

**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
(CLOROTALONIL)**

**CARLOS ANDRES CEPEDA ROJAS
JONATHAN CARLOSAMA CAMACHO**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ, COLOMBIA
2016**

**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
(CLOROTALONIL)**

**CARLOS ANDRES CEPEDA ROJAS
JONATHAN CARLOSAMA CAMACHO**

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERÍA
AMBIENTAL**

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

**BIÓLOGO
FRANCOIS HERRERA JACQUELIN
MSc. FITOPROTECCIÓN
(Codirector)**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ, COLOMBIA
2016**

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

AGRADECIMIENTOS

Les doy gracias principalmente a mis padres Carlos Cepeda y Doris Rojas, que me apoyaron durante toda la carrera, y en especial por darme una excelente educación a través de los años, por los valores inculcados y sin lugar a duda, por ser un ejemplo a seguir en mi vida.

Al Ingeniero Johan Álvarez y Biólogo François Herrera, director y codirector respectivamente, por la confianza y el apoyo a través de estos meses. Por compartir sus conocimientos y sabios consejos que nos ayudaron a culminar con éxitos este proceso en nuestras vidas.

Andrés Cepeda

Doy gracias a Dios por la oportunidad de estudiar, enamorarme de mi carrera y poder culminar esta etapa de mi vida, de igual manera a mis padres Hernán Carlosama y Olga Camacho, quienes son mis pilares, mi fortaleza y mi motivación.

Gracias al Ingeniero Johan por aceptar ser nuestro director de tesis y al profesor y biólogo François Herrera por el acompañamiento y la codirección durante todo el trabajo realizado.

Jonathan Carlosama

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS.....	17
1.1. Objetivo General	17
1.2. Objetivos Específicos.....	17
2. MARCO TEORICO	18
2.1. El Cultivo Del Café y los Impactos del Uso de Fungicidas.....	18
2.1.1. Generalidades del café en Colombia	18
2.1.2. Café en el Huila.....	18
2.1.3. Uso de fungicidas en el café	18
2.2. Plaguicidas	19
2.2.1. Clasificación	19
2.2.2. Fungicidas	21
2.2.3. Clorotalonil.....	22
2.2.4. Estructura y propiedades del Clorotalonil	22
2.2.5. Propiedades físicas y químicas	23
2.2.6. Mecanismo de acción.....	23
2.2.7. Toxicidad.....	23
2.2.8. Persistencia.....	23
2.3. Estudios De Toxicidad	23
2.4. Plaguicidas De Estudio	25
2.5. <i>Eisenia foetida</i> Como Sustrato Biológico.	26
2.5.1. Generalidades	26
2.5.2. Ciclo de vida.....	28
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. Materiales Y Equipos De Laboratorio	30
3.2. Diseño Experimental.....	31
3.3. Prueba de Retención De Agua	33

3.4.	Pre Ensayo	33
3.4.1.	Cálculo de concentración letal	33
3.5.	Bioensayo	34
3.5.1.	Recolección de suelo	34
3.5.2.	Condiciones de prueba:	35
3.5.3.	Organismos de prueba.....	36
3.5.4.	Aclimatación de organismos	36
3.5.5.	Cálculo de la concentración	37
3.5.6.	Aplicación del fungicida.....	37
3.5.7.	Periodo de exposición	38
3.5.8.	Parámetros fisicoquímicos	38
3.5.9.	Determinación de concentración letal 50	39
3.5.10.	Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA.....	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Pre Ensayo	40
4.1.1.	Prueba de retención de agua.....	40
4.1.2.	Cálculo concentración pre ensayo	40
4.2.	Bioensayo	41
4.2.1.	Prueba de retención de agua.....	41
4.2.2.	Cálculo de la concentración	42
4.2.3.	Parámetros fisicoquímicos	44
4.2.4.	Determinación de la Concentración Letal 50.....	47
4.2.5.	Prueba estadística de análisis de varianza (ANAVA) univariante	49
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
5.1.	Prueba de Retención de Agua.....	50
5.2.	Pre Ensayo	50
5.3.	Bioensayo	50
5.3.1.	Parámetros fisicoquímicos	51
5.3.2.	Determinación de la concentración letal 50.....	56

5.3.3. PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ANAVA UNIVARIANTE.....	60
▪ FACTORES INTER – SUJETOS	60
▪ PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER – SUJETOS	60
▪ PRUEBAS POST HOC	60
6. CONCLUSIONES	62
7. RECOMENDACIONES.....	64
8. BIBLIOGRAFÍA.....	64
9. ANEXOS.....	68
ANEXO A. Protocolo para la realización de bioensayos de determinación de concentración letal 50	68
Anexo B .Análisis Probit Para Determinación De Concentración Letal 50	69
ANEXO C. Áreas Bajo La Curva Por Replica.....	72
ANEXO D. Prueba Estadística De Análisis De Varianza ANAVA Univariante	73
▪ Factores inter - sujetos	73
▪ Pruebas de los efectos inter - sujetos	73
▪ Pruebas post hoc	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de organismos al que se dirige el Plaguicida.	19
Tabla 2. Clasificación según la toxicidad de los plaguicidas.	20
Tabla 3. Plaguicidas según su principio activo.....	20
Tabla 4. Tipo de Plaguicidas según su persistencia.	21
Tabla 5. Taxonomía de la lombriz roja californiana.....	26
Tabla 6. Edades de la lombriz Eisenia foetida.	28
Tabla 7. Materiales y equipos.	30
Tabla 8. Humedad Relativa (%) Plaguicida 1.	44
Tabla 9. Humedad Relativa (%) Plaguicida 2	44
Tabla 10. Temperatura (°C) Plaguicida 1	45
Tabla 11. Temperatura (°C) Plaguicida 2	45
Tabla 12. Peso Lombrices (g) Plaguicida 1.	46
Tabla 13. Peso Lombrices (g) Plaguicida 2.	46
Tabla 14. pH Plaguicida 1	47
Tabla 15. pH Plaguicida 2	47
Tabla 16. Mortalidad media de individuos del Plaguicida 1	48
Tabla 17. Mortalidad media de individuos del plaguicida 2	48
Tabla 18. Área de mortalidad acumulada de los plaguicidas.....	48

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Regresión Lineal CI_{50} Pre ensayo	41
Gráfica 2. % Humedad Relativa Plaguicida 1.	52
Gráfica 3. % Humedad Relativa Plaguicida 2	52
Gráfica 4. Temperatura Plaguicida 1.	53
Gráfica 5. Temperatura Plaguicida 2	53
Gráfica 6. Peso Lombrices Plaguicida 1.	54
Gráfica 7. Peso Lombrices Plaguicida 2.	54
Gráfica 8. pH Plaguicida 1	55
Gráfica 9. pH Plaguicida 2	56
Gráfica 10. Mortalidad media del Plaguicida 1.....	57
Gráfica 11. Mortalidad media del plaguicida 2	58
Gráfica 12. Diagrama de caja del Área bajo la curva.	59

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1. Formula Estructural del Clorotalonil	22
Imagen 2. Anatomía de la lombriz	28
Imagen 3. Montaje experimental de los fungicidas.	32

LISTA DE FOTOS

Foto 1. Diagrama de flujo del ensayo toxicológico con la lombriz de tierra (<i>Eisenia foetida</i>)	29
Foto 2. Prueba de retención de agua.....	33
Foto 3. Sitio de recolección del sustrato	34
Foto 4. Parámetros fisicoquímicos.....	35
Foto 5. Población de lombrices con clitelo.....	36
Foto 6. Adaptación de lombrices.....	36
Foto 7. Limpieza de lombrices.	37
Foto 8. Aplicación superficial del fungicida.	38

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

SIGLA	TERMINO
EPA	Environmental protection agency
Fao	Food and agriculture organization of the united nations
Pet	Tereftalato de polietileno
ml	Mililitro
Kg	Kilogramos
L	Litro
M.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
Ddt	Dicloro difenil tricloroetano
Atp	Adenosina trifosfato
Iupac	International union of pure and applied chemistry
G	Gramos
°C	Grados Celsius
Ph	Potencial de Hidrogeno
Mpa	Mega pascales
Oecd	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos
Sc	Suspensión concentrada
Bca	Bloques completamente aleatorio
DL₅₀	Dosis letal 50
CI₅₀	Concentración letal 50
ANAVA	Análisis de varianza
ANOVA	Analysis Of Variance

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Protocolo Para La Realización De Bioensayos De Determinación De Concentración Letal 50	66
ANEXO B. Análisis Probit Para Determinación De Concentración Letal 50	67
ANEXO C. Áreas Bajo La Curva Por Replica.....	68
ANEXO D. Prueba Estadística De Análisis De Varianza Anava Univariante	70
□ Factores inter - sujetos	71
□ Pruebas de los efectos inter - sujetos	71
□ Pruebas post hoc	71

RESUMEN

El presente proyecto tuvo como finalidad determinar la concentración letal 50 (CL_{50}) de dos fungicidas con el mismo principio activo (Clorotalonil), usando como bioindicador la Lombriz Roja Californiana. Ambos fungicidas son usados ampliamente en la agricultura en cultivos como: banano, plátano, papa, tomate, café, melón, cebolla, frijol, entre otros. El bioensayo se realizó de acuerdo al protocolo de la EPA (OPPTS 850.6200) en los laboratorios de la Universidad Santo Tomás, sede central, Bogotá. Para los ensayos se utilizó un diseño bifactorial 2x5 (dos fungicidas y cinco concentraciones), más un testigo; cada tratamiento se repitió cuatro veces con 10 individuos tratados por cada unidad experimental para un total de 440 individuos estudiados.

La unidad experimental consistió en un recipiente de PET de dos litros con 540 gramos de suelo proveniente de una finca cafetera ubicada en el municipio Acevedo, Huila, Colombia; dicho recipiente estaba cubierto con tela tipo lino, con el fin de permitir el intercambio gaseoso y mantener una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Previo al ensayo, se determinó la capacidad de retención de agua del suelo utilizado, para obtener un porcentaje de humedad del 70%. Se hicieron ensayos preliminares con concentraciones calculadas a partir de la recomendación de aplicación de los fabricantes. Siguiendo lo mencionado por Repetto (2009) se determinaron las concentraciones del ensayo final: 0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38 ml fungicida / Kg suelo tratado.

Se generó una variable de respuesta calculando el área bajo la curva para los diferentes tratamientos, este dato agrupa la mortalidad acumulada de los individuos en el tiempo. Al aplicar un análisis de varianza bifactorial se encontró una diferencia estadísticamente significativa para: el factor marca de fungicida, el factor concentración y la interacción marca por concentración. Teniendo en cuenta que ambos tienen el mismo ingrediente activo a la misma concentración pudiendo suponer que la diferencia en la mortalidad entre uno y otro, puede deberse a excipientes y coadyuvantes o demás ingredientes secundarios de cada formulación. Esta diferencia se confirma al calcular la CL_{50} a las 4 semanas mediante el modelo Probit, donde se observó un valor de 0.28 para uno de ellos y 0.38 ml/Kg para el otro. Se concluye que existe una mayor toxicidad en una de las formulaciones, ya que a menores concentraciones usadas, genera una mayor mortalidad.

Palabras claves: Bioensayo, Clorotalonil, Concentración letal 50, *Eisenia foetida*, Toxicología

ABSTRACT

This project was aimed to determine the lethal concentration 50 (CL₅₀) of two fungicides with the same active ingredient (Chlorothalonil), using as bioindicator Californian Red Worm. Both fungicides are widely used in the agriculture crops such as bananas, plantains, potatoes, tomatoes, coffee, melon, onions, beans, among others. The bioassay was performed according to EPA protocol (OPPTS 850.6200) in the laboratories of the Saint Tomas University, headquarters in Bogotá. For the tests, a two-factor design 2x5 (two fungicides and five concentrations), plus a control was used; each treatment was repeated four times with 10 individuals treated for each experimental unit for a total of 440 individuals studied.

The experimental unit consisted in a PET container of two-liter with 540 grams of soil from a coffee farm in the municipality Acevedo in Huila Colombia; the mentioned container was covered with linen fabric type, in order to allow gas exchange and maintain a temperature of 22 ± 2 ° C. Prior to testing the water retention capacity of the soil used was determined to obtain a moisture content of 70%. Preliminary tests with concentrations calculated from implementing the recommendation made manufacturers. 0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38 ml fungicide / kg treated soil: Following mentioned by Repetto final assay concentrations were determined.

We created a response variable in order to calculate the area under the curve for the different treatments, this data groups collected the cumulative mortality of individuals in a period time. The mark fungicide factor, the concentration factor and interaction mark concentration: applying an analysis of variance bifactorial a statistically significant difference was found. Understanding that both have the same active ingredient at the same concentration we can assume that the difference in mortality between the two, may be due to excipients and adjuvants or other secondary ingredients of each formulation. This difference is confirmed to calculate the LC50 at 4 weeks by Probit model, where a value of 0.28 for one and 0.38 ml / kg for the other was observed. It is concluded that there is a greater toxicity of the formulations, as used at lower concentrations, it generates higher mortality.

Keywords: Bioassay, chlorothalonil, Lethal Concentration 50, Eisenia foetida, Toxicology.

INTRODUCCIÓN

Los Fungicidas han sido de gran importancia en el desarrollo agrícola, ya que ayudan a controlar plagas tales como: insectos, malas hierbas, hongos entre otros, los cuales destruyen gran parte de los cultivos y compiten por factores limitantes como: espacio, humedad y nutrientes. Sin embargo, después de favorecer mucho a la tierra, se evidenciaron falencias, puesto que contribuían al aumento de problemas de riesgo ambiental y de la salud humana, dado su uso excesivo e inadecuado causando daños irreversibles o difícilmente reversibles [1]. Siendo un caso específico los cultivos de café, siendo este uno de los cultivos con mayor producción y exportación de Colombia.

Teniendo en cuenta la persistencia que los fungicidas pueden llegar a tener en el suelo y que actúan a corto plazo sobre el ambiente cercano donde se aplican; la contaminación del recurso biótico, aguas subterráneas y aire es inmediata, afectando momentáneamente el equilibrio fisiológico de todos los organismos expuestos a ellos, incluidos los seres humanos [1]. El impacto presentado se puede dar de forma directa afectando la población que aplica el plaguicida o indirecta a la población próxima al sitio de aplicación, ya por contaminación sea del alimento, residuos o por simple dispersión del contaminante en el aire, por lo tanto cualquier persona podría llegar a estar expuesta a este tipo de sustancias [2].

Existen diferentes metodologías y estudios para determinar los efectos nocivos de los plaguicidas, uno de ellos es la determinación de concentración letal 50 (CL₅₀). Para ello es importante utilizar indicadores que permitan establecer una respuesta a las hipótesis planteadas, tomando como indicador la muerte de un sustrato biológico en un periodo de tiempo, en este caso el sustrato es la lombriz californiana *Eisenia foetida* (Lombricidae), utilizada como organismo de pruebas de determinación CL₅₀, puesto que presenta una longevidad de aproximadamente 5 años, es muy prolífica y de gran apetito, ingiriendo diariamente una cantidad de materia orgánica equivalente al propio peso de cada individuo (alrededor de 1 g/día en individuos adultos) [2]. Por lo que la hace susceptible a verse afectada por la contaminación de suelo con plaguicidas, en este caso de uso agrícola.

En la presente investigación se comparan dos fungicidas de uso agrícola de diferentes casas comerciales, con el mismo principio activo (Clorotalonil), tomando como guía la metodología EPA (OPPTS 850.6200), el sustrato biológico

seleccionado corresponde la lombriz californiana *Eisenia foetida* (Lombricidae) al exponerlo en un medio contaminado del fungicida seleccionado con el fin de identificar cuál de los dos presenta un mayor efecto toxicológico y determinar la CL₅₀.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

- Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de dos fungicidas con el mismo principio activo, mediante un bioensayo basado en la metodología EPA (OPPTS 850.6200) tomando como bioindicador la lombriz californiana *Eisenia foetida* (Lombricidae).

