

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA.

TESIS

**“LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS DE IMPORTANCIA
EN CULTIVARES DE GUAYABA EN EL MUNICIPIO DE CALVILLO,
AGUASCALIENTES, Y EVALUACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS EN
ESPECIES ZOOPLANCTÓNICAS NATIVAS”.**

PRESENTA

M. en C. Carlos Vicente Garza León.

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS.**

TUTOR:

Dr. Roberto Rico Martínez - Universidad Autónoma de Aguascalientes.

COMITÉ TUTORAL:

**Dra. Iliana E. Medina Ramírez - Universidad Autónoma de
Aguascalientes.**

Dr. Isidoro Rubio Franchini - Laboratorio Estatal de Salud Pública.

AGUASCALIENTES, AGS. ABRIL DE 2018

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas

Por medio de la presente y como Comité designado del alumno Carlos Vicente Garza León quien presentó la tesis de doctorado titulada "localización y distribución de pesticidas de importancia en cultivos de guayaba en el Municipio de Calvillo, Aguascalientes, y evaluación de efectos adversos en especies zooplanctónicas nativas" y con fundamento en el artículo 175 Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el proceso administrativo para la obtención del grado.

Atentamente

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 22 de marzo de 2018

Dr. Roberto Rico Martínez

Tutor de Carlos Vicente Garza León

Vo. Bo. Dra. Iliana Ernestina Medina Ramirez

Asesora de Tesis

Vo. Bo. Dr. Isidoro Rubio Franchini

Asesor de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARLOS VICENTE GARZA LEÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS DE IMPORTANCIA EN CULTIVARES DE GUAYABA EN EL MUNICIPIO DE CALVILLO AGUASCALIENTES, Y EVALUACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS EN ESPECIES ZOOPLANCTÓNICAS NATIVAS"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 23 de marzo de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

Agradecimientos.

A mi esposa, por haber sido un pilar inquebrantable en todo éste tiempo, por sus acertados consejos y retornarme al camino cuando parecía perder el rumbo, te amo.

A mis padres, por su apoyo incondicional, la paciencia y comprensión que he recibido durante toda mi formación, por hacer de mí una persona de provecho, por ser mis padres, los amo, gracias.

A mis hermanas, y Lula, por su apoyo y cariño.

Al Dr. Roberto Rico, por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por su infinita paciencia y confianza, por no dudar ni un momento de mí, por su amistad, gracias.

A la Dra. Iliana Medina, por otorgarme su total confianza, sus consejos y su amistad.

Al personal del ISEA, en especial a la Dra. Cristina Mendoza y al Dr. Isidoro Rubio por habernos apoyado en una parte fundamental del proyecto y compartir sus conocimientos y amistad.

Al Dr. Mario Arzate, Indudablemente sin su ayuda no hubiera sido posible realizar este sueño, por compartir su conocimiento, por ayudarme sin condiciones, por ser mi amigo, gracias.

A todo el personal de INIFAP en especial a la Ing. Karla de Lira, el Dr. Guillermo Sanchez, la Maestra Olga Rivera, el Maestro Candelario Serrano y Arturo, sin su apoyo no hubiera sido posible realizar gran parte de éste trabajo.

Gracias Conacyt por el apoyo otorgado y UAA por la infraestructura facilitada.

A todos mis compañeros y Doctores(as) del Laboratorio de Toxicología y Biotecnología, Jesús, Josafath, Nancy, Susana, Anahí, Roberto, Juan, Lucila, Lupita, Julieta, Jimena, Mariana, Dalila, Diana, Coral, Cristy, Francisco, Johan, por todos los momentos compartidos.

INDICE GENERAL

Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Pesticidas.....	7
1.1.2 Reseña histórica de Pesticidas.....	7
1.1.3 Clasificación de los pesticidas.....	8
1.1.3.1 Clasificación por su grado de toxicidad.....	9
1.1.3.2 Clasificación por su vida media.....	10
1.1.3.3 Clasificación por su estructura química.....	10
1.1.3.3.1 Pesticidas Organoclorados.....	11
1.1.3.3.2 Pesticidas Organofosforados.....	11
1.1.3.3.3 Carbamatos.....	12
1.1.3.3.4 Piretrinas y piretroides.....	12
1.1.4 Contaminación por pesticidas.....	12
1.1.4.1 Iniciativas contra la contaminación.....	15
1.1.5 Situación de los pesticidas en México.....	16
1.2 Métodos para detección pesticidas en diversas matrices.....	17
1.2.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC/MS) y Microextracción en fase sólida (SPME).....	19
1.3 Medición de la exposición en el ambiente.....	20
1.3.1 Pruebas de toxicidad.....	20
1.3.2 Relación concentración – respuesta.....	21
1.4 Invertebrados acuáticos como organismos de prueba en toxicología.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivos particulares.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Determinación del grupo de pesticidas más utilizados en el estado de Aguascalientes.....	25
4.2 Análisis de Pesticidas en matrices diversas.....	26
4.2.1 Preparación del material.....	26
4.2.2 Estándares, reactivos y equipo.....	26
4.2.3 Aplicación de pesticidas y colecta de muestras.....	27
4.2.4 Extracción de pesticidas utilizando Microextracción en Fase Sólida (SPME).....	28

4.2.5 Extracción de pesticidas utilizando la técnica Rápida, Fácil, Barata, Efectiva, Robusta y Segura (QuEChERS).	29
4.3 Pruebas de toxicidad en invertebrados dulciacuícolas.....	29
4.3.1 Cultivos de <i>Alona cf. Guttata</i> (Cladocera: Chydoridae) y <i>Lecane papuana</i> (Rotifera: Monogononta).	29
4.3.1.1 Preparación de medios.	29
4.3.2 Prueba de toxicidad aguda para el cladócero <i>Alona cf. guttata</i>	30
4.3.3 Prueba de toxicidad aguda para el rotífero <i>Lecane papuana</i>	31
4.3.4 Prueba de toxicidad crónica para el cladócero <i>Alona cf. guttata</i>	32
4.3.5 Prueba de toxicidad crónica para el rotífero <i>Lecane papuana</i>	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Determinación de los pesticidas más utilizados en los principales cultivos del área de influencia del estado de Aguascalientes.	34
5.2 Pruebas de toxicidad aguda de los pesticidas Malatión, Cipermetrina, FAENA® y Glifosato en los invertebrados dulciacuícolas <i>Lecane papuana</i> y <i>Alona cf. guttata</i>	35
5.3 Pruebas de toxicidad crónica de los pesticidas Malatión, Cipermetrina y FAENA® en los invertebrados dulciacuícolas <i>Lecane papuana</i> y <i>Alona cf. guttata</i>	38
.....	39
5.4 Estandarización de métodos de cromatografía, específicos para la detección de residuos de pesticidas.	47
6. DISCUSIÓN.....	57
6.1 Pruebas de toxicidad aguda.	58
6.2 Pruebas de toxicidad crónica.	60
6.3 Detección de residuos de pesticidas.	63
6.3.1 Residualidad de los pesticidas en guayaba.	64
6.3.2 Comparación de la residualidad de pesticidas en la guayaba con otros frutos mexicanos.	67
6.3.3 Residualidad de pesticidas en suelos de huerto de guayaba.....	69
6.3.4 Riesgos en el humano por exposición a pesticidas aplicados en guayaba.	71
6.3.4 Técnicas SPME-GC-MS y QuEChERS-GC-MS.	72
6. CONCLUSIONES.....	73
7. REFERENCIAS.....	75
8. ANEXOS. Artículo y Carta de aceptación.....	91

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Clasificación de los pesticidas recomendada por la OMS.	9
Cuadro 2. Clasificación de los pesticidas según su vida media de efectividad semanas.	10
Cuadro 3. Clasificación de los pesticidas, según la familia química.	10
Cuadro 4. Lista de pesticidas prohibidos en México.	16
Cuadro 5. Lista de pesticidas restringidos en México.	17
Cuadro 6. Pesticidas autorizados en México y prohibidos en otros países.	17
Cuadro 7. Pesticidas más utilizados por los sistemas producto del estado de Aguascalientes.	34
Cuadro 8. Análisis de las pruebas de toxicidad aguda mostrada por dos especies zooplanctónicas con pesticidas.	36
Cuadro 9. Análisis de regresión para los pesticidas estudiados con una curva de calibración de 1 mg/L a 0.001 mg/L	48
Cuadro 10. Porcentaje de recuperación y desviación estándar (DE) de los pesticidas extraídos de guayaba y suelo a tres concentraciones	49
Cuadro 11. Reproducibilidad del método; desviación Estándar (DE) de los pesticidas extraídos de guayaba y suelo a tres concentraciones diferentes	50
Cuadro 12. Niveles de pesticidas (mg/L) en guayaba determinados a los días 0 (dos horas), 3, 7 y 10 después de la aplicación en el huerto virgen.	53
Cuadro 13. Niveles de pesticidas (mg/L) en Suelo circundante a árboles de guayaba determinados a los días 0 (dos horas), 3, 7 y 10 después de la aplicación en el huerto virgen.	54
Cuadro 14. Comparación de las técnicas de extracción de pesticidas QuEChERS y SPME en guayaba (mg/kg) con Paratión y Malatión determinados en los días 0 (dos horas) 3, 7 y 10 posterior a la aplicación de éstos.	56
Cuadro 15. Límites Máximos Residuales (mg/kg) de los pesticidas estudiados sobre guayaba en agencias internacionales.	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Movimiento de los pesticidas en el ambiente.	14
Figura 2. Frecuencia de uso de pesticidas en el estado de Aguascalientes.	35
Figura 3. Diferentes gráficas de regresión lineal para <i>L. papuana</i> a tres pesticidas.	37
Figura 4. Diferentes gráficas de regresión lineal para <i>A. guttata</i> a cuatro pesticidas.	38
Figura 5. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en <i>A. guttata</i> expuesta a cinco concentraciones diferentes de Cipermetrina	39
Figura 6. Tamaño de los neonatos nacidos de <i>A. guttata</i> expuesta a Cipermetrina. Cinco concentraciones diferentes de Cipermetrina fueron ensayadas.	40
Figura 7. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en <i>A. guttata</i> después de la exposición a cinco concentraciones diferentes de Malatión	41
Figura 8. Tamaño de los neonatos nacidos de <i>A. guttata</i> expuesta a Malatión. Cinco concentraciones diferentes de Malatión fueron ensayadas.	42
Figura 9. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en <i>A. guttata</i> expuesta a cinco concentraciones diferentes de Faena®.	43
Figura 10. Tamaño de los neonatos nacidos <i>A. guttata</i> expuesta a Faena®. Cinco concentraciones diferentes fueron ensayadas	45
Figura 11. Tasas intrínsecas de crecimiento de <i>L. papuana</i> expuesta a cinco concentraciones de los pesticidas estudiados (Malatión, Cipermetrina y Faena®).	46
Figura 12. . Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba virgen enriquecida con pesticidas a 0.05 mg/L, extraídos por SPME	47
Figura 13. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba colectada el día 0 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME	50
Figura 14. Croamatograma (en modo SIM) de una muestra de suelo colectada el día 0 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME	51
Figura 15. Croamatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba colectada el día 10 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME	52
Figura 16. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de suelo colectada el día 10 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME	52
Figura 17. Gráficas de regresión lineal correspondientes a la degradación de los pesticidas a través del tiempo en matrices de guayaba y suelo	55
Figura 18. Gráfica de regresión lineal correspondiente a la degradación del Malatión a lo largo de diez días	57

Resumen.

En Calvillo, Aguascalientes, México, existe preocupación especial por los pesticidas debido a su uso intenso en la producción de guayaba, éste tema tiene muchas áreas de estudio, algunas tratadas en este trabajo, cuyo primer objetivo fue evaluar el efecto de los pesticidas (Cipermetrina, Faena® y Malatión) en especies zooplanctónicas nativas: *Alona cf. guttata* (cladóceros) y *Lecane papuana* (rotíferos). Se realizaron pruebas de toxicidad aguda y crónica, se evaluaron CL50 y parámetros poblacionales. Los resultados de las pruebas agudas mostraron que *A. guttata* fue más sensible al Malatión (CL50 = 5.26×10^{-3} mg/L) en concentraciones encontradas en ambientes naturales. *L. papuana* fue más sensible a Faena® (CL50 = 19.89 mg/L). El crecimiento somático de *A. guttata* se inhibió por la exposición crónica a Cipermetrina. Además, la Cipermetrina y Faena® ejercieron efectos endocrinos sobre *A. guttata*. También, la exposición crónica al Malatión disminuyó significativamente la supervivencia de *A. guttata*. Finalmente, *L. papuana* se vio afectada crónicamente por los tres pesticidas. El segundo objetivo fue evaluar residualidad de los pesticidas (Captan, Carbofuran, Cipermetrina, Malatión, Metalaxil y Paratión Metílico) en huertos de guayaba de Calvillo, midiendo su distribución en fruta y suelo así como su degradación en 10 días; se propuso la implementación y/o modificación de Límites Máximos de Residuales (LMR) internacionales de guayaba. Los resultados mostraron la presencia de residuos de pesticidas 10 días después de la aplicación; en guayaba fueron Carbofuran, Metalaxil, Malatión y Paratión Metílico; en suelo fueron Carbofuran, Metalaxil, Malatión y Captan; la vida media de cada pesticida fue evaluada. Las concentraciones de algunos pesticidas encontrados a los 10 días en guayaba superan los LMR internacionales, otros no existen. La comparación de las concentraciones de pesticidas encontradas en este estudio con otros autores indicó que algunas frutas se cosechan en periodos inadecuados. Además, se evaluó la posibilidad de que las concentraciones en el suelo 10 días después de la aplicación, puedan causar daños a la biota terrestre y acuática. Finalmente se realizó una comparación entre dos técnicas de extracción de pesticidas: Rápida, Fácil, Barata, Efectiva, Robusta y Segura (QuEChERS, por sus siglas en inglés) y Microextracción en Fase Sólida (SPME, por sus siglas en inglés), ambas utilizando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), siendo aparentemente mejor SPME.

Abstract.

In Calvillo, Aguascalientes, Mexico, is a special concern about pesticides because of their intensive use on guava production, this issue has many important study areas treated in this work whose first aim was to assess the effect of pesticides on indigenous freshwater species: *Alona cf. guttata* (cladoceran) and *Lecane papuana* (rotifer). Acute and chronic toxicity tests were carried out, LC50 and poblational parameters were evaluated. The results of the acute toxicity tests showed that *A. guttata* was more sensitive to Malathion ($LC_{50} = 5.26 \times 10^{-3}$ mg/L) at concentrations found in natural environments, whereas *L. papuana* was more sensitive to Faena® ($LC_{50} = 19.89$ mg/L). The somatic growth of *A. guttata* was inhibited for the chronic exposure to Cypermethrin. In addition, Cypermethrin and Faena® seemed to exert endocrine disruptive effects on *A. guttata*. Moreover, Malathion chronic exposure significantly decreased the survival of *A. guttata*. Finally, *L. papuana* was affected chronically for the three pesticides. The second aim of this work was to assess pesticides residuality from agricultural activity into guava orchards belonging to Calvillo, evaluating the distribution of pesticides in fruit and soil and their degradation along 10 days; was proposed the implementation and/or modification of international Maximum Residue Limits (MRLs) mainly from guava. Results showed the presence of pesticide residues at 10 days after application; in guava were Carbofuran, Metalaxil, Malathion and Parathion-methyl; in soil were Carbofuran, Metalaxil, Malathion and Captan; the half-life of each pesticide was evaluated. The concentrations of some pesticides founded at 10 day in guava are exceeding some international MRLs and some of them are not even on some lists of MRLs. Comparing the concentrations found in this study with other studies indicated that some fruits are picked up at inadequate times. Moreover, we evaluated the possibility that the concentrations in soil 10 days after application, could cause damage to terrestrial and aquatic biota. Finally was performed a comparison between two extraction techniques for pesticides: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) and Solid Phase Micro extraction (SPME), both using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), being SPME apparently better.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Pesticidas.

Actualmente se ha hecho notoria una exigencia agrícola que viene derivada de las demandas de los consumidores por la necesidad cada vez más evidente de tener productos de la mejor calidad y en el mejor estado de conservación posible, por lo cual los productores se han visto obligados a utilizar diferentes sustancias químicas que ayuden a que sus productos sean del agrado de los consumidores, dichos productos químicos, entre otros, son los pesticidas, que en la actualidad son sumamente indispensables para diferentes finalidades, entre las cuales destacan: eliminar alimañas indeseables, cultivar en sitios donde es complicado por la presencia de otras plantas, mantener una producción constante, incrementar calidad y rendimiento, así como el periodo de almacenamiento. (Pérez, 2009).

Existen muchas definiciones para pesticida, una de ellas y en referencia al Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Pesticidas perteneciente a la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO, por sus siglas en inglés) (2003), un pesticida es la sustancia o mezcla de sustancias, que ha sido diseñada para destruir, controlar y prevenir plagas, dentro de las cuales se pueden citar vectores de enfermedades humanas o animales; especies no deseadas de insectos, plantas o animales que ocasionan un daño o que pueden ser capaces de propiciar alteraciones en productos que ya han sido cosechados, durante su almacenamiento o transporte e incluso cuando se ponen en venta; además de aquellas alimañas que puedan provocar daños a productos que no son de consumo, como la madera o forraje para animales.

1.1.2 Reseña histórica de Pesticidas.

Las plagas han sido un problema desde tiempos inmemorables, desde el inicio de la agricultura en el neolítico hasta los egipcios, cuya necesidad por evitar el contacto con insectos y alimañas los orilló a hacer uso de distintas infusiones y preparados para poderlos repeler; incluso hasta nuestro tiempo se ha mencionado la quema de ciertas sustancias para repeler insectos (Pérez, 2009). Existen ciertas similitudes entre los métodos tradicionales, utilizados a principios de la historia de la humanidad y los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizados el milenio pasado, incluso con los hoy en día vigentes. Se pueden remarcar tres etapas de la “evolución” del uso de los pesticidas; En la primera, durante el principio del siglo XIX, se comenzaron a utilizar bastantes elementos naturales (como el azúfre) que en sí, no tenían una gran acción toxicológica sobre las plagas y además de ello son recalcitrantes, actualmente ya su uso es nulo y además se vieron sustituidos por sustancias provenientes de algunos extractos como los de las flores de pelitre y las piretrinas, cuyas moléculas se degradan más fácilmente y no son tan persistentes (Pérez, 2009).

Durante la segunda guerra mundial se ubica la segunda etapa de “evolución” del uso de pesticidas, en la cual se prohíbe el paso de ciertos productos nitrogenados a Alemania, ya que algunos de ellos eran materia prima que podía servir para la fabricación de explosivos; fue entonces cuando Alemania se ve en la necesidad de fabricar sus propias materias primas, de tal manera que amplía la producción de amoníaco y con ello la producción de distintos derivados, entre ellos los pesticidas, partiendo de éste punto de la historia se dispara la producción de los pesticidas más utilizados durante la segunda mitad del siglo XX, los organoclorados (Gavrilescu, 2005).

La última etapa continúa hasta la actualidad, donde se tienen una gran variedad de opciones para utilizar como pesticidas, muchos de ellos cuya finalidad inicial era la de matar soldados durante la guerra y que se siguieron utilizando como pesticidas. Uno de los principales pesticidas protagonista de esa época fue el DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano) que en 1977 se prohíbe por su alta persistencia, bioconcentración y biomagnificación y su permanencia en matrices donde su toxicidad era inminente, aún después cuarenta años que fué prohibido su uso, siguieron habiendo hallazgos del mismo en concentraciones pequeñas en diferentes tipos de muestras. Finalmente se comienza la producción de grupos de pesticidas ambientalmente más “amigables” y comienzan a tomar auge las piretrinas y los piretroides, que bajo la investigación científica muestran menos riesgo a la salud que los mencionados organoclorados (Pérez, 2009).

1.1.3 Clasificación de los pesticidas.

Existen diferentes clasificaciones sobre las cuales podemos integrar a los pesticidas, el englobarlos en una sola categoría es algo muy complicado. Podemos hablar de ellos en cuanto a su mecanismo de acción o toxicidad, la vida media en el ambiente,

de acuerdo a qué tipo de plaga va dirigido, campo de aplicación etc. Por ejemplo, la clasificación de acuerdo al tipo de plaga que va dirigido, podemos mencionar insecticidas, herbicidas, rodenticidas, molusquicidas, dependiendo del organismo que se quiera atacar (USEPA, 2017). De acuerdo a la vida media en el ambiente, el pesticida puede ser no persistente, que es mucho más fácil que se degrade en poco tiempo (de un día hasta 4 meses), luego siguen los pesticidas considerados moderadamente persistentes (que pueden durar desde un mes hasta un año y medio) y finalmente los persistentes cuya duración en el ambiente puede ser de más de veinte años (Ramírez y Lacasaña, 2001). Así pues, podemos limitar la clasificación únicamente en función de las características principales que nos conciernen, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso.

1.1.3.1 Clasificación por su grado de toxicidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, por sus siglas en inglés), en 2010, dió a conocer la clasificación de pesticidas de acuerdo a su toxicidad, cuyo principal parámetro fue establecido por medio de las dosis letales medias (DL50), , también puede ser medido por medio de la concentración letal media (CL50). Se toman en cuenta condiciones que pueden estarse refiriendo al ambiente, vía de exposición, estado del agente tóxico entre otras.

Cuadro 1. Clasificación de los pesticidas recomendada por la OMS (WHO, 2010).

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	líquidos
Extremadamente tóxicos	<5	<20	<10	<40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Ligeramente tóxicos	>500	>2000	>1000	>4000

1.1.3.2 Clasificación por su vida media.

Por su vida media, los pesticidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Briggs, 1992) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de los pesticidas según su vida media de efectividad en semanas (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, Diazinón, Carbarilo, Diametrín.
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, Lannate.
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, Aldrín, Dieldrín.
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo y arsénico

1.1.3.3 Clasificación por su estructura química.

Existen una gran cantidad de familias de pesticidas que podemos encontrar clasificados de acuerdo a sus estructuras químicas, dónde en su mayoría se encuentran compuestos orgánicos y unos pocos inorgánicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los pesticidas, según la familia química (Miller, 2002).

Tipo	Ejemplos	Persistencia	Biomagnificable
Insecticidas:			
Organoclorados	DDT, aldrin, dieldrin, toxafeno, lindano, clordano, metoxicloro, mirex.	Alta (2-15 años).	Si
Organofosforados	Malatión, Paratión, diazinon, TEPP, DDVP, mevingfos.	Baja a moderada (1-12 semanas) algunos duran años.	No
Carbamatos	Aldicarb, carbarilo, propoxur, maneb, zineb.	Baja (días a semanas).	No
Botánicos	Rotenona, piretrum, pirotróides sintéticos y rotenoides.	Baja (días a semanas).	No
Micro-botánicos	Varias bacterias, hongos y protozoarios.	Baja (días a semanas).	No

Herbicidas:

Químicos de contacto	Atrazina, simazina, y paraquat, 2,4-D, 2,4,5-T,	Baja (días a semanas).	No
Químicos sistemáticos	Silvex diuron, daminosida, alaclor y Glifosato	Muy baja (días a semanas).	No
Esterilizantes del suelo	Trifualin, difenamida, dalapon, butilato.	Baja (días)	No

Fungicidas :

Químicos varios	Captan, pentacorfenol, zeneb, bromuro de metilo, bisulfuro de carbón.	Muy alta (días).	No
-----------------	---	------------------	----

Fumigantes

Químicos varios	Tetracloruro de carbono, dibromuro de etileno, bromuro de metilo.	Muy alta	Si (la mayoría)
-----------------	---	----------	-----------------

1.1.3.3.1 Pesticidas Organoclorados.

Los organoclorados son pesticidas que en gran parte han caído en desuso por causas multifactoriales, se consideran representativos del DDT, y existen algunos como el Endosulfán y el Lindano se siguen utilizando en muchas partes del mundo. Son sustancias altamente lipofílicas y gracias a esta característica son capaces de acumularse en diversos tejidos. Son compuestos orgánicos clorados, lo cual los hace tener ciertas propiedades particulares como su insolubilidad en agua, pero solubles en solventes orgánicos, son relativamente estables fisicoquímicamente, por lo tanto se consideran recalcitrantes, lo que puede significar que algunos de éstos compuestos tienen la capacidad de permanecer en el ambiente por periodos de tiempo largos desde tres hasta treinta años (como es el caso del DDT) (Al-Saleh, 1994; OMS, 1990).

1.1.3.3.2 Pesticidas Organofosforados.

La familia de los pesticidas organofosforados (OF), Son sustancias que han sido sintetizadas en miles de formas para diferentes propósitos, todos ellos con un enlace fosforil o tiofosforil, son ésteres del ácido fosfórico, fosfónico y fosfínico con variadas combinaciones, usualmente poseen actividad anti-acetil colinesterasa, algunos de los más

comúnmente utilizados como pesticidas son el Malatión, Paratión, Diazinon, Metamidofos, etc. (Gupta, 2011).

1.1.3.3 Carbamatos.

Los carbamatos son ésteres del ácido carbámico, no son tan complejos como los organofosforados y se consideran más seguros que éstos, por lo que son más utilizados como pesticidas de huertos y jardines y algunos de ellos como drogas terapéuticas en medicina y veterinaria; usualmente se utilizan como herbicidas y otros como los derivados del ácido tiocarbámico cuya aplicación suele ser contra plagas fúngicas. Entre los más comunes se encuentran el Aldicarb, Carbofuran, Carbarilo, Carbyl, etc. (Gupta, 2011).

1.1.3.4 Piretrinas y piretroides.

Éste grupo de pesticidas se consideran derivados de la flor del crisantemo, cuyo polvo contiene del 1 al 3% del principio activo. Existen diferentes tipos, con diferentes grados de efectividad y selectividad, no se consideran tan tóxicas con organismos que no son blanco. La diferencia entre las piretrinas y los piretroides es que las primeras son consideradas de origen natural, mientras que los piretroides son sintéticos; en cuanto a su metabolismo, las piretrinas se metabolizan rápidamente y no son recalcitrantes, mientras que los piretroides son considerados más potentes. Ambos tipos son metabolizados de la misma manera, por medio de reacciones (conjugación, hidrólisis, etc) que los polarizan para ser más fácilmente excretables y no se acumulen en tejidos. No son considerados acumulables tampoco en suelo, ya que a pesar de que se pueden adsorber fácilmente en éste, con el agua se pueden eliminar sin dificultad. Uno de los principales grupos químicos de ésta categoría de pesticidas son el alfa-ciano y algunos de los más comunes son la Cipermetrina, Permetrina, Fenvalerato, etc. (Ramírez y Lacasaña, 2001).

1.1.4 Contaminación por pesticidas.

La contaminación es un tema de controversia actual, ya que involucra todo tipo de sustancias que son de uso común en la vida diaria, parte de éstas sustancias son los pesticidas, los cuales como hemos mencionado se encuentran clasificados en distintas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

categorías, por lo que dentro de ellos podemos encontrar una gran cantidad de componentes orgánicos que pueden ser de peligro para el ambiente, a pesar de que muchos de ellos han sido diseñados para ser selectivos, nada nos puede asegurar que lo sean al 100%, trayendo como consecuencias distintos problemas, como efectos indeseados en especies no blanco, además de generarse resistencia en ciertos organismos y la residualidad en el ambiente que conlleva a contaminación de diversas matrices como agua, suelo y aire (Sato *et al.*, 2004).

