementaria realizar esta clase de estudio con diversos tipos de suelo donde se utilizó este fungicida.
- Se recomienda realizar un estudio de natalidad de las lombrices estando en contacto con el fungicida.
- Se recomienda a la universidad proporcionar equipos y espacios adecuados para la realización de esta clase de estudios, como equipos que permitan medir con exactitud los diferentes parámetros fisicoquímicos que se evalúan, así mismo las instalaciones deben contar con espacios que faciliten el lavado limpieza de manos y utensilios que estén en contacto con los distintos productos químicos que se utilizan en esta clase de trabajos.
- Se recomienda a las autoridades ambientales correspondientes no solo concentrarse en los estudios del producto activo, sino además en el seguimiento de los coadyuvantes, ya que estos pueden modificar la toxicidad del plaguicida causando complicaciones con estos a la hora de tratarlos.



9. Bibliografía

- [1] J. A. Ramírez y M. Lacasaña, «Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicidad y medición de la exposición,» Barcelona, 2001.
- [2] A. M. del Puerto Rodríguez, S. Suárez Tamayo y D. Palacio Estrada , «Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud,» Habana, 2014.
- [3] I. Zapata, L. Martínez , E. Posada , M. González y J. Saldarriaga, «Efectos de la lombriz roja californiana (Eisenia Foetida), sobre el crecimiento de microorganismos en suelos contaminados con mercurio de Segovia, Antioquia,» Segovia, 2016.
- [4] Food and Agriculture Organization , «Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas,» FAO, Roma, 2006.
- [5] J. T. Zacharia, «Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides,» INTECH, Tanzania, 2011.
- [6] World Health Organization, «The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard,» IPCS, 2005.
- [7] F. Prieto Garcia, S. Cortés Ascencio, J. Gaytan Oyarzun, A. Ceruelo Hernandez y P. Vazquez Alavarado, «Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks,» Copyright, Pachuca, 2012.
- [8] E. Borja, «Evaluación in vitro de funguicidas para el control de Monilinia spp. aislada de duraznos (Prunus persica) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador,» Quito, 2011.
- [9] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Aplicación eficiente de fitosanitarios.
- [10] Du Pont, «Protección profesional para el control eficaz de las enfermedades en cereales,» Copyright, Barcelona, 2015.
- [11] F. Fishel, «Pesticide toxicity profile: triazoles pesticides,» 2005.
- [12] Silvestre Protección vegetal, «Hoja de seguridad,» Lima, 2012.
- [13] Montana, «Bolero, funguicida agrícola,» 2015.
- [14] C. Liñán , «Fungicidas,» de *Vademecum*, Madrid, Agrotécnicas, 2015, p. 192.
- [15] Syngenta, «Hoja de datos de seguridad (HDS),» 2013.



- [16] M. S. Cardona, «Importancia de la biosíntesis del ergosterol en la proliferación celular y en el mecanismo de acción de fármacos en tripanosomátidos,» Universidad de la Granada, Granada, 2007.
- [17] O. M. Gonzáles Sánchez , «Destoxificación fotocatalítica de pesticidas usuales en la agricultura ecuatoriana,» Las Palmas de Gran Canaria, 2013.
- [18] X. Mu, S. Pang, X. Sun, G. Jiejun, C. Jiayi, C. Xiaofeng, L. Xuefeng y C. Wang, «Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays,» Beijing, 2012.
- [19] X. Mu, K. Wang, L. Zhu, Y. Yang , J. Zhang, S. Pang y C. Wang , «Sex specific response in cholesterol level in zebrafish (Danio rerio) after long-term exposure of difenoconazole,» Beijing, 2014.
- [20] US National Library of Medicine, «Exposure to difenoconazole, diclofop-methyl alone and combination alters oxidative stress and biochemical parameters in albino rats,» Bethesda, 2014.
- [21] Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, «Dictamen técnico ambiental para el producto dormulado Zoldifen 250 EC, apartir del ingerdiente activo difenoconazole,» Bogotá D.C., 2009.
- [22] C. N. Cano Chaver y N. Goff Salinas, «Efecto de la aplicación del EM sobre la capacidad reproductiva de la lombriz Eisenia Foetida y la calidad del lombricompost,» Guácimo, 2006.
- [23] C. Fragoso y P. Rojas, «Biodiversidad de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta:Crassiclitellata) en México,» Veracruz, 2013.
- [24] Camara de Comercio de Bogotá, «Manual TOMATE,» Bogotá, 2015.
- [25] F. A. Vallejo Cabrera y E. I. Estrada Salazar , Producción de hortalizas de clima calido, Palmira: Universidad Nacional de Colomabia Sede Palmira, 2004.
- [26] Passport, «Passport,» Euromonitor International, 2017. [En línea]. Available: <http://www.portal.euromonitor.com.bdatos.usantotomas.edu.co:2048/portal/statistics/tab>. [Último acceso: 21 Abril 2017].
- [27] Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, «Guia de consulta: Enfermedades de Tomate,» INTA , Yuto, 2012.
- [28] J. Jaramillo , V. Rodríguez, M. Guzmán, M. Zapata y T. Rengifo, PRODUCCIÓN DE TOMATE BAJO CONDICIONES PROTEGIDAS, Medellin: CTP Print., 2007.