1.2. Objetivos Específicos

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

2. MARCO TEORICO

2.1. El Cultivo Del Café y los Impactos del Uso de Fungicidas

2.1.1. Generalidades del café en Colombia

Introducido por Jesuitas cerca del siglo XVIII el café fue ganando territorio a lo largo de los años llegando a ventas de hasta 15 millones de sacos de 60 kg, presentando hasta cinco variaciones de la misma especie (Colombia, Castilla, Caturra, Tabí, Típica) [3]. La denominación Colombia se le otorga al ser 100% árabe producido en las regiones cafeteras de Colombia, delimitadas entre la latitud del Norte 1°a11°15, Longitud Oeste 72° a 78° y rangos específicos de altitud que pueden superar los 2000 metros sobre el nivel de mar (m.s.n.m). Colombia se encuentra ubicada muy cerca de la línea ecuatorial, garantizando una alta luminosidad a lo largo del año [4]. En algunas regiones del país se cosecha hasta 50 semanas al año. El área cultivada para el cierre del año 2014 fue de 948.53 miles de hectáreas en un total de 22 departamentos [5], de allí radica la importancia a nivel nacional e internacional, al ser uno de los productos que más se exporta debido a su calidad y textura suave, ocupando el tercer puesto a nivel mundial en exportación. De igual forma representa una buena fuente de ingresos tanto económico, cultural y social para la región y a los campesinos que lo cultivan [6].

2.1.2. Café en el Huila

El café en el Huila ha tomado fuerza a comparación de los demás departamento de Colombia, convirtiéndolo en el departamento que más produce café tipo exportación [3]. Las montañas del departamento cerraron el año 2014 con 155.000 hectáreas cultivadas, superando los 131.000 producidos por la región Antioqueña. Según el Centro Regional de Estudios Económicos de Manizales, del Banco de la República muestra que junto a Santander, el Huila registró un aumento de 0.3% en el cultivo del grano, mientras que el resto de zonas cafeteras tuvieron decrecimientos [7].

2.1.3. Uso de fungicidas en el café

Con la llegada del café al país, también llegaron las diferentes plagas y enfermedades a la planta por lo que surgió la necesidad de usar plaguicidas con el fin de controlar o prevenir la enfermedad del cultivo. Los fungicidas son de rápida acción, pueden mezclarse con otros, son estables durante su almacenamiento y su preparación, fáciles de aplicar y tienen buena adherencia, tenacidad y persistencia [8].

Con el fin de mantener la enfermedad en niveles bajos, la primera aplicación del fungicida debe realizarse cuando la incidencia de la enfermedad sea mínima o se inicie la ocurrencia de condiciones de clima y de cultivo adecuadas para su desarrollo, así mismo, la frecuencia de aplicación depende de la persistencia del producto y del número de aplicaciones [8].

2.2. Plaguicidas

Según el Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la *Food and Agriculture Organization* (FAO) en 2016 define como plaguicida a: “la sustancia o el conjunto de mezclas orgánico o inorgánico encargada y destinada a destruir, controlar o prevenir plagas y vectores de enfermedad humana o animal; dentro de las plagas se encuentran ácaros, roedores y especies indeseables de plantas y animales como hongos que interfieren para el hombre en su producción, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, materias primas o productos agrícolas” [9].

2.2.1. Clasificación

Dentro de los diferentes tipos de clasificación están:

Según el tipo al que se dirige, en la tabla 1 se encuentra la información correspondiente al tipo de plaguicida según su función respecto a organismos como hongos, vectores entre otros.

Tabla 1. Tipo de organismos al que se dirige el Plaguicida.

Tipo	Descripción	Ejemplos
Fungicida	utilizado para hongos	Clorotalonil
Herbicida	utilizado para malezas y plantas no deseadas	Hierbamina
Acaricidas	utilizada para ácaros y pequeños arácnidos	Romectin
Rodenticidas	utilizada para roedores	Ratomet
Insecticidas	Utilizado para el control de insectos.	Talita

Fuente: [10]

De igual forma se plantea por parte de la organización mundial para la salud una clasificación para los plaguicidas según el tipo de toxicidad que estos presentan (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación según la toxicidad de los plaguicidas.

Tipo	Clase	Ejemplos
Extremadamente peligroso	IA	Paratión
Altamente peligroso	IB	Eldrín
Moderadamente peligroso	II	DDT
Ligeramente peligroso	III	Malatión

Fuente: [10]

Por otra parte, los plaguicidas se pueden llegar a categorizar por grupo según los elementos que los componen o siendo también llamados sus principios activos (tabla 3).

Tabla 3. Plaguicidas según su principio activo.

Tipos	Descripción	Ejemplos
Organoclorado	Plaguicidas orgánicos sintéticos originados a partir de diferentes derivados halogenados de hidrocarburos	DDT
Organofosforados	Plaguicidas orgánicos derivados de la estructura química del fósforo.	Malatión
Carbamatos	Compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH ₂ COOH)	Carbaryl
Piretroides	Compuestos naturales que tienen propiedades insecticidas.	Permetrín

Fuente: [10]

Otra forma de categorización de los plaguicidas es según su persistencia en el ambiente (tabla 4), pues estos pueden durar desde unas pocas semanas hasta tener una persistencia de décadas.

Tabla 4. Tipo de Plaguicidas según su persistencia.

Tipo	Descripción	ejemplos
Permanentes	No cesa su persistencia	Productos hechos a base de Hg, Pb, As, etc.
Persistentes	Hasta 20 años	DDT
Moderadamente persistentes	Hasta 18 meses	Paratión
No persistentes	Hasta 12 semanas	Malatión

Fuente: [10]

2.2.2. Fungicidas

Los fungicidas son usados extensamente en la industria, la agricultura, en el hogar y el jardín para un número de propósitos que incluyen: protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, transporte y germinación; eliminación de mohos que atacan las superficies pintadas; control del limo en la pasta del papel [de empapelar]; y para la protección de alfombras y telas en el hogar [11], es por ello que es necesario estudiarlos para identificar las adversidades a la salud que podría ocasionar el mal uso, dado el potencial de los mismos.

Los fungicidas se clasifican según su composición química en:

- **Tiocarbamatos:** formulados como suspensión en polvo o líquida, se usan para proteger las semillas, árboles frutales y plantas ornamentales, su potencialidad es baja por lo que no supone un riesgo sobre la salud humana pues no atacan enzimas colinesterásicas. Dentro de sus más conocidos productos se destacan el Metam-Sodio y Thiram [11].
- **Etilenbisditiocarbamatos (EBDC):** formulados en polvos líquidos absorbentes e irrigables, estos productos pueden causar irritación en piel, el tracto respiratorio y en los ojos, según las pruebas de laboratorio se observaron efectos adversos por vía intravenosa e intramuscular, mientras que por vía dermal y oral es más baja. Sus

productos más destacables son el Mancozeb, Maneb, y Zineb, este último siendo insoluble en agua [11].

- **Bencenos sustituidos:** usados ampliamente para proteger, cultivos, semillas y semilleros así como productos perecederos, sus presentaciones varían según las suspensiones concentradas, puede ser líquidas, e polvo, granuladas. Dentro de los principales productos destacan el Cloroneb el cual maneja una toxicidad baja en mamíferos y es moderadamente irritable en la piel; el Diclorán el cual no representa un peligro pues se elimina rápidamente por orina, aunque pueden generar daños hepáticos con altas concentraciones y el Clorotalonil el cual produce irritación en la piel y las membranas de mucosas de los ojos y el tracto respiratorio [11].

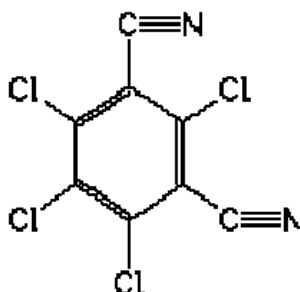
2.2.3. Clorotalonil

Denominado por la IUPAC como *tetrachloroisophthalonitrile* (2, 4, 5,6-tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile), el clorotalonil es un fungicida de contacto el cual se introduce de manera directa sobre el suelo y es absorbido por la planta hasta llegar al tallo y hojas creando una especie de capa protectora que acaba con los hongos e inhibe la proliferación y/o germinación de nuevos hongos. Al ser una molécula estable puede permanecer hasta por 65 días en la planta siempre y cuando no haya lluvias o se moje la planta [12].

2.2.4. Estructura y propiedades del Clorotalonil

Composicion: tetrachloroisophthalonitrile (2, 4, 5,6-tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile). Suspensión concentrada en concentración de 720g/L de Chlorothalonil. Líquido blanco viscoso.

Imagen 1. Fórmula Estructural del Clorotalonil



Fuente: [12].

Tipo de plaguicida: el Clorotalonil es un fungicida de uso agrícola.

Clasificación: aromáticos, benceno derivado [13].

2.2.5. Propiedades físicas y químicas

Es un líquido viscoso blanco en estados de temperatura ambiente de 15 a 25 °C, con olor un poco fuerte. No es inflamable y su punto de ebullición está por encima de los 350°C, de igual manera su punto de fusión se encuentra a los 252.1 °C. Presenta una presión de vapor de 0,076 mPA (25°C) y se solubiliza a los 25°C con agua, xileno, ciclohexanona, acetona y kerosene; para el agua se solubiliza a una concentración de 0,81 mg/L. en cuanto a la hidrólisis se encuentra que se hidroliza lentamente con condiciones de pH superiores a 9 [14].

2.2.6. Mecanismo de acción

El clorotalonil debe estar cerca del hongo, ya sea en la raíz o en el follaje de la planta, se debe utilizar de forma preventiva, es decir, antes de que haya presencia del hongo. Su mecanismo de acción es inhibir inicialmente la respiración de las células del hongo, lo que afecta al ciclo de Krebs impidiendo la producción de adenosintrifostato (ATP) siendo un proceso esencial (obtención de energía) dentro del funcionamiento de la célula, esta muere [15].

2.2.7. Toxicidad

Se considera ligeramente toxico en abejas y peces, y moderadamente toxico en lombrices según su escala de toxicidad, de igual manera se establece en la categoría IV y se clasifica como ligeramente peligroso [12].

2.2.8. Persistencia

El Clorotalonil puede durar hasta 65 días en el ambiente, excepción que se hidrolice, de ser así, su duración disminuye notablemente hasta llegar a 3 días de persistencia [15]. En el aire se degrada lentamente por reacciones con radicales de hidroxilo o por ruptura de los enlaces químicos debido al contacto con energía radiante (fotólisis directa) por lo que puede durar hasta 7 días, mientras que en el suelo su vida media ronda los 40 días máximo en suelos aireados y hasta 15 días en suelos inundados, debido a procesos aerobios y anaerobios que se llevan a cabo en el sustrato. Finalmente en el agua el Clorotalonil puede llegar a tener una vida de hasta 8 días, en aguas marinas y un promedio de 38 días en aguas alcalinas, es decir, con pH superior a un valor de 9 [16].

2.3. Estudios De Toxicidad

Dado el incremento en el daño ambiental del suelo y de organismos que ayudan a su estabilidad por parte de los plaguicidas aproximadamente desde 1950 en la llamada era química, se ven necesarios los estudios que esclarezcan e identifiquen la importancia para las buenas prácticas y uso de insumos que

permitan disminuir el grado de contaminación dado por el potencial toxicológico de los mismos [17].

La lombriz es un organismo utilizado en múltiples estudios. Pruebas tales como mortalidad, evasión o reproducción, son aquellas que permiten evaluar la toxicidad de un producto o suelo contaminado, exponiendo el organismo a los mismos y dando una serie de resultados que permitirán concluir por ejemplo si el suelo al que fue expuesto el organismo es un hábitat funcional o no para su supervivencia [18].

Por ejemplo evaluar los efectos subcrónicos en *E.foetida* del fipronil, con el fin de entender el riesgo potencial asociado a la exposición enantiomera (imagen especular no superponible) del tóxico. Así se podría observar una enantioselectiva toxicidad y bioacumulación de enantiómeros en el bioindicador y una posible transferencia de los productos químicos por organismos depredadores, afectando una red trófica, que finalice afectando el suelo en general [19].

Por otro lado evaluar la toxicidad del cobre y arsénico en suelos agrícolas de áreas mineras muestra que los suelos provenientes de las mismas poseen potenciales características tóxicas para el desarrollo de la macrofauna edáfica dada la disminución de capullos y desarrollo de juveniles, indicando la existencia de toxicidad crónica, todo esto se concluye mediante bioensayos en los que se usan como bioindicador la lombriz roja [20].

Un estudio realizado en la Universidad Nacional del Litoral, sobre uno de los insecticidas piretroides más utilizados en dicho país (Lambda-cialotrina), evaluaron la toxicidad crónica del plaguicida en *E.foetida* sobre los parámetros de comportamiento, sobrevivencia, bioacumulación entre otros, basándose en el método propuesto por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD). Los resultados muestran un comportamiento de huida intenso en el número de organismos a partir de la concentración más baja. Teniendo en cuenta que dichos organismos contribuyen a mantener la estructura y fertilidad del suelo, se obtiene que dicho insecticida afecta significativamente la producción y fertilidad al tener un tiempo de degradación del tóxico en suelo de 86 días, provocando efectos dañinos sobre la fauna no blanco [21].

En Centroamérica, estudiantes de la Universidad de El Salvador realizaron un estudio en el cual determinaron la CL50 utilizando la *E.foetida*, con el fin de evaluar dos plaguicidas sintéticos utilizados en el cultivo de *Cucumis sativus* L. (pepino) a través de la prueba de toxicidad propuesta por la OECD, dando como

resultado que el Thiachlorpridbeta-cyflutrina es mucho más tóxico que el Thiodan, ya que se necesitó una menor cantidad de principio activo para producir un 100% de mortalidad, así mismo se evidenció su peligrosidad potencial sobre el medio ambiente y los cultivos al dañar los organismos que contribuyen a la recuperación del suelo, representando un 80% de la biomasa del mismo y así mismo contribuir a su aireación [22].

Teniendo en cuenta que la mayoría de los plaguicidas que se utilizan hoy en día generan un notable impacto sobre los organismos circundantes y el ambiente, la utilización de productos con bajo o nulo impacto es necesaria para reemplazar y así mitigar los efectos de los productos más tóxicos. Un estudio realizado en la Habana, Cuba, sobre dos productos (NeoNim60 y OleoNim80), propuestos para reemplazar insecticidas, nematicidas, acaricidas entre otros, se evaluó la toxicidad aguda en lombriz *E.Andrei* durante 14 días en donde se obtuvieron el 100% de sobrevivientes y concluyendo que los derivados de los productos utilizados para dicho estudio no producen un efecto tóxico sobre los organismos [23].

A nivel nacional también se realizan una gran cantidad de bioensayos con el fin de evaluar la toxicidad de los plaguicidas, uno de ellos fue realizado en el municipio de Popayán por Benítez, Vivas y Rosero en el año 2009 quienes usaron como bioindicador el *Bacillus subtilis* y en el cual Elaboración propia emplearon la técnica de difusión en disco, en diez plaguicidas utilizados allí, los resultados mostraron que hay gran diferencia en la toxicidad de los mismos ya que se estableció por medio del análisis de varianza que no había correlación entre los plaguicidas y las concentraciones utilizadas, resultando en la clasificación tóxica de los mismos desde la nulidad hasta los altamente tóxicos [2].

Así mismo en Bogotá, un estudio realizado por Benitez & Lesmes, 2014 de la Universidad Santo Tomas evaluaron tres plaguicidas de uso doméstico con el mismo principio activo (tetrametrina), exponiendo a la lombriz californiana como bioindicador, allí las autoras compararon la toxicidad de los tres insecticidas obteniendo diferencias significativas en la toxicidad de los mismos, concluyendo que los excipientes y coadyuvantes podrían influir en la toxicidad de los plaguicidas [24].