El humano se puede ver afectado de diversas maneras, la más común por la exposición directa a éstas sustancias, lo cual puede ocurrir en la aplicación directa sobre los cultivos o durante las actividades post cosecha sobre los frutos, es decir, en su transporte, almacenaje y consumo; aunado a esto pueden estar afectando fauna o flora que sirve de consumo humano; también es bien sabido que los pesticidas no necesariamente permanecen en los sitios de aplicación, sino que pueden ser trasladados a otros puntos por el viento (Bouguerra, 1988).

El ejemplo mayormente conocido de pesticidas recalcitrantes es el de los organoclorados, cuya persistencia en el ambiente puede ser de hasta 30 años. Su estructura química los hace muy estables y resistentes a cambios tanto físicos como químicos; éste favorecimiento por permanecer en el ambiente los hace más fácilmente incorporables a cadenas tróficas y su subsecuente bioacumulación y biomagnificación. (Tuormaa, 1995).

Un ambiente puede verse afectado de diversas maneras al ser contaminado, lo cual ocurre por aplicación directa y arrastre de aire o agua, además de las posibles lixiviaciones y el lavado de material que se utiliza para la aplicación de los pesticidas, dejando contaminación en diversas matrices (agua, suelo, aire, frutos, hojas etc.); cuando se ve alterado el equilibrio de éstas matrices, se pueden evidenciar distintos escenarios que son producto de los efectos negativos de la contaminación, como el daño sobre las cadenas tróficas por la eliminación de o decremento de ciertos organismos que son considerados plagas y que sin embargo son parte fundamental en la cadena, como consumidores de detritus orgánico o como parte de algún ciclo biogeoquímico siendo vitales en el ambiente. Si es eliminada alguna especie, puede conllevar además a efectos como el desarrollo de otras especies que se consideran “enemigas” de las primeras provocando entonces más efectos que llevan a alteraciones en el equilibrio normal del ambiente. Lo

anterior mencionado puede desencadenar en un ciclo que tras repetirse varias veces puede conllevar a incrementar los efectos indeseados en el ambiente. El hecho de que un pesticida permanezca en una concentración constante en el ambiente puede favorecer la contaminación de vegetales, suelos, animales (que pueden formar parte de una cadena de biomagnificación) e incluso el agua, todo esto reforzando el ciclo (Tuormaa, 1995; Rea, 1996; Clement *et al.*, 1999). La figura 1 resume el movimiento de los pesticidas en el ambiente.

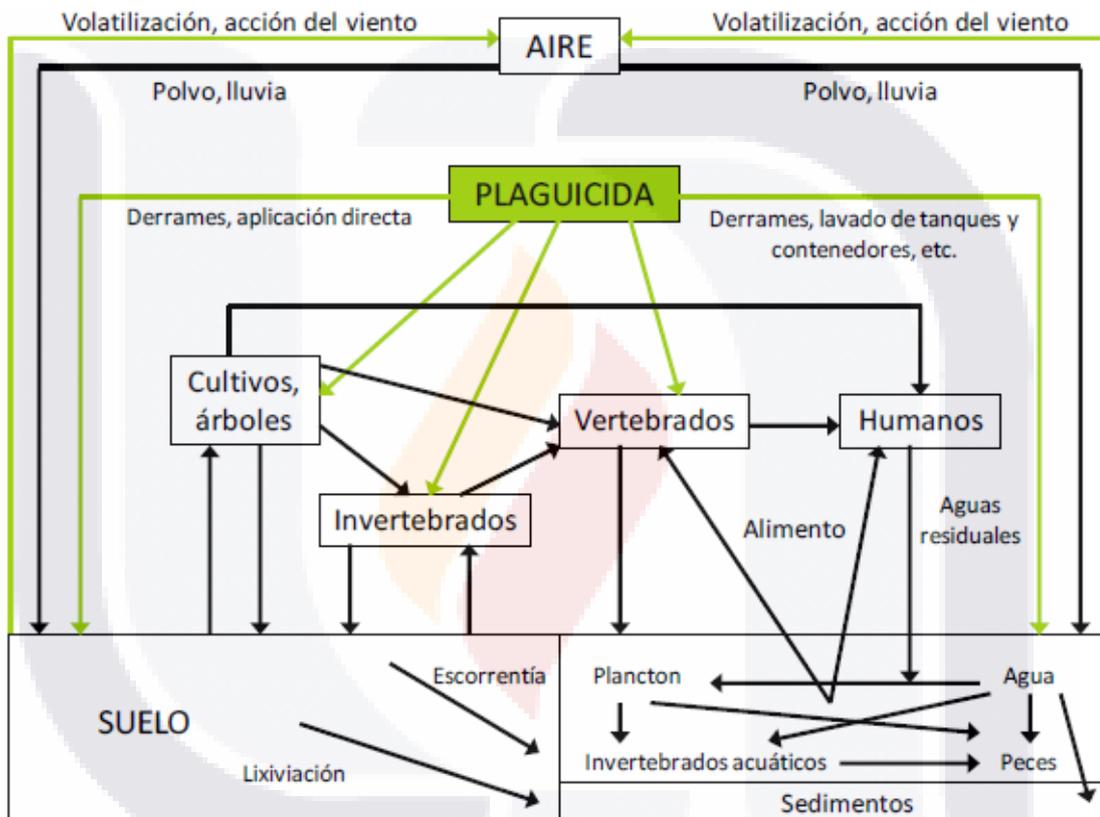


Figura 1. Movimiento de los pesticidas en el ambiente (Gavrilescu, 2005).

Un pesticida no es utilizado en cuanto se fabrica, por muy efectivo que sea, debe de pasar una batería de pruebas que demuestren que es inocuo tanto para el ambiente como para organismos vivos (diversos animales vertebrados e invertebrados). Debido a que tanto los productos que se aplican como pesticidas y sus respectivos productos de degradación de los mismos pudieran estar presentes de manera residual en los productos de cosecha, los países han emitido niveles máximos permisibles de éstos por cada producto de cosecha y es tarea de entidades gubernamentales hacerlo. Sin embargo cuando no existe conocimiento por parte de los productores de la peligrosidad del mal

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

uso de los pesticidas, éstos se convierten en un riesgo inminente para los humanos y el ambiente en general (Guerrero, 2003), sobre todo cuando los pesticidas utilizados no son permitidos por las entidades respectivas como el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) o no incluidos en los catálogos de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Pesticidas y Sustancias Tóxicas. (CICOPLAFEST).

Por tanto, es muy preocupante que los pesticidas que quedan como residuos en los alimentos afecten de manera crónica la salud humana y en los casos mas extremos de forma aguda (Camino-Sánchez *et al.*, 2011); claramente la exposición y las dosis harán que haya variación en cuanto a los efectos, tanto en el tiempo en el que se presentan como en su intensidad y el tipo de sintomatología, pudiendo tener desde neuropatías retardadas (Saunders y Harper, 1994; Repetto, 1995) hasta desregulación de las hormonas reproductivas (reducción significativa en los niveles de testosterona libre), reportadas por Ayotte *et al.* (2001) y De Jager *et al.* (2006).

1.1.4.1 Iniciativas contra la contaminación.

En la década de 1960, fue publicado el libro “La primavera silenciosa”, producto del trabajo de Rachel Carson, donde se argumentaba que el pesticida DDT, se encontraba afectando la salud de organismos vivos y que además estaba ligado a cánceres y mutaciones genéticas, esto debido a los años de uso del mismo y su lenta degradación en el ambiente, éste trabajo fue pionero y revolucionario en su tipo, ya que muy pocas personas se habían preocupado por el bienestar ambiental. Ante tales declaraciones, las compañías productoras de sustancias químicas emitieron en respuesta publicidad amañada, donde argumentaban que la suspensión del uso del pesticida desencadenaría un incremento en enfermedades causadas por proliferación de insectos y alimañas, sin embargo el gobierno norteamericano asesorado por un comité científico logra corroborar lo que Carson encontró, lo que terminó en la prohibición del uso del DDT en USA (Garza-León y Medina-Ramírez, 2010).

1.1.5 Situación de los pesticidas en México.

En México se han usado pesticidas agrícolas desde fines del Siglo XIX. Hasta mediados del siglo pasado se utilizaban cerca de 40 compuestos de tipo botánico o inorgánico, entre éstos, arseniato de plomo, aceto-arseniato de cobre (Verde de París) y una mezcla de sulfato de cobre y cal conocida como Caldo Bordelés (Albert, 2004). Actualmente se emplean 260 marcas de productos químicos de las cuales 24 están prohibidas y 13 restringidas, siendo las principales causas de intoxicación debido a las deficientes medidas de control y previsión (De Lira *et al.*, 2016); sobre esto, Albert (2004) menciona un mayor uso de los herbicidas (Paraquat, Glifosato), seguidos de insecticidas (organofosforados: Paratión Metílico, Metamidofos, Malatión) y fungicidas (Mancozeb y Clorotalonil). La importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de los siguientes pesticidas (Cuadro 4), han sido prohibidos en México conforme al Diario Oficial de la Federación del 3 de enero de 1991.

Cuadro 4. Lista de Pesticidas Prohibidos en México (Diario Oficial de la Federación, 1991).

Pesticidas Prohibidos

Acetato o propionato de fenil	Dialifor	Fumisel
Mercurio	Dieldrina	Kepone/Clordecone
Acido 2,4,5-T	Dinoseb	Mirex/Monuron
Aldrina	Endrina	Nitrofen
Cianofos	Erbon	Schradan
Cloranil	Formotion	Triamifos
DBCP	Fluoroacetato de sodio (1080)	

Existen también pesticidas Autorizados pero cuyo uso ha sido restringido en el catálogo oficial de pesticidas publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 1991 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Lista de Pesticidas Restringidos en México (Diario Oficial de la Federación, 1991).

Pesticidas Restringidos		
DDT	Mevinfos	Quitozeno
BHC	Paraquat	Dicofo
Aldicarb	Pentaclorofenol	Forato
Lindano	Metoxicloro	

Pesticidas autorizados en México y prohibidos en otros países, se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Pesticidas autorizados en México y prohibidos en otros países (Pérez-Olvera *et al.*, 2011).

Pesticidas Autorizados		
Alaclor	Captan	Tridemorph
Methamidophos	Oxyfluorfen	Maneb
Azinphos methyl	Methyl-parathion	Methidathion
Monocrotophos	Quintozene	Captofol
Captan	Phosphamidon	Mevinphos
Omethoate	Paraquat	Diuron
Phorate	Triazophos	Linuron
2,4,D	Endosulfan	Sulfopros
Kadethrin	Carbaryl	

Los Límites Máximos de Residuales (LMR) de Pesticidas indican la cantidad máxima de residuos de un pesticida en un producto, basándose en estudios de ingesta diaria promedio de ese alimento y en la toxicidad de ese pesticida en particular (Codex Alimentarius, 2017).

1.2 Métodos para detección pesticidas en diversas matrices.

Para poder determinar si existe una sustancia en particular en alguna matriz cualquiera, es necesario conocer algunas de las principales características de la muestra para poder elegir de manera adecuada el mejor método para detectarla, en éste caso en particular, para poder medir la cantidad de un pesticida, es necesario saber de qué tipo de

pesticida se trata, la matriz que lo contiene (fruto, suelo, agua, etc.), sus propiedades físicas y químicas, etc. Actualmente existen muchos métodos que difieren en sus principios para detectar sustancias y que sin embargo unos son mejores que otros, dependiendo de las características de la matriz y el analito. Por mencionar algunos, podemos listar en primera instancia los métodos de extracción y preconcentración, los cuales generalmente van de la mano con técnicas de detección más complejas, es decir que casi siempre son útiles, independientemente de la técnica final de detección que se utilice, con ésta metodología, como su nombre lo dice, se preconcentra el analito y se separa de la matriz para posteriormente detectarlo y cuantificarlo con alguna otra técnica, los métodos de extracción y preconcentración más comunes son Extracción líquido – líquido, extracción en fase sólida (SPE), Microextracción en fase sólida (SPME), técnicas inmunológicas, entre otras. Usualmente éstas técnicas de extracción son un paso previo para el uso de otra técnica de detección y cuantificación; dentro de las más utilizadas podemos citar las técnicas cromatográficas, que son las mayormente utilizadas y que tienen una gran variedad de opciones, que son aplicables a un gran número de moléculas con diferentes características fisicoquímicas, por citar algunas de las más utilizadas: La Cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) es una excelente técnica con muy buena sensibilidad, sin embargo en muchas ocasiones requiere de la derivatización del analito a determinar. La Cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS), es una técnica que se puede utilizar para la detección de sustancias polares, sin embargo, con matrices complejas no es muy funcional (Zuehlke *et al.*, 2004). La Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ofrece una buena sensibilidad y mucho mejor selectividad para la identificación y cuantificación de contaminantes que estén presentes en concentraciones trazas, utilizado ampliamente en la detección de pesticidas (Zuehlke *et al.*, 2004).

Además de los métodos antes mencionados, existe toda una batería de técnicas que pueden ser aplicadas para la determinación de pesticidas en diversas muestras, sin embargo, se han mencionado aquellas que se han utilizado con mayor frecuencia. Cabe mencionar que muchos autores han preferido métodos cromatográficos como GC/MS, LC/MS, HPLC, LC-ESI-MS, LC-MS/MS para detección de pesticidas y sustancias como fármacos en diversas matrices, debido a que son métodos que requieren poco tiempo de

proceso y en muchos casos cuando se tiene el equipo no es tan costoso llevarlos a cabo (Zuehlke *et al.*, 2004).

1.2.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC/MS) y Microextracción en fase sólida (SPME).

Esta técnica se trata del uso simultáneo de dos métodos instrumentales, como su nombre lo menciona, el primero de ellos es el cromatógrafo de gases (GC), que se encarga de separar los componentes de una mezcla determinada y el segundo es el espectrómetro de masas (MS), que funciona como un detector de moléculas, pero no sirve para detectar moléculas en mezclas, de tal suerte que ambos se complementan (Herbert y Johnstone, 2003). La cantidad de trabajos existentes con el uso de éste acoplamiento de técnicas es enorme y variada, muchos de éstos estudios han sido realizados o implementados para la detección de pesticidas. Velicu y Suri (2008) detectaron la presencia de hormonas esteroides y antibióticos en aguas residuales rurales y urbanas. Kuster *et al.*, (2008) analizaron la ocurrencia de fármacos, estrógenos, progestágenos y pesticidas de naturaleza polar en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, ríos y agua potable. Hayes *et al.*, (2006) detectaron mezclas de pesticidas relacionados con la disrupción endócrina y el declive de los anfibios. Yang *et al.*, (2006) establecieron una automatización completa de la técnica SPME, utilizando la derivatización para una determinación simultánea de sustancias químicas que funcionan como disruptores endócrinos y hormonas esteroides. Hudson *et al.*, (2007) determinaron acetona en aguas marinas con ayuda de la derivatización. Henriksen *et al.*, (2001) realizaron análisis sobre pesticidas de carácter ácido usando SPME. Canosa *et al.*, (2005) optimizaron las condiciones necesarias en SPME para aplicarla a la detección de triclosán en muestras acuosas. Rodríguez *et al.*, (2004) también aplicaron SPME para la determinación de fármacos antiinflamatorios. Lamas *et al.*, (2004) detectaron serotonina en muestras de diversos ambientes acuáticos. Todos los trabajos anteriormente mencionados requirieron del uso de GC-MS para poder hacer las detecciones, la mayoría de ellos utilizando el acople de otra técnica de preconcentración como la SPME. Así pues el uso de éste equipo provee a sus poseedores de una herramienta muy versátil que se puede aplicar a diversos campos de la ciencia.

La elección de una técnica analítica adecuada para la determinación de pesticidas depende de una variedad de factores incluyendo las propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, costo, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis. En la actualidad, la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente utilizada para el análisis multiresidual de pesticidas en diversas matrices, dada su elevada sensibilidad y selectividad en la detección de este tipo de compuestos. El detector selectivo de Espectrómetro de Masas (MS) es una excelente alternativa para la determinación e identificación de numerosos pesticidas de diferentes familias por lo que, en la actualidad, su uso resulta necesario para abordar con garantía el análisis de residuos de pesticidas volátiles, apolares y térmicamente estables (Alpendurada, 2000; Soboleva *et al.*, 2004).

1.3 Medición de la exposición en el ambiente.

La medición de la exposición y la posibilidad de establecer un gradiente dosis-respuesta son aspectos relevantes en los estudios sobre pesticidas. Medir la exposición a pesticidas en un individuo o en una población determinada es complejo, pues está influenciada por factores como la diversidad de productos comercializados, su uso indiscriminado, la multiplicidad de las fuentes de exposición y la variación en la intensidad y la duración de la exposición en un lapso de tiempo. Todos estos aspectos escapan al control del investigador y, generalmente, se carece de información completa y oportuna sobre ellos. Diversos estudios epidemiológicos han usado de forma combinada algunas herramientas de medición, como la historia de exposición, la evaluación de expertos, la monitorización ambiental y biológica, con el propósito de lograr una mayor precisión al medir la exposición (Ramírez y Lacasaña, 2001); sin embargo también existen estudios sobre la toxicidad de estos compuestos y dependen extensivamente de la utilización de invertebrados, se trata de las pruebas de toxicidad (Guilhermiro *et al.*, 1999).

1.3.1 Pruebas de toxicidad.

Las pruebas de toxicidad se utilizan para detectar y evaluar los efectos toxicológicos potenciales de los agentes químicos sobre organismos de prueba, los cuales pueden ser acuáticos. Estos efectos no siempre son perjudiciales, una función de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pruebas es identificar los agentes químicos que pueden tener efectos adversos en los organismos, así se pueden evaluar los riesgos asociados con las situaciones donde el agente químico, el organismo y las condiciones de exposición están definidas (Rand y Petrocelli, 1985).

Las pruebas de toxicidad permiten la construcción de bases de datos para la comparación de la sensibilidad de las especies a los contaminantes o de la toxicidad de un grupo de compuestos en una especie en particular, de una manera rápida y económica. Además pueden ser utilizadas para determinar índices de calidad ambiental, evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental (Ramírez y Mendoza, 2008).

Se deben comparar las concentraciones de exposición con las concentraciones a las que la sustancia es tóxica. Si la proporción entre el valor de CL50 (Concentración letal media) y su concentración de exposición en el medio ambiente es cercana a 1, entonces hablamos de un riesgo ecológico (Martínez-Jerónimo y Rico-Martínez, 2009).

La concentración letal media (CL50) de una toxina, radiación o patógenos, es la dosis o cantidad requerida para matar a la mitad de los miembros de una población de prueba luego de un periodo de exposición de tal manera que una baja CL50 es indicativo de una alta toxicidad (Canada.ca, 2018). En los organismos acuáticos como los rotíferos, la CL50 permite comparar la sensibilidad entre los organismo de prueba, sea de la misma especie o no, sin embargo este valor no debe de ser asumido como una constante, pues se sabe que cepas de la misma especie pueden presentar diferencias en sensibilidad a un mismo tóxico (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2008).

1.3.2 Relación concentración – respuesta.

Se trata de la relación cuantitativa entre la concentración del compuesto químico al cual es expuesto el organismo y la magnitud del efecto nocivo que se produce, ésta relación constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por la liberación de sustancias tóxicas en el medio ambiente. Cuando en la evaluación de una sustancia tóxica se obtiene una respuesta de magnitud definida para cada concentración, se dice que la respuesta es gradual, esto significa que para diferentes concentraciones se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observarán respuestas que variarán de forma continua y tendrán un valor por cada concentración (Díaz, 2004).

1.4 Invertebrados acuáticos como organismos de prueba en toxicología.

El uso de invertebrados acuáticos para valorar el efecto de sustancias tóxicas en un ecosistema acuático es muy válido ya que estos organismos son de gran importancia como consumidores primarios en éstos ecosistemas, además de la enorme sensibilidad que presentan a una amplia variedad de sustancias tóxicas. Tomando en cuenta la sensibilidad, especialmente en el caso de los rotíferos, es mayor comparada con la de otras especies tradicionalmente utilizadas en toxicología acuática (Rico-Martínez *et al.*, 2001).

La actividad de los rotíferos se puede ver comprometida por la contaminación del agua, ya que los rotíferos son sensibles a muchos tóxicos, que si bien, no en todos los casos causan su muerte, algunos estudios han demostrado que la exposición constante, tiene como efecto la bioconcentración de ciertos tóxicos e incluso su probable biomagnificación, ya que los organismos los incorporan a sus tejidos y se transfieren a los depredadores (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente, existe una gran preocupación debido a la contaminación antropogénica por pesticidas en el ambiente. El comportamiento y destino final de estos contaminantes se está convirtiendo en un tema central dentro de las investigaciones en el área de toxicología y remediación ambiental, a pesar de que los avances científicos han permitido a la industria producir ingredientes activos de pesticidas menos agresivos y menos persistentes en el ambiente, no se conoce a ciencia cierta el comportamiento de su degradación y por tanto su posible biodisponibilidad.

La peligrosidad de estos compuestos puede afectar tanto a las personas implicadas en su fabricación y formulación, como al agricultor que está en contacto con ellos, al ambiente y al ser humano en general. Así, se han detectado residuos de pesticidas en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

multitud de alimentos (vegetales principalmente), aguas, suelos y fluidos biológico, entre otros (Berrada *et al.*, 2003); existen algunos reportes sobre los efectos secundarios de estos contaminantes en organismos acuáticos, los cuales son numerosos y variados (Howard, 1993).

En el sector agropecuario, la política en materia de inocuidad está orientada a ofrecer a los consumidores productos inocuos y a coadyuvar en la productividad y comercialización de productos agrícolas. El comercio internacional de frutas y hortalizas frescas ha crecido de manera sistemática y representa el principal rubro de exportación, sin embargo ha habido casos de rechazo en la exportación de frutas y hortalizas, debido principalmente al uso de pesticidas no permitidos o al uso excesivo de los permitidos; uno de los principales criterios para asegurar la calidad de los productos y la salud humana es el Límite Máximo Residual (LMR) de estos pesticidas, que permite la circulación de las frutas en el mercado y su venta, siempre que no sean excedidos. Si se exceden estos límites, esto corresponde a una alerta de malas prácticas agrícolas y un riesgo inminente de toxicidad aguda y crónica (Nasreddine y Parent-Massin, 2002). En México, los LMR emitidos por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (COFEPRIS, 2016) no están bien establecidos para la guayaba, o incluso peor, los LMR no existen. A veces se exceden los LMR de COFEPRIS y como resultado, algunos LMR internacionales; incluso cuando no se exceden estos límites, varios residuos pueden estar presentes en el mismo producto y tener efectos sinérgicos que aumentan el riesgo ambiental (Van der Hoff y Van Zoonen, 1999; Pérez *et al.*, 2009).

Aunado a lo anteriormente mencionado, poco se sabe de cómo éstos productos afectan a los organismos no diana tanto terrestres como acuáticos, alterando la abundancia de las especies y la estructura del ecosistema (Beketov *et al.*, 2013). Se ha reportado que contaminantes en ecosistemas acuáticos en concentraciones tan bajas como algunos nanogramos por litro puede causar daño a la biota y modificar las interacciones dentro de las redes tróficas; por lo tanto, es importante usar marcadores para evaluar el riesgo ambiental asociado al uso de los pesticidas y su exposición (Rebechi *et al.*, 2014).

En Calvillo, Aguascalientes, México, se han aplicado varios pesticidas durante décadas debido a su alta producción de guayaba (Mendoza *et al.*, 2015). Actualmente se utilizan más de 10 productos químicos para la producción del fruto; algunas políticas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nacionales y principalmente internacionales sobre salud y seguridad han cambiado y se han establecido más restricciones legales para prevenir la acumulación de residuos de pesticidas en los productos agrícolas (De Lira *et al.*, 2016); por lo que es urgente evaluar los LMR ya que los residuos de estos pesticidas puede estar presente en las frutas que se comercializan y exportan; Además, estas concentraciones pueden estar afectando a las personas que viven cerca de los cultivos (Mendoza *et al.*, 2015) y como se ha mencionado también a los organismos no diana, tanto terrestres como acuáticos (Garza-León *et al.*, 2017). En el último caso es bien conocido que en Calvillo muchos de los huertos de guayaba se encuentran rodeando cuerpos de agua y pueden estar contaminándolos con pesticidas, pues se ha reportado que algunos productores realizan aplicaciones muy frecuentes (De Lira *et al.*, 2016).

Por lo tanto, con éste proyecto se pretende: a) evaluar la residualidad de los pesticidas más usados en Calvillo Aguascalientes en cultivos de guayaba, b) para lo anterior se utilizará una técnica de microextracción en fase sólida (SPME) que a su vez se propondrá como alternativa para extracción de pesticidas en lugar del método QuEChERS (the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) por sus siglas en inglés, utilizado en algunas instituciones de salud gubernamentales en México, c) determinar el riesgo de que los LMR internacionales y los de COFEPRIS estén sobrepasados, d) estimar el riesgo que representa el uso de éstos pesticidas en otros huertos frutales cultivados en México, e) monitorear la residualidad de los pesticidas en suelo y su posible movilización y toxicidad para biota terrestre y acuática f) así mismo implementar pruebas de toxicidad aguda y crónica para evaluar el impacto de pesticidas comúnmente utilizados en Calvillo Aguascalientes en especies nativas de agua dulce, g) de las pruebas anteriores, determinar concentraciones letales, efectos en procesos de reproducción e inferir posibles efectos disruptores endócrinos o de hormesis en los organismos de prueba.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1 Objetivo general.

Estudiar la localización, distribución y efectos adversos mediante pruebas en el laboratorio con invertebrados dulciacúcolas de tres pesticidas selectos de importancia en cultivos de guayaba en el Municipio de Calvillo, Aguascalientes.

3.2 Objetivos particulares.

Determinar los pesticidas más utilizados en los cultivos de guayaba en el Municipio de Calvillo, Aguascalientes.

Evaluar la residualidad de los pesticidas mayormente aplicados en los cultivos de guayaba mediante métodos biológicos y/o instrumentales.

Implementar pruebas con especies nativas de invertebrados dulciacúcolas para la evaluación de la toxicidad de tres pesticidas utilizados en el Municipio de Calvillo, Aguascalientes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Determinación del grupo de pesticidas más utilizados en el estado de Aguascalientes.

Fueron utilizados como fuente de información los datos proporcionados por los gerentes y/o presidentes de los 8 sistemas producto distribuidos en el estado de Aguascalientes: Guayaba, Vid, Ajo, Chile, Nopal, Durazno, Maíz y Hortalizas. A los cuales se les consultó sobre los pesticidas que utilizan los productores más frecuentemente y en mayores cantidades, de acuerdo a los tipos de cultivo y la normatividad.