- [29] C. M. Gamez Rojas y E. J. Ramirez Riveros, «Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con Daphnia Magna,» Bogotá, 2008.
- [30] J. Espinosa y E. Molina, «Acidez y encalado de los suelos,» International Plant Nutrition Institute, 1999.
- [31] W. Forsythe, «Parametros ambientales que afectan la temperatura del suelo en Turrialba, Costa Rica y sus consecuencias para la producción de cultivos,» Turrialba, 2002.
- [32] A. Senior Mojica, «Asohofrucol,» Febrero 2007. [En línea]. Available: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_28_PHN.pdf. [Último acceso: 21 Abril 2017].
- [33] Minagricultura, «Tomate,» Bogotá, 2014.
- [34] Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, «Perfil económico: Departameno de Boyacá,» Boyacá, 2017.



A. ANEXO. Análisis con el método Probit para la determinación de la concentración letal 50

Imagen A.1. Análisis Probit del plaguicida 1

```
Fitting Model ->          Probit Model
Model Equation:  Probit_Mortality=A+B*Log10_Concentracion

Input Data ...

Dose/Concentration ->      Concentracion
Dead Number ->           Muertes
Total Number ->          Total organismos

Results ...

Parameter A:              0.81447688
Parameter B(slope):       1.99811455

Deviance:                 44.94479999
AIC:                      86.97988398

LD50/LC50 Value:          0.39118058
LOG10(LD50/LC50) Value:   -0.40762271

95% Confidence Interval for LD50/LC50...
Lower Limit:               0.28611837
Upper Limit:               0.53482147
```



Imagen A.2. Análisis Probit del plaguicida 2

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: $\text{Probit_Mortality} = A + B * \text{Log10_Concentracion}$

Input Data ...

Dose/Concentration ->	Concentracion
Dead Number ->	Muertes
Total Number ->	Total organismos

Results ...