2.4. Plaguicidas De Estudio

El plaguicida uno es uno de los fungicidas que más se utiliza para la reducción de enfermedades en el café, es una suspensión concentrada y ataca muchos de los problemas del cultivo, tales como la mancha de hierro, mancha de ojo de gallo, mal hilachas, La dosis de aplicación para estos es de 200 a 250ml/100L de agua,

para la antracnosis la dosis recomendada es de 300ml/100L de agua, finalmente para la roya es de 720ml+750g de cobre en 100 L de agua. Es recomendado usar de 400 a 800 litros de agua por cada mil plantas o por hectárea. Para este producto las épocas de aplicación recomendadas son antes del inicio de lluvias y repetir a intervalos de 20 a 30 días [12].

El plaguicida dos es una opción de compra alterna al plaguicida uno, utilizado de igual manera para la prevención de enfermedades producidas por hongos en diferentes cultivos como el café, la presentación estudiada es la 720 SC, lo que indica que por cada litro de producto, contiene 720 ml de ingrediente activo (Clorotalonil). Su clasificación toxicológica es moderadamente peligroso (categoría II) y se recomienda usar un volumen de 200-250 litros de mezcla por cada hectárea de cultivo, se realiza la aplicación directamente sobre el suelo por aspersión; se utiliza normalmente bombas de espalda y en casos de aspersiones a mayor escala, utilizan avionetas [25].

2.5. *Eisenia foetida* Como Sustrato Biológico.

2.5.1. Generalidades

La lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) se encuentra dentro del grupo de los anélidos terrestres, los oligoquetos tienen en la lombriz su representante más destacado. Es un organismo biológicamente simple, el agua es el principal constituyente en un 80 y 90% de su peso total, tiene diferentes colores por la presencia de pigmentos como la protoporfirina [26].

Según Alcívar Orley la taxonomía de la lombriz roja californiana es como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5. Taxonomía de la lombriz roja californiana

REINO	Animal
SUB-REINO	Metazoos
PHYLUM	Protostomados
GRUPO	Anélidos
ORDEN	Oligoquetos
FAMILIA	<i>Lombrícidae</i>
GÉNERO	<i>Lombricus, Eisenia</i>

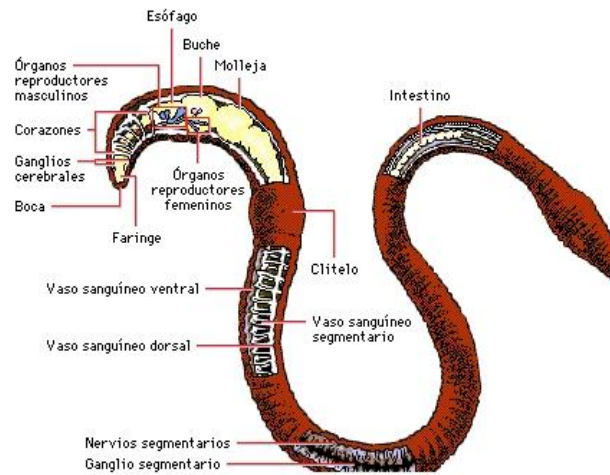
ESPECIES	<i>Lombricus terrestres</i> (lombriz de tierra común) <i>Eisenia foetida</i> (lombriz californiana) <i>Eudrillus eugnie</i> (lombriz africana)
-----------------	--

Fuente: [27]

La *Eisenia foetida* tiene un color rojizo intenso, es por ello que se le conoce como Roja Californiana, pero no siempre su color es determinado por el pigmento de la piel, sino también por la hemolinfa o el contenido del intestino. Puede llegar a medir en su estado adulto de 3 a 10 cm y de 3 a 5 mm de diámetro y pesar 1 gramo aproximadamente. Su cuerpo tiene forma cilíndrica, pero puede presentar variaciones en secciones cuadrangulares, o en la parte superior presentar achatamiento [28]. La lombriz presenta metámeros, conocidos también como segmentos, los cuales son los anillos que rodean el cuerpo de la misma. Su principal característica para identificar una lombriz en estado de adultez es la presencia de clitelo, el cual es un espesamiento glandular superficial en algunos segmentos, su principal función es secretar la sustancia que forma los capullos, donde se alojan los huevos. Finalmente una característica importante de la lombriz, es que no soportan la luz solar, es decir son fotófobas, y al estar expuestas a los rayos solares pueden llegar a morir en pocos minutos [25].

La lombriz presenta una gran variedad de características internas que se pueden observar en la ilustración 1, se pueden ver después de realizar la disección de la misma con la ayuda de instrumentos ópticos adecuados; principalmente se observa que la lombriz cuenta con cinco pares de corazones, seis pares de riñones y 182 conductos excretores en cada metámero [29].

Imagen 2. Anatomía de la lombriz



Fuente: [29].

2.5.2. Ciclo de vida

La lombriz roja californiana vive entre uno y cuatro años en cautiverio, se reproduce una vez por semana mediante fecundación cruzada, ya que al ser hermafrodita, es decir que contiene ambos sexos, necesita de otro ejemplar para fecundarse, de cada acoplamiento resultan dos capullos que contienen de dos a cuatro lombrices cada uno. Las lombrices se reproducen durante todo el año, pero se observa un incremento en la tasa durante los meses estivales, es decir cuando la temperatura se encuentra entre 15 y 25°C, las lombrices al interior del capullo se nutren de las secreciones albuminoideas que contienen hasta su nacimiento. A continuación en la tabla 6 se observa los cuatro tipos de edades por los que atraviesa la lombriz antes de convertirse en adulta y con características reproductivas [28].

Tabla 6. Edades de la lombriz *Eisenia foetida*.

Cocones (puesta/capullo)	Juveniles	Subadultos	Adultos
-----------------------------	-----------	------------	---------

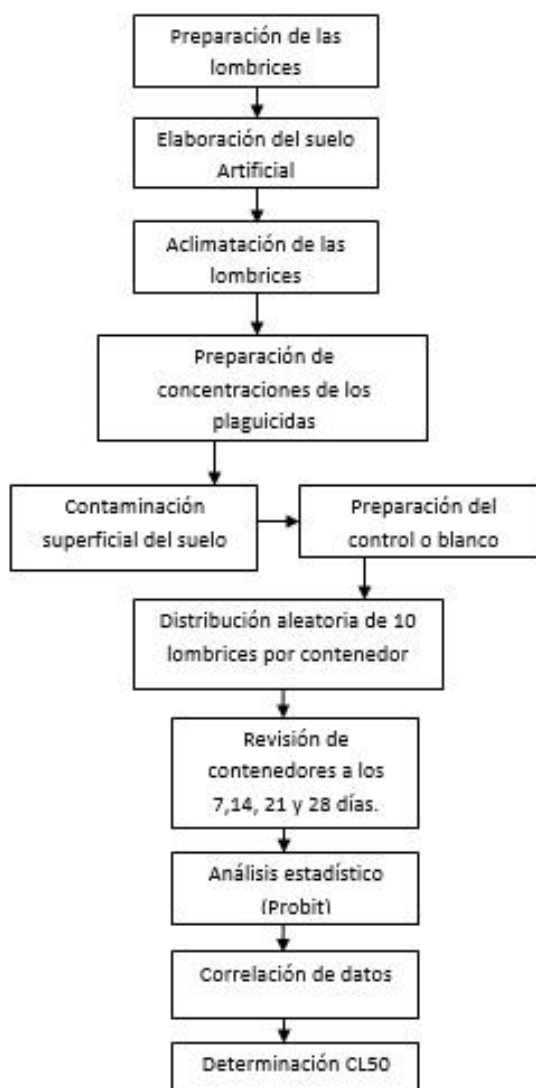
			
Eclosiona luego de 15 días y de él se pueden obtener de 2 a 4 pequeñas lombrices.	Lombrices transparentes, o con pigmento rojo insuficiente para evitar que el tubo digestivo se observe al trasluz.	Carentes de clitelo.	Poseen clitelo, lo que indica que es sexualmente madura.

Fuente: [28]

3. METODOLOGÍA

Se realizó un bioensayo de toxicidad basado en el método de la EPA OPPTS 850.6200 [30], utilizando lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) en un estado de adulto (4-6 meses) para examinar suelos contaminados con dos fungicidas diferentes con un mismo principio activo (Clorotalonil). Las lombrices estarán expuestas a diferentes concentraciones por un tiempo estimado de 28 días con revisiones cada 7 días, teniendo un cultivo control con el que se podrá comparar presencia de efectos tóxicos letales o no como se muestra en la foto 1.

Foto 1. Diagrama de flujo del ensayo toxicológico con la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)



Fuente: [24].

3.1. Materiales Y Equipos De Laboratorio

Para llevar a cabo el bioensayo se contó con una serie de materiales y equipos, no solamente para medir las variables, sino también herramientas de trabajo con los que se desarrolló el experimento (tabla 7).

Tabla 7. Materiales y equipos.

Criterios	Características
Contenedor de prueba. Frascos de plástico tipo PET.	Contenedor plástico con capacidad para 500 gramos de sustrato.

Termómetro	Con un rango de medición de -10°C a 100°C
Higrómetro	Específico para medición en suelos.
pH metro	Específico para medición en suelos.
Balanza analítica	Con al menos 3 décimas de precisión.
Tela (Lino)	Permite el intercambio gaseoso con el bioensayo
Soporte universal	Con brazo.
Beaker	Capacidad de 300 ml.
Caja de Petri	Con capacidad para 10 unidades de lombriz.
Jeringas	Con capacidad de 1 ml.
Rótulos	
Papel filtro	Lo suficientemente grande para añadirlos a las cajas de Petri.
Agua destilada	
Atomizador	Capacidad de 330 ml
Ligas de caucho	
Guantes	Protección ante cualquier evento generado por los plaguicidas.
Tapabocas	De tipo industrial.
Bata de laboratorio	Blanca.
Contenedor	Puede ser cartón o cualquier material que impida el contacto de luz directa con los cultivos.

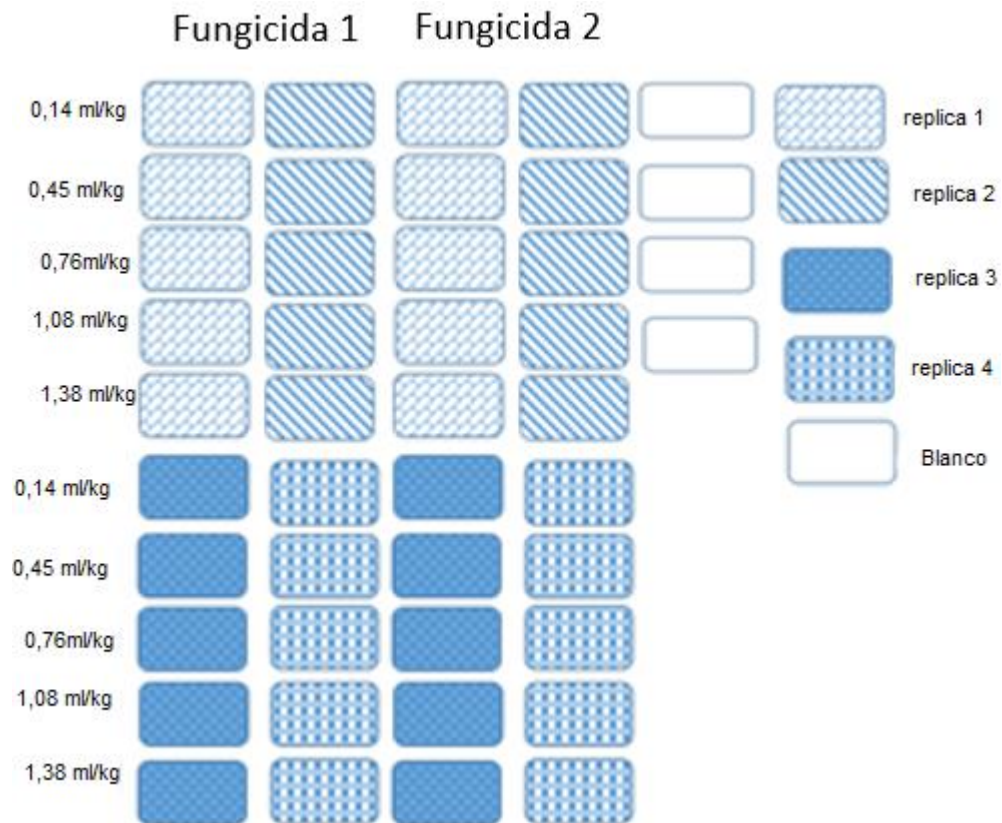
Fuente: Elaboración propia.

3.2. Diseño Experimental

Con la finalidad de evaluar la toxicidad de dos fungicidas de uso agrícola bajo el mismo principio activo (Clorotalonil) calculando la concentración letal 50, se contó con un total de 44 unidades experimentales divididas como se muestra en la imagen 3, la cual cuenta con cuatro controles, cinco concentraciones por fungicida y finalmente 4 réplicas que permitió obtener resultados confiables y que permitan una buena correlación de los datos.

Las unidades experimentales fueron conformadas por 540g de suelo dentro de un recipiente Pet y 10 organismos en cada uno, escogidos al azar y que cuentan con su respectivo clíelo, además cada unidad se encuentra cubierta con tela (lino negro) con la finalidad de mantener un intercambio gaseoso, evitar el contacto directo de la luz solar y mantener la temperatura en el rango aceptable. Así mismo fue añadida una concentración diferente en cada unidad experimental (0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38) ml/Kg con el fin de determinar la concentración letal media y así comparar la toxicidad de los fungicidas.

Imagen 3. Montaje experimental de los fungicidas.



Fuente: Elaboración propia.

En el transcurso de la investigación fueron controladas y medidas las siguientes variables para el óptimo desarrollo del bioensayo:

- Variable independiente: concentraciones de los fungicidas utilizados con el fin de establecer el efecto sobre la lombriz roja californiana.
- Variable dependiente: concentración letal media de los fungicidas utilizados durante el bioensayo en un tiempo de exposición de 28 días, puesto que dicho resultado depende de los efectos del fungicida sobre los organismos de prueba.
- Constantes: número de organismos utilizados (10 lombrices (*Eisenia foetida*) por unidad experimental), tiempo de duración del bioensayo (28 días), parámetros fisicoquímicos requeridos durante el bioensayo (pH, temperatura y humedad relativa).

3.3. Prueba de Retención De Agua

Para el desarrollo del pre ensayo y bioensayo fue indispensable realizar la prueba de retención o saturación de agua puesto que permitió conocer la cantidad de agua que satura el suelo y así mismo lograr calcular el porcentaje necesario para estar en el rango de humedad establecido por la EPA. Para ello se pesó 100 g de suelo y se colocaron en un recipiente de poliestireno que permitió medir el nivel de saturación del agua, el cual estuvo sujeto a un soporte universal, posteriormente se adiciono agua al recipiente, midiendo el volumen gastado cuando cae la primera gota (Foto 2). Teniendo el volumen que satura el 100% del suelo, se realizó una regla de tres que permita calcular el volumen necesario para humedecer el suelo en un 70%, este procedimiento se realizó dos veces, una para el pre ensayo y otra para el ensayo final.

Foto 2.*Prueba de retención de agua.*



Fuente: Elaboración propia.

3.4. Pre Ensayo

Antes de comenzar el montaje experimental principal, fue necesario realizar un pre ensayo que nos permitiera establecer una concentración letal media de referencia. Para ello se simulo el montaje experimental original, en donde se expusieron un total de seis unidades (cinco concentraciones y un blanco) a uno de los fungicidas, utilizando como sustrato biológico la lombriz roja californiana. El suelo utilizado fue el mismo en el que venían las lombrices por lo que no fue necesaria la adaptación de las mismas, pero si se realizó el vacío de los estómagos durante 24 horas.