4.2 Análisis de Pesticidas en matrices diversas.

4.2.1 Preparación del material.

Los instrumentos y materiales de vidrio a utilizar llevan un tratamiento previo para evitar fluctuaciones en los resultados:

Se lavan con agua y jabón, posteriormente se enjuagan con agua de la llave, hasta que todo el detergente desaparezca, luego se enjuagan con 10 mL de acetona (grado ACS) sin permitir que la porción de teflón de la tapa entre en contacto con la acetona (en el caso de las botellas), posteriormente se enjuagan con agua desionizada, hasta que ya no desprendieran olor a acetona, finalmente se escurren, y son colocados en una estufa 30-60 minutos a 120°C, para después taparlos y almacenarlos en un ambiente libre de polvo hasta su uso (Csuros, 1994).

4.2.2 Estándares, reactivos y equipo.

Los estándares fueron adquiridos de distintas casas comerciales y diferentes purezas como se menciona a continuación: Carbofuran (99.5% de pureza), Cipermetrina (99.2% de pureza), Malatión (97.1% de pureza) y Paratión Metílico (98.4% de pureza) fueron adquiridos de Chem Service, West Chester, PA, USA; Captan (98% de pureza) fue adquirido de Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania; y el Metalaxil (99.8% de pureza) fue adquirido de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Alemania.

Fueron preparadas soluciones patrón de los pesticidas a una concentración de 1000 mg/L, disolviendo la cantidad correspondiente en 10 mL de acetona grado HPLC, adquirida de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA) y posteriormente se prepararon soluciones de trabajo de cada pesticida a 10 mg/L, éstos estándares fueron utilizados para el enriquecimiento de las muestras en la optimización de la extracción, para la validación del estudio y para preparar los estándar de calibración (1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 mg/L). Todos los estándares fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. El cloruro de sodio utilizado fue adquirido de Herschi Trading (99% de pureza, Ciudad de Mexico).

La extracción y análisis de los pesticidas fue llevado a cabo en un GC-MS (Agilent technologies) equipado con un inyector "Split/splitless" operando en modo "splitless" a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

280°C durante la corrida cromatográfica. Los pesticidas fueron separados en una columna capilar (HP-5MS, de Agilent, (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane; 30m×0.25mm ID×0.25 μm, USA) usando helio (99.99% de pureza) como gas acarreador con un flujo de 1.0 mL/min. La rampa de temperatura del horno inició en 60 °C (1 min); seguida de un incremento de 25°C/min hasta 170°C y posteriormente un incremento de 6°C/min hasta 230°C; nuevamente se incrementa a 25°C/min hasta 277°C y finalmente hasta 283°C a 1°C/min, donde permanece por 1 min. Las condiciones del detector de masas fueron: Temperatura de la línea de transferencia 250°C; temperatura de la fuente de iones 230°C; impacto de electrones en modo de ionización 70 eV. Los análisis fueron realizados en modo SIM (Monitoreo de iones seleccionados, por sus siglas en inglés), para cada pesticida se utilizó un primer ion “diana” y dos más “calificadores”: 79, 149 y 80 (Captan); 164, 149 y 131 (Carbofuran); 163, 181 y 165 (Cipermetrina); 206, 160 y 132 (Metalaxil); 125, 109 y 263 (Paratión Metílico); 127, 93 y 173 (Malatión) La confirmación de éstos pesticidas fue realizada por medio de escaneo de iones en modo completo, con los estándares correspondientes.

4.2.3 Aplicación de pesticidas y colecta de muestras.

Los pesticidas comerciales utilizados fueron INTERCAPTAN 50 PH® (Captan < 50%), Velfuran 350L (Carbofuran 33.21%), Cyperina 200 CE (Cipermetrina 20.36%), EL MATABICHOS (Paratión Metílico 2%), Malatión 1000 (Malatión 83.6%), Malvador CT 81 P.H. (Metalaxil + clorotanlonil > 9%).

Se tuvo acceso a un huerto completamente virgen de la aplicación de pesticidas, con la autorización del INIFAP (Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria) en “El Chiquihuitero”, Calvillo, Aguascalientes (21°52'22.5"N y 102°41'54.4"W). Fueron seleccionados diez árboles y medida el área que ocupaban; se aplicaron los productos comerciales de los pesticidas mencionados siguiendo las recomendaciones del comerciante y las prácticas de los productores.

La colecta de las muestras se llevó a cabo los días 0 (2 horas), 3, 7 y 10 después de la aplicación; el fruto fue recolectado de manera aleatoria y equitativa en los árboles aplicados, colectando un total de 2 kg de guayaba por día de muestreo, se envolvieron en aluminio y se introdujeron en bolsas de plástico

Las muestras de suelo fueron recolectadas del área circundante a los árboles aplicados, de manera aleatoria y tomando suelo de no más de 5 cm de profundidad, colectando un total de 2 kg de suelo por día de muestreo, se introdujeron en bolsas de plástico.

Todas las muestras fueron trasladadas en una hielera; las muestras fueron procesadas para su extracción el mismo día de la colecta.

Los 2 kg de guayaba de cada día fueron homogeneizados con una moladora de laboratorio (Waring comercial) hasta que no se vieran residuos ni semillas; los 2 Kg de muestras de suelo de cada día fueron tamizados hasta tener partículas finas; posteriormente las muestras totales de cada día fueron homogenizadas y almacenados a -50°C hasta realizar la microextracción (Devi *et al.*, 2016; Lehotay, 2007).

4.2.4 Extracción de pesticidas utilizando Microextracción en Fase Sólida (SPME).

La técnica SPME fue llevada a cabo con un sujetador manual de Supelco (Bellefonte, PA, USA); la fibra utilizada para realizar la microextracción fue de poliacrilato de 85 µm, adquirida de Supelco (Bellefonte, PA, USA); seleccionada así debido a que los pesticidas seleccionados pertenecen a diferentes grupos y por tanto tienen diferentes polaridades; ésta fibra es la más afín de manera general.

De las muestras almacenadas, se realizó el mismo procedimiento (Adaptado de Menezes *et al.*, 2010; Sapahin *et al.*, 2014) independientemente de la matriz; fueron tomados 0.5 g de la muestra y mezclados con 250 mg de NaCl para ajustar la fuerza iónica (5%), ésta mezcla fue aforada a 5 mL con una solución Agua desionizada: Acetona (4:1) y agitada con un magneto a 950 rpm durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos y se colocó el sobrenadante en un vial de 20 mL con tapón para realizar la microextracción (SPME); fue utilizada una fibra de Poliacrilato de 85 µm, la cual fue acondicionada en el puerto de inyección del equipo (GC-MS) de acuerdo a las instrucciones del fabricante; posteriormente se llevó a cabo la extracción de los pesticidas por medio de inmersión directa (SPME) a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación constante de 850 rpm con agitador magnético; posterior a la extracción, la fibra

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fue colocada en el puerto de inyección del GC-MS a 280°C durante 5 minutos para desorción de los pesticidas.

4.2.5 Extracción de pesticidas utilizando la técnica Rápida, Fácil, Barata, Efectiva, Robusta y Segura (QuEChERS).

Solo las muestras de guayaba fueron enviadas al Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes, dependencia de gobierno, donde se analizan muestras de vegetales en busca de residuos de pesticidas, y no existe una metodología bien establecida para hacerlo en muestras de guayaba; además sólo se trabaja buscando dos pesticidas en este fruto: Malatión y Paratión Metílico; la técnica que se utiliza es QuEChERS y está descrita por la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC por sus siglas en inglés), Método oficial 2007.01 Residuos de pesticidas en alimentos por extracción con acetonitrilo y fraccionamiento con sulfato de magnesio (Lehotay, 2007).

4.3 Pruebas de toxicidad en invertebrados dulciacuícolas.

4.3.1 Cultivos de *Alona cf. Guttata* (Cladocera: Chydoridae) y *Lecane papuana* (Rotifera: Monogononta).

Ambas especies han sido cultivadas por al menos dos años en el laboratorio de Toxicología acuática de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; las cepas se han mantenido en una cámara bio-climática a 25 ± 2 °C y un foto-período de 16:8 horas luz:oscuridad antes de realizar las pruebas. Para los cultivos y las pruebas, los animales se mantuvieron en medio EPA (USEPA, 1985) y se alimentaron con el alga verde *Nannochloropsis oculata* (Cepa LB2194 de la colección de la Universidad de Texas) (1×10^6 células mL^{-1}), la cual se hizo crecer en medio basal Bold (Nichols, 1973).

4.3.1.1 Preparación de medios.

Tóxico de referencia; en éste estudio se emplearon pesticidas, en diversas concentraciones, para los cuales se prepararon patrones a partir de los cuales se realizaron las diluciones correspondientes para las pruebas; dependiendo del pesticida en cuestión se eligió el solvente para preparar el patrón.

Patrones:

10 mg de Malatión en 10 mL de acetona.

100 mg de Cipermetrina en 500 μ L de acetona.

30 mg de FAENA® en 10 mL de EPA.

20 mg de Glifosato en 10 mL de EPA.

El medio EPA fue preparado de acuerdo a las siguientes especificaciones: Se utilizó agua desionizada (aproximadamente 18 megaohms), 96 mg/L de Carbonato de sodio (NaHCO_3), 60 mg/L de Sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 60 mg/L de Sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 4 mg/L de Cloruro de potasio (KCl). Se mezclaron éstas sales con agua desionizada por espacio de 24 horas. Se recomienda hacer volúmenes de más de dos litros. El pH se ajustó a 7.5 con HCl o KOH (USEPA, 1985).

4.3.2 Prueba de toxicidad aguda para el cladóceros *Alona cf. guttata*.

La prueba se inició con la separación de hembras que presentaron huevos, al día siguiente se colectaron los neonatos de menos de 24 horas para realizar las pruebas toxicológicas.

La prueba se realizó siguiendo las recomendaciones de la Norma Técnica Mexicana de toxicidad Aguda para *Daphnia magna* (NMX-AA-087-SCFI-2010), con algunas adaptaciones dado que el tamaño de *A. guttata* es considerablemente menor. Brevemente, la prueba consistió en lo siguiente:

Se realizó en placas de poliestireno (Corning) de 24 pozas, colocando en cada una 2 mL de medio EPA, se transfirieron 10 organismos por poza con ayuda de una pipeta de transferencia de plástico para contar con precisión a los cladóceros, los cuales se transfirieron sobre una pequeña gota en el centro con un volumen mínimo estimado de medio EPA de 100 μ L, para facilitar su conteo; se dividió la poza en seis columnas de cuatro pozas cada una, de tal manera que son cinco concentraciones diferentes y un control, cuatro réplicas para cada columna, se utilizaron dos placas ya que las réplicas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necesarias para el análisis son cinco y la placa solo nos permite usar cuatro. Para los pesticidas en cuestión, se deben hacer diluciones para ajustar la concentración requerida en cada caso y aforar siempre a 2 mL con medio EPA en cada poza. Los ensayos se hicieron en ausencia de alimento y con una temperatura de 25 ± 2 °C durante 48 horas y foto-período de 16:8 horas luz:oscuridad, la cámara bioclimática debe tener una iluminación que oscile entre los 600 y los 1,100 luxes. Al término de la prueba se hizo un conteo de los organismos muertos con ayuda de un microscopio óptico de disección (Olympus®), tolerándose para el control una mortalidad menor o igual al 10% como máximo permisible, registrando de esta manera los decesos para cada tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Statistica 6.0 (Statsoft Inc., 2004), en el cual se realizaron pruebas de regresión múltiple ($p < 0.05$) para obtener los valores de CL50, CL10 y R^2 ; Además de realizar ANOVA para los valores de NOEC (Concentración de Efecto No Observado), LOEC (Concentración de Mínimo Efecto Observado) (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

Se llevaron a cabo pruebas iniciales para determinar el rango en el cual los pesticidas seleccionados son tóxicos y después se realizaron las pruebas definitivas, las cuales consistieron en un control negativo y cinco concentraciones del pesticida en cuestión.

4.3.3 Prueba de toxicidad aguda para el rotífero *Lecane papuana*.

Se colocaron previamente suficientes huevos asexuales de hembras partenogénicas aclimatadas a temperatura ambiente, posteriormente a las 12 horas se obtuvieron los animales neonatos (neonatos) de *Lecane papuana*, esto es importante ya que las etapas juveniles son las más susceptibles a cualquier factor de estrés. Después fueron colocados 10 neonatos ($n=5$ réplicas) de menos de 24 horas de edad en cada poza de una placa de poliestireno (Corning) de 24 pozas mediante un microscopio óptico de disección (Olympus®) con ayuda de una pipeta de transferencia de plástico para contar con precisión a los rotíferos, los cuales se transfirieron sobre una pequeña gota en el centro con un volumen mínimo estimado de medio EPA de 100 μ L, para facilitar su conteo. Se utilizó una poza para el control con un volumen total de 1 mL de medio EPA y una poza para cada tratamiento que comprenden diferentes concentraciones del tóxico a evaluar sin alimento, con los respectivos 10 neonatos en el mismo volumen (1 mL). El

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pH del medio EPA fue ajustado a 7.5 con KOH (USEPA, 1985). El pesticida en cuestión fue diluido en medio EPA para obtener las diversas concentraciones a las cuales se expusieron los neonatos a una temperatura de 25°C en una cámara bioclimática (Revco Scientific). Posteriormente, a las 48 horas se revisó el número de individuos muertos mediante un microscopio óptico de disección para el tratamiento correspondiente, tolerándose para el control una mortalidad menor o igual al 10% como máximo permisible, registrando de esta manera los decesos para cada tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Statistica 6.0 (Statsoft Inc., 2004), en el cual se realizaron pruebas de regresión múltiple ($p < 0.05$) para obtener los valores de CL50, CL10 y R^2 ; además de realizar ANOVA para los valores de NOEC, LOEC (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

4.4.4 Prueba de toxicidad crónica para el cladóceros *Alona cf. guttata*.

La prueba se inició con la separación de hembras que presentaron huevos, al día siguiente se colectaron los neonatos de menos de 24 horas para realizar las pruebas toxicológicas.

La prueba se realizó siguiendo las recomendaciones de la OECD (1998) para *Daphnia magna*, con algunas adaptaciones dado que el tamaño de *A. guttata* es considerablemente menor. Brevemente, la prueba consistió en lo siguiente:

Se realizó en placas de poliestireno (Corning) de 24 pozas, colocando en cada una 2 mL de medio EPA, se transfirieron 10 organismos por poza con ayuda de una pipeta de transferencia de plástico para contar con precisión a los cladóceros, los cuales se transfirieron sobre una pequeña gota en el centro con un volumen mínimo estimado de medio EPA de 100 μ L, para facilitar su conteo; se dividió la poza en seis columnas de cuatro pozas cada una, de tal manera que son cinco concentraciones diferentes y un control, cuatro réplicas para cada columna. Para las concentraciones, se partió de la CL50 registrada en las pruebas agudas, la cual fue dividida entre 5 y fue tomado el valor resultante como el más alto para las pruebas crónicas, de ahí fue dividido entre dos cada vez para ir obteniendo las concentraciones más pequeñas hasta completar las cinco. Para los pesticidas en cuestión, se deben hacer diluciones para ajustar la concentración

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

requerida en cada caso y aforar siempre a 2 mL con medio EPA en cada poza. Los ensayos se hicieron con alimento, 2×10^6 células/mL y con una temperatura de 25 ± 2 °C durante 21 días y foto-período de 16:8 horas luz:oscuridad (Osorio-Treviño, 2016), la cámara bioclimática debe tener una iluminación que oscile entre los 600 y los 1,100 luxes. Los organismos muertos y neonatos fueron contados diariamente con ayuda de un microscopio óptico de disección (Olympus®), tolerándose para el control una mortalidad menor o igual al 20% como máximo permisible al final de la prueba (OECD, 1998). El medio y el alimento fueron renovados cada dos días para garantizar la limpieza y concentración respectivamente.

Posteriormente a partir de los datos de supervivencia y fecundidad se realizó un análisis de tabla de vida parcial con ayuda del software Microsoft Excel, los parámetros poblacionales (Tasa intrínseca de crecimiento, Tasa de reproducción neta, Esperanza de vida, Tiempo generacional y Vida Media) se calcularon mediante las ecuaciones de Krebs (1985). En adición Los neonatos de cada tratamiento fueron medidos al menos al día 7 y 14 en todas las pruebas con la finalidad de encontrar diferencias en sus tamaños con los controles.

4.3.5 Prueba de toxicidad crónica para el rotífero *Lecane papuana*.

Prueba de toxicidad crónica de 5 días; se emplearon 6 tratamientos con 4 réplicas. Se usaron neonatos de < 12 h de nacidos para las pruebas. Se colocaron 5 neonatos por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 1 mL. Se alimentaron con el alga *Nannochloropsis oculata* en una concentración final de 1×10^6 células/mL. Las placas fueron colocadas en cámara bioclimática durante 5 días (Revo Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a 25 °C \pm 2 °C.

Al término del período correspondiente para cada ensayo se contó el número de organismos para el cálculo de la tasa intrínseca de crecimiento (r) con la siguiente fórmula:

$$r = \ln (N_t - N_0) / t$$

N_t = Número de rotíferos vivos en la poza al final del experimento.

No = Número inicial de rotíferos en la poza.

ln = logaritmo natural

t = tiempo de exposición

5. RESULTADOS.

5.1 Determinación de los pesticidas más utilizados en los principales cultivos del área de influencia del estado de Aguascalientes.

Se han gestionado a los Sistemas producto de los ocho tipos de cultivos del estado de Aguascalientes para saber cuáles son los pesticidas que se utilizan en cada uno de ellos y así determinar cuáles pueden tener un mayor impacto, encontrando de manera resumida lo que se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Pesticidas más utilizados por los sistemas producto del estado de Aguascalientes.

Guayaba	Chile	Ajo	Maíz	Durazno	Nopal	Vid	Hortalizas
Malatión	Glifosato	Diazinón	Cipermetrina	Fenazaquin	Malatión	Naled	N/a
Glifosato	Trifluralina	Piretroides	Clorpirifos	Captan		Malatión	
Permetrina	Paraquat	Mancozeb	Furadán	Glifosato		Imidacloprid	
Cipermetrina	Mancozeb	Trebanil	Atrazina	Paratión		Carbarilo	
Paratión	Micobutanil	Oxifluorfen		Paraquat		Dinotefurán	
Diazinón	Prpropanocarb	Fenamifos		Kumulus bf		Clotianidín	
Furadán	Metalaxil			Spinosad		Sulfoxaflor	
	Clorpirifos			Imidacloprid		Spinosad	
	Metamidofos			Mancozeb			
	Carbofuran			Cipermetrina			

Podemos observar que existen algunos sistemas producto que comparten o utilizan los mismos pesticidas a pesar de tratarse de cultivos diferentes, por lo que es necesario manejar éstos resultados de manera global, para saber cuáles son los de más frecuencia en los sistemas producto del estado; en la figura 2, podemos observar dicha frecuencia por cada tipo de pesticida.

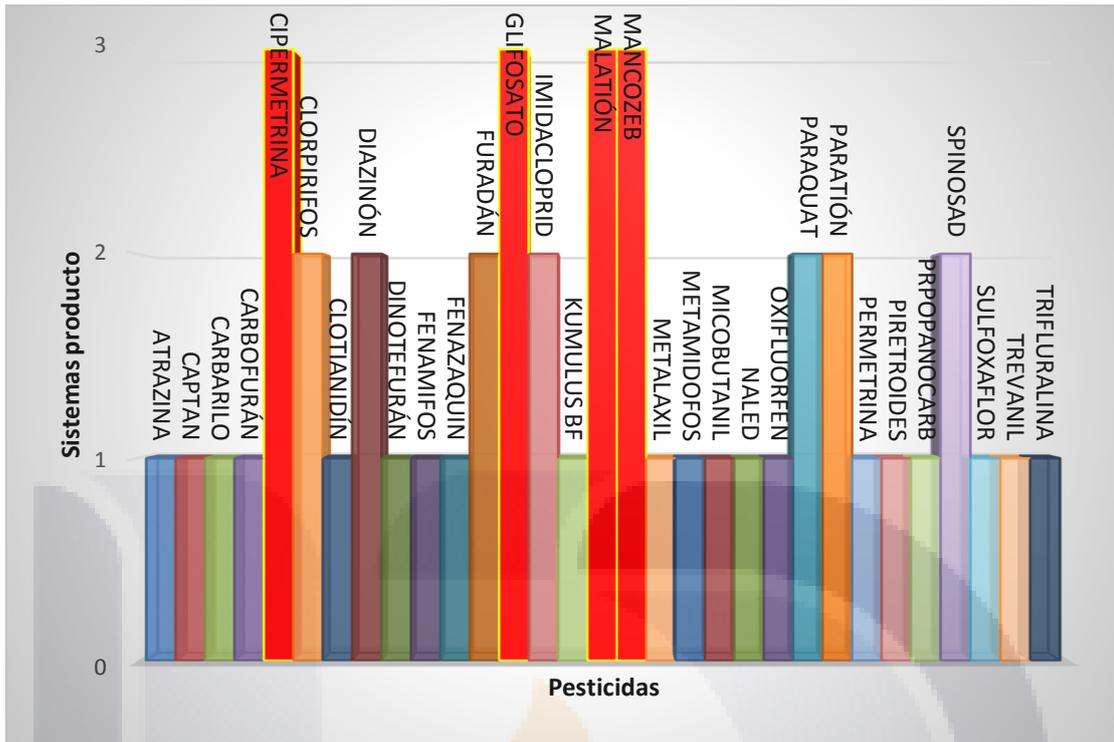


Figura 2. Número de sistemas producto en los que se utiliza cada pesticidas en el Estado de Aguascalientes.

Podemos inferir entonces que los pesticidas que más se utilizan en el estado de Aguascalientes en al menos tres sistemas producto son: Cipermetrina, Glifosato, Malatión y Mancozeb (Todos marcados en color rojo), pues son los que más se repiten. Lo anterior mencionado concuerda con un estudio realizado en Calvillo Aguascalientes por parte del INIFAP en el sistema producto Guayaba en el que se encontró que los pesticidas más utilizados en éste fruto son Malatión y Faena® (Glifosato) (De Lira *et al.*, 2016), por lo tanto se trabajó con éstos pesticidas además de la Cipermetrina, suponiendo que son los de mayor influencia en Calvillo y el resto del estado, para evaluar posibles riesgos, y llevar a cabo las pruebas de Toxicidad.

5.2 Pruebas de toxicidad aguda de los pesticidas Malatión, Cipermetrina, FAENA® y Glifosato en los invertebrados dulciacuícolas *Lecane papuana* y *Alona cf. guttata*.

Fueron calculados los valores de CL50 y CL10 en pruebas de 48-h de los pesticidas mencionados para neonatos de menos de 24-h de edad en ambas especies,

utilizando para ello un análisis probit con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados de todas las pruebas son detallados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis de las pruebas de toxicidad aguda mostrada por dos especies zooplanctónicas con pesticidas. Los significados de abreviaturas son los siguientes; CL50 = Concentración letal donde el 50% de los animales mueren. CL10 = Concentración letal donde el 10% de los animales mueren. CV = Coeficiente de variación. IC = Intervalo de confianza al 95% para los valores de CL50. r² = Coeficiente de determinación para éstos resultados. NOEC = Concentración en la que no se observa efecto (No observed effect concentration, por sus siglas en ingles). LOEC = Concentración en la que se observa poco efecto (Low observed effect concentration, por sus siglas en ingles).

Especies	Pesticida	CL50 (mg/L)	CL10 (mg/L)	CV %	IC- 95%	r ²	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)	Regresión lineal (ecuación)
<i>Lecane papuana</i>	Malatión	42.84	20.95	14.42	38.34- 47.87	0.80	35	20	y = -7.98 + 7.80x
	Cipermetrina	34.58	22.98	15.58	30.01- 39.83	0.81	20	10	y = -4.05 + 5.86x
	Faena®	19.89	16.27	6.39	18.77- 21.08	0.88	15	10	y = -11.84 + 12.93x
<i>Alona cf. guttata</i>	Malatión	5.26 x 10 ⁻³	3.96 x 10 ⁻³	13.02	4.89 x 10 ⁻³ - 5.70 x 10 ⁻³	0.89	4 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	y = -1.66 + 9.23x
	Cipermetrina	3.77 x 10 ⁻²	2.23 x 10 ⁻²	8.74	3.51 x 10 ⁻² - 4.06 x 10 ⁻²	0.93	3 x 10 ⁻²	2 x 10 ⁻²	y = -3.20 + 5.23x
	Faena®	50.43	22.51	12.59	45.42 - 56	0.86	30	20	y = -12.04 + 9.70x
	Glifosato	232.60	223.76	1.31	229.06- 236.20	0.767	220	210	y = - 133.0339+58.3082x

Los resultados muestran que el Malatión fue el compuesto más tóxico para *A. guttata*, de los 4 investigados para ésta especie cuyo valor de CL50 fue de 0.00526 mg/L,

por otro lado, el compuesto menos tóxico fue el Glifosato con un valor de 232.60 mg/L (Cuadro 8).

Para el rotífero *L. papuana* el compuesto más tóxico fue FAENA® mostrando una CL50 de 19.89 mg/L y el compuesto menos tóxico fue el Malatión con un valor de CL50 de 42.84 mg/L (Cuadro 8). Entre ambas especies, la mayor diferencia en cuanto a la toxicidad de los pesticidas se refiere, se ve muy marcada con el Malatión, ya que para *A. guttata* se encuentra en el orden de $\mu\text{g/L}$ mientras que para *L. papuana* fue de mg/L. Los otros pesticidas mostraron una toxicidad similar en ambas especies teniendo CL50 de entre 30-40 mg/L para Cipermetrina y 19-50 mg/L para FAENA®. Es necesario mencionar también que el pesticida FAENA® (que contiene Glifosato), se comportó más tóxico que el Glifosato puro, en la prueba realizada para *A. guttata*.