Parameter A:	0.36471408
Parameter B(slope):	0.8326845

Deviance:	23.78487351
AIC:	78.10208544

LD50/LC50 Value:	0.36475569
LOG10(LD50/LC50) Value:	-0.43799792

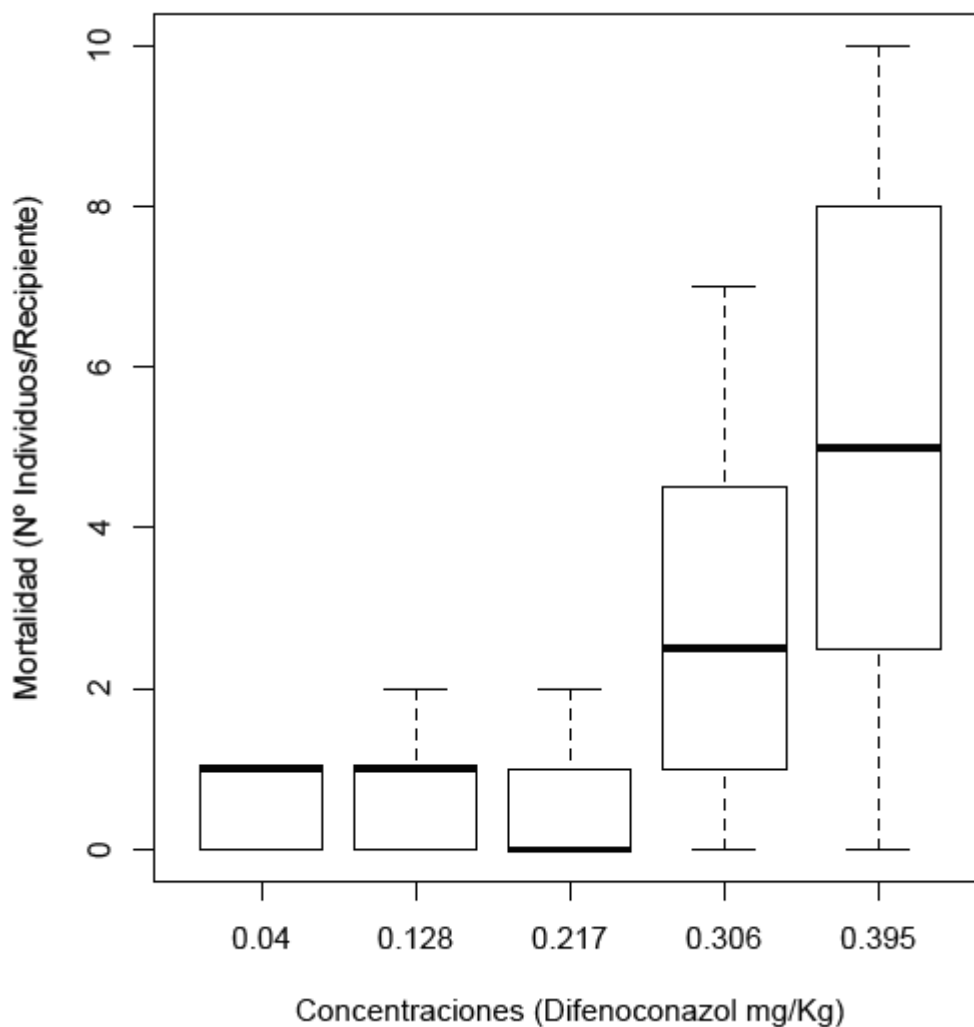
95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	0.186651213
Upper Limit:	0.71280928



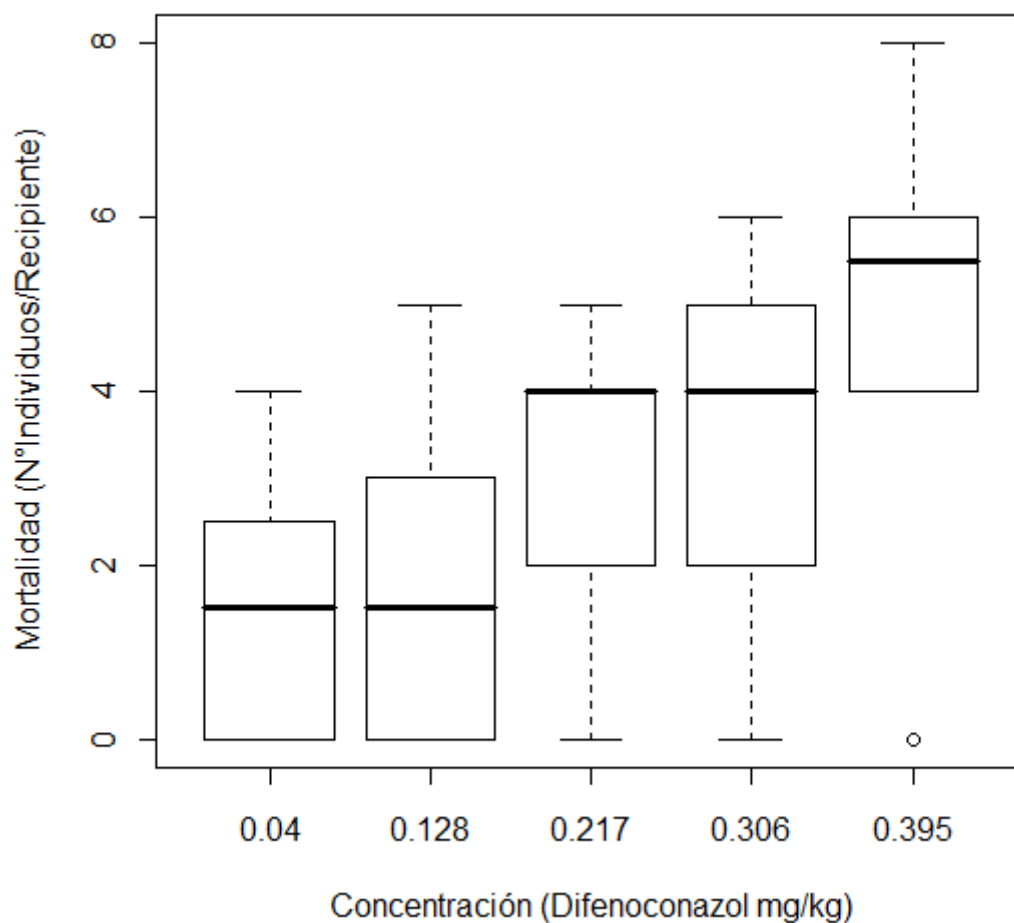
B. ANEXO. Diagrama de caja de los plaguicidas