3.4.1. Cálculo de concentración letal

Con la finalidad de obtener un mejor resultado, se realizó el cálculo de una concentración previa (6,25 ml/L), utilizando la cantidad propuesta por el fabricante para el cultivo del café, posteriormente se multiplicó dicho resultado por 2 y por 3 y

así mismo se dividió por las mismas cantidades, con el fin de obtener cinco concentraciones. Esta prueba tuvo una duración de 28 días en el que se evaluó principalmente la mortalidad. Concluidos los 28 días se realizó una regresión lineal con los resultados de mortalidad, proporcionando de esta forma la concentración letal media a tomar como referencia en el ensayo final. Cabe resaltar que en este punto se trabajó en concentraciones de ml de fungicida/ Litro de agua.

3.5. Bioensayo

En el ensayo principal se evaluaron los fungicidas que tienen como ingrediente activo el Clorotalonil. Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorio (BCA) en donde los tratamientos a aplicar se determinaron en el pre ensayo recién descrito. Se montó un experimento bifactorial 2x5: tipo de fungicida y concentración del fungicida (0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38) ml/kg. Se tiene un total de diez tratamientos, cinco por cada fungicida más un tratamiento en el que se aplica agua en el mismo volumen que el resto pero sin plaguicida (blanco). A su vez se contó con un número total de cuatro repeticiones por tratamiento con el fin de obtener una mejor correlación de los datos.

3.5.1. Recolección de suelo

El suelo utilizado en el bioensayo fue recolectado de una finca cafetera ubicada en el municipio de Acevedo, departamento del Huila, en la vereda el paraíso, fue tamizado con el fin de remover impurezas del mismo. De igual forma fue indispensable que el lugar de la recolección de suelo estuviera libre de plaguicida con el fin de contar con una suelo limpio y que no influya en las pruebas experimentales (ver foto 3).

Foto 3. Sitio de recolección del sustrato



Fuente: Elaboración propia.

3.5.2. Condiciones de prueba:

El bioensayo fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomas, sede central, en la cual para el óptimo desarrollo de la prueba se mantuvo dentro de los contenedores una temperatura de 22 ± 2 °C. Dentro del diseño de la unidad experimental que contenía las 10 lombrices de tierra, se aseguró el intercambio gaseoso con el ambiente y a la vez se protegió de la luz directa del sol utilizando tela (lino) de color negro para cubrir la unidad. Así mismo se controló el pH con el fin de mantener un rango entre 6.5 ± 0.5 , en nuestro caso el pH siempre estuvo en el margen estipulado por lo cual no fue necesario utilizar carbonato de calcio para estabilizarlo. Finalmente se verificó semanalmente que el porcentaje de humedad relativa de la unidad (70%) no tuviera pérdidas mayores del 10%, por tanto por diferencia de biomasa del contenedor se reponían las pérdidas agregando la cantidad de agua necesaria (ver foto 4).

Foto 4. Parámetros fisicoquímicos



Fuente: Elaboración propia.

3.5.3. Organismos de prueba

Para la prueba experimental se utilizó como organismo de prueba *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana), de mínimo dos meses de edad y no mayores de un año, con clitelo y cuya población no difería en edad, tamaño y masa (ver foto 5).

Foto 5. Población de lombrices con clitelo.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.4. Aclimatación de organismos

Las lombrices fueron acondicionadas 15 días antes de la prueba de toxicidad dentro de las unidades experimentales, adicionando como alimento cascara de fruta y mezclándolo con 500g de suelo a utilizar durante el bioensayo, cada unidad contenía 10 lombrices junto a 75g de alimento (0.5g lombriz/día), todo esto con el fin de asimilar las características a las cuales vivían anteriormente y así adaptarlas al espacio de la unidad experimental y al nuevo suelo (ver foto 6).

Foto 6. Adaptación de lombrices.



Fuente: Elaboración propia.

Una vez concluidos los 15 días de adaptación, las lombrices fueron retiradas de las unidades experimentales con el fin de vaciar sus estómagos en cajas de Petri sobre papel filtro con el fin de eliminar sesgos en la mortalidad de los individuos, como residuos tóxicos en sus organismos provenientes de su lugar de origen, de igual manera para que los tratamientos entren en sus tractos digestivos, lo anterior se realizó siendo lavadas con agua destilada. Se dejaron durante un periodo de 24 horas (ver foto 7) y una vez concluido el procedimiento se daba inicio a la prueba de toxicidad, pesando en grupos de a 10 las lombrices e introduciéndolas en las unidades experimentales.

Foto 7. Limpieza de lombrices.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.5. Cálculo de la concentración

Con la finalidad de calcular las cinco concentraciones a utilizar durante el bioensayo, fue necesario realizar un pre ensayo para obtener datos de una posible CL_{50} como se mencionó anteriormente, y así según lo mencionado por Repetto (2009) obtener el volumen mínimo y máximo a utilizar para finalmente contar con las cinco concentraciones. Se realizaron varias conversiones que permitieran conocer la cantidad de producto específico a utilizar, y así mismo conocer su concentración al mezclarse con el sustrato de suelo obteniendo las cinco concentraciones deseadas (0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38) ml/kg [31].

3.5.6. Aplicación del fungicida

Una vez calculadas las cinco concentraciones a utilizar, con una pipeta de 1ml se agregó la cantidad de producto (fungicida) en la cantidad de agua necesaria para saturar el suelo al 70% y fueron mezclados para posteriormente aplicar de modo artificial sobre cada una de las unidades experimentales, mediante un atomizador (ver foto 8) exceptuando los controles, los cuales estarán libres de contaminantes en su totalidad. Finalmente cuando se tuvieron los medios preparados, se ingresaron en grupos de a 10 los organismos dentro de las unidades. Es

indispensable el uso de los instrumentos adecuados para la manipulación de este tipo de plaguicidas, como lo son guantes, bata, tapa bocas industrial y gafas.

Foto 8. Aplicación superficial del fungicida.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.7. Periodo de exposición

Concluido el montaje de las unidades experimentales, la prueba tiene una duración de 28 días en total, de los cuales se hicieron revisiones cada 7 días, en búsqueda de cocones, lombrices nacidas y muertes dentro de cada unidad.

3.5.8. Parámetros fisicoquímicos

Con la finalidad de cumplir con lo establecido por el método de la EPA, se controlaron los siguientes parámetros:

- pH: se revisó semanalmente y se controló para que estuviera en el rango de 6.5 ± 0.5 .
- Temperatura: se revisó semanalmente y se controló para que estuviera en el rango de 22 ± 2 .
- Humedad relativa: se revisó semanalmente y se controló para que estuviera en el rango de 60-80%
- Masa de la unidad: se revisó semanalmente para controlar la humedad relativa dentro de la unidad experimental, compensando el peso perdido con agua.

- **Peso de lombrices:** se revisó semanalmente pesando inicialmente el grupo de 10 y posteriormente las lombrices que iban quedando por semana dada la mortalidad.

3.5.9. Determinación de concentración letal 50

Una vez concluidas las cuatro semanas de prueba, se procedió a ingresar los datos de mortalidad al programa ProStat-Statistical Analysis and Data Presentation, por medio del método Probit, con la finalidad de determinar la concentración letal media de ambos fungicidas en estudio.

De igual forma se obtuvieron los resultados de las muertes de los dos plaguicidas con sus cinco concentraciones y los controles, de allí se realizaron un promedio de las réplicas por concentración de cada uno de los plaguicidas para graficar y determinar el área bajo la curva.

Adicional a esto por medio del software OriginPRo, se ingresaron los datos de las muertes medias obtenidas por las diferentes réplicas y el número de semanas de prueba y así realizar un análisis matemático integrando los datos, obteniendo el área bajo la curva de las medias por cada concentración estudiada.

3.5.10. Prueba estadística de análisis de varianza ANAVA

Luego de obtener las áreas bajo la curva, se procedió a ingresar los datos en el software “Statistical Product and Service Solutions” (SPSS) para realizar un análisis de varianza ANAVA univariante, pues este analiza no solamente las variables fijas, sino, también las aleatorias obteniendo similitudes o diferencias estadísticos entre datos y entre factores. Para las comparaciones se utilizaron los métodos de TUKEY y HMS con un nivel de confianza del 95% (anexo D)

4. RESULTADOS

4.1. Pre Ensayo

4.1.1. Prueba de retención de agua

Se realizó la prueba siguiendo las pautas mencionadas anteriormente obteniendo como resultado que para humedecer el sustrato de 500g al 70% se necesitan 120 ml como se observa a continuación

$$34ml \text{----} > 100\%$$

$$X \text{----} > 70\%$$

$$X = \frac{34ml * 70\%}{100g} = 24ml$$

$$100g \text{----} > 24ml$$

$$500g \text{----} > x$$

$$X = \frac{500g * 24ml}{100g} = 120ml$$

4.1.2. Cálculo concentración pre ensayo

Las concentraciones a utilizar fueron (4.81, 7.28, 14.37, 28.34, 41.92 ml/L). Tomando como referencia la dosis recomendada por el fabricante del producto.

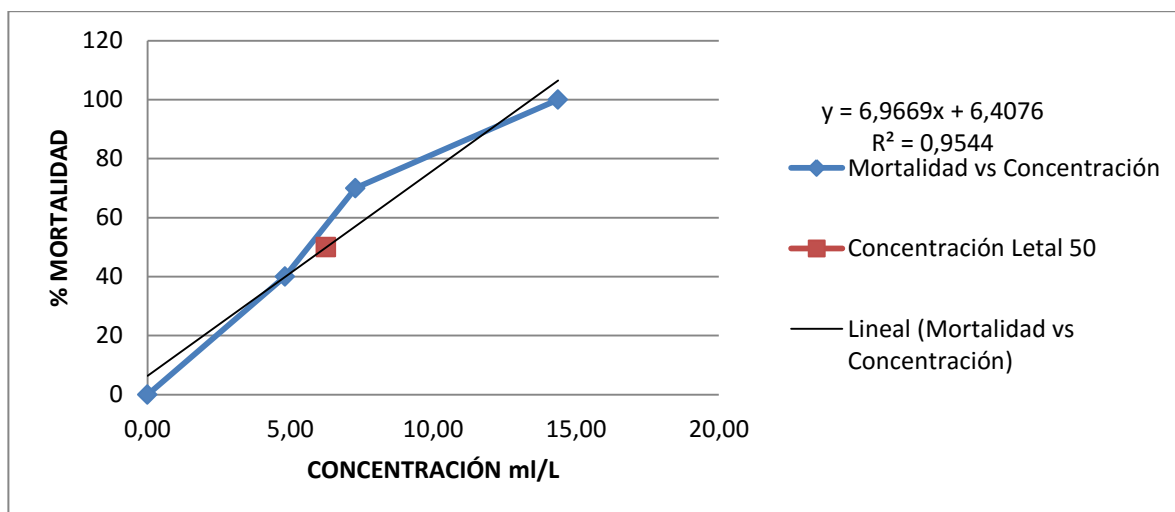
Por medio de la ecuación de la recta observada en la gráfica 1. Se realiza el cálculo de la concentración que se describirá a continuación:

$$\frac{50 - 6.4076}{6.9669} = Cl_{50}$$

$$Cl_{50} = 6.25ml/L$$

Es decir que la concentración de referencia a utilizar en el ensayo final fue de 6.25 ml/L.

Gráfica 1. Regresión Lineal CI_{50} Pre ensayo



Fuente: Elaboración propia.

4.2. Bioensayo

4.2.1. Prueba de retención de agua

Teniendo en cuenta que para la prueba se utilizaron 100g de sustrato y su resultado fue de 20 ml, el cual es la saturación del 100% del suelo, fue necesario realizar una regla de tres en la que se estableciera el valor del 70% y además para los 540 g de sustrato que se utilizaron en el bioensayo como se muestra a continuación:

$$\begin{array}{l} 20\text{ml} \text{---} > 100\% \\ X \text{---} > 70\% \end{array}$$

$$X = \frac{20\text{ml} * 70\%}{100\text{g}} = 14\text{ml}$$

$$\begin{array}{l} 100\text{g} \text{---} > 14\text{ml} \\ 540\text{g} \text{---} > x \end{array}$$

$$X = \frac{540\text{g} * 14\text{ml}}{100\text{g}} = 75\text{ml}$$

Por tanto, se obtuvo que la cantidad de agua a utilizar para la mezcla con el fungicida, y que alcanzará una saturación al suelo del 70% fue de 75 ml aproximado.

4.2.2. Cálculo de la concentración

Según lo calculado en el pre ensayo la CL_{50} es de 6.257 ml/L, la cual fue establecida para un suelo cuya humedad relativa del 70% se debía al agregar 120 ml de agua, por tanto fue ajustado para la prueba de toxicidad final, en la que se necesitan 75 ml de agua como se mostró con anterioridad en la prueba de retención de agua.

$$\frac{6.257ml/L * 120ml}{1000ml} = 0.7508ml/L$$

$$\frac{0.7508ml/L * 1000ml}{75ml} = 10.011ml/L$$

Entonces se obtuvo que la CL_{50} de referencia para la prueba de toxicidad final sea de 10.011 ml/L, posteriormente, según Repetto para determinar la concentración mínima se debe dividir lo obtenido anteriormente en 10 [31].

$$\frac{10.011ml/L}{10} = 1.0011ml/L$$

Posteriormente a la concentración máxima se le resta la mínima hallada anteriormente, y se procede a dividir en 4, con la finalidad de hallar las cinco concentraciones a utilizar en la prueba de toxicidad final.

$$\frac{10.011ml/L - 1.0011ml/L}{4} = 2.2525ml/L$$

Para calcular las cinco concentraciones se suma el resultado de la diferencia de las concentraciones mínima y máxima (2.2525ml/L), al valor de la concentración mínima (1.0011ml/L) y así sucesivamente hasta llegar a la concentración máxima como se observa a continuación:

- $[]_1 = 1.0011ml/L$
- $[]_2 = 1.0011ml/L + 2.2525 \frac{ml}{L} = 3.2536 ml/L$
- $[]_3 = 3.2536 \frac{ml}{L} + 2.2525 \frac{ml}{L} = 5.5062 ml/L$
- $[]_4 = 5.5062 \frac{ml}{L} + 2.2525 \frac{ml}{L} = 7.7587 ml/L$
- $[]_5 = 7.7587 \frac{ml}{L} + 2.2525 \frac{ml}{L} = 10.011 ml/L$

Posteriormente dado que la presentación de los fungicidas a utilizar están dados en suspensión concentrada, es decir se encuentran en estado líquido, 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:

- $[]_1 = 1.0011 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1.0011 \text{ ml/L} * 75 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.075 \text{ ml}$
- $[]_2 = 3.2536$
 - $\frac{3.2536 \text{ ml/L} * 75 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.244 \text{ ml}$
- $[]_3 = 5.5062 \text{ ml/L}$
 - $\frac{5.5062 \text{ ml/L} * 75 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.413 \text{ ml}$
- $[]_4 = 7.7587 \text{ ml/L}$
 - $\frac{7.7587 \text{ ml/L} * 75 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.582 \text{ ml}$
- $[]_5 = 10.011 \text{ ml/L}$
 - $\frac{10.011 \text{ ml/L} * 75 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.75 \text{ ml}$

Una vez concluido los pasos anteriores, se procede a convertir las concentraciones de ml/L a ml de fungicida/kg de sustrato como se muestra a continuación:

- $[]_1 = 1.0011 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1000 * 0.075 \text{ ml}}{540 \text{ Kg}} = 0.14 \text{ ml/Kg}$
- $[]_2 = 3.2536 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1000 * 0.244 \text{ ml}}{540 \text{ Kg}} = 0.45 \text{ ml/Kg}$
- $[]_3 = 5.5062 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1000 * 0.41 \text{ ml}}{540 \text{ Kg}} = 0.76 \text{ ml/Kg}$
- $[]_4 = 7.7587 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1000 * 0.58 \text{ ml}}{540 \text{ Kg}} = 1.077 \text{ ml/Kg}$
- $[]_5 = 10.011 \text{ ml/L}$
 - $\frac{1000 * 0.75 \text{ ml}}{540 \text{ Kg}} = 1.38 \text{ ml/Kg}$

Finalmente, con los cálculos realizados anteriormente, se obtienen las cinco concentraciones que se utilizaron para el desarrollo de la prueba de toxicidad y además se conoció la cantidad de producto específico de cada concentración

utilizada para la mezcla con 75ml de agua y así lograr una humedad relativa del 70%.