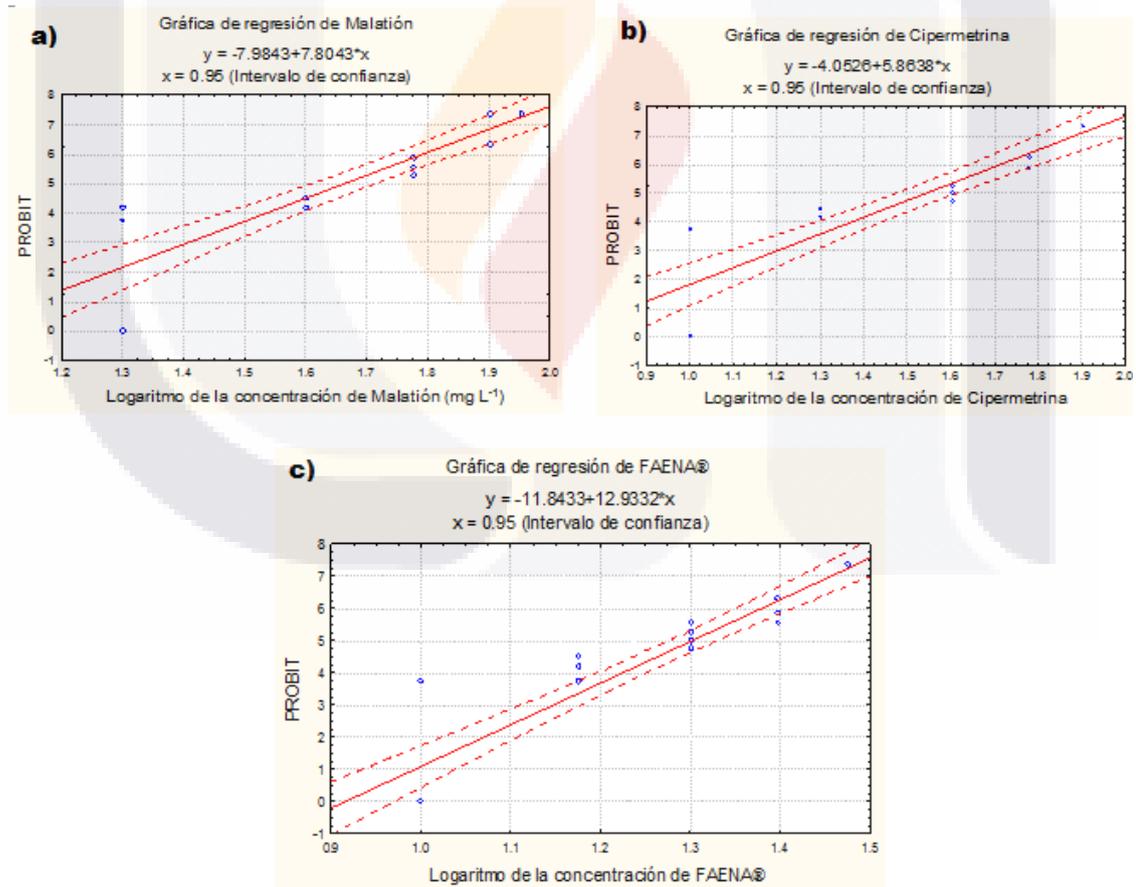


Figura 3. Diferentes gráficas de regresión lineal para *L. papuana* expuestas a cinco concentraciones diferentes ($n=5$) de tres pesticidas (a=Malatión, b=Cipermetrina, c=FAENA®); se aprecian las bandas del intervalo de confianza con un nivel del 0.95 (IC = 0.95).

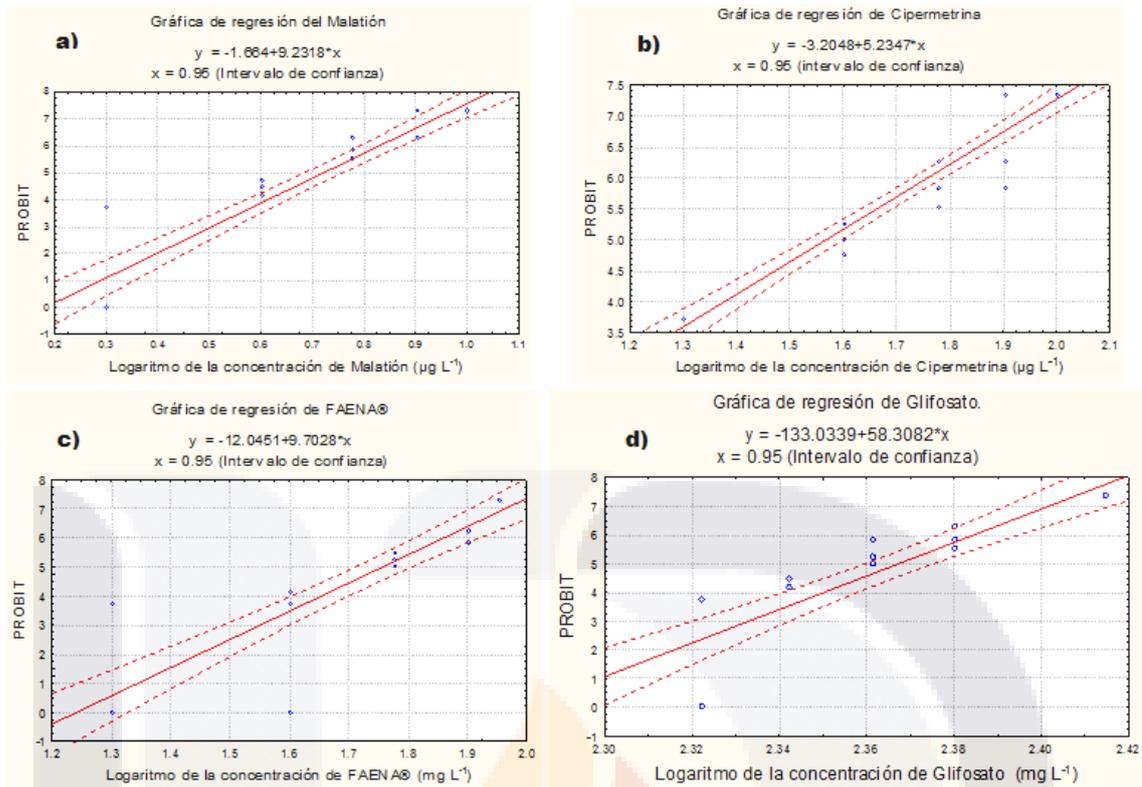


Figura 4. Diferentes gráficas de regresión lineal para *A. guttata* expuestas a cinco concentraciones diferentes (n=5) de cuatro pesticidas (a=Malatión, b=Cipermetrina, c=FAENA®, d=Glifosato); se aprecian las bandas del intervalo de confianza con un nivel del 0.95 (IC = 0.95).

5.3 Pruebas de toxicidad crónica de los pesticidas Malatión, Cipermetrina y FAENA® en los invertebrados dulciacuícolas *Lecane papuana* y *Alona cf. guttata*.

Fue realizada la prueba crónica a 14 días con el cladóceros *Alona cf. guttata*, y al finalizar la misma se procedió a realizar los cálculos de los parámetros poblacionales a partir de los datos de supervivencia y fecundidad con ayuda del software Microsoft Excel mediante las ecuaciones de Krebs (1985). En adición Los neonatos de cada tratamiento fueron medidos al menos al día 7 y 14 con la finalidad de encontrar diferencias en sus tamaños con los controles; la figura 5 resume los parámetros poblacionales medidos en la prueba con Cipermetrina.

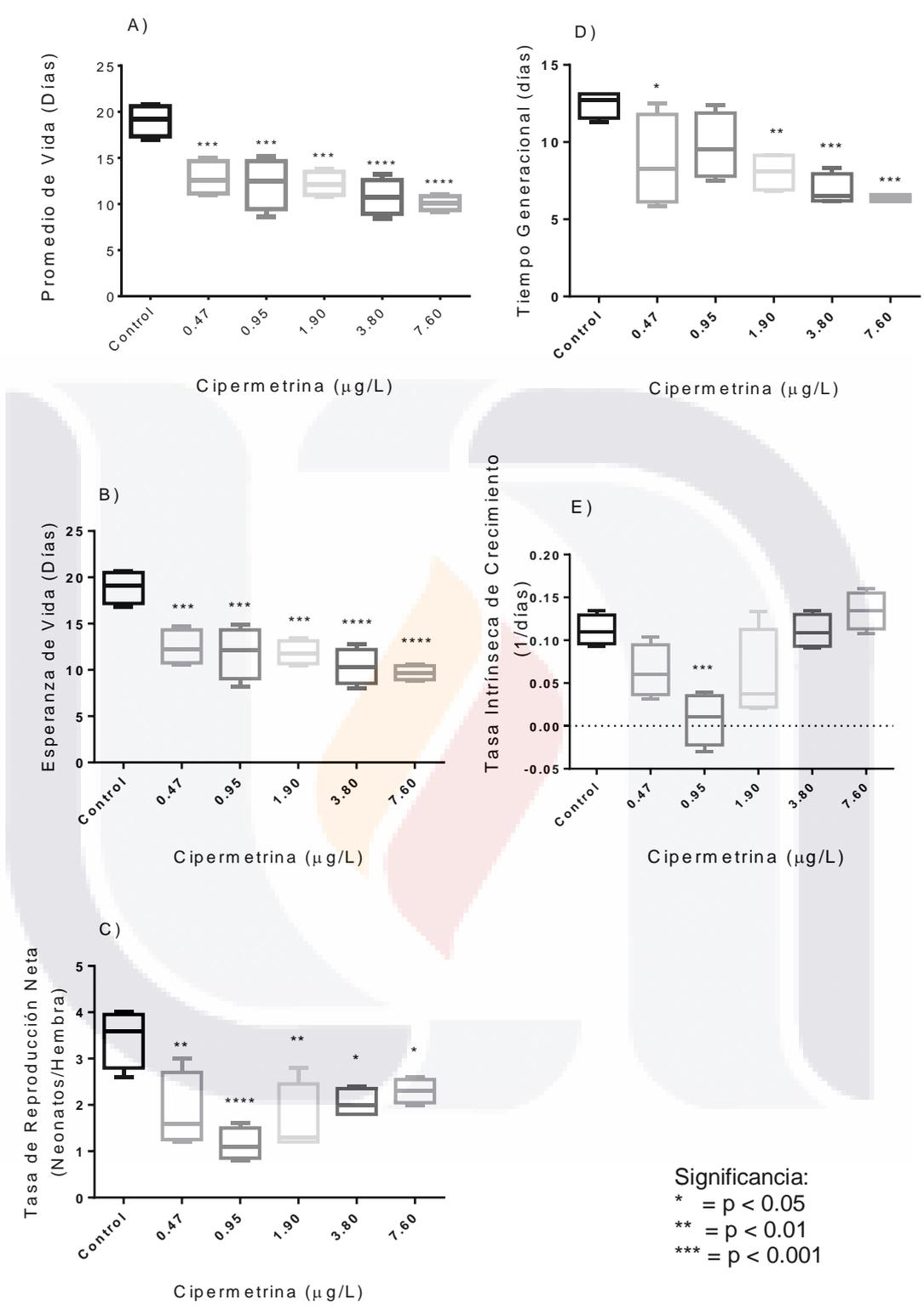


Figura 5. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en *A. guttata* expuesta a cinco concentraciones diferentes de Cipermetrina. Los parámetros demográficos presentados en la figura son: a) Promedio de vida; b) Esperanza de vida; c) Tasa de reproducción neta; d) Tiempo generacional; y e) Tasa intrínseca de crecimiento. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Podemos apreciar en la figura 5 que los parámetros poblacionales medidos se ven afectados por la influencia del pesticida (Cipermetrina); el promedio de vida disminuye significativamente a partir de la concentración más baja 0.00047 mg/L, con una tendencia similar en las siguientes cuatro concentraciones; lo mismo ocurre con la esperanza de vida. En cuanto a la tasa de reproducción neta, podemos observar que también a partir de la misma concentración más baja ya se hacen notar diferencias significativas respecto al control, sin embargo en la concentración más alta de 0.0076 mg/L no hay diferencia significativa respecto al control, pero si la hay en el promedio de vida en la misma concentración. La tasa intrínseca de crecimiento muestra un comportamiento similar al de la tasa de reproducción neta, mostrando diferencias significativas en la concentración de 0.00095 mg/L donde se ve una disminución muy marcada en la misma.

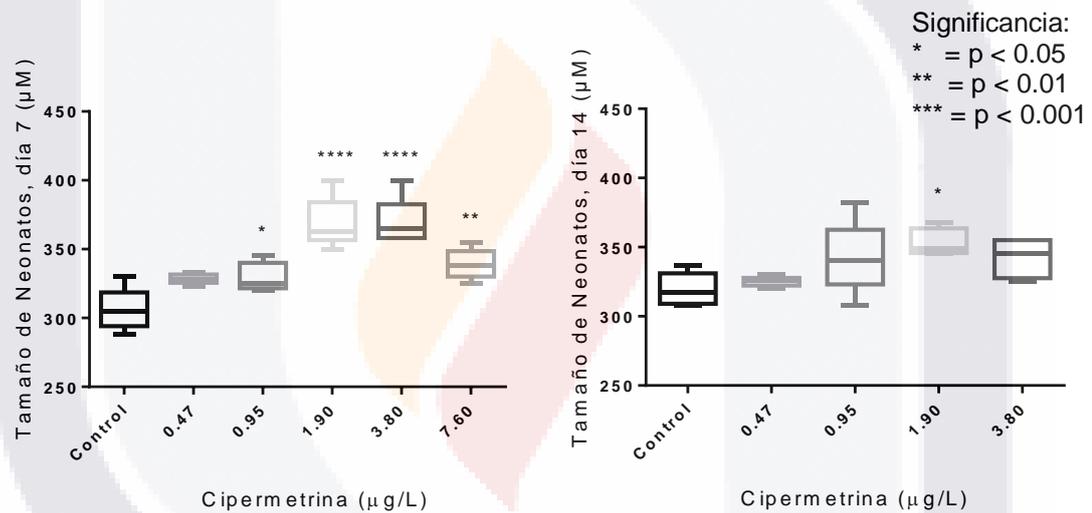


Figura 6. Tamaño de los neonatos nacidos de *A. guttata* expuesta a Cipermetrina. Cinco concentraciones diferentes de Cipermetrina fueron ensayadas. Los neonatos fueron recolectados cuando las hembras alcanzaron la edad 7 y 14 días. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Las mediciones que muestra la figura 6 fueron realizadas a los días 7 y 14 del experimento, únicamente se observan diferencias significativas al día 7; sobre las mediciones realizadas éste día, se observan cambios con diferencias significativas respecto al control, los neonatos estaban naciendo más grandes cuando las hembras estaban intoxicadas y justamente a partir de la concentración de 0.00095 mg/L es cuando las hembras ya se ven afectadas, además coincide ésta concentración con la disminución marcada de la tasa intrínseca de crecimiento.

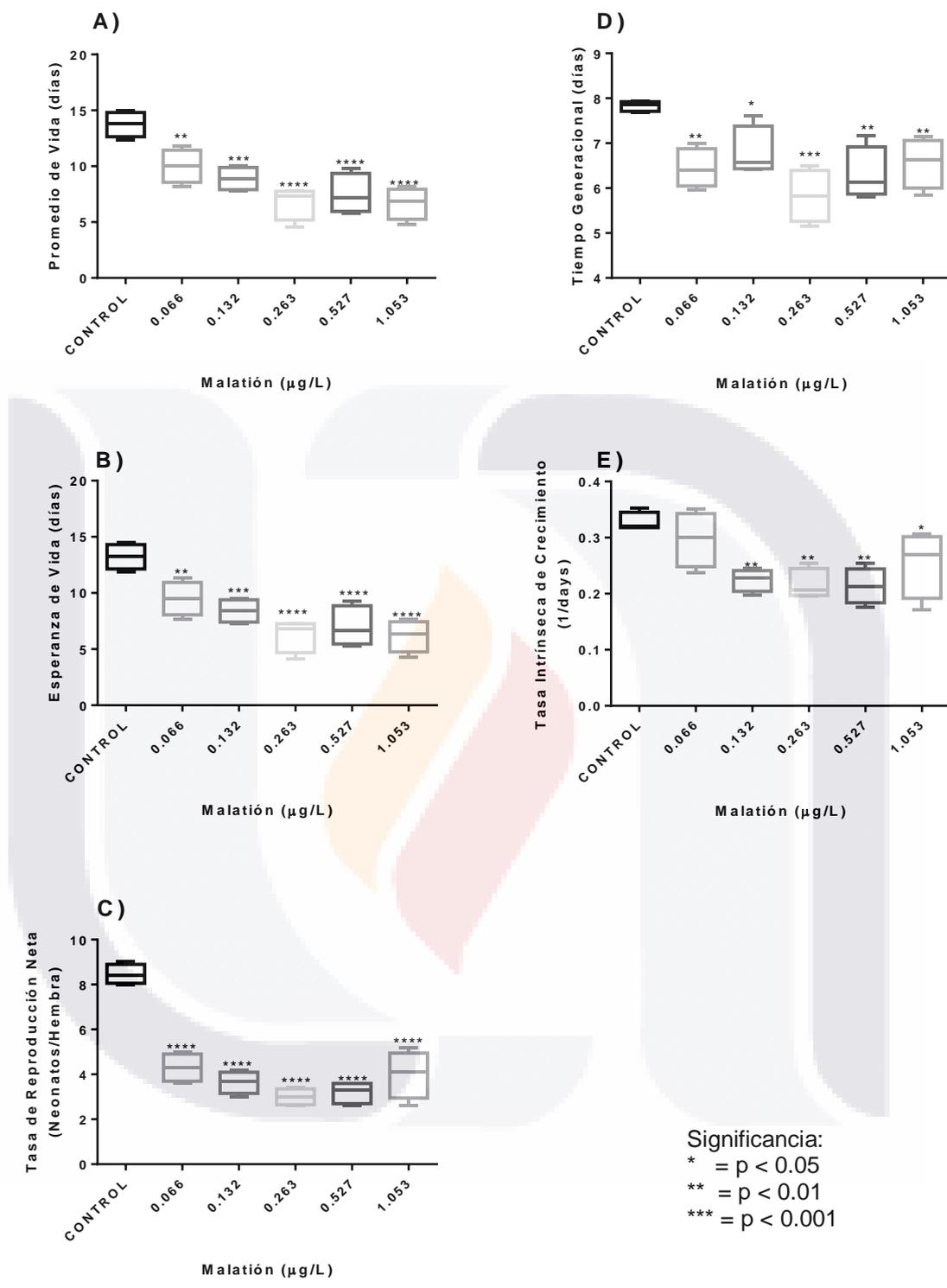


Figura 7. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en *A. guttata* después de la exposición a cinco concentraciones diferentes de Malatión. Los parámetros demográficos presentados en la figura son: A) Promedio de vida; B) Esperanza de vida; C), Tasa de reproducción neta; D) Tiempo generacional; y E), Tasa intrínseca de crecimiento. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001

En la figura 7, se observa el efecto del Malatión en los parámetros demográficos de *A. guttata*; los cuales se redujeron significativamente con todas las concentraciones de Malatión ($p < 0.05$), excepto las de la tasa intrínseca de crecimiento que no se redujo estadísticamente en la concentración más baja de Malatión (6.5×10^{-5} mg/L).

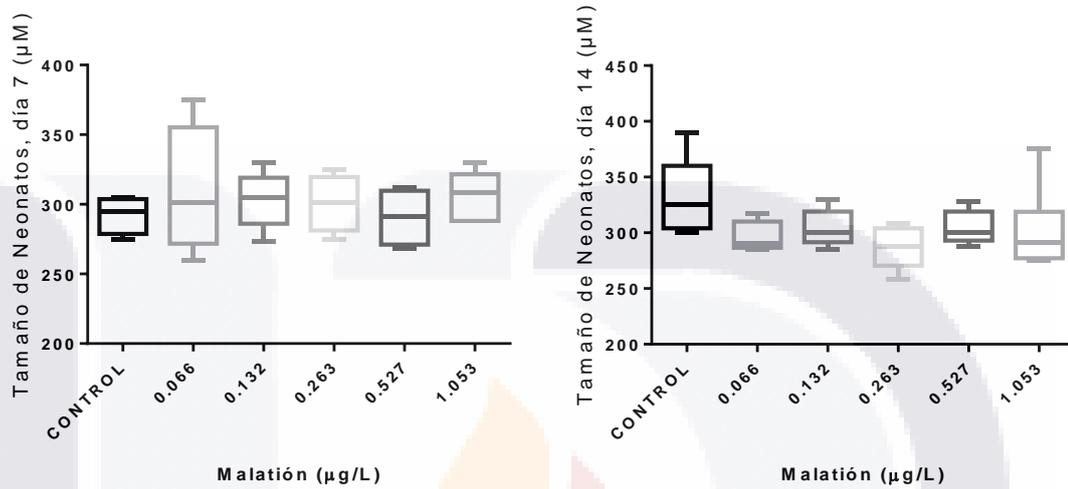


Figura 8. Tamaño de los neonatos nacidos de *A. guttata* expuesta a Malatión. Cinco concentraciones diferentes de Malatión fueron ensayadas. Los neonatos fueron recolectados cuando las hembras alcanzaron la edad de ambos 7 y 14 días. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001

Como se puede apreciar en la figura 8, no hubo diferencias significativas de los neonatos de hembras de *A. guttata* expuestas a cinco concentraciones de Malatión comparados con los neonatos de hembras no intoxicadas.

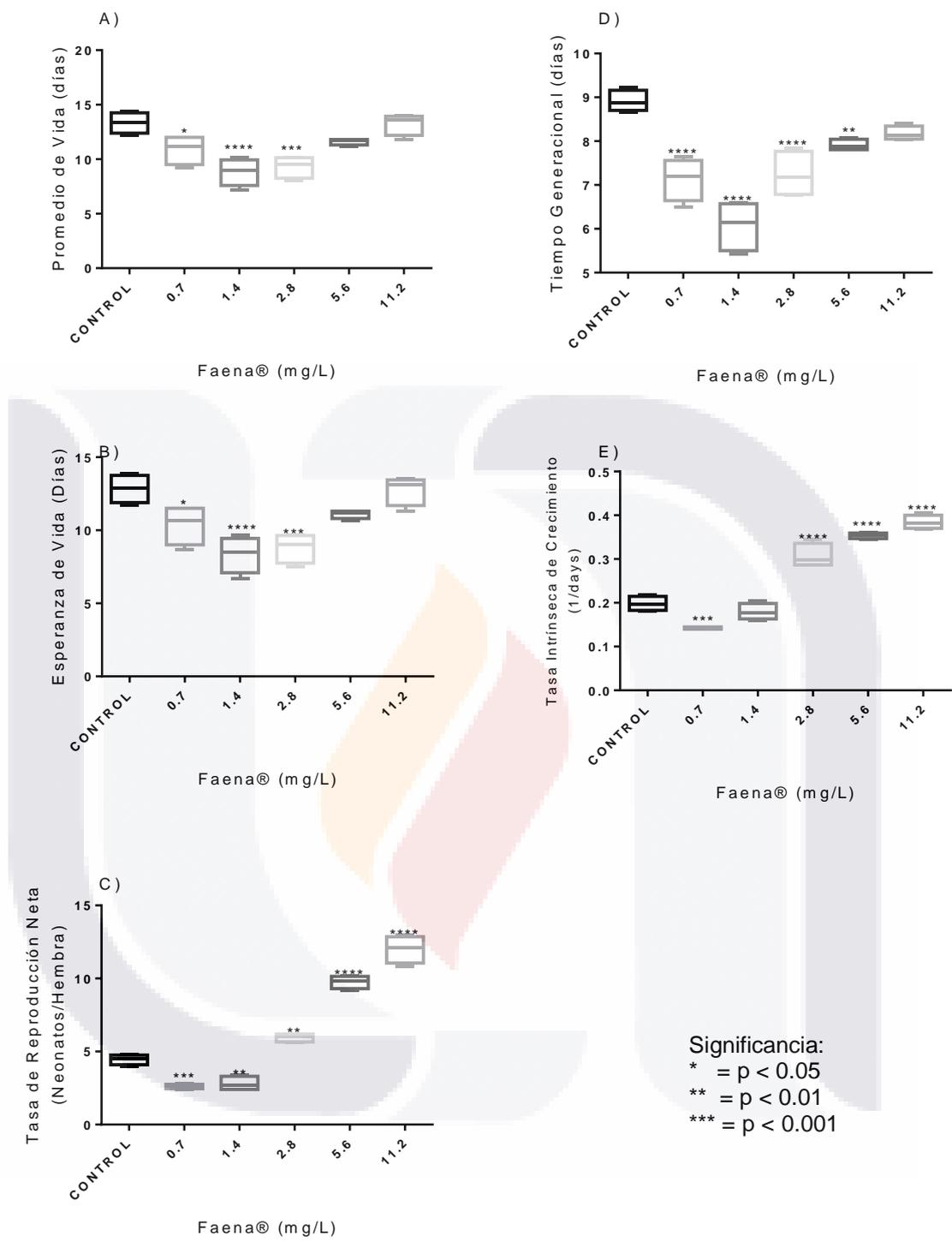


Figura 9. Resultados de la prueba de toxicidad crónica en *A. guttata* expuesta a cinco concentraciones diferentes de Faena®. Los parámetros demográficos presentados en la figura son: A) Promedio de vida; B) Esperanza de vida; C), Tasa de reproducción neta; D) Tiempo generacional; y E), Tasa intrínseca de crecimiento. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * <0.05, ** <0.01, *** <0.001.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En el caso del ensayo crónico con *A. guttata* expuesto a Faena®, los parámetros demográficos (Figura 9) se ven afectados por este producto comercial, mostraron una tendencia diferente a la que se observó con Cipermetrina y Malatión, estimulando la liberación de la progenie. La figura 9 muestra que el promedio de vida y la esperanza de vida al nacer fueron significativamente afectados cuando los quidoridos fueron expuestos a las tres concentraciones más bajas (0.70, 1.40 y 2.80 mg/L); Sin embargo, a mayores concentraciones (5.60 y 11.20 mg/L) no hubo una diferencia significativa en comparación con el grupo control. Además, se observa una tendencia similar en el tiempo generacional que fue afectado por todas las concentraciones de Faena®, pero el valor más bajo se alcanzó en la concentración de 1.40 mg/L. En contraste, este parámetro no fue afectado a 11.20 mg/L.

En la Figura 9 es importante señalar que la tasa de reproducción neta y la tasa intrínseca de crecimiento tuvieron una tendencia similar, lo que denota que las menores concentraciones de Faena® (0.70 y 1.40 mg/L) afectaron negativamente a ambos parámetros demográficos mientras que las concentraciones más altas probadas parecían afectar positivamente en un patrón anormal de fecundidad, que se exacerbó a la concentración más alta ensayada (11.20 mg/L), que corresponde a 1/5 de la CL50 de Faena® previamente determinada (este trabajo).

Como se puede apreciar en la figura 10, no hubo diferencias significativas de los neonatos de hembras de *A. guttata* expuestas a cinco concentraciones de Faena® comparados con los neonatos de hembras no intoxicadas.