Gráfica B.1. Diagrama de caja de la mortalidad del plaguicida 1





Gráfica B-2. Diagrama de caja de la mortalidad del plaguicida 2





C. Anexo. Área bajo la curva de cada replica de los dos plaguicidas.

Tabla C.1. Área bajo la curva de cada replica.

Plaguicida 1			Plaguicida 2		
Replica	Concentración	Área	Replica	Concentración	Área
1	0,04	3,5	1	0,04	0
2	0,04	3,5	2	0,04	8
3	0,04	3,5	3	0,04	6
4	0,04	0	4	0,04	9,5
1	0,128	1,5	1	0,128	3
2	0,128	5	2	0,128	9
3	0,128	2,5	3	0,128	9,5
4	0,128	2,5	4	0,128	7,5
1	0,217	5	1	0,217	12
2	0,217	2,5	2	0,217	12,5
3	0,217	0	3	0,217	11
4	0,217	1,5	4	0,217	13
1	0,306	13,5	1	0,306	15,5
2	0,306	3,5	2	0,306	15,5
3	0,306	8	3	0,306	15
4	0,306	22,5	4	0,306	11,5
1	0,395	10	1	0,395	20,5
2	0,395	35	2	0,395	24
3	0,395	28	3	0,395	17
4	0,395	16,5	4	0,395	18



D. Anexo. Análisis de varianza de parámetros fisicoquímicos.

Ilustración D.1. Análisis de varianza de mortalidad con los tratamientos del plaguicida 1.

```
Analysis of Variance Table

Response: Mortalidad
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tratamiento  1 250.88  250.880   52.427 1.017e-10 ***
Residuals   98  468.96    4.785
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Ilustración D.2. Análisis de varianza del peso con los tratamientos del plaguicida 1.

```
Analysis of Variance Table

Response: Peso
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
as.factor(Tratamiento)  4  0.14939  0.037346   2.4262 0.05322 .
Residuals              95  1.46233  0.015393
```

Ilustración D.3. Correlación de Tukey de la mortalidad entre tratamientos del plaguicida 1.

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Mortalidad ~ Tratamiento)

$Tratamiento
      diff      lwr      upr    p adj
2-1  0.10 -1.6901967  1.890197 0.9998669
3-1 -0.05 -1.8401967  1.740197 0.9999916
4-1  2.20  0.4098033  3.990197 0.0081030
5-1  4.55  2.7598033  6.340197 0.0000000
3-2 -0.15 -1.9401967  1.640197 0.9993358
4-2  2.10  0.3098033  3.890197 0.0130364
5-2  4.45  2.6598033  6.240197 0.0000000
4-3  2.25  0.4598033  4.040197 0.0063434
5-3  4.60  2.8098033  6.390197 0.0000000
5-4  2.35  0.5598033  4.140197 0.0038354
```



Ilustración D.4. Correlación de Tukey del peso entre tratamientos del plaguicida 1.

```
Fit: aov(formula = Peso ~ as.factor(Tratamiento))
```

```
$`as.factor(Tratamiento)`
      diff      lwr      upr      p adj
2-1  0.0335 -0.075604015 0.14260401 0.9127728
3-1  0.0115 -0.097604015 0.12060401 0.9983620
4-1  0.1105  0.001395985 0.21960401 0.0455921
5-1  0.0310 -0.078104015 0.14010401 0.9328953
3-2 -0.0220 -0.131104015 0.08710401 0.9803310
4-2  0.0770 -0.032104015 0.18610401 0.2922812
5-2 -0.0025 -0.111604015 0.10660401 0.9999962
4-3  0.0990 -0.010104015 0.20810401 0.0940233
```

Ilustración D.5. Análisis de varianza de mortalidad con los tratamientos del plaguicida 2.