4.2.3. Parámetros fisicoquímicos

Con los datos promedio de cada réplica por concentración incluyendo el control, se graficaron los parámetros fisicoquímicos controlados en el transcurso de las cuatro semanas de cada uno de los plaguicidas como se observa a continuación:

▪ Humedad relativa

El agua es esencial para todos los seres vivos, ya que participa en varias reacciones metabólicas celulares, actúa como solvente y portador de nutrientes, a su vez permite que la materia orgánica sea fácilmente biodegradable, facilitando en este caso el proceso biológico de los organismos de prueba, es por eso que fue necesario establecer la cantidad de agua necesaria para mezclar el producto y agregarlo al sustrato suelo, en las tablas 8 y 9 se observa los valores promediados de la humedad relativa a través de las cuatro semanas de ensayo.

Tabla 8. Humedad Relativa (%) Plaguicida 1.

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0.14 ml/kg	70	64.68	64.45	66.13	64.65
0.45ml/kg	70	64.35	64.85	64.90	64.775
0.76 ml/kg	70	64.03	65.1	64.38	61.625
1.08 ml/kg	70	63.53	64.85	62.13	60.9
1.38 ml/kg	70	66.23	64.55	64.33	60.225
Control	70	69.3	68.25	68.71	67.82

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Humedad Relativa (%) Plaguicida 2

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0.14 ml/kg	70	66.1	66.7	64.975	66.625
0.45ml/kg	70	63.575	65.15	64.15	62.425
0.76 ml/kg	70	64.375	65.6	67.225	65.625
1.08 ml/kg	70	66.025	63.575	65.15	65.225
1.38 ml/kg	70	63.8	63.475	66.55	65.325

Control	70	69.3	68.25	68.71	67.82
---------	----	------	-------	-------	-------

Fuente: Elaboración propia.

▪ **Temperatura**

La temperatura en el sustrato es primordial ya que influye sobre las reacciones químicas y procesos biológicos dentro del mismo permitiendo el desarrollo y crecimiento de los organismos [32], por tanto fue fundamental mantener el rango de temperatura entre $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pues es lo exigido para este tipo de pruebas toxicológicas. En las tablas 10 y 11 se observan los valores promediados por semana que se obtuvieron a lo largo del bioensayo.

Tabla 10. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) Plaguicida 1

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	22,625	23,2	22,45	23,25	23,125
0,45ml/kg	23,2	22,45	23,25	23,125	22,625
0,76 ml/kg	23	22,625	23	23,15	23
1,08 ml/kg	22,5	23	22,575	22,75	23
1,38 ml/kg	22,75	22,65	22,675	23,25	22,9
Control	22,325	22,25	22,25	22,175	22,125

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) Plaguicida 2

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	22,5	22,525	23,25	22,75	22,7
0,45ml/kg	23,25	22,575	22,375	22,75	22,625
0,76 ml/kg	22,2	22,75	23	22,575	23
1,08 ml/kg	23,25	23,375	23,15	22,5	23,25
1,38 ml/kg	22,625	22,875	23	22,5	22,9
Control	22,325	22,25	22,25	22,175	22,125

Fuente: Elaboración propia.

- **Peso de lombrices**

En las tablas 12 y 13 se muestran los valores en gramos del peso de las lombrices promediado al transcurrir las cuatro semanas. El peso de la lombriz se evaluó con el fin de determinar si la toxicidad de los plaguicidas influía en la variación del peso de los organismos prueba, ya que existen varios aspectos que pueden influir en el cambio del peso de las lombrices como: el área donde habitan, el estrés que implica un gasto energético, alimentación y/o cambios en la temperatura, humedad y pH [24].

Tabla 12. Peso Lombrices (g) Plaguicida 1.

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	4,2	3,98	3,475	3,1	3,025
0,45ml/kg	3,875	3,45	3,125	2,45	2,175
0,76 ml/kg	4,05	3,25	2,25	1,18	0
1,08 ml/kg	3,9	2,93	1,425	0	0
1,38 ml/kg	3,625	0,8	0	0	0,0
Control	3,95	3,85	3,825	3,85	3,775

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13. Peso Lombrices (g) Plaguicida 2.

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	3,95	3,825	3,75	3,325	3,125
0,45ml/kg	4,3	4,125	3,55	3,025	2,625
0,76 ml/kg	3,325	1,975	1,375	0,875	0
1,08 ml/kg	2,725	1,5	0,45	0	0
1,38 ml/kg	3,55	2,475	1,575	0,425	0,0
Control	3,95	3,85	3,825	3,85	3,775

Fuente: Elaboración propia.

- **pH**

El pH es un factor fundamental para el crecimiento, supervivencia o desarrollo de todo ser vivo incluyendo organismos dentro del suelo [33], por tanto fue un factor importante a medir dentro del presente estudio y por lo que debía mantener un rango neutro, entre 6.5 y 7. En las tablas 14 y 15 se puede apreciar el comportamiento del potencial de hidrogeno en el transcurrir de la prueba de toxicidad.

Tabla 14. pH Plaguicida 1

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	6,58	6,6125	6,6175	6,5825	6,575
0,45ml/kg	6,635	6,6275	6,5875	6,5825	6,573
0,76 ml/kg	6,6875	6,6525	6,6425	6,6325	6,625
1,08 ml/kg	6,75	6,7175	6,7	6,6625	6,6525
1,38 ml/kg	6,7825	6,7275	6,695	6,6675	6,7
Control	6,5725	6,6025	6,64	6,6725	6,6925

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15. pH Plaguicida 2

	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0,14 ml/kg	6,5775	6,58	6,595	6,6025	6,61
0,45ml/kg	6,6275	6,6475	6,6325	6,6325	6,613
0,76 ml/kg	6,6825	6,6675	6,6525	6,6475	6,675
1,08 ml/kg	6,7425	6,7	6,685	6,6525	6,6525
1,38 ml/kg	6,7825	6,76	6,7425	6,7375	6,7
Control	6,5725	6,6025	6,64	6,6725	6,6925

Fuente: Elaboración propia.

4.2.4. Determinación de la Concentración Letal 50

Mediante el programa ProStat se obtuvieron las concentraciones letales medias para el plaguicida 1 y 2, 0.28 y 0.37 respectivamente teniendo como variables la concentración, mortalidad, total de organismos y grupo control como se observa en el ANEXO B.

Posterior a la determinación de concentración letal 50 se realizó una media de las muertes de las cuatro replicas por cada una de las concentraciones y el control

como se puede ver en las tablas 16 y 17 para cada uno de los plaguicidas respectivamente.

Tabla 16. Mortalidad media de individuos del Plaguicida 1

Plaguicida 1					
Concentración (ml/Kg)	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,14	0	0,75	1,25	1,5	2
0,45	0	1,75	3	4,25	6
0,76	0	2,5	5,75	8,25	10
1,08	0	3,25	7,75	10	10
1,38	0	7,5	10	10	10
Control	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17. Mortalidad media de individuos del plaguicida 2

Plaguicida 2					
Concentración (ml/Kg)	semana 0	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
0,14	0	0	0,5	0,75	1,25
0,45	0	0	1,75	3,25	4,25
0,76	0	4	6	7	8,75
1,08	0	4,25	8,5	9,75	10
1,38	0	3,25	6,25	8,5	10
Control	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, se introdujeron los datos en el software OriginPro obteniendo las areas bajo la curva media para cada uno de los plaguicidas, de las cinco concentraciones (ver anexo C). Para el plaguicida uno y dos se realizó una media de las áreas en las cuatro replicas por cada una de las concentración mostrado en la tabla 18 y se realizaron las gráficas de área bajo la curva para cada una de las concentraciones comparando los dos plaguicidas.

Tabla 18. Área de mortalidad acumulada de los plaguicidas

Concentración (ml/Kg)	plaguicida 1	plaguicida 2
-----------------------	--------------	--------------

0,14	5,5	1,9
0,45	12,0	7,3
0,76	21,5	21,4
1,08	26,0	27,5
1,38	32,5	22,5

Fuente: Elaboración propia.

4.2.5. Prueba estadística de análisis de varianza (ANAVA) univariante

Los resultados arrojados al momento de correr el método en el software SPSS se pueden observar con mayor detalle en el anexo D.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. Prueba de Retención de Agua

Conocer la cantidad de agua que satura el suelo permitió mantener un rango en la humedad relativa en el sustrato que estuviera dentro de los parámetros establecidos para el desarrollo óptimo de la prueba de toxicidad, por lo que fue un paso indispensable y que permitió establecer el valor exacto para el pre ensayo (120ml) y bioensayo final (75ml), de no conocer dicha cantidad de agua, no se podría establecer la mezcla necesaria con el producto (fungicida). Por otro lado usar una cantidad mínima ocasionaría un suelo seco y que no permitiría el desarrollo del sustrato biológico utilizado para la prueba de toxicidad como lo fue la lombriz roja californiana. Caso contrario, usar una cantidad mucho mayor, provocaría una saturación del suelo total, volviendo el sustrato de suelo grumos y que impediría la supervivencia de los organismos al cortar el paso de oxígeno dentro de los recipientes. En ambos casos se generarían incertidumbre en los datos, puesto que habría muertes no ocasionadas por los fungicidas en estudio.

5.2. Pre Ensayo

El pre ensayo permitió reducir el rango del valor de las concentraciones a aplicar en el estudio permitiendo reducir sesgos de resultados por valores demasiado grandes o pequeños que hagan perder información relevante o alejarlos de unos resultados más precisos y veraces, por lo que es indispensable realizarse antes de hacer la prueba de toxicidad final, con el fin de obtener una concentración de referencia, al no conocer la toxicidad del producto en el sustrato biológico escogido, pues nunca antes se había realizado una prueba como tal, que involucrara los fungicidas en estudio.

5.3. Bioensayo

La prueba de toxicidad final permitió conocer la mortalidad en un periodo de tiempo de exposición de un sustrato biológico, logrando así establecer resultados que permitieran el desarrollo del estudio como los fisicoquímicos logrando estar dentro del rango establecido por el método de la EPA y finalmente los de interés del mismo que es la concentración letal 50, logrando establecer el objetivo general del estudio y así mismo desarrollar los objetivos secundarios, al conocer la

variación dado por el fungicida sobre el peso de las lombrices, y conocer que un fungicida es más toxico que el otro, aunque estén bajo el mismo principio activo y suspensión concentrada(720). De igual forma permitió generar una serie de resultados estadísticos que comprobaran lo dicho anteriormente.

5.3.1. Parámetros fisicoquímicos

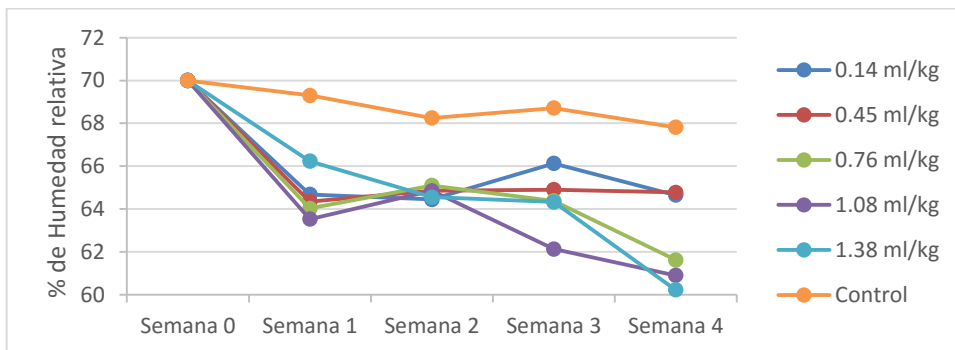
Controlar los parámetros fisicoquímicos es indispensable para la realización del estudio puesto que, además de cumplir lo establecido por la metodología de la EPA, permite establecer que no hay sesgos en el estudio por muertes ajenas al producto utilizado. Así mismo es controlado en diversos estudios sin importar el sustrato biológico u organismo usado, como lo es el caso de Gamez & Rivas [33] quienes usaron la *Daphnia Magna* controlando entre otros parámetros el oxígeno disuelto. De igual forma Alonzo & Chicas [22] usando la lombriz roja californiana, controlaron los mismos parámetros del presente estudio. Evidenciando la importancia de mantener constante y dentro de los rangos establecidos con el fin de evitar una mortalidad sesgada en el estudio por el cambio de los parámetros como lo fue el caso de López, 2009 [34] quien al cambiar las condiciones de la prueba al ser el organismo prueba (*Daphnia Pulex*) susceptible al cambio de factores ambientales y antrópicos tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto, olores ofensivos, entre otros. Cabe resaltar que es indispensable en el presente estudio y en los que se usen la lombriz roja como sustrato biológico, mantener la oscuridad pues son fotofóbicas y podrían causar la mortalidad de las mismas.

▪ Humedad relativa

Las gráficas 2 y 3 muestran el comportamiento de la humedad promediada a través de las cuatro semanas del bioensayo, obteniendo que en los recipientes que contenían alguna concentración de fungicida se dieron pérdidas entre el 6 y 9% y 4 y 8% para el plaguicida 1 y 2 respectivamente, estando dentro del rango permitido en la prueba que era del 10%, cabe resaltar que cada semana la pérdida era compensada nuevamente con la cantidad necesaria de agua [22]. La disminución semanal de humedad se da principalmente por el intercambio gaseoso natural que se presenta dentro de los recipientes dada la descomposición natural de la materia orgánica. Se observa que en los controles no hubo pérdida, por lo que se cree que al no haber muertes dentro

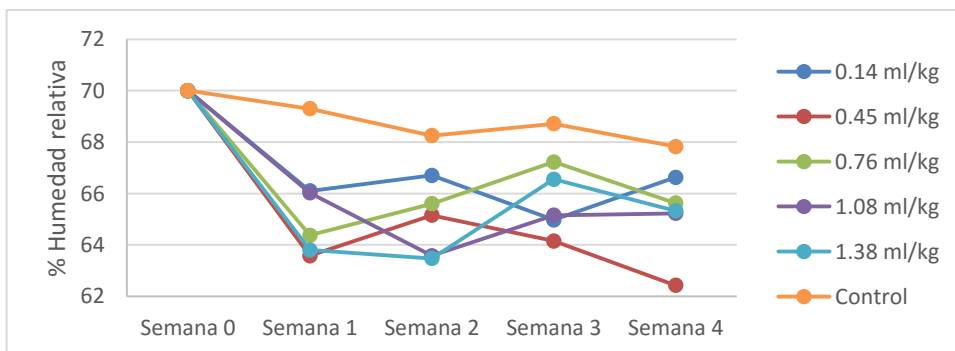
de los mismos, el ciclo de vida de los organismos permitía mantener la humedad dentro de los recipientes.

Gráfica 2. % Humedad Relativa Plaguicida 1.



Fuente: Elaboración propia.