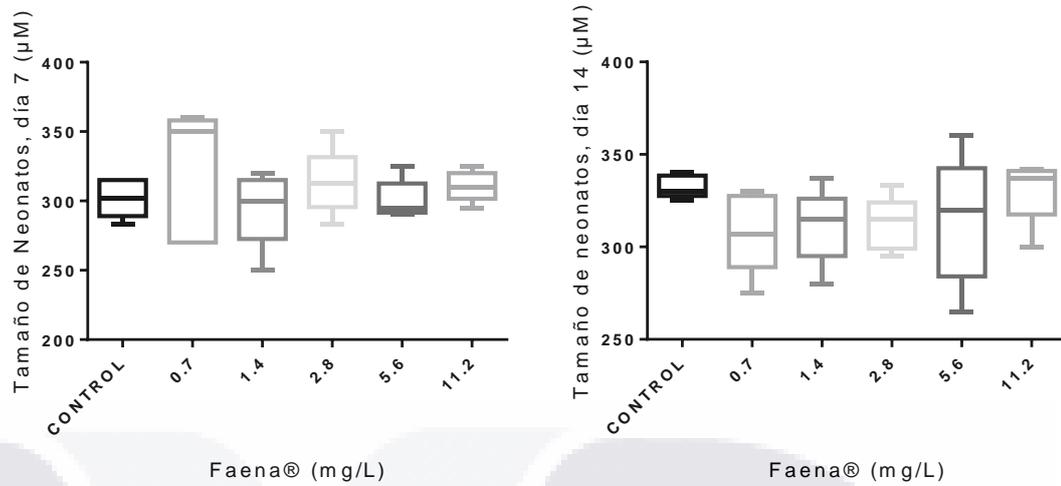
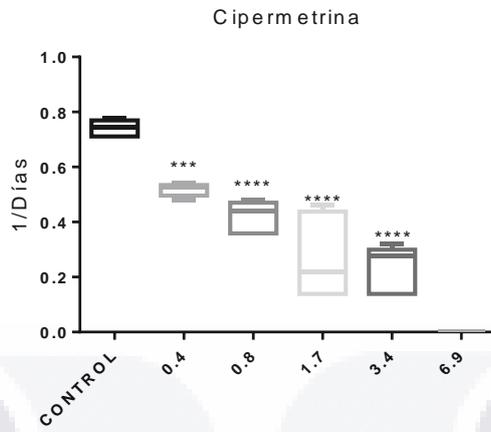


Figura 10. Tamaño de los neonatos nacidos *A. guttata* expuesta a Faena®. Cinco concentraciones diferentes fueron ensayadas. Los neonatos fueron recolectados cuando las hembras alcanzaron la edad de 7 y 14 días. Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * <0.05, ** <0.01, *** <0.001

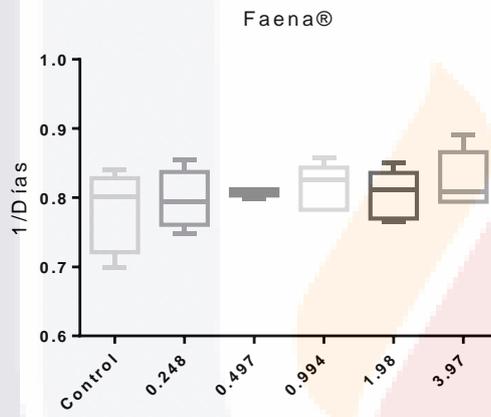
En cuanto a las pruebas de toxicidad crónica con el rotífero *L. papuana*, se observó que la tasa intrínseca de crecimiento se vio afectada negativamente por Malatión y Cipermetrina. Por un lado, todas las concentraciones de Cipermetrina evaluadas, afectaron negativamente la tasa intrínseca de crecimiento de *L. papuana*, mientras que el Malatión no tuvo el mismo efecto en el proceso de reproducción, lo que se puede observar en la mayor concentración (9.40 mg/L) y la de 1.18 mg/L no afectó el crecimiento poblacional de este rotífero.

Tasa Intrínseca de Crecimiento de *L. papuana*

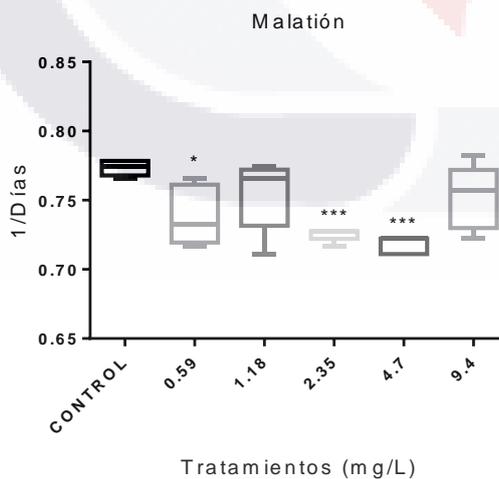
A)



B)



C)



Significancia:
 * = $p < 0.05$
 ** = $p < 0.01$
 *** = $p < 0.001$

Figura 11. Tasas intrínsecas de crecimiento de *L. papuana* expuesta a cinco concentraciones diferentes de los tres pesticidas estudiados (Malatión, Cipermetrina y Faena®). Se establecieron diferencias significativas a través del ANOVA unidireccional y las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001

5.4 Estandarización de métodos de cromatografía, específicos para la detección de residuos de pesticidas.

Fueron realizadas pruebas con patrones de diferentes pesticidas, logrando implementar una técnica sensible al menos para 5 pesticidas del área de aplicación en Calvillo (Captan, Carbofuran, Malatión, Metalaxil y Paratión), tomando en cuenta la técnica de SPME, se consiguieron rampas de temperatura del equipo para la detección de los mismos a diferentes concentraciones en soluciones acuosas y muestras reales, logrando detectar hasta 0.001 mg/L de algunos de ellos por medio de GC-MS.

Para poder llevar a cabo nuestro estudio, fueron realizadas varias pruebas para poder analizar muestras reales de fruto y suelo, para tales fines fue utilizada muestra de guayaba virgen, enriquecida a diferentes concentraciones de los pesticidas para evaluar la viabilidad del método; la figura 12 muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de guayaba enriquecida con pesticidas, donde todos muestran señal cuantificable; lo mismo fue realizado con muestras de suelo virgen.

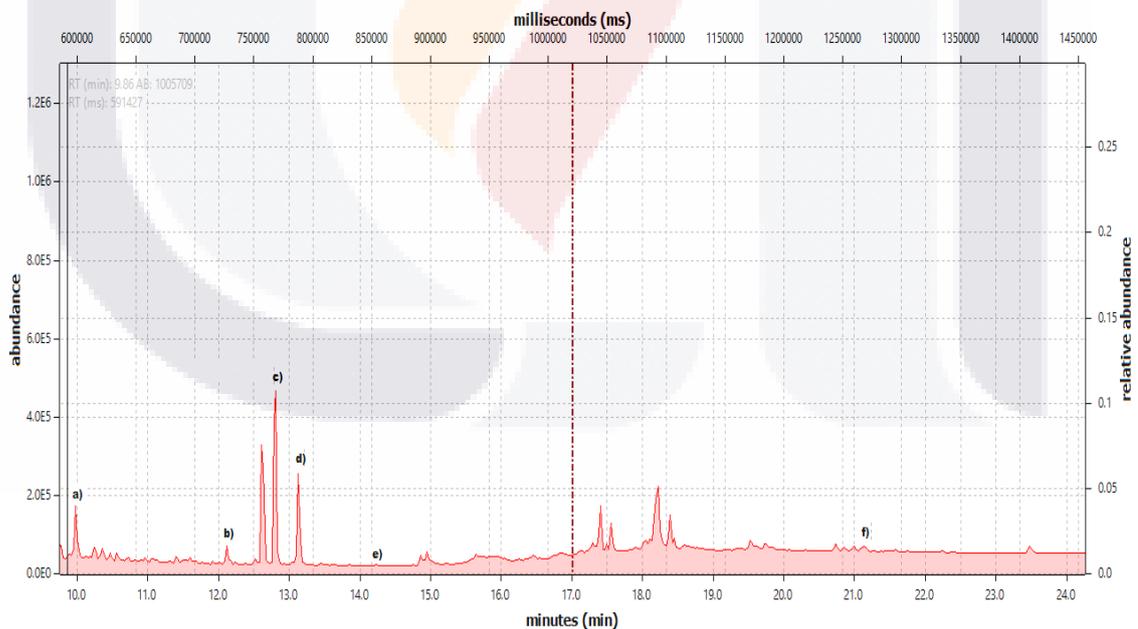


Figura 12. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba virgen enriquecida con pesticidas a 0.05 mg/L, extraídos por SPME, Los picos identificados son: a) Carbofuran, b) Metalaxil, c) Malatión, d) Paratión, e) Captan, y f) Cipermetrina.

El método mostró linealidad en la curva de calibración realizada con soluciones estándar de cada pesticida, utilizando concentraciones desde 1 mg/L hasta 0.001 mg/L, el cuadro 9 muestra el análisis de regresión para los pesticidas, todos ellos con un R^2 aceptable y límites de detección (LOD, por sus siglas en inglés) de 0.001 mg/L, excepto el Captan con un 0.002 mg/L; además se observan los límites de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) de 0.003 para todos los pesticidas excepto Captan (0.006 mg/L); todos éstos valores por debajo de los límites máximos residuales establecidos por la Comisión europea.

Cuadro 9. Análisis de regresión para los pesticidas estudiados con una curva de calibración de 1 mg/L a 0.001 mg/L; se muestra la ecuación de la recta para cada uno, además de los Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ por sus siglas en inglés) y R^2 = Coeficiente de determinación para éstos resultados.

Pesticidas	Tiempo de Retención (min.)	Ecuación de Regresión	R^2	LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)
Captan	14.257	$Y = 6.235e+006 * X + 70934$	0.88	0.002	0.006
Carbofuran	9.978	$Y = 3.023e+007 * X + 431898$	0.98	0.001	0.003
Cipermetrina	20.995	$Y = 4.095e+009 * X + 4.182e+007$	0.99	0.001	0.003
Malatión	12.812	$Y = 2.707e+008 * X + 4.977e+006$	0.98	0.001	0.003
Metalaxil	12.118	$Y = 1.653e+007 * X + 839231$	0.99	0.001	0.003
Paratión Metílico	13.159	$Y = 3.782e+008 * X + 7.278e+006$	0.96	0.001	0.003

Fueron medidos los porcentajes de recuperación de los pesticidas a tres concentraciones (0.5, 0.1 y 0.05 mg/kg, n = 6 para cada pesticida y cada concentración) en guayaba fueron 70, 105, 90, 77 y 70% (n = 18) para Captan, Carbofuran, Malatión,

Metalaxil y Paratión Metílico respectivamente, y para el suelo fueron 82, 65, 76, 74 y 66% (n = 18) (mismas concentraciones), respectivamente. Todos ellos con desviaciones estándar que van desde 1.80 hasta 17.32%. La Cipermetrina fue el único pesticida que mostró un porcentaje de recuperación muy bajo (<10%), lo que significa que esta técnica no es la adecuada para este pesticida en estas muestras (guayaba y suelo) (Cuadro 10). Además, se llevó a cabo un análisis de reproducibilidad a las mismas concentraciones. El cuadro 11 muestra los valores de desviación estándar (DE) obtenidos de cada pesticida, de 1.81 a 16.96% para ambas matrices, excepto la Cipermetrina.

Cuadro 10. Porcentaje de recuperación y desviación estándar (DE) de los pesticidas extraídos de guayaba y suelo a tres concentraciones (0.5, 0.1 y 0.05 mg/L) (n=6), por medio del método adaptado SPME.

Pesticida	Concentración (mg/L)	%Recuperación en	
		Guayaba (Promedio ± DE)	en Suelo (Promedio ± DE)
Captan	0.5	50.16 ± 10.28	80.04 ± 13.45
	0.1	66.36 ± 12.23	82.25 ± 8.58
	0.05	70.01 ± 9.62	76.01 ± 11.42
Carbofurán	0.5	114.15 ± 9.4	45.00 ± 6.99
	0.1	105.00 ± 7.33	46.95 ± 5.95
	0.05	124.50 ± 5.84	38.07 ± 12.34
Cipermetrina	0.5	1.63 ± 11.8	1.09 ± 10.17
	0.1	1.72 ± 10.98	1.35 ± 3.78
	0.05	1.67 ± 9.89	1.27 ± 11.33
Malatión	0.5	90.84 ± 6.17	71.91 ± 4.94
	0.1	57.84 ± 3.49	66.63 ± 1.80
	0.05	70.13 ± 7.90	71.12 ± 11.32
Metalaxil	0.5	60.60 ± 6.94	59.45 ± 8.75
	0.1	64.90 ± 7.32	61.00 ± 6.32
	0.05	77.13 ± 8.72	74.21 ± 17.32
Paratión	0.5	49.44 ± 17.15	66.00 ± 10.13
	0.1	36.31 ± 16.96	56.31 ± 9.44
	0.05	58.39 ± 7.33	60.23 ± 6.30

Cuadro 11. Reproducibilidad del método; desviación Estándar (DE) de los pesticidas extraídos de guayaba y suelo a tres concentraciones diferentes (0.5, 0.1 y 0.05 mg/L) (n=6), por medio del método adaptado SPME

Pesticida/mg/kg	Carbofuran	Metalaxil	Malatión	Paratión	Captan	Cipermetrina
Guayaba	0.05	5.85%	7.32%	8.36%	9.12%	10.99%
	0.1	7.33%	8.75%	3.49%	16.96%	21.24%
	0.5	9.40%	6.95%	6.18%	17.16%	10.28%
Suelo	0.05	12.34%	6.32%	11.33%	3.13%	9.87%
	0.1	5.96%	11.50%	1.81%	9.44%	12.00%
	0.5	7.00%	7.30%	4.95%	10.14%	13.46%

Las figuras 13 y 14, muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras (guayaba y suelo respectivamente) tomadas el día 0 (2 horas) después de la aplicación de pesticidas, se identificaron los picos correspondientes a todos los pesticidas en ambas matrices, excepto Cipermetrina en el suelo.

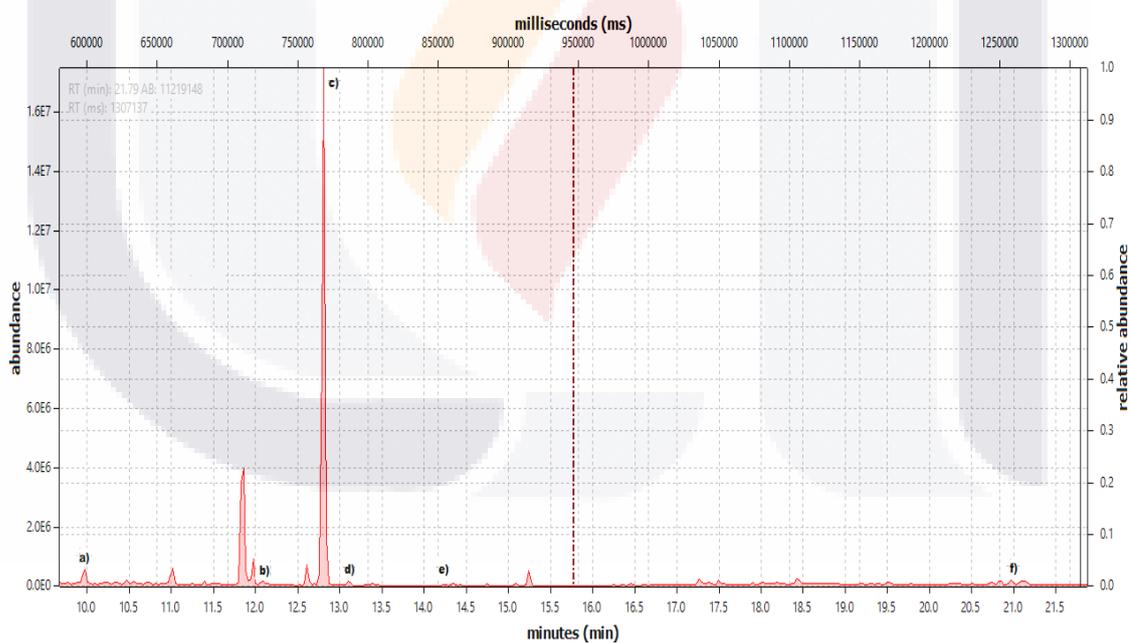


Figura 13. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba colectada el día 0 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME, Los picos identificados son: a) Carbofuran, b) Metalaxil, c) Malatión, d) Paratión, e) Captan, y f) Cipermetrina.

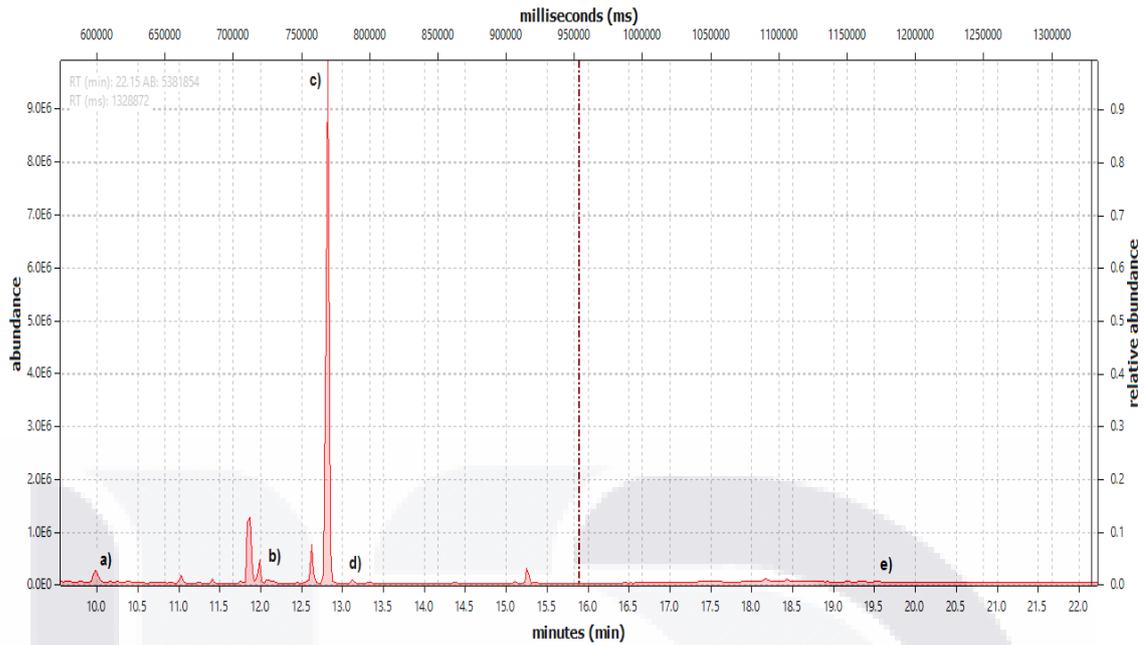


Figura 14. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de suelo colectada el día 0 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME, Los picos identificados son: a) Carbofuran, b) Metalaxil, c) Malatión, d) Paratión y e) Cipermetrina.

Las figuras 15 y 16 muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras (guayaba y suelo respectivamente) tomadas 10 días después de la aplicación de los pesticidas, se identificaron los picos correspondientes al Carbofuran, Metalaxil, Malatión y Paratión Metílico en las muestras de guayaba y Carbofuran, Metalaxil, Malatión y Captan en las muestras de suelo.

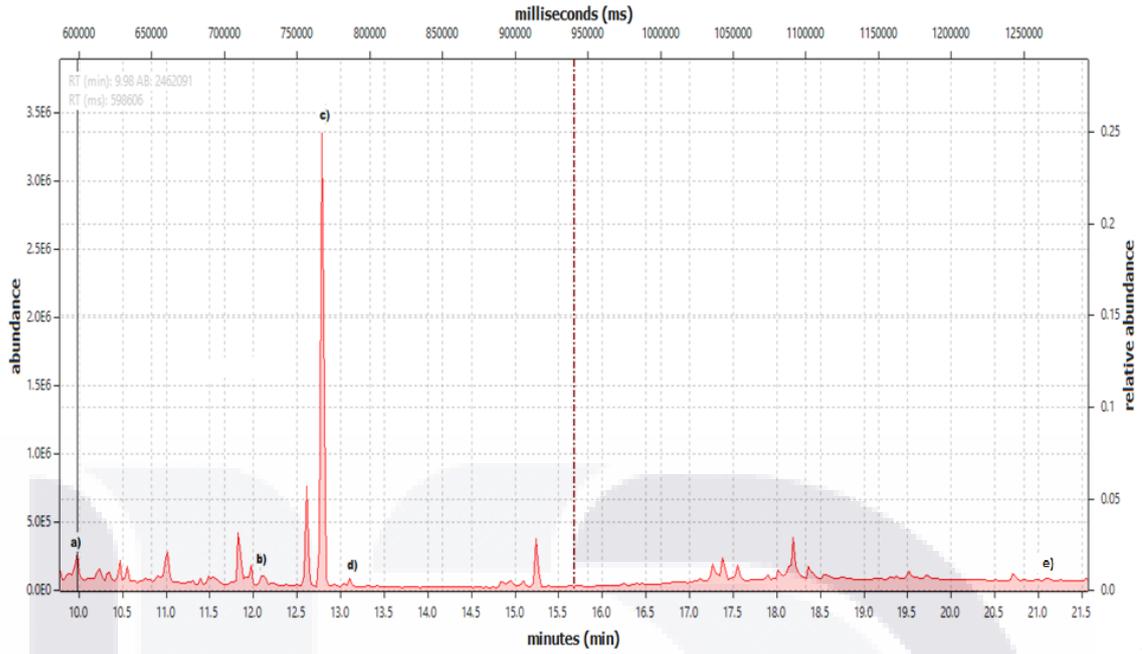


Figura 15. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de guayaba colectada el día 10 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME, Los picos identificados son: a) Carbofuran, b) Metalaxil, c) Malatión, d) Paratión, e) Cipermetrina.

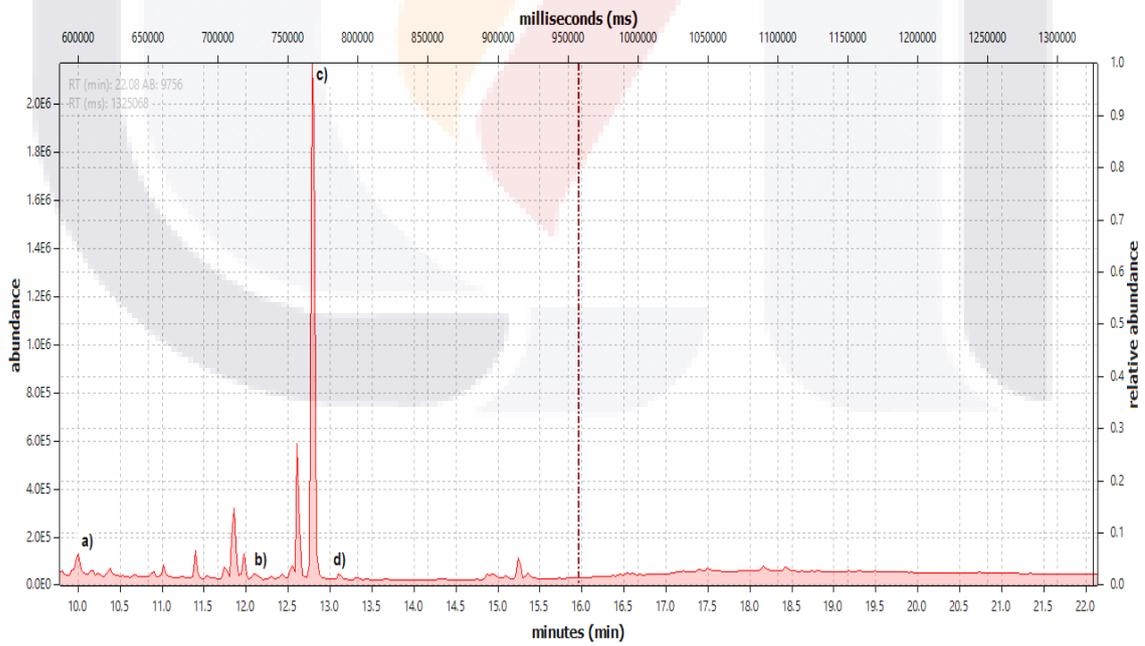


Figura 16. Cromatograma (en modo SIM) de una muestra de suelo colectada el día 10 de la aplicación de los pesticidas extraídos por SPME, Los picos identificados son: a) Carbofuran, b) Metalaxil, c) Malatión y d) Paratión.

Las Cuadros 12 y 13 muestran las concentraciones de los pesticidas, correspondientes a los picos de los cromatogramas registrados para cada día de muestreo (guayaba y suelo, respectivamente). Está claro que incluso después de 10 días, todavía hay concentraciones residuales de algunos pesticidas, en guayaba se encontraron las siguientes concentraciones (del más alto al más bajo), Carbofuran (2.27 mg/kg), Metalaxil (1.58 mg/kg) Malatión (1.50 mg/kg), y Paratión Metílico (0.015 mg/kg) y para el suelo se encontraron al día 10, Malatión (1.31 mg/kg), Carbofuran (0.30 mg/kg), Metalaxil (0.19 mg/kg) y Captan (0.08 mg/kg); se aprecia R² para el modelo de degradación, que varía de 0.79 a 0.94 en la guayaba y de 0.73 a 0.96 en el suelo, casi todos los casos son valores aceptables; las vidas medias de los pesticidas estudiados en guayaba oscilan entre 6.17 y 8.19 días y para el suelo son de 2.78 a 5.85 días (Cuadros 12 y 13).

Cuadro 12. Niveles de pesticidas (mg/L) en guayaba determinados a los días 0 (dos horas), 3, 7 y 10 después de la aplicación en el huerto virgen. (DE (%); n=2) ND = No Detectado.

Pesticidas	Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	R ²	Ecuación de regresión	Vida media (Días)
Carbofuran	6.6663 16.03%	4.9680 13.03%	4.4580 17.76%	2.2650 4.16%	0.833	Y = -0.040X + 0.657	8.168
Metalaxil	4.2945 11.023%	3.8600 21.64%	2.4690 36.26%	1.5815 32.33%	0.810	Y = -0.02820*X + 0.4454	8.193
Malatión	11.0800 10.19%	10.2501 5.74%	4.1640 0.03%	1.5020 28.77%	0.941	Y = -0.104X + 1.193	6.167
Paratión	0.0499 2.38%	0.0457 15.08%	0.0269 40.08%	0.0153 20.02%	0.874	Y = -0.0003642*X + 0.005268	7.602
Captan	0.4559 13.92%	0.2549 24.18%	0.2297 4.35%	ND	0.787	Y = -0.00273X + 0.0409	6.634
Cipermetrina	0.0161 67.36%	ND	ND	ND	-----	-----	-----

Cuadro 13. Niveles de pesticidas (mg/L) en Suelo circundante a árboles de guayaba determinados a los días 0 (dos horas), 3, 7 y 10 después de la aplicación en el huerto virgen. (DE (%); n=2) ND = No Detectado.