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: Mortalidad
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(Tratamiento)	4	134.96	33.740	9.3408	2.073e-06 ***
Residuals	95	343.15	3.612		

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Ilustración D.6. Análisis de varianza del peso con los tratamientos del plaguicida 2.

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: Peso
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(Tratamiento)	4	0.0738	0.018449	1.1712	0.3285
Residuals	95	1.4965	0.015753		



Ilustración D.7. Correlación de Tukey de la mortalidad entre tratamientos del plaguicida 2.

```
Fit: aov(formula = Mortalidad ~ as.factor(Tratamiento))
```

```
$`as.factor(Tratamiento)`
      diff      lwr      upr      p adj
2-1  0.40 -1.27132165  2.071322  0.9632546
3-1  1.50 -0.17132165  3.171322  0.1001957
4-1  2.00  0.32867835  3.671322  0.0106885
5-1  3.25  1.57867835  4.921322  0.0000047
3-2  1.10 -0.57132165  2.771322  0.3625043
4-2  1.60 -0.07132165  3.271322  0.0674311
5-2  2.85  1.17867835  4.521322  0.0000718
4-3  0.50 -1.17132165  2.171322  0.9200531
5-3  1.75  0.07867835  3.421322  0.0353989
5-4  1.25 -0.42132165  2.921322  0.2373760
```

Ilustración D.8. Correlación de Tukey del peso entre tratamientos del plaguicida 2.

```
Fit: aov(formula = Peso ~ as.factor(Tratamiento))
```

```
$`as.factor(Tratamiento)`
      diff      lwr      upr      p adj
2-1  0.0300 -0.08037136  0.14037136  0.9424109
3-1  0.0430 -0.06737136  0.15337136  0.8146449
4-1  0.0485 -0.06187136  0.15887136  0.7386382
5-1 -0.0230 -0.13337136  0.08737136  0.9777898
3-2  0.0130 -0.09737136  0.12337136  0.9974722
4-2  0.0185 -0.09187136  0.12887136  0.9901653
5-2 -0.0530 -0.16337136  0.05737136  0.6699646
4-3  0.0055 -0.10487136  0.11587136  0.9999155
5-3 -0.0660 -0.17637136  0.04437136  0.4616884
5-4 -0.0715 -0.18187136  0.03887136  0.3788233
```



Ilustración D.9. Correlación de Tukey entre los parámetros fisicoquímicos y la mortalidad del plaguicida 1.

```
> CORR_Toxi
-
Mortalidad      Peso Temperatura      pH      Humedad
Mortalidad  1.000000000 -0.141840863 -0.08818143  0.005093384  0.076528241
Peso        -0.141840863  1.000000000  0.03024653 -0.039007700 -0.009758153
Temperatura -0.088181433  0.030246529  1.000000000  0.119189640 -0.089890289
pH          0.005093384 -0.039007700  0.11918964  1.000000000 -0.112110377
Humedad     0.076528241 -0.009758153 -0.08989029 -0.112110377  1.000000000
Luz         0.407020517 -0.095154681  0.54120656 -0.036491086  0.086479087
Luz
Mortalidad  0.40702052
Peso        -0.09515468
Temperatura 0.54120656
pH          -0.03649109
Humedad     0.08647909
Luz         1.00000000
```

Ilustración D.10. Correlación de Tukey entre los parámetros fisicoquímicos y la mortalidad del plaguicida 2.

```
-
Mortalidad      Peso Temperatura      pH      Humedad
Mortalidad  1.000000000  0.16052403 -0.08818143  0.005093384  0.07652824
Peso        0.160524027  1.000000000 -0.03299123 -0.190428617  0.16924261
Temperatura -0.088181433 -0.03299123  1.000000000  0.119189640 -0.08989029
pH          0.005093384 -0.19042862  0.11918964  1.000000000 -0.11211038
Humedad     0.076528241  0.16924261 -0.08989029 -0.112110377  1.00000000
Luz         0.407020517  0.06654261  0.54120656 -0.036491086  0.08647909
Luz
Mortalidad  0.40702052
Peso        0.06654261
Temperatura 0.54120656
pH          -0.03649109
Humedad     0.08647909
Luz         1.00000000
```



E. Anexo. Análisis de varianza ANAVA Univariable.

Tabla E.1. Factor inter-sujetos.