Gráfica 3. % Humedad Relativa Plaguicida 2



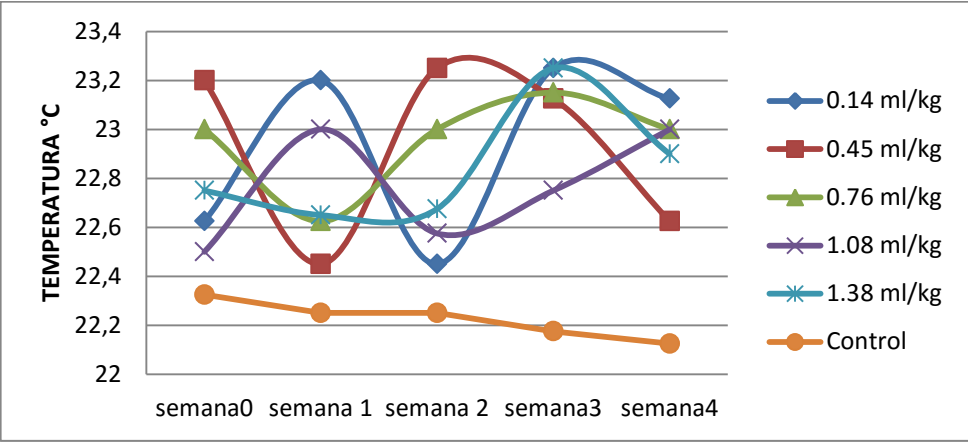
▪ **Fuente:** Elaboración propia.

▪ **Temperatura**

En las gráficas 4 y 5 se observa que la variación de la temperatura a través del tiempo de prueba se mantuvo dentro del rango establecido de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ [30], siendo óptimo para el desarrollo de la prueba. El comportamiento bimodal de las gráficas, se dan gracias al cambio constante en las temperaturas que se dieron en el mes de febrero y marzo del presente año en Bogotá. De igual forma se observa una variación en la temperatura de los controles con el resto de concentraciones, esto se debe a que se mantuvieron en un lugar aparte con

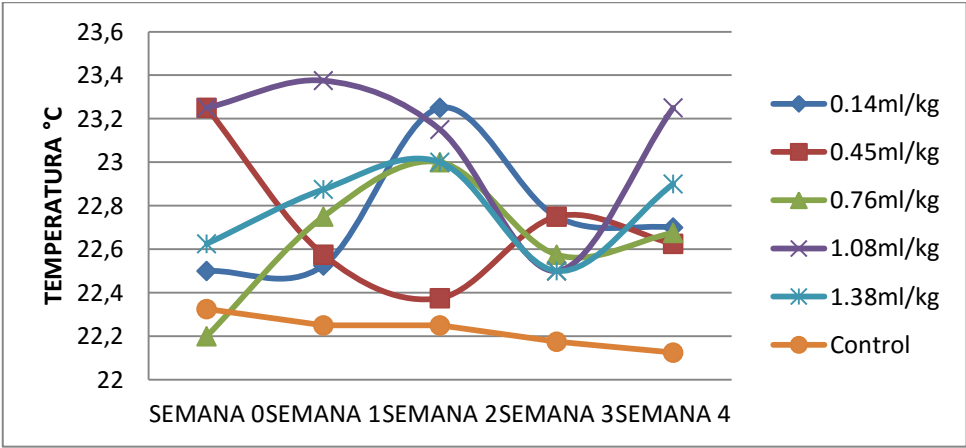
el fin de que no entraran en contacto con el tóxico que había en los otros recipientes.

Gráfica 4. Temperatura Plaguicida 1.



Fuente: Elaboración propia.

Gráfica 5. Temperatura Plaguicida 2



Fuente: Elaboración propia.

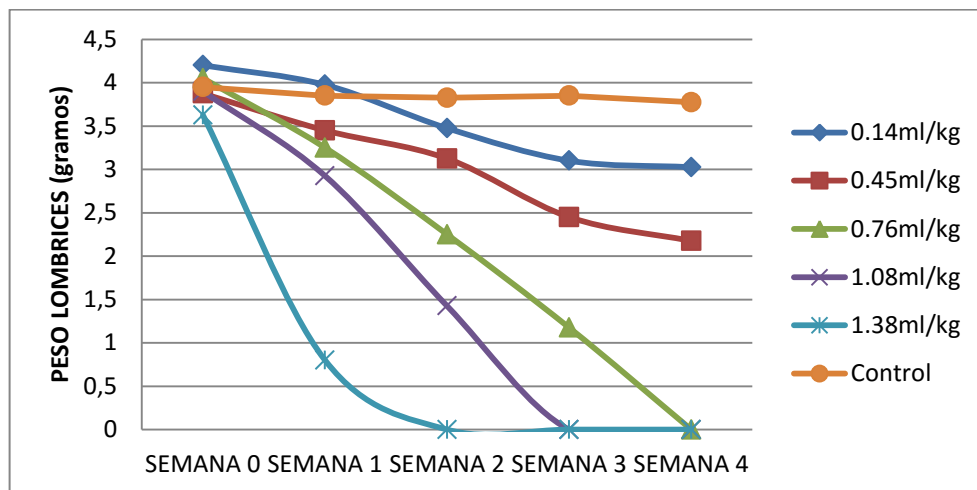
▪ **Peso de lombrices**

En la gráficas 6 y 7 se observa la variación del peso de los sustratos biológicos en los que se da una reducción presentada por la mortalidad a través del

tiempo, puesto que al morir, la lombriz se deshidrata y desaparece dentro del suelo. De igual forma se observa que hay una mayor caída al inicio de las semanas del peso de las lombrices del plaguicida 1, puesto que al ser más tóxico que el plaguicida 2 presenta una mortalidad más resaltada y rápida. Por lo cual se estima que la pérdida de peso es influenciada directamente por los fungicidas en estudio. Este postulado parece obvio, pero al comparar los resultados con otros estudios de la misma índole Giménez & Kesten [35] se observan diferencias en los mismos, puesto que los plaguicidas en estudio no afectan el peso de los individuos y por el contrario permiten el desarrollo normal de su ciclo de vida.

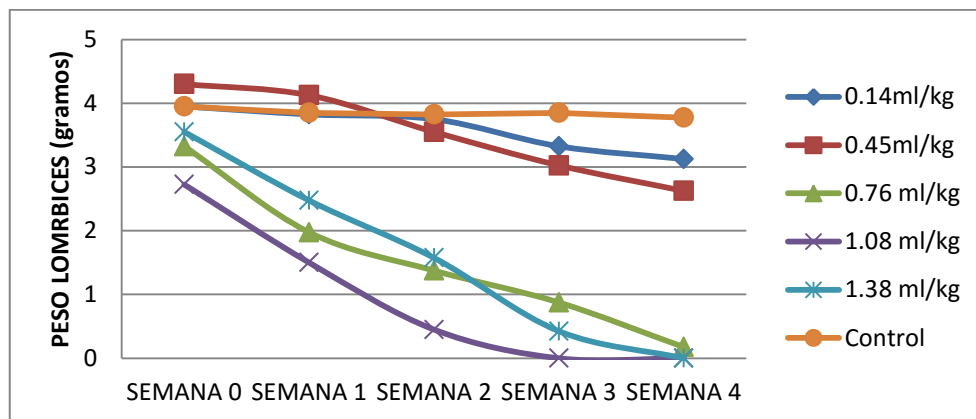
Por lo anteriormente expuesto, se estima que la selectividad del producto y las concentraciones suministradas, son las que tienen una mayor afectación sobre el peso de los organismos, ya que a mayores concentraciones su tasa de mortalidad aumenta. Cabe resaltar que en el presente estudio no fue suministrado alimento al sustrato biológico por lo que se estima que podría ser otro factor incidente.

Gráfica 6. Peso Lombrices Plaguicida 1.



Fuente: Elaboración propia.

Gráfica 7. Peso Lombrices Plaguicida 2.

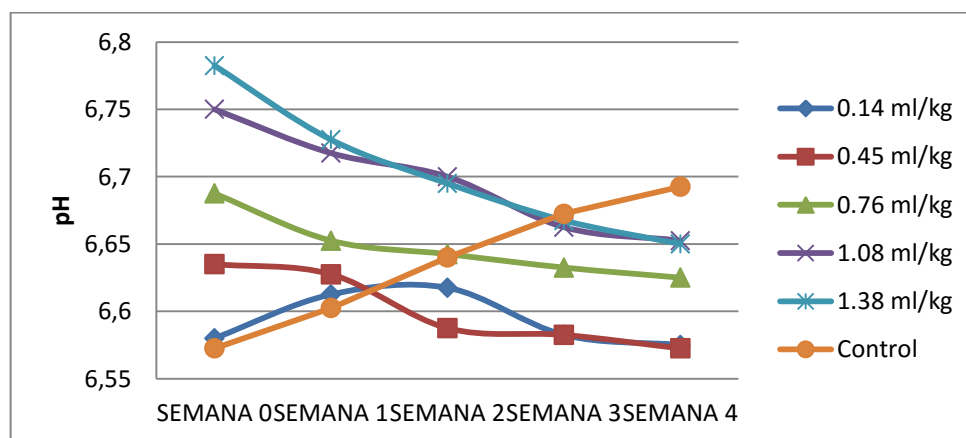


Fuente: Elaboración propia.

▪ pH

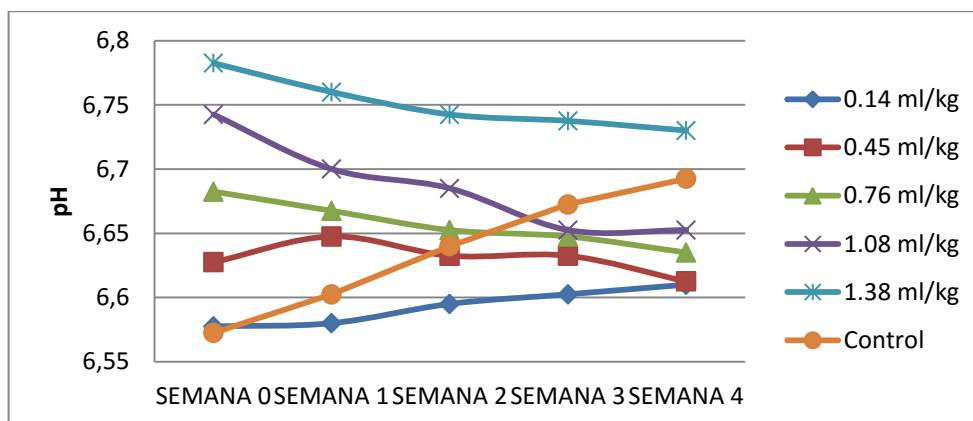
En las gráficas 8 y 9 se muestra el comportamiento del pH a través de las cuatro semanas, en donde se puede observar el comportamiento en aumento del control y de la concentración 1(0.14ml/kg) del plaguicida 2, esto se debe a la cantidad de materia orgánica y producción de vermiabono o humus por parte de las lombrices al sobrevivir durante las cuatro semanas de prueba. En el caso de las concentraciones más altas, se observa que el pH comienza a disminuir a medida que la mortalidad se va presentando en cada semana, por lo que se estima que se da por la descomposición del sustrato biológico y la acción del plaguicida [22].

Gráfica 8. pH Plaguicida 1



Fuente: Elaboración propia.

Gráfica 9. pH Plaguicida 2



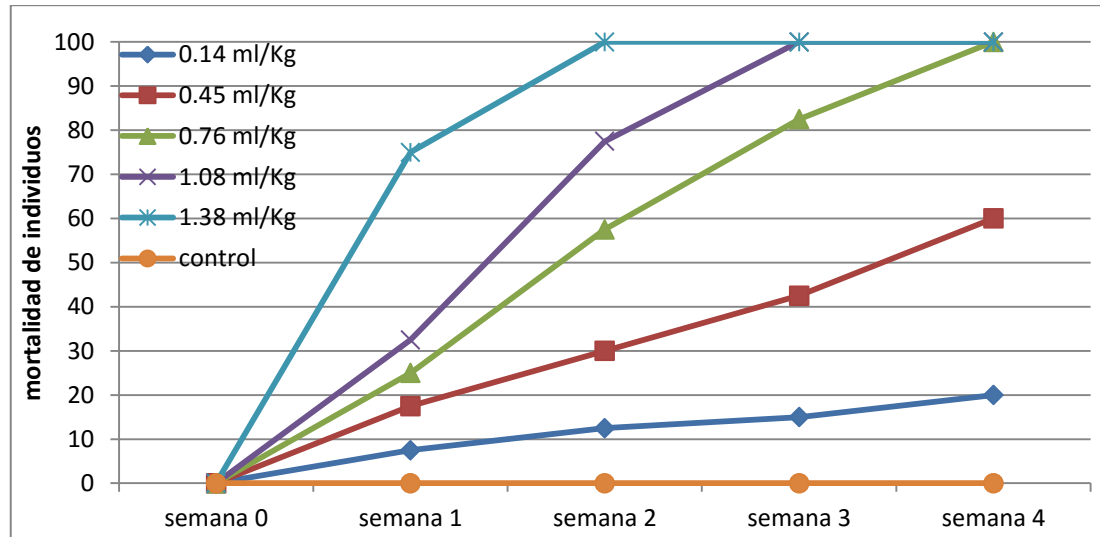
Fuente: Elaboración propia.

5.3.2. Determinación de la concentración letal 50

En el anexo B se observan los resultados de la prueba estadística mediante el modelo Probit en donde se muestra como el plaguicida 1 es mucho más tóxico que el plaguicida 2 al obtener una concentración letal 50 más baja, interpretando que a menores cantidades de producto su mortalidad es mayor, por lo que se puede establecer una diferencia, dada por los ingredientes secundarios usados por cada casa comercial, influyendo en la toxicidad final del producto.

Luego se graficarón las cinco concentraciones en el periodo de las 4 semanas tanto para el plaguicida 1, como para el plaguicida 2, (ver gráfico 10 y gráfico 11).

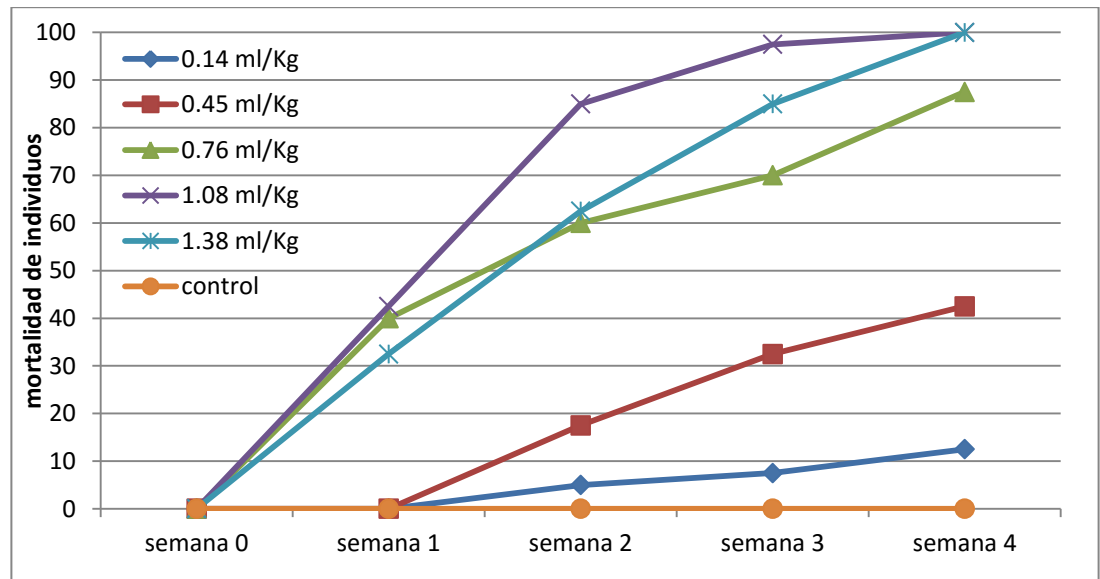
Gráfica 10. Mortalidad media del Plaguicida 1



Fuente: Elaboración propia.

