

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua
UNAN-MANAGUA
Recinto Universitario Rubén Darío
Facultad de Ciencias e Ingenierías
Departamento de Química
Monografía para Optar al Título de Licenciado en Química
Ambiental



TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL FUNGICIDA VONDOZEB 80WP, UTILIZANDO COMO BIOINDICADORES ALLIUM CEPA, ARTEMIA SALINA; LABORATORIO DE BIOLOGÍA, UNAN-MANAGUA, FEBRERO-ABRIL 2015.

Autora:

Bra. Giselle Alejandra Guadamuz Gutiérrez

Biblioteca Central "Salomón de la Seiva

UNAN-Managua

Fecha de Ingreso

10/2/16

Comprado:

Donx Química

Precio: C\$

US

Registro No.

57901

Tutor:

Lic. Francisca Teresa Salazar Cabrera

QUIAM
378.242
Gua
2015

Managua, Octubre 2015

“Cuanto mayor sea el esfuerzo, mayor será la gloria”
Pierre corneille

Dedicatoria

A *Dios*, por darme la vida y por su infinita misericordia, por permitirme ser lo que ahora soy y regalarme salud y vida para saborear las mieles de este nuevo capítulo en mi vida.

Por demostrarme día con día que "no soy un error y haber escrito todos los días de mi vida en Su Libro" Sal. 139:15

A mis *padres*, ejemplo de lucha y perseverancia, los seres que más amo y a los cuales les estaré eternamente agradecida por la entrega de su vida y dedicación. Ellos que con esfuerzo, sacrificio y horas de desvelo me han ayudado a coronar mi carrera y hacer de mí una profesional.

Esperando hacerlos sentir orgullosos de cada éxito que he logrado, solo me resta decir que este logro es ¡por ellos y para ellos!

A mis *hermanos*, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. A Karla y Carlos Guadamuz por llenar mi vida de alegrías y amor cuando así lo he necesitado, por siempre apoyarme en las buenas y en las malas, pero por sobre todas las cosas por su amor incondicional. ¡Los amo!

Agradecimiento

"Todo lo puedo en Cristo que me fortalece." **Filipenses 4:13**

Son muchas los seres a los que me gustaría agradecer por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Sin importar si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mi vida y por todo el cariño brindado.

A Dios:

Primero que nada quiero agradecerte a ti Padre Celestial, porque cuando necesité de consuelo y fortaleza, Tú estuviste a mi lado, dando muestras de tu gran amor, y en mi horas de flaqueza me cargastes entre tus brazos, para poder seguir adelante.

Y, por supuesto, por haber puesto a personas tan maravillosas en mi camino que en lugar de hacer que desviara mi rumbo en la vida, me han dirigido por el camino correcto.

A mi padre y Madre:

Carlos Guadamuz Navas; quien ha sido siempre un hombre admirable, que me ha brindado cuidados, quien con sus sabios consejos orientó mis pasos por el camino recto de la vida, por enseñarme a encarar las adversidades de la vida sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento, y por supuesto invirtió en mi formación profesional. Y a mi madre, Ivania Gutiérrez Rosales, por apoyarme en los momentos más difíciles, por respetar mi persona y abrir paso a mis decisiones, por confiar en mi sentido común, infundirme valores y principios e inspirarme perseverancia y acompañarme durante mis desvelos.

A ambos, gracias por enseñarme el valor que tiene todo trabajo y la responsabilidad que este conlleva para lograr estar siempre dentro de los mejores.

A mis familiares, en general:

Por sus afectos y oraciones que han estado siempre presentes en mi vida. Por apoyarme en este camino incierto lleno de obstáculos y barreras, por no dejarme rendir y por demostrarme que las cosas se pueden hacer siempre y cuando uno las quiera hacer. En especial a Andrea Espinoza, quien siempre creyó en mi y me alentaba a no dejarme vencer cuando en las cosas no parecían irme bien.

Gracias por compartir conmigo los momentos más importantes de mi vida.

A mis amigos:

Ana Osorio, Grethel Loáisiga, Joseling López e Irvin Alemán, su presencia y apoyo incondicional no permitió que desanimara en ningún momento, su alegría fue el mayor empuje para este culmen.

Por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca olvidaré, por tantos momentos compartidos a lo largo de este camino en el cual aprendí a trabajar en equipo y a tomar en cuenta que ante todo lo que se nos presente en nuestras vidas lo más importante es la amistad, y que a pesar de los problemas siempre habrá otra familia que te apoyará a perseverar en todas tus metas por alcanzar. ¡Simplemente los amo!.

A mi tutora; Francisca Salazar:

Por haberme guiado con paso firme y emprendedor en todo este tiempo de investigación y aprendizaje.

Por creer en mi, y haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional en el Laboratorio de Biología de la UNAN- Managua, y por todo el apoyo y facilidades que me fueron otorgadas. Por permitirme crecer profesionalmente y aprender de ella cosas nuevas.

A mis maestros:

Que con esmero y paciencia me formaron y transmitieron el conocimiento que hoy poseo, y unos que de manera especial invirtieron tiempo extra en mi preparación particular.

MSc. Lucina Bermúdez, por que cuando necesité de un sabio consejo para tomar la mejor decisión ella estuvo allí para escucharme y orientarme, así como brindarme la solución al problema.

No solo mi familia y amigos me han hecho madurar cómo persona, su presencia durante este corto tiempo en mi vida, queridos maestros, marcará el resto de ella.