		Etiqueta de valor	N
Concentraciones	,00	0	20
	1,00	0,04	8
	2,00	0,128	8
	3,00	0,217	8
	4,00	0,306	8
	5,00	0,395	8
Plaguicidas	1,00	Plaguicida 1	20
	2,00	Plaguicida 2	20
	3,00	Control	20

Tabla E21.2. Prueba de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Área

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3243,233 ^a	10	324,323	21,785	,000
Intersección	3607,792	1	3607,792	242,333	,000
Concentraciones	1590,162	4	397,541	26,703	,000
Plaguicidas	122,500	1	122,500	8,228	,006
Concentraciones * Plaguicidas	156,938	4	39,234	2,635	,045



Error	729,500	49	14,888		
Total	6720,000	60			
Total corregido	3972,733	59			

a. R al cuadrado = ,816 (R al cuadrado ajustada = ,779)

Tabla E.3. Pruebas Post Hoc Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área

	(I) Concentraciones	(J) Concentraciones	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	0	0,04	-4,2500	1,61411	,109	-9,0365	,5365
		0,128	-5,0625*	1,61411	,032	-9,8490	-,2760
		0,217	-7,1875*	1,61411	,001	-11,9740	-2,4010
		0,306	-13,1250*	1,61411	,000	-17,9115	-8,3385
		0,395	-21,1250*	1,61411	,000	-25,9115	-16,3385
	0,04	0	4,2500	1,61411	,109	-,5365	9,0365
		0,128	-,8125	1,92923	,998	-6,5335	4,9085
		0,217	-2,9375	1,92923	,652	-8,6585	2,7835
		0,306	-8,8750*	1,92923	,000	-14,5960	-3,1540
		0,395	-16,8750*	1,92923	,000	-22,5960	-11,1540
	0,128	0	5,0625*	1,61411	,032	,2760	9,8490
		0,04	,8125	1,92923	,998	-4,9085	6,5335
		0,217	-2,1250	1,92923	,878	-7,8460	3,5960
		0,306	-8,0625*	1,92923	,002	-13,7835	-2,3415
		0,395	-16,0625*	1,92923	,000	-21,7835	-10,3415
	0,217	0	7,1875*	1,61411	,001	2,4010	11,9740
		0,04	2,9375	1,92923	,652	-2,7835	8,6585
		0,128	2,1250	1,92923	,878	-3,5960	7,8460
		0,306	-5,9375*	1,92923	,038	-11,6585	-,2165



		0,395	-13,9375°	1,92923	,000	-19,6585	-8,2165
	0,306	0	13,1250°	1,61411	,000	8,3385	17,9115
		0,04	8,8750°	1,92923	,000	3,1540	14,5960
		0,128	8,0625°	1,92923	,002	2,3415	13,7835
		0,217	5,9375°	1,92923	,038	,2165	11,6585
		0,395	-8,0000°	1,92923	,002	-13,7210	-2,2790
	0,395	0	21,1250°	1,61411	,000	16,3385	25,9115
		0,04	16,8750°	1,92923	,000	11,1540	22,5960
		0,128	16,0625°	1,92923	,000	10,3415	21,7835
		0,217	13,9375°	1,92923	,000	8,2165	19,6585
		0,306	8,0000°	1,92923	,002	2,2790	13,7210
DMS	0	0,04	-4,2500°	1,61411	,011	-7,4937	-1,0063
		0,128	-5,0625°	1,61411	,003	-8,3062	-1,8188
		0,217	-7,1875°	1,61411	,000	-10,4312	-3,9438
		0,306	-13,1250°	1,61411	,000	-16,3687	-9,8813
		0,395	-21,1250°	1,61411	,000	-24,3687	-17,8813
	0,04	0	4,2500°	1,61411	,011	1,0063	7,4937
		0,128	-,8125	1,92923	,675	-4,6894	3,0644
		0,217	-2,9375	1,92923	,134	-6,8144	,9394
		0,306	-8,8750°	1,92923	,000	-12,7519	-4,9981
		0,395	-16,8750°	1,92923	,000	-20,7519	-12,9981
	0,128	0	5,0625°	1,61411	,003	1,8188	8,3062
		0,04	,8125	1,92923	,675	-3,0644	4,6894
		0,217	-2,1250	1,92923	,276	-6,0019	1,7519
		0,306	-8,0625°	1,92923	,000	-11,9394	-4,1856
		0,395	-16,0625°	1,92923	,000	-19,9394	-12,1856
	0,217	0	7,1875°	1,61411	,000	3,9438	10,4312
		0,04	2,9375	1,92923	,134	-,9394	6,8144
		0,128	2,1250	1,92923	,276	-1,7519	6,0019
		0,306	-5,9375°	1,92923	,003	-9,8144	-2,0606
		0,395	-13,9375°	1,92923	,000	-17,8144	-10,0606