Pesticidas	Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	R2	Ecuación de regresión	Vida media (días)
Carbofuran	2.1670 43.70%	1.4740 0.28%	0.7911 34.52%	0.3034 23.33%	0.797	$Y = -0.0184167 * X + 0.210454$	5.544
Metalaxil	0.5931 22.31%	0.3005 6.64%	0.2297 11.36%	0.1904 11.96%	0.733	$Y = -0.00371597 * X + 0.0514221$	5.851
Malatión	10.530 6.70%	3.8250 26.33%	1.5310 6.47%	1.3140 2.89%	0.786	$Y = -0.0873549 * X + 0.866785$	3.895
Paratión	0.0251 4.82%	0.0115 20.29%	ND	ND	0.964	$Y = -0.000451247 * X + 0.00250577$	2.776
Captan	0.4477 4.45%	0.3899 11.83%	0.0839 1.09%	0.0800 8.18%	0.889	$Y = -0.00422439 * X + 0.0461616$	5.630
Cipermetrina	ND	ND	ND	ND	-----	-----	-----

Degradación de Pesticidas

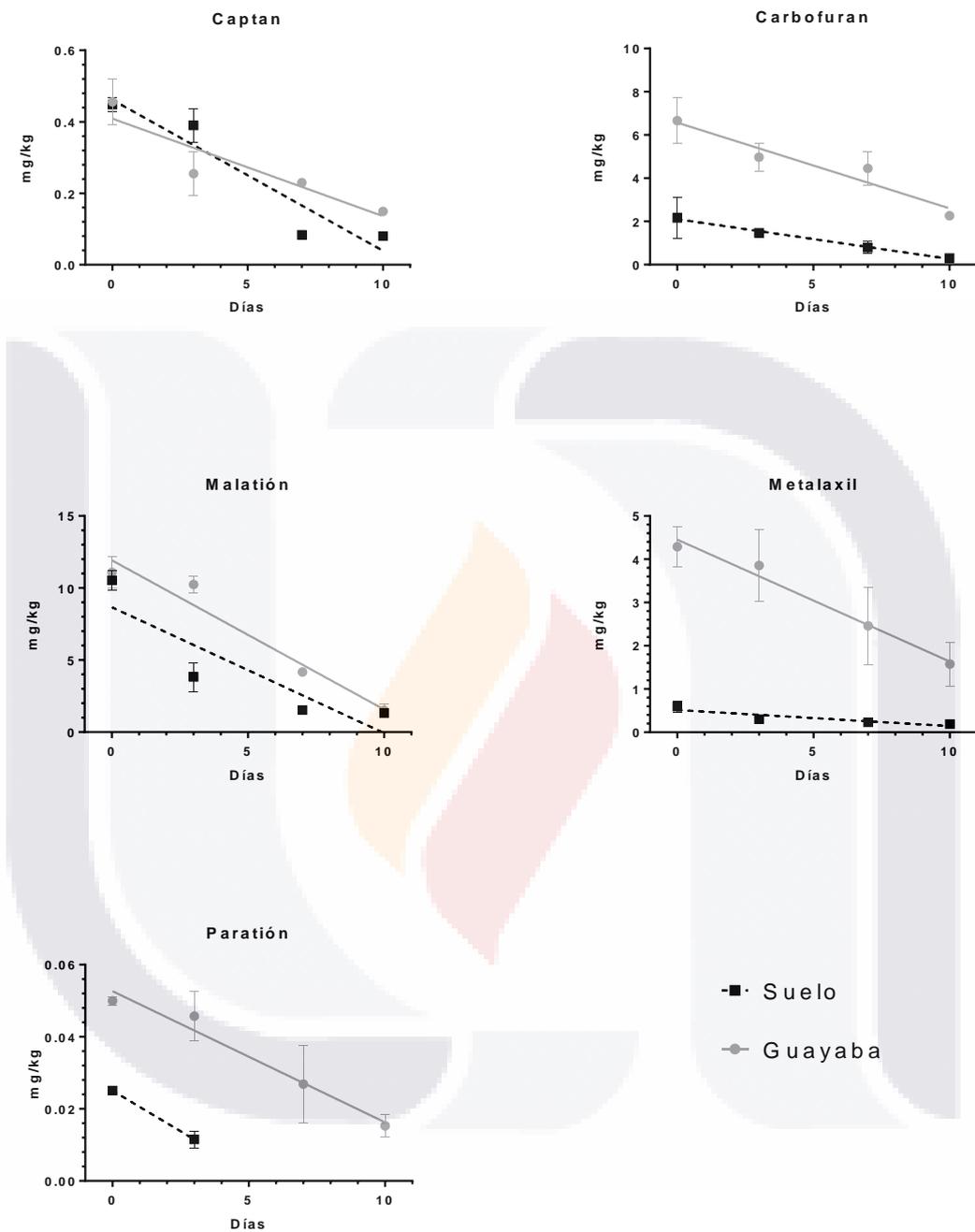


Figura 17. Gráficas de regresión lineal correspondientes a la degradación de los pesticidas a través del tiempo en matrices de guayaba y suelo, los valores, ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación se aprecian en las Cuadros 12 y 13 respectivamente.

En cuanto a la comparación entre ambas metodologías de extracción (SPME y QuEChERS) en guayaba, solamente se llevaron a cabo con Malatión y Paratión Metílico, los resultados se muestran en la Cuadro 14; en el caso del Malatión, se aprecia R^2 aceptable para ambos modelos de degradación y los valores son similares en todas las muestras (de los 4 días de muestreo); se realizó la prueba de comparación de Sidak ($p < 0.05$) para ver diferencias entre ambas metodologías sin encontrar discrepancias significativas (extrayendo Malatión), estas comparaciones se pueden apreciar mejor en la figura 18. Por otro lado, la comparación entre ambas metodologías extrayendo Paratión Metílico no fue posible debido a que QuEChERS no tuvo suficiente sensibilidad para detectarlo, incluso en el día 0, mientras que SPME fue capaz de detectar el pesticida incluso en el día 10 de muestreo (0.015 mg/kg) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Comparación de las técnicas de extracción de pesticidas QuEChERS y SPME en guayaba (mg/kg) con Paratión y Malatión determinados en los días 0 (dos horas) 3, 7 y 10 posterior a la aplicación de éstos. (DE (%); n = 2) ND= No Detectado.

Pesticida	Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	R^2	Ecuación de Regresión	Vida media (Días)
Malatión	11.0800	10.2501	4.1640	1.5020	0.941	$Y = -0.104X + 1.193$	6.167
SPME	10.19%	5.74%	0.03%	28.77%			
Malatión	12.7800	8.4020	3.0010	1.0630	0.9647	$Y = -1.197 * X + 12.30$	6.390
QuEChERS	10.43%	10.39%	10.39%	10.39%			
Paratión	0.0499	0.0457	0.0269	0.0153	0.874	$Y = -0.0003642 * X +$	7.602
SPME	2.38%	15.08%	40.08%	20.02%		0.005268	
Paratión	ND	ND	ND	ND	-----	-----	-----
QuEChERS							

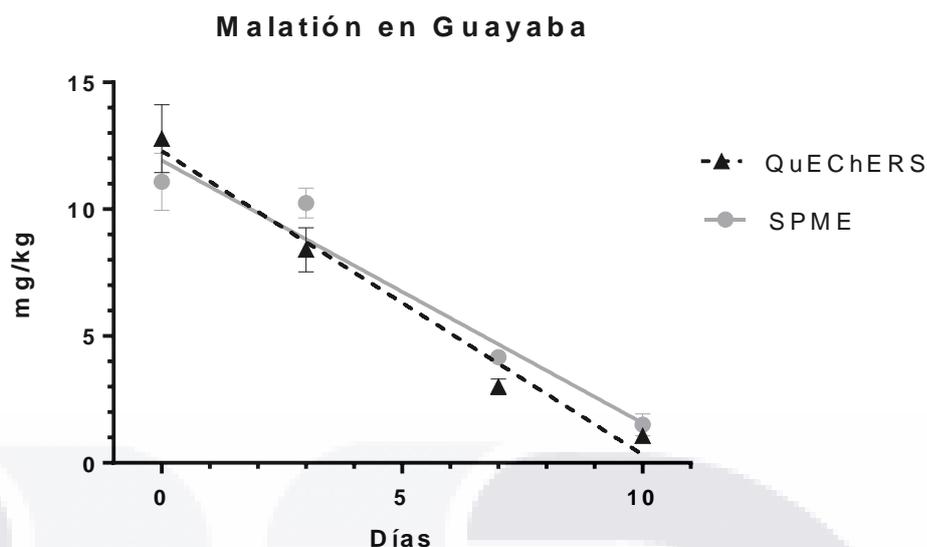


Figura 18. Gráfica de regresión lineal correspondiente a la degradación del Malatión a lo largo de diez días, donde fueron comparados los métodos de extracción, sin diferencias significativas (Análisis de comparaciones múltiples de Sidak, $p < 0.05$). Los valores, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación se muestran en el cuadro 14.

6. DISCUSIÓN.

Una de las principales contribuciones de éste trabajo, fué la implementación de pruebas de toxicidad aguda y crónica con dos especies zooplanctónicas nativas: a) el rotífero litoral *L. papuana*, que es una especie estenotérmica, con distribución pantropical y pansubtropical (Segers, 1995), y b) el cladocero *A. guttata* (Chydoridae: Aloninae), cuyos registros incluyen fósiles en zonas árticas (Frey, 1991; Nevalainen *et al.*, 2012) y organismos vivos en diversas condiciones climáticas, incluyendo África (Van Damme y Eggermont, 2011), Asia (Hirai, 1970; Sharma y Sharma, 2012), América (DiFonzo y Campbell, 1988) y Europa (Mezquita y Miracle, 1997; Irfanullah y Moss, 2005); y también ha sido reportado en Aguascalientes, México (Sinev y Silva-Briano, 2012). Por lo tanto, *A. guttata* podría considerarse una especie cosmopolita y un organismo modelo importante debido a su distribución natural.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ambas especies estudiadas presentaron sensibilidades similares a los tóxicos y también fueron más sensibles que otros organismos modelo como los cladóceros: *Ceriodaphnia dubia* o *D. magna*, y el rotífero *B. calyciflorus*, todos formando parte de la biota que representa la columna de agua (Charoy y Clément, 1993; Versteeg *et al.*, 1997; Siehoff *et al.*, 2009), en contraste con *A. guttata* y *L. papuana*, ambas especies litorales (Koste y Robertson 1990; Adamczuk, 2014), las cuales podrían ofrecer la ventaja de evaluar el efecto de los contaminantes en el interfase sedimento-agua, preferentemente en ambientes subtropicales y tropicales, aunque podrían ser utilizados también en otras latitudes, ya que su distribución natural parece ser cosmopolita.

6.1 Puebas de toxicidad aguda.

Para *A. guttata*, el orden decreciente de toxicidad registrado de los valores de CL50 fue Malatión > Cipermetrina > Faena®. El Malatión fue el compuesto más tóxico, aproximadamente siete veces más tóxico que la Cipermetrina y casi 1.000 veces más tóxico que la fórmula comercial de Glifosato, Faena®. Éstas diferencias en la toxicidad relativa de los pesticidas en *A. guttata* podrían desencadenar nuevas preguntas sobre los mecanismos implicados para producir efectos nocivos en este organismo no diana, sin embargo no son el objetivo principal de la investigación aquí presentada. No obstante, diferentes patrones de toxicidad podrían deberse al modo de acción específico de cada pesticida estudiado; es decir, el Malatión actúa reduciendo la actividad de la acetilcolinesterasa (ACE) y carboxilesterasas (CbE) en organismos expuestos (Trac *et al.*, 2016). La Cipermetrina interfiere con los canales de sodio ubicados en todas las membranas neuronales, manteniendo abiertos los canales iónicos y causando la pérdida del impulso nervioso y la muerte (Sánchez-Bayo, 2012). Faena®, que contiene Glifosato como ingrediente activo, tiene varios modos de acción en organismos no diana, incluida la inhibición de la acetilcolinesterasa (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2008), la inducción del daño por estrés oxidativo y la genotoxicidad; aunque no hay consenso sobre un solo mecanismo de toxicidad del Glifosato; además, su toxicidad depende también de los componentes dentro de la fórmula comercial, ya que pueden modificar los efectos del Glifosato (Annett *et al.*, 2014). Por otra parte, las concentraciones de Cipermetrina y Malatión que indujeron la muerte de *A. guttata* son muy relevantes, ya que se pueden

encontrar en entornos naturales y, por lo tanto, pueden llegar a afectar las poblaciones de cladoceros (Newhart, 2006).

Para *L. papuana*, el orden decreciente de toxicidad (valores CL50) fue Faena® > Cipermetrina = Malatión. A pesar de la importancia de los rotíferos en los ecosistemas de agua dulce y del hecho de que están siendo afectados por varios tóxicos como los pesticidas, actualmente hay poca información disponible sobre el efecto de tales sustancias en los rotíferos y aún menos en las especies nativas; una prueba de esto es que en el sitio web de USEPA ECOTOX (2015), hay menos de 20 coincidencias con los términos de la consulta: rotífero y los pesticidas estudiados. Por tal motivo, los resultados de este trabajo se compararon con los de otra especie de rotífero, *L. quadridentata* expuestos a Faena®, en los que el CL50 fue de 13.10 mg/L (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2008), que es muy similar al mostrado para *L. papuana* (19.89 mg/L, este trabajo).

Por otra parte, *L. papuana* fue menos sensible a Cipermetrina en comparación con *B. calyciflorus*, cuya CL50 se ha reportado entre 0.50 y 3.38 mg/L (Huang *et al.*, 2011). Además, Snell y Persoone (1989) expusieron al rotífero *B. rubens* a Malatión y encontraron una CL50 de alrededor de 35.30 mg/L y Fernández-Casalderry *et al.* (1992) reportaron que *B. calyciflorus* mostró una CL50 de 33.72 mg/L, ambas coincidieron con las de *L. papuana* encontradas en esta investigación. A partir de entonces, se puede formular la hipótesis de que *L. papuana* podría usarse como un organismo modelo no convencional porque su susceptibilidad a los tóxicos probados en este estudio fue similar a la del organismo modelo *B. calyciflorus*. Sin embargo, la susceptibilidad de ambos organismos debería evaluarse comparando una gran cantidad de tóxicos; pero éste no era el objetivo de la presente investigación, sino la evaluación del efecto de tres pesticidas usados exhaustivamente en Aguascalientes, México, sobre especies indígenas zooplanctónicas, que fueron negativamente afectadas por todas ellas en concentraciones ambientales relevantes (referidas como concentraciones nominales).

En general, *L. papuana* mostró más resistencia que *A. guttata* para el Malatión y la Cipermetrina, y la diferencia es muy notable, pero *A. guttata* fue menos susceptible a Faena®. Tales diferencias, incluso de varios órdenes de magnitud (hasta cuatro veces en el caso del Malatión), podrían ser el resultado de procesos específicos de detoxificación. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que: a) *A. guttata*, como otras especies de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cladoceros, reasigna la energía de los lípidos y disminuye su concentración corporal cuando están expuestos a sustancias tóxicas (Sancho *et al.*, 2009; Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2012), lo cual involucra menos capacidad para bioacumular compuestos lipófilicos como los pesticidas, que podrían tener mayores efectos sobre los cladóceros ya que estos tóxicos pueden interactuar con varios componentes celulares y afectar así las funciones de los tejidos y órganos, causando en algunos casos la muerte; y b) debido a que la actividad respiratoria en *A. guttata* en su mayoría se lleva a cabo en la superficie del cuerpo (Smirnov, 2013), abre la posibilidad de movilizar pesticidas lipofílicos a través del intercambio de gases que se lleva a cabo a través de las membranas celulares.

Por el contrario, los rotíferos del género *Lecane*, incluida *L. papuana*, presentan una lórica dura compuesta principalmente de quitina y proteínas, que supuestamente actúa como una barrera protectora contra los tóxicos y los bioacumula sobre dicha estructura, por lo tanto, produce menos daño (Hernández-Ruiz *et al.*, 2016).

6.2 Pruebas de toxicidad crónica.

Con respecto a las pruebas crónicas, hay evidencia de que todos los pesticidas afectaron a ambas especies en casi todos los parámetros demográficos; *A. guttata* se vio afectada a la concentración más baja de Cipermetrina (0.47 µg/L o 1/80 del valor CL50), que es ambientalmente relevante ya que se puede encontrar en cuerpos de agua contaminados (Marino y Ronco, 2005) como los de Calvillo, Aguascalientes. Además, se ha informado que otros cladóceros como *D. magna* pueden verse afectados en concentraciones tan bajas como 6.1×10^{-4} µg/L (Kim *et al.*, 2008) debido a la exposición crónica a la Cipermetrina (14 días), lo que puede reducir significativamente la tasa intrínseca de crecimiento (r) de una manera dependiente de la concentración. En contraste, nuestros resultados mostraron que la tasa intrínseca de crecimiento se vio afectada solamente a la concentración de 0.95 µg/L (1/40 del valor CL50), pero no se alteró a concentraciones inferiores o superiores de dicho valor, lo que sugiere una curva de dosis-respuesta no-monotónica, que podría estar relacionada con un proceso de hormesis, que se conoce por efectos de un mismo tóxico, estimulando a bajas concentraciones e inhibiendo a concentraciones más altas (Kefford *et al.*, 2008).

Además, cuando los cladoceros están expuestos a factores ambientales de estrés, pueden reasignar sus recursos energéticos en procesos mutuamente excluyentes, como el crecimiento o la reproducción somática, una vez que se ha garantizado la supervivencia. Sin embargo, algunos cladoceros pueden asignar incluso más recursos energéticos a sus descendientes (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2012), lo que pudo aumentar la fecundidad de *Alona* como respuesta al estrés promovido por la Cipermetrina. Además, el tamaño de los neonatos de cladóceros puede verse influido de diferentes maneras, como la presencia de depredadores (Repka y Walls, 1998), la disponibilidad de alimentos, la densidad de población (Gorbi *et al.*, 2011) o la presencia de compuestos tóxicos; así pues, los neonatos de *A. guttata* nacidos de hembras intoxicadas fueron más grandes que los nacidos de hembras control. Por lo tanto, podemos atribuir este comportamiento a la capacidad de las hembras intoxicadas de cambiar su disposición de energía para producir neonatos más grandes, asegurando su posible supervivencia en ambientes tóxicos (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2012).

La exposición crónica al Malatión afectó a *A. guttata* reduciendo significativamente todos los parámetros demográficos de una manera dependiente respecto a la concentración, comenzando por la concentración más baja (0.066 µg/L o 1/80 del valor CL50) ambientalmente relevante (Newhart, 2006). En otros estudios, se han medido efectos adversos como supervivencia, reproducción y otros en *D. magna* intoxicada con Malatión (21-d), donde todas las alteraciones se observaron por debajo de 0.23 µg/L (Toumi *et al.*, 2015) cuyo valor está cerca de lo que afecta a *A. guttata* en un período similar (14-d). En el sitio web de ECOTOX de USEPA, se encuentran varios informes sobre efectos de Malatión en cladoceros, en los que los valores de LOEC varían entre 3.10 y 20 µg/L, pero la concentración más baja que se probó en nuestro estudio (0.066 µg/L) es al menos 46 veces menor que la LOEC más baja descrita para *D. magna*. Por lo tanto, se puede afirmar que *A. guttata* es un organismo muy sensible que se ve notablemente afectado por el Malatión y, por lo tanto, podría sugerirse como organismo modelo para evaluar la toxicidad en ambientes contaminados por pesticidas.

Con respecto a la prueba de toxicidad crónica con *A. guttata* expuesta a Faena®, todos los parámetros demográficos se vieron afectados, como se puede observar en la Figura 9, donde es evidente que desde las concentraciones más bajas se redujeron la supervivencia y fecundidad de los cladóceros, y en las concentraciones más altas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

probadas se estimuló la reproducción de esta especie, que puede notarse en el incremento en la tasa de reproducción neta. Tal resultado sugiere que Faena® podría estar actuando como un disruptor endocrino porque no afecta a los organismos a concentraciones bajas o altas. Sin embargo, debe señalarse que otra posibilidad es que todos los productos químicos en ésta formulación comercial puedan tener actividad de xenoestrógenos y así aumentar la fecundidad (Weltje *et al.*, 2005). De ser así, el incremento de la fecundidad podría tener efectos negativos a largo plazo en la capacidad de la especie para asignar energía a otros procesos importantes, lo que significa que una mayor fecundidad no siempre es una respuesta positiva.

Los efectos negativos antes mencionados coinciden con los hallazgos de Cuhra *et al.* (2013), donde los organismos no lograron nacer, pero la cantidad de abortos fué más alta en las dafnias intoxicadas que en los controles, ya sea con Glifosato solo (1.35 mg/L) o la formulación comercial Round Up®. Por otra parte, Papchenkova *et al.* (2009) llevaron a cabo un estudio multigeneracional con *D. magna* expuesto al Glifosato y encontraron un mayor número de eclosiones y crías en las pulgas de agua intoxicadas en comparación con el grupo control. Para *A. guttata* el número de nacimientos aumentó significativamente a 2.80 mg/L de Glifosato. Estas comparaciones entre abortos y nacimientos de cladoceros se realizan en términos de la energía asignada a la producción de huevos; en ambos casos, dichos recursos ya no están disponibles para otros procesos, sino solo para el desarrollo de embriones. Por lo tanto, es posible comparar el incremento del número de huevos, incluso si no alcanzaron la madurez, concluyendo que el Glifosato y sus formulaciones comerciales poseen un mecanismo de toxicidad similar a los xenoestrógenos o estimuladores reproductivos.

Lecane papuana se vio afectada por el Malatión y la Cipermetrina en las concentraciones más bajas (0.59 y 0.40 mg/L, respectivamente, o 1/80 del valor CL50). Han sido reportados resultados similares para el rotífero *B. calyciflorus* expuesto a Cipermetrina (a 1 y 2 mg/L) (Huang *et al.*, 2011), y para el rotífero *Philodina acuticornis* expuesto al Malatión, que afecta su reproducción a 0.17 mg/L (Kegley *et al.*, 2016).

Algunos estudios han mostrado que el Glifosato alarga la fase de desarrollo embrionario y disminuye la fecundidad de *B. calyciflorus* cuando son expuestos a concentraciones de 3 mg/L, por lo tanto se esperaba que *L. papuana* se viera afectada de

la misma manera con las concentraciones utilizadas de Faena®; sin embargo, la aparente diferencia podría deberse al hecho de que solo alrededor del 37% de Faena® es Glifosato, además de que la fórmula comercial es incluso más tóxica que el Glifosato solo. Por lo tanto, especulamos que Faena® a 3.97 mg/L (Glifosato 1.45 mg/L) podría afectar en mayor medida a *L. papuana*, pero los rotíferos utilizados no mostraron ninguna evidencia de tal sensibilidad a este tóxico a las concentraciones probadas durante esta investigación.

Vera *et al.* (2012), llevaron a cabo experimentos de microcosmos en los que diferentes rotíferos fueron expuestos al Glifosato en la fórmula comercial Atanor®, lo que resultó en un aumento de la abundancia de *Lecane*, que de acuerdo con los resultados aquí presentados, el Glifosato podría promover la producción de huevos, independientemente de los agentes químicos (vehículos) encontrados en las formulaciones comerciales, y por lo tanto alterar los ciclos de reproducción natural. No obstante, se requiere más investigación para aclarar la participación de diferentes vías de señalización endocrina.

En general, en las pruebas crónicas, ambas especies muestran una notable diferencia con respecto a los órdenes de magnitud, donde *A. guttata* fue más sensible que *L. papuana*, esto se puede explicar con los hechos abordados en las pruebas agudas, ya que las concentraciones utilizadas se derivaron de la CL50 de cada pesticida.

6.3 Detección de residuos de pesticidas.

Se evaluó la residualidad de los pesticidas en guayaba y suelo de un huerto virgen en un período de 0 a 10 días después de la aplicación, los hallazgos mostraron altas concentraciones que podrían representar un riesgo ambiental y al consumidor; éste estudio se realizó bajo las condiciones ambientales de Calvillo, Aguascalientes, en un huerto real; sus objetivos fueron proponer la evaluación de los límites máximos residuales (LMR) de pesticidas utilizados para la guayaba en México, y compararlos con los establecidos en instituciones gubernamentales de salud a nivel mundial, ya que un gran número de éstos no existen para la guayaba (Cuadro 15); las autoridades sanitarias mexicanas parecen estar subestimando los riesgos toxicológicos, algunas de estas sustancias deben ser prohibidas o restringidas; también fue de gran importancia evaluar el peligro que la residualidad de los pesticidas en la fruta representa, para su exportación

y consumo, así como la residualidad en el suelo que puede estar subestimada e incluso podría ser un peligro potencial para contaminar los cuerpos de agua, pudiendo dañar organismos no diana (terrestres y acuáticos); además, se evaluó que la técnica SPME-GC-MS podría ser un método alternativo a QuEChERS utilizado en las instituciones de salud del gobierno; incluso esta técnica adaptada para evaluar pesticidas en guayaba (SPME-GC-MS), también es funcional y aplicable para evaluar la presencia y residualidad de pesticidas en el suelo.

Cuadro 15. Límites Máximos Residuales (mg/kg) de los pesticidas estudiados sobre guayaba en agencias internacionales. SDG: Sin Datos para Guayaba. (Codex Alimentarius, 2017; Canada.ca, 2017; COFEPRIS, 2016; Europa.eu., 2016; Japanese Positive List, 2017; Pesticides, A., y Authority, V. M., 2012 and USEPA, 2012)

Pesticidas	Australia	Canada	Codex Alimentarius	Comisión Europea	Japon	México	USA
Captan	SDG	SDG	SDG	0.03	5	SDG	SDG
Carbofuran	SDG	SDG	SDG	0.01	0.3	SDG	Expirado
Cipermetrina	SDG	1	SDG	0.05	0.03	SDG	1
Malatión	SDG	SDG	SDG	0.02	8	8	8
Metalaxil	SDG	SDG	SDG	0.05	SDG	SDG	SDG
Paratión	No listado	No listado	SDG	0.01	0.2	0.01	Expirado
Metílico							

6.3.1 Residualidad de los pesticidas en guayaba.

En México, la COFEPRIS ha publicado la lista más reciente de LMR para pesticidas; en la cual, ninguno de los pesticidas estudiados está registrado para la guayaba, excepto Malatión y Paratión Metílico con LMR de 8 y 0.01 mg/kg (Cuadro 15) respectivamente, los restantes (Captan, Carbofuran, Cipermetrina y Metalaxil) aún no han sido propuestos para tener LMR, se pueden observar casos similares en los LMR de Australia, Canadá o incluso en el Codex Alimentarius, donde la mayoría de estos pesticidas no tienen LMR para la guayaba (Cuadro 15). Esto es de gran importancia ya que todos estos pesticidas se aplican en Calvillo con alta frecuencia; quizás el caso más

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

grave en el área es el Malatión, utilizado por el 94% de los productores y cuya frecuencia de uso alcanza hasta 24 aplicaciones por año, una situación que nos hace pensar que los productores no están orientados adecuadamente para realizar las aplicaciones (De Lira *et al.*, 2016). De acuerdo con nuestros resultados, el Malatión está presente en guayaba incluso el día 10 después de la aplicación a una concentración de 1.50 mg/kg (Cuadro 12), que está dentro de los LMR de COFEPRIS, EE.UU. y Japón, pero no dentro de los LMR de la Comisión Europea (CE) (0.02 mg/kg), y no están establecidos en Australia, Canadá y el Codex Alimentarius (Cuadro 15). Sin mencionar que las concentraciones de Malatión mencionadas pueden ser subestimadas, ya que nuestro estudio se llevó a cabo en un huerto virgen, situación que difícilmente será la misma en un huerto donde los productores apliquen pesticidas una vez por quincena, y eso puede ser causa de la residualidad a lo largo del año dando lugar a una concentración constante en la fruta, sin degradarse o incluso con la posibilidad de aumentar gradualmente.

Devi *et al.* (2016) realizaron un estudio en guayaba, similar al nuestro, en el que se evaluó la vida media del Malatión, la cual fue de 3 días y de 3.30 días cuando se aplicaron dosis dobles, mientras que en nuestro estudio se encontró una vida media de 6.17 días (Cuadro 12) con aplicaciones de acuerdo con las recomendaciones del producto; esto puede deberse a las muy diferentes condiciones ambientales y climatológicas, mientras éstos autores realizaron su estudio durante el verano en Hisar, India, a una temperatura que oscila entre 35 y 45 ° C, nuestro trabajo se realizó a finales de otoño y principios de invierno, con una temperatura que varió entre 10 y 25 ° C.