Observando la grafica 10, correspondiente al plaguicida 1 se encuentra un aumento lineal de la mortalidad en las primeras dos concentraciones, y un aumento exponencial en las ultimas tres concentraciones que para la cuarta semana habian completado el 100% de muerte de los organismos de prueba. La concentracion de 1,38 ml/kg presentó para la primera semana un total del 50% de las muertes a comparacion de de las demas concentraciones, en especial de la cuarta y tercera que aunque completaron un total de muertes, lo hicieron de forma mas paulatina que la quinta concentracion que en la segunda semana tenia todos sus organismos de prueba muertos.

Gráfica 11. Mortalidad media del plaguicida 2



Fuente: Elaboración propia.

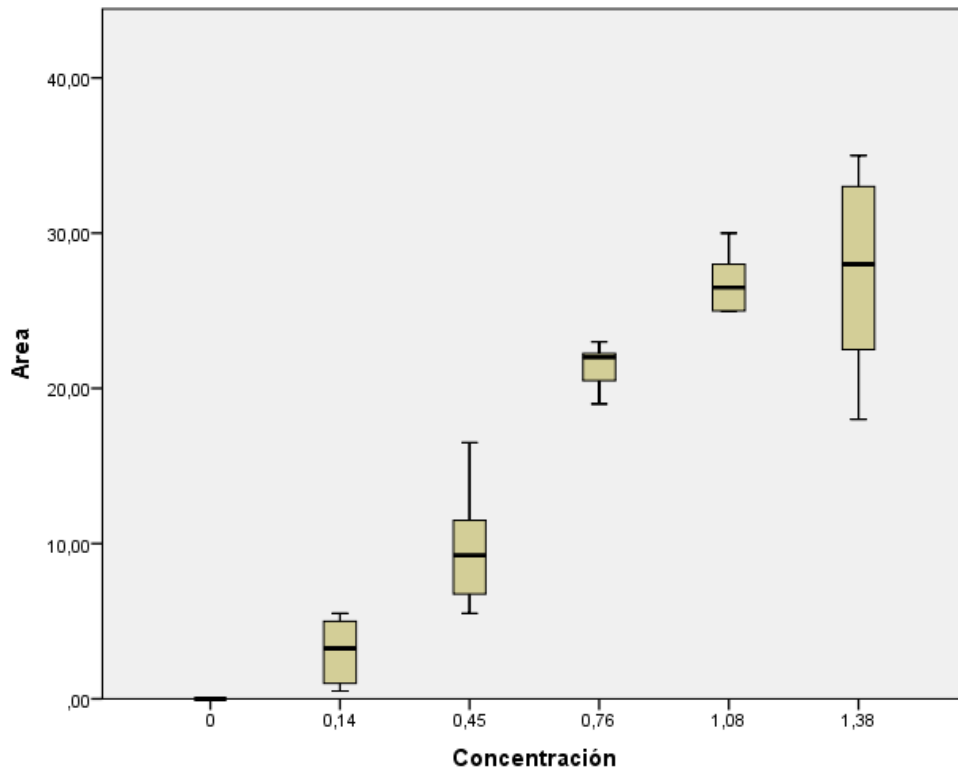
Por otro lado, la grafica 11 correspondiente al plaguicida 2, mostró un crecimiento mas lento en las primeras dos concentraciones, que no superaron el 50% de las muertes, a comparacion de las concentraciones de 1,08 ml/kg y 1,38 ml/kg que presentaron el 100% de las muertes de los organismos. En un inicio la concentracion de 0,76 ml/kg presento un aumento mayor a la concentracionde 1,08 ml/kg en la primera semana, pero luego de pasadas las 4 semanas, la concentracion 4 tuvo un 100% de las muertes a comparaciond e la concentracion 3 que alcanzo solamente un 88% de muertes.

Consecuente a esto, la concentracion de 1,08 ml/kg logra una tasa de mortalidad mas alta que la concentración de 1,38 ml/kg desde la primera semana, lo que contradice que a mayor cantidad de plaguicida, la mortalidad se hace mayor, por lo que se podria estar encontrando una cierta resistencia por parte de los organismos de prueba o una accion no efectiva a altas concentraciones por parte del plaguicida.

Al comparar los dos plaguicidas se encontró que el plaguicida 1 presenta una mayor mortalidad a menor concentración, a comparacion del plaguicida 2, que presenta un valor atipico en donde la cuarta concentracion es mas efectiva que la quinta concentracion y que la mortalidad es menor y se realiza de forma mas paulatina a comparacion del plaguicida uno (grafica 10). Por otro ladoo, las

primeras dos concentraciones en el plaguicida 1 como se observa en la grafica 10 presenta una tasa de mortalidad mas alta (60% y 20% respectivamente) a comparacion del plaguicida 2 (grafica 11) que presenta una tasa inferior al 40% de la mortalidad y 12% respectivamente.

Gráfica 12. Diagrama de caja del Área bajo la curva.



Fuente: Elaboración propia

Observada la gráfica 12, se encuentra que la concentración de 1,38 ml/kg presenta una mayor desviación en los datos donde la mayoría de los datos se encuentran por debajo de la mediana, e incluso la mayor parte de los datos se encuentran alejados de la mediana por debajo del 25%. Para la concentración de 1,08 ml/kg no se encuentran valores alejados en menos del 25% de las veces pero si una mayor agrupación de los datos respecto a la media de los mismos, con una leve desviación por encima de la mediana.

En cuanto a la concentración de 0,76 ml/kg se encuentra que la mayoría de los datos se encuentran por debajo de la mediana y no presenta una desviación superior a la misma, pero si una ligera desviación por debajo de la mediana, puesto que la mayoría de los datos presenta la mejor agrupación con respecto a

las demás concentraciones. La concentración de 0,45 ml/kg le sigue la concentración de 1,38 ml/kg en cuanto a que presenta una desviación mayor donde la mayoría de los valores están por encima de la mediana y están más dispersos respecto a las demás concentraciones. Finalmente la concentración de 0,14 ml/kg presenta unos datos agrupados con ligeras dispersiones tanto por encima como debajo de la mediana.

5.3.3. PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ANAVA UNIVARIANTE

▪ FACTORES INTER – SUJETOS

El factor inter sujeta solamente nos muestra los factores a estudiar y como se relacionó, con la respectiva cantidad de datos analizados de cada uno, muestra que se estudió cinco concentraciones (0.14, 0.45, 0.76, 1.08, 1.38 ml/kg) y un control correspondiente a una concentración cero, por otra parte se analizarán 2 tipos de plaguicidas (plaguicida 1, plaguicida 2) y un control.

▪ PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER – SUJETOS

Al observar la significancia del plaguicida, la concentración y la relación entre las dos encontró que tiene una significancia de 0,000, valor inferior a 0,05 por lo que se dice que se rechaza la hipótesis nula, la cual dice que no hay diferencias significativas entre los factores mencionados con anterioridad y se acepta la hipótesis alternativa que dice que al menos uno de los factores es diferente a los demás, en este caso puede ser la concentración, el plaguicida o ambos.

▪ PRUEBAS POST HOC

La concentración para las pruebas post hoc se realizó por tres métodos, Tukey, DMS y Dunnet. En Tukey se encontró:

Tukey: al comparar al grupo control con las 5 concentraciones se encontró que todas presenta diferencia con todas ellas, aunque con la concentración de 0,14 ml/kg presenta una significancia de 0,003 no es suficiente para decir que estadísticamente es igual al grupo control.

Al contrastar la concentración de 0,14 ml/kg con el control y las demás concentraciones se encuentra que también presenta diferencia con todas las demás concentraciones y que aunque presenta una significancia de 0,003 con el grupo control, no las hace estadísticamente iguales. Las concentraciones de 0,76

y 0,45 ml/kg presenta diferencia de medias con todas las demás concentraciones y entre ellas mismas al igual que con el grupo control.

Al analizar las concentraciones de 1,08 y 1,38 ml/kg se encuentra que son diferentes con una significancia de 0,0 tanto con el grupo control como con las primeras tres concentraciones, pero al observar la relación entre las dos se encontró una similitud con un nivel de significancia de 0,965, por lo que se puede decir que estadísticamente son iguales.

DMS: Al comparar las primeras tres concentraciones entre ellas, con el control y con las concentraciones de 1,08 y 1,38 ml/kg se encontró que presenta diferencia al relacionarlas con todas y que al estudiar el control también presenta diferencia con las demás concentraciones. Por otra parte al estudiar las concentraciones de 1,08 y 1,38 ml/kg se encontró que son iguales estadísticamente entre sí con una significancia de 0,423, que aunque no es lo suficientemente alta, el modelo encuentra similitudes entre las dos concentraciones por lo que se consideran estadísticamente iguales (ver anexo D).

Dunnet: Se observa en el anexo D que todas las concentraciones presentan diferencias al compararlas con el grupo control.

En cuanto a los subconjunto homogéneos, analizando la tabla 15 se puede encontrar que el grupo control y las tres primeras concentraciones presentan diferencias entre si y se agrupan en diferentes subconjuntos, a diferencia de las concentraciones cuatro y cinco, las cuales se agruparon en un mismo subconjunto, por lo que hay homogeneidad entre las dos variables y son estadísticamente iguales con una significancia de 0,956, es decir 95,6% de confiabilidad en el método.

Al igual que con las concentraciones se hizo el análisis de similitud estadístico usando Tukey, DMS y Dunnet, arrojando que no hay similitud estadística de los dos plaguicidas con el control, así como tampoco hay similitud entre los dos plaguicidas, nuevamente rechazando la hipótesis nula que dice que todos las variables son iguales, por lo que se constata que hay diferencia entre los plaguicidas y que aunque presentan una concentración igual de ingrediente activo (720 ml/kg) en cuanto al producto, si tienen diferencias en su efecto toxico sobre los organismos de prueba, por los diferentes excipientes y coadyuvantes y demás ingredientes que tienen los productos aparte de su ingrediente activo. Reforzando

lo estudiado con anterioridad al ver que las áreas bajo la curva presentaban diferencias entre plaguicidas aun teniendo las mismas concentraciones.

6. CONCLUSIONES

- El fungicida de uso agrícola más tóxico para el sustrato biológico utilizado (*Eisenia foetida*), fue el plaguicida 1 puesto que a menores cantidades de tóxico usado, su tasa de mortalidad es mayor, estimando diferencias entre las toxicidades de productos bajo el mismo principio activo De acuerdo a estos resultados se evidencia que la formulación o ingredientes secundarios tales como excipientes o coadyuvantes de los productos usados en cada casa comercial, pueden estar incidiendo directamente en su toxicidad, al obtener una diferencia significativa en los resultados de las concentraciones letales medias.
- El uso de este tipo de fungicidas influye directamente en el peso de las lombrices, puesto que no tienen selectividad de organismo, atacando así al sustrato biológico, produciendo una pérdida de su peso hasta la muerte, por lo cual se estima que la selectividad del producto es indispensable al momento de usar este tipo de productos, para no influir en el ciclo de vida de la lombriz u otros organismos en el suelo.
- Durante la realización de todo el bioensayo se controlaron los parámetros físico químicos del sustrato, como lo fueron (pH, temperatura, humedad relativa, peso) con el fin de cotejar que la mortalidad es producto del efecto de los fungicidas en estudio y no un factor ajeno a los mismos, al estar entre los rangos exigidos por la EPA como se muestran en los resultados, evitando resultados sesgados dentro del estudio.
- De acuerdo con el análisis estadístico, es posible constatar que para ambos plaguicidas, las concentraciones de 1,08 y 1,38 ml/kg, no presentan diferencia estadística, debido a que las dos produjeron el mismo efecto letal sobre los organismos de prueba, en comparación con las demás en donde sí se encontraron diferencias estadísticas; de esta manera se rechaza la hipótesis nula que dice que todas las concentraciones son iguales y se acepta la hipótesis alternativa.

- El uso de tecnologías informativas y software estadísticos permite un mejor estudio sobre el bioensayo, permitiendo encontrar homogeneidad de los datos y dándole una mayor credibilidad al estudio, en el caso del uso de SPSS y Origin Pro que permitió encontrar similitudes entre productos (concentraciones 4 y 5) y diferencias significativas (área bajo la curva de las concentraciones) sobre las mismas a pesar de tener las mismas concentraciones con diferentes metodologías de análisis de varianza (Tukey y DMS), permitiendo una mayor seguridad en los resultados arrojados.
- Con el desarrollo de un pre ensayo se logra disminuir el rango de las concentraciones sobre el ensayo definitivo, permitiendo darle una mayor robustez al estudio y disminuyendo sesgos entre concentraciones o información innecesaria dentro del estudio como demasiadas concentraciones que arrojen los mismos resultados o caso contrario, concentraciones con resultados con poca significancia o irrelevantes para el análisis del mismo.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio similar, suministrando alimento a las lombrices, con el fin de observar si tiene alguna influencia en la mortalidad de los organismos.
- Se sugiere un estudio de selectividad de los plaguicidas al observar que ataca a organismos no objetivos.
- Se sugiere realizar un estudio de reproducción en contacto con este tipo de plaguicidas.
- Este estudio se podría complementar evaluando diferentes tipos de suelo bajo el mismo fungicida, con el fin de observar si el suelo tiene influencia en la mortalidad, reproducción y peso de los organismos.
- Se recomienda tener un espacio exclusivo para el trabajo con tóxicos dentro de la universidad y además compra de equipos que permitan un mejor análisis físico químico de los bioensayos para motivar más la realización de estudios de esta índole.
- Es indispensable el uso de equipos de seguridad, duchas, entre otros dentro de las instalaciones de trabajo, para personas que manejen este tipo de tóxicos, con el fin de evitar cualquier tipo de intoxicación.
- Se recomienda a las autoridades ambientales, evaluar los plaguicidas, no solo por su principio activo, sino también por los ingredientes secundarios usados en cada casa comercial al dictaminar su toxicidad.
- Realizar un protocolo en el que se determine el manejo y disposición final de residuos tóxicos luego de este tipo de estudios.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, «Riesgos de los plaguicidas para el ambiente,» México D.F, S.f.
- [2] N. Benitez Campo, D. H. Vivas Zarate y E. D. Rosero Hernandez, «Toxicidad de los principales plaguicidas utilizados en el municipio de Popayán, usando *Bacillus subtilis*,» *Scielo*, Febrero 2009.

- [3] D. Escobar, «Evolución de la caficultura colombiana,» 2013.
- [4] Federación Nacional de Cafeteros de Colombia , 13 Abril 2011. [En línea]. Available:
http://www.federaciondecafeteros.org/clientes/es/sala_de_prensa/detalle/produccion_y_exportaciones_de_cafe_de_colombia_crecieron_en_marzo_y_en_l_o_c/. [Último acceso: Mayo 2015].
- [5] Federación Nacional de Cafeteros, «Área cultivada según exposición solar,» 2014.
- [6] M. Delgado, C. Samir y J. M. Ramirez, «La economía del departamento del Huila: Diagnostico y perspectivas de mediano plazo,» Bogotá D.C, 2015.
- [7] J. Cardenas Gutierrez, «La industria del cafe en Colombia.,» de *La industria del cafe en Colombia.*, pp. 3-12.
- [8] Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), «Fungicidas sistémicos y protectores,» S.f. [En línea]. Available:
http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f_spa/icon/44653/1/Fungicidasistemicoyprotectores31-40.pdf.
- [9] Food and agriculture organization of the united nations, «Pesticides,» [En línea]. Available:
<http://www.fao.org/docrep/w1604s/w1604s04.htm#TopOfPage>. [Último acceso: 10 Mayo 2016].
- [10] J. T. Zacharia, «Identity, Physical and Chemical Properties of pesticides,» Tanzania.
- [11] J. Roberts y J. Reigart, «Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas,» EPA, Ed., Washington, D.C, 1999, p. 152.
- [12] Syngenta, «Daconil 720 SC».
- [13] Guia para la protección y nutrición vegetal (SATA), «El Clorotalonil,» 2015.
- [14] C. M. Gamez Rivas y E. J. Ramírez Riveros, «Determinación de concentración letal media del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuaticos, mediante pruebas toxicologicas con Daphnia Magna,» Bogota,

D.C, 2008.