	0,306	0	13,1250*	1,61411	,000	9,8813	16,3687
		0,04	8,8750*	1,92923	,000	4,9981	12,7519
		0,128	8,0625*	1,92923	,000	4,1856	11,9394
		0,217	5,9375*	1,92923	,003	2,0606	9,8144
		0,395	-8,0000*	1,92923	,000	-11,8769	-4,1231
	0,395	0	21,1250*	1,61411	,000	17,8813	24,3687
		0,04	16,8750*	1,92923	,000	12,9981	20,7519
		0,128	16,0625*	1,92923	,000	12,1856	19,9394
		0,217	13,9375*	1,92923	,000	10,0606	17,8144
		0,306	8,0000*	1,92923	,000	4,1231	11,8769
T de Dunnett (bilateral) b	0,04	0	4,2500	1,61411	,052	-,0214	8,5214
	0,128	0	5,0625*	1,61411	,014	,7911	9,3339
	0,217	0	7,1875*	1,61411	,000	2,9161	11,4589
	0,306	0	13,1250*	1,61411	,000	8,8536	17,3964
	0,395	0	21,1250*	1,61411	,000	16,8536	25,3964

Tabla E.4. Subconjuntos homogéneos

	Concentraciones	N	Subconjunto			
			1	2	3	4
HSD Tukey ^{a,b,c}	0	20	,0000			
	0,04	8	4,2500	4,2500		
	0,128	8	5,0625	5,0625		
	0,217	8		7,1875		
	0,306	8			13,1250	
	0,395	8				21,1250
	Sig.		,080	,599	1,000	1,000



Tabla E.5. Comparaciones múltiples entre plaguicidas.

Variable dependiente: Área

	(I) Plaguicidas	(J) Plaguicidas	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Plaguicida 1	Plaguicida 2	-3,5000*	1,22015	,016	-6,4490	-,5510
		Control	8,4000*	1,22015	,000	5,4510	11,3490
	Plaguicida 2	Plaguicida 1	3,5000*	1,22015	,016	,5510	6,4490
		Control	11,9000*	1,22015	,000	8,9510	14,8490
	Control	Plaguicida 1	-8,4000*	1,22015	,000	-11,3490	-5,4510
		Plaguicida 2	-11,9000*	1,22015	,000	-14,8490	-8,9510
DMS	Plaguicida 1	Plaguicida 2	-3,5000*	1,22015	,006	-5,9520	-1,0480
		Control	8,4000*	1,22015	,000	5,9480	10,8520
	Plaguicida 2	Plaguicida 1	3,5000*	1,22015	,006	1,0480	5,9520
		Control	11,9000*	1,22015	,000	9,4480	14,3520
	Control	Plaguicida 1	-8,4000*	1,22015	,000	-10,8520	-5,9480
		Plaguicida 2	-11,9000*	1,22015	,000	-14,3520	-9,4480
T de Dunnett (bilateral) ^b	Plaguicida 1	Control	8,4000*	1,22015	,000	5,6211	11,1789
	Plaguicida 2	Control	11,9000*	1,22015	,000	9,1211	14,6789