Por otro lado, Carbofuran, Metalaxil y Paratión Metílico están presentes en el día 10 en guayaba en concentraciones de 2.27, 1.58 y 0.015 mg/kg (Cuadro 12), respectivamente; el valor de Carbofuran está por encima de los LMR de CE y Japón (0.01 y 0.3 mg/kg respectivamente) (Cuadro 15) y no hay datos para LMR para guayaba (de Carbofuran) en Australia, Canadá, Codex Alimentarius y COFEPRIS; el valor del Metalaxil está por encima del LMR de CE, y no hay datos para guayaba del resto de instituciones mundiales para este pesticida (Cuadro 15); el valor de Paratión Metílico está por encima de los LMR de CE y COFEPRIS al día 10, está por debajo de los de Japón, pero está prohibido en Australia, Canadá y USA, y no hay datos en el Codex Alimentarius para guayaba (Cuadro 15); es importante recordar que el Paratión Metílico está prohibido en México, y que todavía se usa, al menos el 25% de los productores en Calvillo (De Lira

et al., 2016), y no necesariamente usan el mismo producto comercial que nosotros utilizamos para nuestro estudio, el cual solo tiene una concentración del 2% de Paratión Metílico. Existen pocos estudios sobre guayaba, por lo que es urgente monitorear las aplicaciones de pesticidas en frutas de México y generar programas de capacitación efectivos para productores, así como acordar LMR mundiales de pesticidas en guayaba y establecer aquellos que no existen y modificar aquellos que existen que pueden ser de gran riesgo.

En cuanto a la vida media de estos pesticidas en guayaba, encontramos 8.17, 8.19, 7.60 y 6.63 días (Cuadro 12) para Carbofuran, Metalaxil, Paratión Metílico y Captan respectivamente; comparando estos resultados con los de otros autores encontramos que, con los datos en el trabajo de Nigg *et al.* (1984), se obtuvo una vida media de Carbofuran de 19.18 días, lo que es 2.34 veces más de lo que encontramos, sin embargo, este trabajo se llevó a cabo con un cultivo de naranja, a los 35 días y en Lake Alfred, Florida, donde las condiciones pueden ser menos favorable para la degradación del producto. Mehta *et al.* (1997), encontraron que la vida media del Metalaxil en la mostaza es de entre 1.79 y 2.08 días, lo que es aproximadamente 4 veces menos de lo que encontramos en nuestro estudio (8.19 días) (Cuadro 12), sin embargo este trabajo se llevó a cabo en India en un clima subtropical, donde las condiciones ambientales pueden favorecer su degradación, en contraste el sitio de nuestro estudio tuvo una temperatura promedio de 15.8°C, muy inferior a la temperatura de climas tropicales y subtropicales. Según la ATSDR (2017), pequeñas capas de Paratión Metílico formadas en hojas y otras superficies, tienen una vida media de fotodegradación de 3.66 días (88 horas), en nuestro caso fueron 7.60 días (Cuadro 12) (2.08 veces más). Por otro lado, el Captan tiene una vida media en hojas que puede variar de 3 a 13 días (USEPA, 1999), similar a lo que obtuvimos. Como se puede ver, no todos los estudios están de acuerdo con lo que encontramos, ya que las condiciones no son las mismas, y probablemente los productos comerciales (y sus concentraciones) son diferentes; además de las matrices y/o áreas de aplicación y por lo tanto su composición y tiempos de degradación varían.

6.3.2 Comparación de la residualidad de pesticidas en la guayaba con otros frutos mexicanos.

Ortelli (2005), presentó un trabajo en el que se llevaron a cabo estudios para detectar pesticidas en productos cítricos importados de diferentes países, entre ellos México, encontrando Paratión Metílico en concentraciones de 0.02 mg/kg, casi la misma concentración que encontramos en el día 7 de muestreo (0.027 mg/kg); el paratión Metílico también fue encontrado por Ciscato (2009) a una concentración cercana a 0.05 mg/kg en chirimoya, que es la misma concentración que nosotros encontramos en el día 0. En otro estudio conducido en Costa Grande, Guerrero, los pesticidas fueron monitoreados en 19 muestras de mango, encontrando Paratión Metílico en todas ellas, además de algunos organoclorados (Encarnación *et al.*, 2016); sin mencionar que los cítricos, la chirimoya y los mangos tienen los mismos LMR que la guayaba en COFEPRIS y CE (COFEPRIS, 2016; Comisión Europea, 2016); según la ATSDR (2017), el Paratión Metílico se ha encontrado en diversos alimentos en diferentes concentraciones, presente en zanahorias, manzanas, peras, espinacas (incluso enlatadas), entre otros, en concentraciones (en este último) de 1.6 mg/kg (32 veces la concentración que encontramos el día 0); es importante señalar que el producto comercial de Paratión Metílico que utilizamos en nuestro estudio tiene solo el 2% del pesticida, situación que puede no ser la misma en los otros estudios.

Otro estudio de Vargas-González *et al.* (2016) en Coahuila, México, encontraron que hay una larga lista de ingredientes activos (alrededor de 50) que se usan en el cultivo de melón, que comprenden muchos pesticidas, incluidos los utilizados para nuestro estudio, excepto el Paratión Metílico; del resto, todos están permitidos para el melón; sin embargo, el Malatión, el Carbofuran y la Cipermetrina se consideran peligrosos y vale la pena mencionar que los LMR para melones según COFEPRIS también están sobreestimados (Malatión 8 mg/kg, y para Carbofuran y Metalaxil sin límite aplicado en suelo), como lo son los de guayaba; si nuestra fruta de guayaba fuera melón el día 10, los residuos de Carbofuran, Metalaxil y Malatión (2.27, 1.58 y 1.50 mg/kg respectivamente) (Cuadro 12) podrían estar dentro de los LMR de la COFEPRIS, pero estarían por encima de los LMR según el Comisión Europea (0.01, 0.2 y 0.02 mg/kg respectivamente, para el melón) 227, 7.9 y 75 veces más, respectivamente, si agregamos que como en Calvillo, en

Coahuila también hay aplicaciones de hasta 21 veces por ciclo agrícola, la residualidad es inminente; además, el 95% de los productores usan mezclas en Coahuila (Vargas-González *et al.* 2016), lo que puede estar subestimando el efecto tóxico de estos pesticidas.

En 2002, se detectaron varios pesticidas, incluidos Captan y Paratión Metílico en manzanas frescas en Cuahutémoc, Chihuahua, México (Ramírez *et al.*, 2004); el Captan se encontró a concentraciones de hasta 0.99 mg/kg, aproximadamente el doble de lo que encontramos el día 0 (0.46 mg/kg) y el Paratión Metílico a 0.044 mg/kg, casi lo que encontramos el día 0 (0.05 mg/kg) (Ámbos valores obtenidos con un promedio de 70% de recuperación, por lo que pueden estar subestimados); los productores de manzanas podrían estar sobredosificando pesticidas, porque las concentraciones encontradas en la manzana cosechada son más altas que las encontradas en la guayaba el día que se aplicó el pesticida, e incluso el LMR de la CE para Paratión Metílico en manzana es el mismo que de guayaba; un caso similar ocurre en Nuevo León, México, donde se han encontrado Malatión y Paratión Metílico en los huertos de cítricos en concentraciones de hasta 0.44 y 0.009 mg/kg respectivamente (Suárez-Jacobo *et al.*, 2017); la guayaba tuvo una concentración de 1.50 y 0.015 mg/kg, respectivamente (Cuadro 12) a los diez días de la aplicación (3.4 y 1.7 veces más); si tomamos en cuenta la cinética de degradación de nuestro estudio, podemos inferir que estos productos cítricos corren el riesgo de ser cosechados cuando solo han pasado unas dos semanas desde la aplicación de los pesticidas; cabe aclarar que las condiciones de ambos cultivos no son exactamente las mismas, a pesar de ser ámbos en México.

Todos estos hallazgos y comparaciones indican que los pesticidas podrían ser aplicados en México en concentraciones más altas de lo que los productos comerciales sugieren; se aplican con mucha frecuencia, y los frutos se pueden cosechar en fechas muy cercanas a las aplicaciones, ya que comparando estos estudios con los nuestros, hay evidencia de malas prácticas en varias áreas de México, no solo en Calvillo, Aguascalientes.

Es importante aclarar que según las fichas técnicas de los pesticidas comerciales, dependiendo de la plaga y la fruta, será la aplicación de pesticidas en más o menos concentraciones, y por lo tanto la residualidad entre las frutas o vegetales puede variar,

sin embargo, esto no significa que no existe un riesgo inminente ya que muchas frutas tienen los mismos o menos LMR que la guayaba, como el melón. Además, en nuestro trabajo, como en otros estudios, se midió el principio activo de cada pesticida independientemente de los metabolitos; En el caso de los LMR establecidos por la mayoría de las instituciones gubernamentales mundiales, las cantidades tienen en cuenta la suma del principio activo y sus metabolitos, por lo que las cantidades que encontramos podrían ser mayores si medimos estos metabolitos, por lo que el riesgo es subestimado; además, todos los productos comerciales que utilizamos en nuestro estudio tenían entre 2 y 50% del principio activo, excepto el Malatión (83.6%), las concentraciones de estos productos pueden variar incluso en la región de Calvillo.

6.3.3 Residualidad de pesticidas en suelos de huerto de guayaba.

En general, se esperaba que la vida media de todos los pesticidas fuera menor en el suelo que en la fruta, ya que la aplicación se hace en la fruta, además el suelo tiene microorganismos que favorecen la degradación (Newhart, 2006). Sin embargo, en el día 10 del muestreo, el suelo todavía presentó residualidad cuantificable de los pesticidas, a excepción del Paratión Metílico y Cipermetrina; el primero tal vez debido a la pequeña concentración del producto comercial y el segundo debido a la baja tasa de recuperación de la extracción; los otros pesticidas estuvieron presentes en las siguientes concentraciones: Carbofuran 0.30, Malatión 1.31, Metalaxil 0.19 y Captan 0.08 mg/kg (Cuadro 13); estas concentraciones son algo alarmantes, ya que en todos los casos se exceden los LMR de CE (Cuadro 15) establecidos para la guayaba pero de una muestra de suelo (el Carbofuran también excede los LMR japoneses); podemos inferir que la biota terrestre y acuática puede verse perjudicada, si estos pesticidas alcanzan una movilización en este período de tiempo; además, como en la fruta, las concentraciones de Malatión mencionadas para el suelo a los 10 días podrían subestimarse, ya que como hemos mencionado arriba, nuestro estudio se llevó a cabo en un huerto virgen y algunos productores aplican pesticidas en promedio una vez cada quince días, lo que resulta en una concentración constante en el suelo, o peor, un aumento gradual de pesticidas en el suelo e incluso en agua donde la vida media del Malatión puede ser varias semanas. (Newhart, 2006); algunos estudios han demostrado que el Malatión puede ser extremadamente dañino para diferentes organismos, por ejemplo, Garza-León *et al.*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(2017) reportaron que el Malatión puede disminuir los parámetros poblacionales en organismos de agua dulce a partir de concentraciones tan bajas como 66 ng/L (19,000 veces menos de lo que encontramos el día 10); y en estudios con Carbofuran, puede volverse tóxico desde 0.0013 mg/L para *Ceriodaphnia dubia* (Kegley *et al.*, 2016) 200 veces menos de lo que encontramos el día 10; además, el uso de mezclas de pesticidas puede provocar daños a organismos no diana, acuáticos y terrestres, como las larvas de abejas melíferas (Zhu *et al.*, 2014); entonces puede haber daño colateral, si agregamos que hay muchos huertos con drenes a varias represas en Calvillo, probablemente los pesticidas se están movilizando y afectando a la biota acuática y terrestre; Existe evidencia de que hay algunos drenes contaminados en México, como el sistema de drenaje agrícola del Valle de Culiacán, donde se han encontrado organofosforados en concentraciones de 1.29 mg/kg (García-de la Parra *et al.*, 2012), casi el mismo valor de lo que encontramos de Malatión a los 10 días en el suelo (1.31 mg/kg) pero estando en el agua, de nuevo un indicativo de aplicaciones muy frecuentes o excedidas.

Por otro lado, la vida media del Malatión que obtuvimos en el suelo fue de 3.90 días (Cuadro 13), lo que concuerda con lo que menciona Newhart (2006), de 3 a 7 días; aunque hay otros estudios que mencionan que puede durar 17 días en el suelo y hasta 18 en el agua dependiendo de las condiciones (NPIC, 2010); en el caso del Carbofuran, su vida media en el campo puede variar de 1 a 5 semanas, dependiendo en gran medida del tipo de suelo, la humedad, el pH y la temperatura (Cohen *et al.*, 1984); de modo que las condiciones del cultivo de guayaba Calvillo podrían indicar que son adecuadas para llevar a cabo una degradación de Carbofuran en poco tiempo, ya que la vida media de este pesticida en el suelo fue de 5.54 días (Cuadro 13), sin embargo no garantiza que tanto el Malatión como el Carbofuran no estarán presentes en la siguiente aplicación, ya que, como se mencionó, todavía están presentes en el día diez a altas concentraciones.

La vida media de los otros pesticidas en el suelo fue de 6.41, 5.90 y 5 días (Captan, Metalaxil y Paratión Metílico, respectivamente) (Cuadro 13); que en el caso del Captan está de acuerdo con la literatura, durando menos de un día en el agua y de 1 a 10 días en el suelo (USEPA, 1999; Kamrin, 1997). Sin embargo, es importante destacar que Metalaxil y Captan también están presentes en el día 10 del muestreo de suelo (0.19 y 0.08 mg/kg respectivamente) (Cuadro 13) y si se están movilizando, podrían dañar la biota acuática, ya que está documentado que *D. magna* se ve afectado por Metalaxil de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

forma crónica en su reproducción en concentraciones de 0.10 mg/kg (la mitad de lo que encontramos en el día 10) y en el caso de Captan puede afectar agudamente a los protozoos de 0.004 mg/kg en 24 h (Kegley *et al.*, 2016), veinte veces menos de lo que encontramos en el suelo en el día 10 (Cuadro 13).

En un estudio realizado en Río Verde, San Luis Potosí, en suelo, también se encontró, además de pesticidas organoclorados, Paratión Metílico en el 100% de las muestras en concentraciones de 0.025 mg/kg en promedio (Velasco *et al.*, 2014); en nuestro estudio, detectamos Paratión Metílico en el suelo hasta el día tres (0.011 mg/kg) (Cuadro 13), luego la concentración ya no era detectable, lo que sugiere que las muestras de San Luis Potosí se encontraban en una zona de aplicación intensa o el pesticida comercial utilizado en la zona era más concentrado, ya que estas muestras contienen 2.27 veces más Paratión Metílico que el nuestro (a los tres días de aplicación), cabe mencionar que los métodos utilizados para extracción y cuantificación de éste trabajo fue distinto al nuestro, por lo que éstas comparaciones pueden estar subestimadas ya que los límites de detección de éstos autores (0.7 ppm) estaban muy por encima de los nuestros (0.001 ppm). Además, el Paratión Metílico también puede tener efectos graves en la biota acuática. Se ha documentado que afecta a *D. magna* de forma aguda desde concentraciones tan bajas como 0.0001 mg/kg (Kegley *et al.*, 2016) 100 veces menos de lo que encontramos en el suelo el día 3, y 250 veces menos de lo que se encontró en las Río verde.

6.3.4 Riesgos en el humano por exposición a pesticidas aplicados en guayaba.

En México, se sabe poco sobre los cuidados que tienen los productores y los aplicadores de pesticidas, y se han realizado muy pocos estudios para evaluar el riesgo; en Tejupilco, México, se realizó un estudio en el que se evaluaron diferentes aspectos para monitorear el riesgo de exposición a pesticidas en personas intoxicadas, encontrando que el 71.8% fueron durante actividades agrícolas, la mayoría por inhalación, el 54% de los casos fueron considerados por inapropiado manejo de pesticidas, el 88.6% tenía alimentos en los sitios de aplicación y el 74.2% no usó la protección adecuada (Hernández *et al.*, 2007); ésta es una situación que se puede estar replicando en más áreas como Calvillo, ya que hemos visto que una gran parte de los aplicadores (incluidos los que nos ayudaron a llevar a cabo este estudio) no están capacitados adecuadamente para la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aplicación de pesticidas, poniendo en riesgo su salud y también la calidad del producto; además del peligro que involucra tanto al producto y su consumo, como a la biota en general, la aplicación irresponsable de pesticidas en el territorio mexicano, puede estar causando daños a las personas, las que aplican, como las que recoger frutas y personas que viven cerca de huertos; Mendoza *et al.* (2015), menciona que en Calvillo, Aguascalientes, se encuentra el mayor número de pacientes con enfermedades renales en el estado, coincidiendo con el elevado uso de pesticidas; en su trabajo menciona que el 71% de la población estudiada presenta coexposición a pesticidas sugiriendo que este es un factor importante para el desarrollo de la enfermedad renal; entonces, adicionalmente a la residualidad en frutas y suelo (y probablemente en agua) los pesticidas podrían movilizarse a poblaciones rodeadas de huertos de guayabas (en algunos lugares a pocos metros), dada la residualidad que informamos en el día 10 y la frecuente aplicación de pesticidas, el riesgo podría ser subestimado y puede estar afectando a los colonos de Calvillo.

6.3.4 Técnicas SPME-GC-MS y QuEChERS-GC-MS.

Como mencionamos anteriormente, esta comparación se realizó sólo con muestras de guayaba y solo detectando Malatión y Paratión Metílico porque son los únicos pesticidas en los que se enfoca el Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes para guayaba utilizando la metodología de extracción QuEChERS; por lo tanto las mismas muestras que analizamos bajo el método SPME, se enviaron a este Instituto de Gobierno; los resultados muestran que ambas metodologías son capaces de detectar Malatión en las muestras a los 10 días, y no hay diferencia significativa entre las metodologías en cualquier día de muestreo (prueba de comparaciones múltiples de Sidak, $p < 0.05$), la figura 18 muestra la tendencia que siguieron ambos métodos, con una diferencia nula; con respecto al Paratión Metílico, la metodología SPME parece ser más sensible que QuEChERS ya que ésta última no fue capaz de detectarlo incluso en el día 0, mientras que SPME lo detectó hasta el día 10 (0.015 mg/kg) (Cuadro 14) en cantidades superiores a los LMR de COFEPRIS y CE; por lo tanto, existe evidencia de que el método SPME podría ser una alternativa a QuEChERS para implementarlo en Institutos Gubernamentales para determinar pesticidas en vegetales con una sensibilidad igual o incluso mejor, y que cubra las demandas de LMR establecidos por CE. Algunos trabajos

han reportado que los métodos de extracción SPME podrían ser utilizados para sustituir a QuEChERS buscando pesticidas, Silva *et al.* (2013) mencionan que los límites de cuantificación alcanzados por SPME fueron al menos un orden de magnitud menores que los logrados por el método QuEChERS midiendo fungicidas en uvas y fresas; otros estudios reportan que SPME muestra mejores límites de cuantificación (hasta 200 veces más bajos) que QuEChERS midiendo pesticidas en jugos de fruta (Cherta *et al.*, 2013) o midiendo pesticidas a partir de salsa de espagueti, donde la principal ventaja es la sensibilidad y simplicidad (Stenerson *et al.*, 2016).

Finalmente, todos los pesticidas, excepto la Cipermetrina fueron detectados bajo la técnica SPME-GC-MS; los porcentajes de recuperación que nosotros reportamos para ambas matrices van desde 65 a 105%, lo cual coincide parcialmente con aquellos obtenidos por Menezes *et al.* (2010), cuyos porcentajes variaron de 52 a 117% quién utilizó como matriz el mango; también coinciden parcialmente con aquellos obtenidos por Sapahin *et al.* (2014) de 21 a 117% en diversos vegetales, razón por la cual se pueden encontrar variaciones en los resultados y sensibilidad de la técnica, donde puede ser muy buena para ciertos pesticidas en ciertas matrices y caótica para otros pesticidas, como fue en nuestro caso la Cipermetrina, la confiabilidad del método dependerá del pesticida y matriz en cuestión.

6. CONCLUSIONES.

En Calvillo, Aguascalientes, México, se han aplicado varios pesticidas durante décadas debido a su alta producción de guayaba, actualmente existen problemas emergentes en el estado, debido a la aplicación frecuente de pesticidas. Éste trabajo fué dividido en dos partes fundamentales, la primera de ellas Biológica y la segunda la instrumental, en el primer caso se implementaron pruebas de toxicidad aguda y crónica para evaluar el impacto de pesticidas comúnmente utilizados en Calvillo Aguascalientes en especies nativas de agua dulce, el cladocero *A. guttata* y el rotífero *L. papuana*. De éstas pruebas, se determinaron concentraciones letales, efectos en procesos de reproducción y efectos de disrupción endócrina o de hormesis en los organismos de prueba, la susceptibilidad de éstos organismos se evaluó a concentraciones muy bajas, que son de preocupación ambiental, ya que se pueden encontrar en los depósitos naturales de agua. *A. guttata* fue el organismo más sensible y aquí presentamos algunas pruebas de que Faena® podría

actuar como un disruptor endocrino o probablemente como un xenoestrógeno, induciendo un aumento de la fecundidad en el cladóceros. Finalmente, proponemos estas dos especies como organismos modelo para la evaluación de toxicidad en ambientes tropicales y subtropicales.

En cuanto a la parte instrumental del trabajo, se sabe que algunas políticas nacionales e internacionales sobre salud y seguridad han cambiado y se han establecido más restricciones legales para prevenir la acumulación de residuos de pesticidas en los productos agrícolas. Por lo tanto, con éste proyecto se evaluó la residualidad de los pesticidas más usados en Calvillo Aguascalientes en cultivos de guayaba utilizando una técnica de microextracción en fase sólida (SPME) donde encontramos alta residualidad de cinco pesticidas (Captan, Carbofuran, Malatión, Metalaxil y Paratión) en un huerto virgen de guayaba donde se aplicaron estos pesticidas; diez días después de la aplicación solo dos pesticidas (Captan y Cipermetrina) estaban por debajo de los límites de detección de nuestra técnica. En el caso del suelo, la residualidad también fue alta y solo dos pesticidas (Cipermetrina y Paratión) estuvieron por debajo de los límites de detección diez días después de la aplicación. Casi todos los pesticidas estudiados aquí, en algún momento superaron los LMR mundiales establecidos para la guayaba, en algunos casos en varios órdenes de magnitud. Solo dos: el Captan y la Cipermetrina aparentemente no exceden estos límites diez días después de la aplicación del pesticida. La mayoría de los LMR de las agencias internacionales no existen para varios pesticidas que se sabe que se aplican sobre la guayaba, o si existen son en muchos casos superados, además se estimó el riesgo que representa el uso de éstos pesticidas en otros huertos frutales cultivados en México y fue monitoreada la residualidad de los pesticidas en suelo donde puede existir una posible movilización y toxicidad para biota terrestre y acuática; todos éstos hechos representan una seria amenaza para la salud humana y ambiental en la región de Calvillo, Aguascalientes, México, donde las prácticas inadecuadas de aplicación de pesticidas podrían ser comunes y se han reportado serios problemas de salud en la población en el pasado.

Finalmente también se propuso SPME como alternativa para extracción de pesticidas en lugar del método QuEChERS utilizado en algunas instituciones de salud gubernamentales en México, cuya comparación entre éstas dos metodologías de extracción sugiere que el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

método SPME podría ser una alternativa a QuEChERS para implementarlo en Institutos Gubernamentales para determinar pesticidas en vegetales.

7. REFERENCIAS.

Adamczuk, M. 2014. Niche separation by littoral-benthic Chydoridae (Cladocera, Crustacea) in a deep lake-potential drivers of their distribution and role in littoral-pelagic coupling. *J. Limnol.* 73(3)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2017. Toxicological profile for Parathion. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Disponible en línea: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=1425&tid=246> (Acceso: 5 de enero de 2018).

Alpendurada, M. F. 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A.* 889:3-14.

Albert, L. 2004. Panorama de los plaguicidas en México. 7º Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Nayarit, México, 2-8. Disponible en línea: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd56/panorama.pdf> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

Al-Saleh, I. A. 1994. Pesticides: a review article. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*; 13:151-161.

Annett, R., Habibi, H.R. y Hontela, A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34(5):458-479

Arzate-Cárdenas, M. A. y Martínez-Jerónimo, F. 2012. Energy resource reallocation in *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae) reproduction induced by exposure to hexavalent chromium. *Chemosphere.* 87(4):326–332

Ayotte, P., Giroux, S., Dewailly, E., Hernández, M., Farías, P., Danis, R., y Villanueva, C. 2001. DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men. *Epidemiology* 12:366-367.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schäfer, R. B. y Liess, M. 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(27):11039-11043

Berrada, H., Font, G. y Monto, J. C. 2003. Determination of Urea Pesticide Residues in Vegetable, Soil, and Water Samples. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33:19-41.

Bouguerra, M. 1988. Los pesticidas y el Tercer Mundo; *M.C.* 6(59):697-707.

Briggs, S. 1992. Rachel Carson Council. Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor & Francis publishers.

Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Oliver-Rodríguez, B., Ballesteros, O., Navalon, A., Crovetto, G. y Vílchez, J. L. 2011. UNE_EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 24:427-440.

Canada.ca. 2017. Government of Canada – Maximum Residue Levels for Pesticides. Health Canada. Disponible en línea: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/consumer-product-safety/pesticides-pest-management/public/protecting-your-health-environment/pesticides-food/maximum-residue-limits-pesticides.html> (Acceso: 11 de Septiembre de 2017).

Canada.ca. 2018. Government of Canada – Canadian Centre for Occupational Health and Safety. Disponible en línea: <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>. (Acceso: 3 de enero de 2018).

Canosa, P., Rodriguez, I., Rubí, E. y Cela, R. 2005. Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. *J. Chromatogr. A.* 1072(1):107-115

Charoy, C. y Clément, P. 1993. Foraging behaviour of *Brachionus calyciflorus* (Pallas): variations in the swimming path according to presence or absence of algal food (*Chlorella*). In: *Rotifer Symposium VI* (pp. 95–100). Springer, Netherlands.

Cherta, L., Beltran, J., Pitarch, E., y Hernández, F. 2013. Comparison of simple and rapid extraction procedures for the determination of pesticide residues in fruit juices by fast gas chromatography–mass spectrometry. *Food. Anal. Method.* 6(6):1671-1684.

Ciscato, C. H. P., Bertoni G. A., y Henrique M. S. (2009). Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. *Food. Addit. Contam.* 2(2):140-145.

Clement, W. P., Knoll, M. D., Liberty, L. M., Donaldson, P. R., Michaels, P., Barrash, W., y Pelton, J. R. 1999. Geophysical surveys across the Boise Hydrogeophysical Research Site to determine geophysical parameters of a shallow, alluvial aquifer. In *Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems* (pp. 399-408). Society of Exploration Geophysicists.