- [15] Syngenta, «Ficha técnica Clorotalonil,» 2009.
- [16] Barpen, «Ficha Técnica Clortocaffaro,» 1999.
- [17] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), «Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos,» Burlington, Canadá, 1997.
- [18] A. Palafox, Á. Hernández, J. Luna y M. Cuevas, «Evaluación de toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices,» México, d.f, S.f, pp. 47-74.
- [19] F. Qin, Y. Gao, B. Guo, L. J y H. Wang , «Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure.,» Beijing, 2014.
- [20] G. Ávila , H. Gaete, M. Morales y A. Neaman, «Reproducción de *Eisenia Foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico,» *Scielo*, vol. 42, nº 3, Marzo 2007.
- [21] T. Ricardo, M. I. Maitre y A. R. Rodríguez, «Efectos subletales de la lambda-cialotrina sobre *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae),» *Scielo*, vol. 28, nº 1, Julio 2010.
- [22] L. D. Alonzo Hernandez y S. J. Chicas Quintanilla, «Determinación de la concentración letal 50 (CL50) de dos plaguicidas sintéticos utilizando *Eisenia foetida* S. en el cultivo de *Cucumis sativus* L.(pepino),» San Salvador, 2013.
- [23] M. Rodríguez, Ortiz Estrada, C. González Triana, Y. González Torres y B. Navarro, «Evaluación ecotoxicológica de dos derivados del Nim en lombriz de tierra,» *Revista de Toxicología*, vol. 28, nº 2, 2011.
- [24] M. Benitez Blanco y J. Lesmes Montañez, «Determinación de la concentración letal 50 de tres insecticidas de uso doméstico,» Bogotá, 2014.
- [25] Agrohacienda, «Agro Hacienda,» [En línea]. Available: http://www.agrohacienda.com.co/deaq2014/src/productos/13708_58.htm. [Último acceso: 17 Mayo 2016].

- [26] R. C. Alas Rosales y A. M. Alvarenga Hernández, «Evaluación de sustratos de origen animal y vegetal en la producción de humus y carne de lombriz (eisenia foetida),» Ciudad Universitaria, 2002.
- [27] Fundación hogares juveniles campesinos, Manual de la granja integral autosuficiente, Bogotá: San Pablo, 2004.
- [28] Inversanet, «Ciclo biológico y desarrollo de Eisenia foetida,» 07 Septiembre 2011. [En línea]. Available: <https://inversanet.wordpress.com/2011/09/07/ciclo-biologico-y-desarrollo-de-eisenia-foetida-lombriz-roja/>. [Último acceso: 25 Agosto 2015].
- [29] O. Y. Alcívar Mecías , «Descripción de taxonomía, biología, etología, sistema de cría y usos de la lombriz californiana Eisenia foetida,» Manabí, Ecuador, 2008.
- [30] Environmental Protection Agency, «DATA EVALUATION RECORD EARTHWORM SUBCHRONIC TOXICITY TEST OPPTS 850.620,» 1999.
- [31] Repetto, Toxicología Fundamental, Sevilla, España: Diaz de Santos, 2009.
- [32] F. Ingelmo, S. Cuadrado y J. Hernandez, «Estudio de la Conducta Termica del Suelo.,» Salamanca, 1986, pp. 595-608.
- [33] C. M. Gamez Rojas y E. J. Ramirez Riveros, «Determinación de la concentración letal media del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuaticos mediante pruebas toxicologicas con daphnia magna,» Bogotá D.C, 2008.
- [34] L. M. López Martínez, «Determinación de la concentración letal media del cloro en el efluente de una industria mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia Pulez,» Bogotá D.C, 2009.
- [35] Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, «Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados,» 2006, pp. 19-22.
- [36] R. Giménez y E. Kesten, «Efecto de plaguicidas sobre lombrices y descomposición de materia orgánica en un sistema silvopastoril,» Québec, Canada., 2003.

9. ANEXOS

ANEXO A. Protocolo para la realización de bioensayos de determinación de concentración letal 50

1. Adaptar las lombrices al estrés del espacio dentro las unidades experimentales, alimentándolas durante 15 días para asemejar las características a las que vivían anteriormente.
2. Vaciar los estómagos de los organismos, lavándolas con agua destilada y dejándolas en un periodo de 24 horas en cajas de petri sobre papel filtro.
3. Pesar 540g de suelo en una balanza semi analítica.

4. Preparar la cantidad de plaguicida a utilizar por concentración y mezclar con la cantidad de agua necesaria (75ml) para humedecer el suelo al 70%.
5. Aplicar la mezcla sobre el sustrato de forma superficial con ayuda de un atomizador.
6. Repetir los procedimientos 3, 4, 5, para cada unidad experimental y repetición establecida.
7. Medir los parámetros fisicoquímicos iniciales (temperatura, humedad, pH)
8. Seleccionar aleatoriamente en grupos de 10 los organismos, lavar con agua destilada, retirar el exceso de agua, pesarlos e ingresarlos a las unidades experimentales.
9. Pesar las unidades experimentales que contienen ya las lombrices (biomasa).
10. Semanalmente pesar y revisar el estado de las lombrices, evaluando la mortalidad y controlando los parámetros anteriormente mencionados. Agregar agua si hay pérdidas en la biomasa.
11. En el día 28 revisar la totalidad de las unidades experimentales y revisar la mortalidad y parámetros finales del bioensayo.
12. Determinar la concentración letal 50 mediante cualquier programa estadístico.

Anexo B .Análisis Probit Para Determinación De Concentración Letal 50

Imagen B.1. Análisis Probit Plaguicida 1.

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality39=A+B*Log10_Concentración ml/Kg

Input Data ...

Dose/Concentration ->	Concentración ml/Kg
Dead Number ->	Muertes
Total Number ->	Total Organismos
Control Group ->	Control

Results ...

Parameter A:	1.98684473
Parameter B(slope):	3.58149965
Deviance:	15.84350828
AIC:	40.15017165
LD50/LC50 Value:	0.278771147
LOG10(LD50/LC50) Value:	-0.55475218

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	0.231027384
Upper Limit:	0.33638156

Imagen B.2. Análisis Probit Plaguicida 2.

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality32=A+B*Log10_Concentración ml/Kg

Input Data ...

Dose/Concentration ->	Concentración ml/Kg
Dead Number ->	Muertes
Total Number ->	Total Organismos
Control Group ->	Control

Results ...

Parameter A:	1.49304783
Parameter B(slope):	3.48055217
Deviance:	19.1422655
AIC:	50.53665178
LD50/LC50 Value:	0.37241857
LOG10(LD50/LC50) Value:	-0.42896867

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	0.312204323
Upper Limit:	0.44424623

ANEXO C. Áreas Bajo La Curva Por Replica

Tabla C.1 Áreas bajo la curva por replica

Plaguicida 1			Plaguicida 2		
Replica	Concentración (ml/Kg)	área	Replica	Concentración (ml/Kg)	área
1	0,14	5,5	1	0,14	0,5
2	0,14	3	2	0,14	0,5
3	0,14	5	3	0,14	5
4	0,14	3,5	4	0,14	1,5
1	0,45	16,5	1	0,45	7,5
2	0,45	8,5	2	0,45	6
3	0,45	11	3	0,45	10
4	0,45	12	4	0,45	5,5
1	0,76	22	1	0,76	19,5
2	0,76	19	2	0,76	22
3	0,76	22	3	0,76	21,5
4	0,76	23	4	0,76	22,5
1	1,08	25	1	1,08	30
2	1,08	26	2	1,08	27
3	1,08	28	3	1,08	28
4	1,08	25	4	1,08	25
1	1,38	33	1	1,38	25
2	1,38	29	2	1,38	27
3	1,38	35	3	1,38	18
4	1,38	33	4	1,38	20

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO D. Prueba Estadística De Análisis De Varianza ANAVA Univariante

Factores inter - sujetos

Tabla D.1 Factores inter - sujetos

		Etiqueta del valor	N
Concentración	,00	,00	20
	1,00	0,14	8
	2,00	0,45	8
	3,00	0,76	8
	4,00	1,08	8
	5,00	1,38	8
Plaguicida	1,00	Plaguicida 1	20
	2,00	Plaguicida 2	20
	3,00	Control	20

Fuente: Elaboración propia

Pruebas de los efectos inter - sujetos

Tabla D.2 Prueba de los efectos inter - sujetos

Variable dependiente: Área

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8197,308 ^a	10	819,731	237,849	,000
Intersección	10940,275	1	10940,275	3174,380	,000
Concentración	3770,963	4	942,741	273,541	,000
Plaguicida	99,225	1	99,225	28,791	,000
Concentración * Plaguicida	161,713	4	40,428	11,730	,000
Error	168,875	49	3,446		
Total	16697,000	60			
Total corregida	8366,183	59			

a. R cuadrado = ,980 (R cuadrado corregida = ,976)

Fuente: Elaboración propia.

- Pruebas post hoc

- Concentración

Tabla.D.3 Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área

	(I)Concentración	(J)Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	,00	0,14	-3,0625*	,77661	,003	-5,3655	-,7595
		0,45	-9,6250*	,77661	,000	-11,9280	-7,3220
		0,76	-21,4375*	,77661	,000	-23,7405	-19,1345
		1,08	-26,7500*	,77661	,000	-29,0530	-24,4470
		1,38	-27,5000*	,77661	,000	-29,8030	-25,1970
	0,14	,00	3,0625*	,77661	,003	,7595	5,3655
		0,45	-6,5625*	,92823	,000	-9,3151	-3,8099
		0,76	-18,3750*	,92823	,000	-21,1276	-15,6224
		1,08	-23,6875*	,92823	,000	-26,4401	-20,9349
		1,38	-24,4375*	,92823	,000	-27,1901	-21,6849
	0,45	,00	9,6250*	,77661	,000	7,3220	11,9280
		0,14	6,5625*	,92823	,000	3,8099	9,3151
		0,76	-11,8125*	,92823	,000	-14,5651	-9,0599
		1,08	-17,1250*	,92823	,000	-19,8776	-14,3724
		1,38	-17,8750*	,92823	,000	-20,6276	-15,1224
	0,76	,00	21,4375*	,77661	,000	19,1345	23,7405
		0,14	18,3750*	,92823	,000	15,6224	21,1276
		0,45	11,8125*	,92823	,000	9,0599	14,5651
		1,08	-5,3125*	,92823	,000	-8,0651	-2,5599
		1,38	-6,0625*	,92823	,000	-8,8151	-3,3099
	1,08	,00	26,7500*	,77661	,000	24,4470	29,0530
		0,14	23,6875*	,92823	,000	20,9349	26,4401
		0,45	17,1250*	,92823	,000	14,3724	19,8776

DMS		0,76	5,3125*	,92823	,000	2,5599	8,0651
		1,38	-,7500	,92823	,965	-3,5026	2,0026
		,00	27,5000*	,77661	,000	25,1970	29,8030
		0,14	24,4375*	,92823	,000	21,6849	27,1901
	1,38	0,45	17,8750*	,92823	,000	15,1224	20,6276
		0,76	6,0625*	,92823	,000	3,3099	8,8151
		1,08	,7500	,92823	,965	-2,0026	3,5026
		0,14	-3,0625*	,77661	,000	-4,6232	-1,5018
		0,45	-9,6250*	,77661	,000	-11,1857	-8,0643
	,00	0,76	-21,4375*	,77661	,000	-22,9982	-19,8768
		1,08	-26,7500*	,77661	,000	-28,3107	-25,1893
		1,38	-27,5000*	,77661	,000	-29,0607	-25,9393
		,00	3,0625*	,77661	,000	1,5018	4,6232
		0,45	-6,5625*	,92823	,000	-8,4278	-4,6972
	0,14	0,76	-18,3750*	,92823	,000	-20,2403	-16,5097
		1,08	-23,6875*	,92823	,000	-25,5528	-21,8222
		1,38	-24,4375*	,92823	,000	-26,3028	-22,5722
		,00	9,6250*	,77661	,000	8,0643	11,1857
		0,14	6,5625*	,92823	,000	4,6972	8,4278
	0,45	0,76	-11,8125*	,92823	,000	-13,6778	-9,9472
		1,08	-17,1250*	,92823	,000	-18,9903	-15,2597
		1,38	-17,8750*	,92823	,000	-19,7403	-16,0097
		,00	21,4375*	,77661	,000	19,8768	22,9982
		0,14	18,3750*	,92823	,000	16,5097	20,2403
	0,76	0,45	11,8125*	,92823	,000	9,9472	13,6778
		1,08	-5,3125*	,92823	,000	-7,1778	-3,4472
		1,38	-6,0625*	,92823	,000	-7,9278	-4,1972
		,00	26,7500*	,77661	,000	25,1893	28,3107
		0,14	23,6875*	,92823	,000	21,8222	25,5528
	1,08	0,45	17,1250*	,92823	,000	15,2597	18,9903
		0,76	5,3125*	,92823	,000	3,4472	7,1778
		1,38	-,7500	,92823	,423	-2,6153	1,1153
		,00	27,5000*	,77661	,000	25,9393	29,0607
		0,14	24,4375*	,92823	,000	22,5722	26,3028
	1,38	0,45	17,8750*	,92823	,000	16,0097	19,7403
		0,76	6,0625*	,92823	,000	4,1972	7,9278
		1,08	,7500	,92823	,423	-1,1153	2,6153

	0,14	,00	3,0625*	,77661	,001	1,0074	5,1176
	0,45	,00	9,6250*	,77661	,000	7,5699	11,6801
t de Dunnet	0,76	,00	21,4375*	,77661	,000	19,3824	23,4926
(bilateral) ^b	1,08	,00	26,7500*	,77661	,000	24,6949	28,8051
	1,38	,00	27,5000*	,77661	,000	25,4449	29,5551

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,446.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fuente: Elaboración propia.

▪ Subconjuntos homogéneos

Tabla D.4 Subconjuntos homogéneos

Área							
	Concentración	N	Subconjunto				
			1	2	3	4	5
DHS de Tukey ^{a,b,c}	,00	20	,0000				
	0,14	8		3,0625			
	0,45	8			9,6250		
	0,76	8				21,4375	
	1,08	8					26,7500
	1,38	8					27,5000
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,956

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,446.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,889

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos.
No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = 0,05.

Fuente: Elaboración propia

■ Plaguicida

Tabla D.5 Comparaciones múltiples para plaguicida.

Variable dependiente: Área

	(I)Plaguicida	(J)Plaguicida	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	Plaguicida 1	Plaguicida 2	3,1500*	,58706	,000	1,7311	4,5689
		control	19,2500*	,58706	,000	17,8311	20,6689
	Plaguicida 2	Plaguicida 1	-3,1500*	,58706	,000	-4,5689	-1,7311
		control	16,1000*	,58706	,000	14,6811	17,5189
	control	Plaguicida 1	-19,2500*	,58706	,000	-20,6689	-17,8311
		Plaguicida 2	-16,1000*	,58706	,000	-17,5189	-14,6811
DMS	Plaguicida 1	Plaguicida 2	3,1500*	,58706	,000	1,9703	4,3297
		control	19,2500*	,58706	,000	18,0703	20,4297
	Plaguicida 2	Plaguicida 1	-3,1500*	,58706	,000	-4,3297	-1,9703
		control	16,1000*	,58706	,000	14,9203	17,2797
	control	Plaguicida 1	-19,2500*	,58706	,000	-20,4297	-18,0703
		Plaguicida 2	-16,1000*	,58706	,000	-17,2797	-14,9203
t de Dunnet	Plaguicida 2	Plaguicida 1	-3,1500*	,58706	,000	-4,4870	-1,8130
(bilateral) ^b	control	Plaguicida 1	-19,2500*	,58706	,000	-20,5870	-17,9130
Basadas en las medias observadas.							
El término de error es la media cuadrática (Error) = 3,446.							
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.							
b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.							

Fuente: Elaboración propia.