Codex, Alimentarius. 2017. Pesticide residues in food: maximum residue limits. Issued by Secretariat of the joint FAO/WHO Food Standards Program. Disponible en línea: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticides/en/> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

COFEPRIS, 2016. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Catálogo de pesticidas de uso en México. Disponible en línea: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Pesticidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPesticidas.aspx> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

Cohen, S. Z., Creeger, S. M., Carsel, R. F. y Enfield, C. G. 1984. Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses. Chapter 18 on book: *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes* (pp 297–325)

Csuros, M. 1994. *Environmental sampling and analysis for technicians*. Ed. CRC Press. USA.

Cuhra, M., Traavik, T. y Bøhn, T. 2013. Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22(2):251–262

De Jager, C., Farias, P., Barraza-Villarreal, A., Avila, M., Ayotte, P., Dewailly, E., Dombrowski, C., Rousseau, F., Díaz, V. y Bailey, J. 2006. Reduced seminal parameters

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: A cross-sectional study. *J. Androl.* 27:16-27.

De Lira, K., Borja, B. y Ramos, G. 2016. Diagnóstico de plaguicidas en el manejo del cultivo del guayabo en Calvillo, Ags. Dropdown for producers No. 60. Serial Publication from INIFAP. National Institute of Forest, Agricultural and livestock Research. México, Aguascalientes, Pabellón de Arteaga. North-Center region

Devi, M., Duhan, A., Kumari, B. y Yadav, G. S. 2016. Determination of dimethoate, lambda-cyhalothrin and malathion residues in guava fruits using GCMS-tandem mass spectrometry. *Indian. J. Hortic.* 73(2):197-201.

De la Federación, D. O. 1991. Catálogo oficial de plaguicidas. México D.F.

Díaz, M., Bustos, M. y Espinoza, A. 2009. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. *Ing. Investig.* 29(1):142-142.

DiFonzo, C.D. y Campbell, J.M. 1988. Spatial partitioning of microhabitats in littoral cladoceran communities. *J. Freshw. Ecol.* 4(3):303-313

Domínguez-Cortinas, G., Mejía, J., Santos-Medrano, G. E., y Rico-Martínez, R. 2008. An analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. *Toxicol. Environ. Chem.* 90(2): 377-384.

ECOTOX. 2015. Avanzada base de datos de consulta. Disponible en línea en: http://cfpub.epa.gov/ecotox/advanced_query.htm (Acceso: 13 de octubre de 2017).

Encarnación, Y. V., García, Y. P., Godínez, M. M., Fitz, P. Á., Beristaín, G. H., y González, D. N. 2016. Determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in mango (*Mangifera indica L.*) in the State of Guerrero, Mexico. *Toxicol. Lett.* 259:S222.

Europa.eu. 2016. EUROPA - European Commission. Disponible en línea: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> (Acceso: 14 de Agosto de 2017).

FAO. 2003. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2003. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/005/Y4544E/y4544e00.htm> (Acceso: 3 de enero de 2018).

Fernández-Casalderry, A., Ferrando, M.D. y Andreu-Moliner, E. 1992. Acute toxicity of several pesticides to rotifer (*Brachionus calyciflorus*). B. Environ. Contam. Tox. 48(1):14–17

Frey, D.G. 1991. First subfossil records of *Daphnia* headshields and shells (Anomopoda, Daphniidae) about 10 000 years old from northernmost Greenland, plus *Alona cf. guttata* (Chydoridae). J. Paleolimno. 6(3):193-197

García-de la Parra, L. M., Cervantes-Mojica, L. J., González-Valdivia, C., Martínez-Cordero, F. J., Aguilar-Zárate, G., Bastidas-Bastidas, P., y Betancourt-Lozano, M. 2012. Distribution of pesticides and PCBs in sediments of agricultural drains in the Culiacan Valley, Sinaloa, Mexico. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1-14.

Garza-León, C. V., Arzate-Cárdenas, M. A., y Rico-Martínez, R. 2017. Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24(22):18123-18134

Garza-León, C.V. y Medina-Ramírez, I. 2010. Evaluación de la presencia de medicamentos como contaminantes de agua. Tesis. Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.

Gavrilescu, M. 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. Eng. Life. Sci. 5(6):497-526.

Gorbi, G., Moroni, F., Sandra, S. y Rossi, V. 2011. Anticipatory maternal effects in two different clones of *Daphnia magna* in response to food shortage. J. Limnol. 70(2):222-230

Guerrero, J. A. 2003. Estudio de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. Agron. Colomb. 21(3):198-209

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Guilhermino, L., Sobral, O., Chastinet, C., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Silva, M. C., y Soares, A. M. 1999. A *Daphnia magna* First-Brood Chronic Test: An Alternative to the Conventional 21-Day Chronic Bioassay? *Ecotoxicol Environ. Saf.* 42(1):67-74.

Gupta, R. C. 2011. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Academic Press.

Hayes, T., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Phoung, V., Marjua, Y., Parker, J. y Tsui, M. 2006. Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact? *Environ. Health. Perspect.* 114(1):40

Henriksen, T., Svensmark, B., Lindhardt, B. y Juhler, R. 2001. Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid phase microextraction for GC-MS use. *Chemosphere.* 44:1531-1539

Herbert, C. y Johnstone, R. 2003. *Mass Spectrometry Basics*. Ed. CRC Press. USA. 253-260 pp.

Hernández, M., Jimenez C., Jimenez F. y Arceo, M. 2007. Characterization of acute poisoning by pesticides: occupational profile and behavior of use of agrochemicals in an agricultural area of the State of Mexico, Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 23(4):159-167.

Hernández-Ruiz, E., Alvarado-Flores, J., Rubio-Franchini, I., Ventura-Juárez, J. y Rico-Martínez, R. 2016. Adverse effects and bioconcentration of chromium in two freshwater rotifer species. *Chemosphere* 158:107-115

Hirai, K. 1970 A quantitative relationship between zooplankton and attached animals on aquatic plant in the littoral zone of Lake Biwa, Japan. *J. Limnol.* 31:1-14

Howard, P. 1993. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic chemicals*. Vol. III. Lewis Publishers. Michigan, USA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Huang, L., Liu, C., Wei, C., y Xia, L. 2011. Effects of cypermethrin and deltamethrin on reproduction of *Brachionus calyciflorus*. Shengtai Xuebao/Acta. Ecol. Sinica. 31(34):7632-7638

Hudson, E., Okuda, K., y Parisa, A. 2007. Determination of acetone in seawater using derivatization solid-phase microextraction. Anal. Bioanal. Chem. 388:1618-2642

Irfanullah, H. y Moss, B. 2005. Limnology of an unusual eutrophic acid forest lake. J. Freshw. Ecol. 20(3):441-449

Japanese Positive List, 2017. The Japan Food Chemical Research Foundation. The Japanese Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods. Disponible en línea: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html> (Acceso: 13 de octubre de 2017)

Kamrin, M. A. 1997. Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate. CRC press.

Kefford, B. J., Zalizniak, L., Warne, M. S. y Nugegoda, D. 2008. Is the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? Environ. Pollut. 151(3):516-523

Kegley, S. E., Hill, B. R., Orme, S. y Choi, A. H. 2016. PAN pesticide database. Pesticide Action Network, North America (Oakland, CA). Disponible en línea: <http://www.pesticideinfo.org> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

Kim, Y., Jung, J., Oh, S. y Choi, K. 2008. Aquatic toxicity of cartap and cypermethrin to different life stages of *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. J. Environ. Sci. Health. 43(1):56-64

Koste, W. y Robertson, B. 1990. Taxonomic studies of the Rotifera from shallow waters on the Island of Maraca, Roraima, Brazil. Amazoniana. 11(2):185-200

Krebs, C. J. 1985. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance, 3rd edn. Harper and Row, New York.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Kuster, M., de Alda, M. J. L., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., y Barceló, D. 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. hydrol.* 358(1):112-123.

Lamas, J., Salgado, C., García, C., Llompart, M., Cela, R. y Gómez, M. 2004. Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *J. Chromatogr.* 1046(1-2):241-247

Lehotay, S. J., Tully, J., Garca, A. V., Contreras, M., Mol, H., Heinke, V. y Poulsen, M. E. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC. Int.* 90(2):485-520.

Marino, D. y Ronco, A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *B. Environ. Contam. Toxicol.* 75(4):820-826

Martínez-Jerónimo F., y Rico-Martínez, R. 2009. Ecotoxicología acuática. Capítulo 7, en: *Toxicología Ambiental.* (Jaramillo, F., Rincón, R., y Rico R. coordinadores). Universidad Autónoma de Aguascalientes y Universidad de Guadalajara. Aguascalientes, México.

Mehta, N., Saharan, G. S., y Kathpal, T. S. 1997. Absorption and degradation of Metalaxil in mustard plant (*Brassica juncea*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37(2):119-124.

Mendoza, E. C., González-Ramírez, C., Martínez-Saldaña, M. C., Avelar-González, F. J., Valdivia-Flores, A. G., Aldana-Madrid, M. L. y Jaramillo-Juárez, F. 2015. Estudio de exposición a malatión y cipermetrina y su relación con el riesgo de daño renal en habitantes del municipio de Calvillo Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 46(3):62-72

Menezes, A., dos Santos, F. y de Paula P. 2010. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta.* 81(1):346-354.

Mezquita, F. y Miracle, M. R. 1997. Chydorid assemblages in the sedimentary sequence of Lake La Cruz (Spain) subject to water level changes. In *Cladocera: the Biology of Model Organisms* (pp. 277–285). Springer Netherlands

Miller, G. T. 2002. *Sustaining the Earth, An integrated Approach*. 5th Ed. Brooks/Cole. 227-2332.

Nasreddine, L., y Parent-Massin, D. 2002. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol. Lett.* 127(1):29-41

National Pesticide Information Center (NPIC). 2010. Disponible en línea: <http://npic.orst.edu/factsheets/malagen.html> (Acceso: 5 de enero de 2018)

Nevalainen, L., Van Damme, K., Luoto, T. P. y Salonen, V. P. 2012. Fossil remains of an unknown *Alona* species (Chydoridae, Aloninae) from a high arctic lake in Nordaustlandet (Svalbard) in relation to glaciation and Holocene environmental history. *Polar. Biol.* 35(3):325-333

Newhart, K. 2006. Environmental fate of malathion. California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation, Sacramento

Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater. In J. R. Stein (ed.), *Handbook of physiological methods*. Cambridge University Press. 7-24.

Nigg, H. N., Stamper, J. H., y Knaak, J. B. 1984. Leaf, fruit and soil surface residues of carbosulfan and its metabolites in Florida citrus groves. *J. Agric. Food. Chem.* 32(1):80-85.

NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de agua - evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (crustacea - cladocera) - método de prueba (cancela a la NMX-AA-087-SCFI -1995). Disponible en línea: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166797/NMX-AA-087-SCFI-2010.pdf> (Acceso: 14 de Agosto de 2017).

OECD. 1998. Guidelines for testing of chemicals. Guidelines 211: *Daphnia magna* reproduction test. Paris, France.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1990. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS. Disponible en línea: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/033965/033965-01.pdf> (Acceso: 14 de Agosto de 2017).

Ortelli, D., Edder, P. y Corvi, C. 2005. Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food. Addit. Contam.* 22(5):423-428

Osorio-Treviño, O. C. 2016. Implementación de *Alona cf. guttata* Sars, 1862 (Chydoridae: Aloninae) como organismo modelo para pruebas de toxicidad. Tesis. Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.

Papchenkova, G. A., Golovanova, I. L. y Ushakova, N. V. 2009. The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generations affected by Roundup herbicide. *Inland. Water. Biol.* 2(3):286-291

Pérez-Legaspi, I. A. y Rico-Martínez, R. 2001. Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia* 446(1):375-381

Pérez, L. M. R. 2009. Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios. Universidad de La Laguna.

Pérez, M. A., Segura, A., García, R., Colinas, T., Pérez, M., Vázquez, A. y Navarro, H. 2009. Residuos de pesticidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 25(2):103-110.

Pérez-Olvera, M. A., Navarro-Garza, H. y Miranda-Cruz, E. 2011. Use of pesticides for vegetable crops in Mexico. In *Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management*. InTech.

Pesticides, A. y Authority, V. M. (2012). Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument No. 4 (MRL Standard). Disponible en línea: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2014C00970> (Acceso: 26 de octubre de 2017).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ramírez, J. A. y Lacasaña, M. 2001. Pesticidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch. Prev. Riesgos. Labor. 4(2):67-75

Ramírez, P. y Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. pp. 5-8. Disponible en Línea: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/573.pdf>. (Acceso: 3 de enero de 2018)

Rand, G. M. y Petrocelli, S. 1985. Fundamentals of Aquatic toxicology. Hemisphere Publishing Corporation. pp. 666.

Rea, W. 1996. Pesticides, review article. J. Nutr. Environ. Med. 6(1):55-124

Rebechi, D., Richardi, V. S., Vicentini, M., Guiloski, I. C., Assis, H. C. y Navarro-Silva, M. A. 2014. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. Rev. Bras. Entomol. 58(3):296-301

Repetto, M. 1995. Toxicología del alcohol etílico. Toxicología avanzada. 1ª ed. Madrid: Díaz de Santos, 425-75.

Repka, S. y Walls, M. 1998. Variation in the neonate size of *Daphnia pulex*: the effects of predator exposure and clonal origin. Aquat. Ecol. 32(3):203-209

Rico-Martínez, R., Velázquez-Rojas, C. A., Pérez-Legaspi, I. A., y Santos-Medrano, G. E. 2001. The use of aquatic invertebrate toxicity tests and invertebrate enzyme biomarkers to assess toxicity in the states of Aguascalientes and Jalisco, Mexico. In Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2 (pp. 427-438). Springer US.

Ramírez, J. A. y Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch. Prev. Riesgos. Labor. 4(2):67-75

Ramírez, L. M. R., Jacobo C. J. L., Ávila M. M. R. y Parra Q. R. Á. 2004. Eficiencia del Uso de Plaguicidas en Huertos de Manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. doméstica (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. Rev. Mex. Fitopatol. 22(3)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rodríguez, I., Carpinteiro, J., Quintana, J. B., Carro A. M. Lorenzo, R. A. y Cela, R. 2004. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. *J.Chromatogr.* 8:1-8

Sánchez-Bayo, F. 2012. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 4:2161-0525

Sancho, E., Villarroel, M. J., Andreu, E. y Ferrando, M. D. 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere.* 74(9):1171-1178

Santos-Medrano, G. E. y Rico-Martínez, R. 2013. Lethal effects of five metals on the freshwater rotifers *Asplanchna brighwellii* and *Brachionus calyciflorus*. *Hidrobiológica.* 23 (1): 82-86.

Sapahin, H. A., Makahleh, A. y Saad, B. 2014. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography–flame photometric detector. *Arabian J. Chem.*

Sato, R., Medina, C., Medina, J. y Frausto, C. 2004. Aplicación de la espectroscopia Raman para la caracterización de pesticidas orgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 20(1):2330.

Saunders, D. y Harper, C. 1994. Pesticides. En: Hayes, A. W. (ed) *Principles and methods of toxicology.* Raven Press, Nueva York, NY, pp. 389-415.

Segers, H. 1995. Rotifera 2. The Lecanidae (Monogononta). In: Nogrady, T. y Dumont, H. J. (eds) *Guides to the identification of the Microinvertebrates of the continental waters of the world 6.* SPB Academic, The Hague.

Sharma, B. K. y Sharma, S. 2012. Notes on some rare and interesting Cladocera (Crustacea: Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae) from Deepor Beel, Assam, India. *J. Threat. Taxa.* 4(1):2304-2309

Siehoff, S., Hammers-Wirtz, M., Strauss, T. y Ratte, H.T. 2009. Periphyton as alternative food source for the filter-feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshw. Biol.* 54(1):15-23

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Silva, É. A. S., Lopez-Avila, V., y Pawliszyn, J. 2013. Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits. *J. Chromatogr. A.* 1313:139-146

Sinev, A. Y. y Silva-Briano, M. 2012. Cladocerans of genus *Alona Baird*, 1843 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) and related genera from Aguascalientes State, Mexico. *Zootaxa* 3569:1-24

Smirnov, N. N. 2013. *Physiology of the Cladocera*. Academic Press, London, U.K.

Snell, T. W. y Persoone, G. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquat. Toxicol.* 14(1):65-80

Soboleva, E., Ahad, K. y Ambrus, A., 2004. Contribution of Sampling to the Variability of Pesticide Residue Data. *J. AOAC. Int.* 129:1123.

StatSoft, Inc. 2004 Statistica (data analysis software system), versión 7. www.statsoft.com

Stenerson, K. K., Young, T., Shirey, R., Chen, Y., y Sidisky, L. 2016. Application of SPME Using an Overcoated PDMS-DVB Fiber to the Extraction of Pesticides From Spaghetti Sauce: Method Evaluation and Comparison to QuEChERS. *LC. GC. N. Am.* 34(7):500-509.

Suárez-Jacobo, A., Alcantar-Rosales, V. M., Alonso-Segura, D., Heras-Ramírez, M., Elizarragaz-De La Rosa, D., Lugo-Melchor, O., y Gaspar-Ramírez, O. 2017. Pesticide residues in orange fruit from citrus orchards in Nuevo Leon State, Mexico. *Food. Addit. Contam. Part B.* 1-8.

Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Camara, B.I., Felten, V. y Ferard, J.F. 2015. Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion (organophosphorous pesticide). *J. Environ. Sci. Health. B.* 50(1):34-44

Trac, L.N., Andersen, O. y Palmqvist, A. 2016. Deciphering mechanisms of malathion toxicity under pulse exposure of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 35(2):394-404

Tuormaa, T. 1995. Adverse effects of agrochemicals on reproduction and health: a brief review from the literatura. J. Nutr. Environ. Med. 5(4):353.

U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA-600/4-85-013, U.S.A. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S.A. Disponible en línea: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30000V40.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1986%20Thru%201990&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C86THRU90%5CTXT%5C00000005%5C30000V40.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C- &MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=20&ZyEntry=1&slide> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Reregistration Eligibility Decision (RED): Captan; EPA-738-R-99-015; Office of Pesticide Programs. U.S.A. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S.A. Disponible en línea: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0120red.pdf> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

US Environmental Protection Agency (2012) Office of Pesticide Programs Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Commodity). U.S.A. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S.A. Disponible en línea: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/tolerances-commodity.pdf> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

U.S. Environmental Protection Agency. 2017. Types of pesticide ingredients. U.S.A. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S.A. Disponible en línea: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients> (Acceso: 13 de octubre de 2017).

Van Damme, K. y Eggermont, H. 2011. The Afromontane Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) of the Rwenzori (Uganda–DR Congo): taxonomy, ecology and biogeography. *Hydrobiologia* 676(1):57-100

Van der Hoff, G. R. y Van Zoonen, P. 1999. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 843(1):301-322.

Vargas-González, G., Alvarez-Reyna, V., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., Jiménez-Díaz, F., Vásquez-Arroyo, J., y García-Carrillo, M. 2016. Patrón de uso de pesticidas de alto riesgo en el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) en la Comarca Lagunera. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(9):367-378.

Velasco, A., Hernández, S., Ramírez, M. y Ortiz, I. 2014. Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico. *J. Environ. Sci. Health. B.* 49(7):498-504

Velicu, M. y Suri, R. 2008. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ. Monit. Assess.* 154(1):349-359.

Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M, Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology.* 21(7):1805-1816

Versteeg, D. J., Stalmans, M., Dyer, S. D. y Janssen, C. 1997. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere.* 34(4):869-892

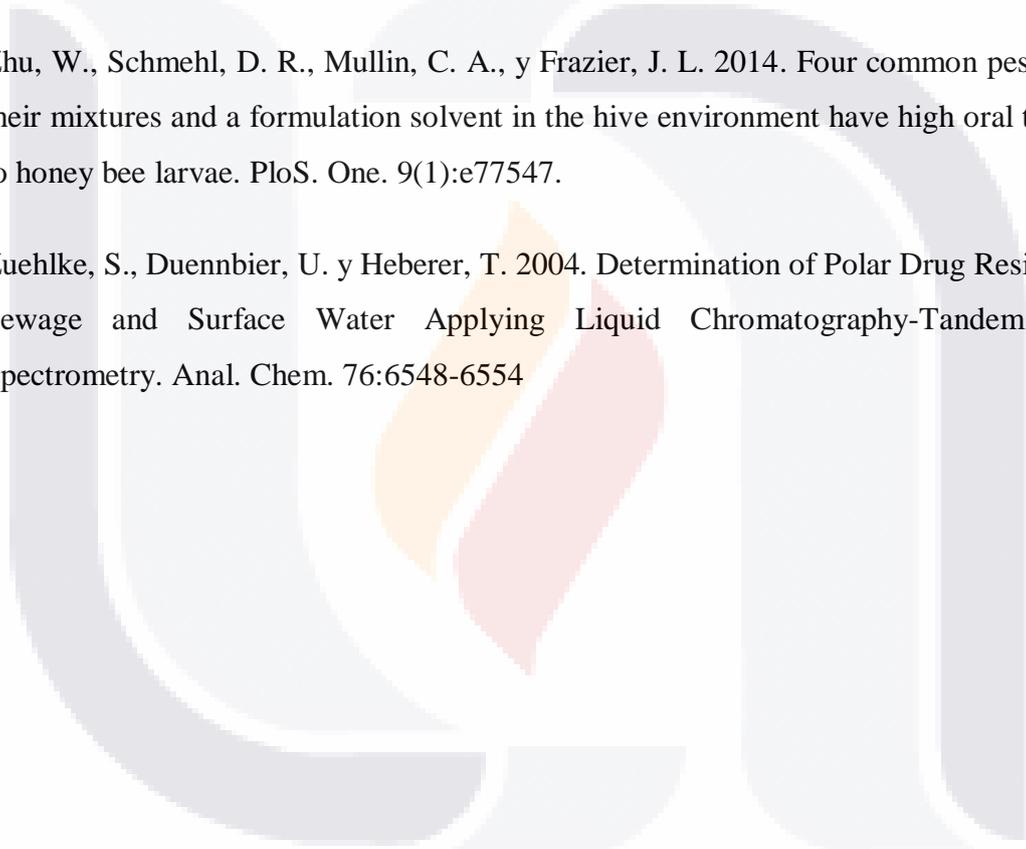
Weltje, L., Vom Saal, F. S. y Oehlmann, J. 2005. Reproductive stimulation by low doses of xenoestrogens contrasts with the view of hormesis as an adaptive response. *Hum. Exp. Toxicol.* 24(9):431–437

World Health Organization (WHO). 2010. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Disponible en línea: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf. (Acceso: 5 de enero de 2018)

Yang, L., Chongyu, L., Hongtao, L., Jun, D. y Tiangang, L. 2006. Full automation of solid-phase microextraction/on-fiber derivatization for simultaneous determination of endocrine-disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386:391–397

Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., y Frazier, J. L. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PloS. One.* 9(1):e77547.

Zuehlke, S., Duennbier, U. y Heberer, T. 2004. Determination of Polar Drug Residues in Sewage and Surface Water Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 76:6548-6554



8. ANEXOS. Artículo y Carta de aceptación.

Environ Sci Pollut Res
 DOI 10.1007/s11356-017-9454-y



RESEARCH ARTICLE

Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species

Carlos Vicente Garza-León¹ · Mario Alberto Arzate-Cárdenas¹ · Roberto Rico-Martínez¹

Received: 1 February 2017 / Accepted: 1 June 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract In Aguascalientes, Mexico, there is a special concern about pesticides because of their intensive use on guava production areas, which are located in the vicinity of water reservoirs; thus, non-target organisms could be exposed. Thereafter, the aim of this work was to assess the effect of cypermethrin, Faena® (glyphosate), and malathion, which are the most used pesticides in Aguascalientes' guava production, on the indigenous freshwater species *Alona guttata* (cladoceran) and *Lecane papuana* (rotifer). Acute 48-h toxicity tests were carried out, and LC₅₀ values were calculated. Then, five sublethal concentrations (1/80, 1/40, 1/20, 1/10, and 1/5 of the respective LC₅₀) were selected for the chronic assays: (a) intrinsic growth rate analysis in the rotifer and (b) partial life table analysis in the cladoceran. The results of the acute toxicity tests showed that *A. guttata* was more sensitive to malathion (LC₅₀ = 5.26 × 10⁻³ mg/L) at concentrations found in natural environments with continuous application on guava fields, whereas *L. papuana* was more sensitive to Faena® (LC₅₀ = 19.89 mg/L). The somatic growth of *A. guttata* was inhibited for the chronic exposure to cypermethrin. In addition, cypermethrin and Faena® seemed to exert endocrine disruptive effects on *A. guttata*. Moreover, malathion chronic exposure significantly decreased the survival of *A. guttata*. Moreover, *L. papuana* was affected chronically for the three pesticides.

Keywords Alternative test organisms · Cladocerans · LC₅₀ · Pesticides · Rotifers · Partial life table analysis

Introduction

Pesticides are chemical substances used to control or eliminate organisms that are considered pests, which can cause human and animal diseases or even affect agricultural and forestry production (USEPA 2010). Despite the importance of pesticides in agriculture to increase crop yield, these chemicals have become important pollutants that cause negative effects at different biological trophic levels, including human health (Alvarado-Flores et al. 2015). Pesticides are mainly used for agriculture in high concentrations over extended areas, and little is known of how their degradation products affect non-target organisms in terrestrial and freshwater environments, altering species abundance and ecosystem structure (Beketov et al. 2013). Pollutants in aquatic ecosystems at concentrations as low as few nanograms can cause damage to living biota and modify the interactions within the trophic webs; therefore, it is important to use sensitive markers to assess the environmental risk associated to pesticide use and exposure (Rebechi et al. 2014).

The use of pesticides in México is increasing, with an annual consumption of about 95 kt (Hernandez-Antonio and Hansen 2011). In the state of Aguascalientes located in Central Mexico, eight crops are being cultivated, but guava cultivar represents one of the most important products in the region at national level (Padilla-Ramirez et al. 2005). For its culture, croplands are situated in the surroundings of water reservoirs, which can be polluted by pesticides; additionally, recent surveys within agricultural producers in the state of Aguascalientes suggest that the most frequently applied pesticides in guava culture are cypermethrin, glyphosate, and malathion (De Lima et al. 2016; Mendoza et al. 2015).

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Roberto Rico-Martínez
 rrico@correouasa.mx

¹ Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad 940, C.P. 20131 Aguascalientes, Ags, Mexico

Published online: 19 June 2017



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Editor Decision - Accepted.

01/06/2017

Ref.: Ms. No. ESPR-D-17-00623R1

TOXICITY EVALUATION OF CYPERMETHRIN, GLYPHOSATE AND
MALATHION, ON TWO INDIGENOUS ZOOPLANKTONIC SPECIES

Environmental Science and Pollution Research

Dear Dr. Rico-Martinez,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Environmental Science and Pollution Research. This letter serves as an acceptance certificate. Your article has been sent to the production service and you will receive the proofs soon.

If you have any question regarding:

- Proofs/erratum: please contact Dennis Villahermosa +
dennis.villahermosa@springer.com

- Any other question: please contact the editorial office: Géraldine Billerot or Marianne Salaun + edito@ism.u-bordeaux1.fr

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Dr. Philippe Garrigues

Editor

Environmental Science and Pollution Research