Hoy se cierra un capítulo de esfuerzo personal, para abrirse uno más en el libro de mi vida, y todo por el granito de arena que aportaron todos y cada uno de ustedes. Si solo pudiera decir una frase en mi vida, sería "Gracias", y sería por haberme alentado a no decaer, es por todos ustedes; y por todos aquellos que no logre mencionar, pero que a su vez agradezco sus muestras de cariño para conmigo; que ahora estoy a un pequeño paso de ser Licenciada.

MSc. Rosa María González Tapia
Directora del Departamento de Química
Facultad de Ciencias e Ingeniería
UNAN – MANAGUA

Estimada Sra. González:

Por medio de la presente hago constar que la autora **Bra. Giselle Alejandra Guadamuz Gutiérrez** ha culminado satisfactoriamente su trabajo monográfico que lleva por tema “Evaluación de la toxicidad del fungicida *Vondozeb 80WP*, utilizando Bioindicadores de toxicidad *Allium cepa*, *Artemia salina*; Laboratorio de Biología, UNAN – Managua, Febrero – Abril 2015” y todas las posibles correcciones ya fueron totalmente incorporadas.

Atentamente:

Lic. Francisca Salazar
Responsable de Laboratorio
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias e Ingeniería
UNAN - Managua

Resumen

El estudio se centró en la *evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP* mediante los bioensayos en *Artemia salina* y *Allium cepa*. El bioensayo con *Allium Cepa* fue utilizado para evaluar la genotoxicidad del fungicida; para ello se expusieron bulbos de cebolla (*Allium Cepa*) durante 24h a concentraciones de 312.5, 625, 1250, 1875 y 2500 ppm. Al finalizar el estudio se concluyó que a una concentración mayor a 1155 ppm se inhibe el 50% del crecimiento de las raíces y además se observan alteraciones en las fases de mitosis sobre las células meristemáticas del ápice de la raíz; siendo la alteración cromosómica predominante el puente anafásico en el proceso de mitosis.

Artemia Salina fue usado para evaluar citotoxicidad mediante la determinación de la dosis letal media (DL₅₀); para ello se utilizaron nauplios de *Artemia Salina* que fueron expuestos durante 24 horas al fungicida *Vondozeb 80WP* a concentración de 1250, 156.25, 78.125, 39.062, 19.531 y 9.766 ppm, resultando ser 26.302 ± 5.274 ppm la concentración que provoca la muerte del 50% del total de *Artemias Salinas* sometidas al estudio, evidenciándose la alta toxicidad del producto agrícola.

Palabras claves: Allium Cepa, Artemia Salina, Vondozeb 80WP, Toxicidad.

Tabla de contenido

<i>Dedicatoria</i>	<i>i</i>
<i>Agradecimiento</i>	<i>ii</i>
<i>Opinión del Tutor</i>	<i>v</i>
<i>Resumen</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de Abreviatura</i>	<i>vii</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>x</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>xiii</i>
<i>Índice de Diagramas</i>	<i>xiv</i>
<i>Índice de Ecuaciones</i>	<i>xv</i>
<i>Índice de Gráficos</i>	<i>xvi</i>
CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES	1
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Planteamiento del problema	3
1.4. Justificación	4
1.5. Antecedentes.....	5
CAPÍTULO II. MARCO DE REFERENCIA	8
2.1. Generalidades del tóxico sometido a prueba	9
2.1.1. Pesticidas	10
2.1.2. Clasificación	10
2.1.3. Fungicidas	15
2.1.4. Vondozeb 80WP.....	20
2.2. Bioindicadores de Toxicidad	26
2.2.1. Allium cepa	27
2.2.2. Artemia salina	32
2.3. Bioensayo.....	38
2.3.1. Definición.....	39
2.3.2. Objetivo	40

2.3.3. Aplicación	41
2.3.4. Parámetros	41
2.3.5. Ventajas.....	42
2.3.6. Bioensayos en este estudio	42
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS.....	49
CAPITULO IV. DISEÑO METODOLÓGICO.....	51
4.1. Descripción del ámbito de estudio	52
4.2. Tipo de estudio	52
4.3. Población y muestra	52
4.3.1. Población.....	52
4.3.2. Muestra	53
4.4. Variables y Operacionalización	53
4.4.1. Variable independiente	53
4.4.2. Variables dependientes	53
4.4.3. Operacionalización de variables	54
4.5. Material y método	55
4.5.1. Materiales para recolectar información	55
4.5.2. Materiales para procesar la información	55
4.5.3. Material y métodos a utilizar	56
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	68
5.1. Bioensayo Allium Cepa.....	69
5.2. Bioensayo Artemia Salina	89
5.2.1. Método de los Probits	89
5.2.2. Método Reed-Muench	101
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	106
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....	108
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS.....	117

Índice de tablas

Tabla 2.1 Clasificación de los plaguicidas según toxicidad aguda expresada en DL_{50} (mg/Kg).....	14
Tabla 2.2 Clasificación de la toxicidad según CYTED.....	14
Tabla 2.3 Composición porcentual Vondozeb 80WP.....	22
Tabla 2.4 Propiedades físicas y químicas Vondozeb 80WP.....	23
Tabla 2.5 Toxicidad aguda del Vondozeb 80WP.....	24
Tabla 2.6 Toxicidad Crónica del Vondozeb 80WP.....	24
Tabla 2.7 Ecotoxicología del Vondozeb 80WP.....	25
Tabla 2.8 Morfología de Allium Cepa.....	27

Índice de tablas

Tabla 5.1. Longitudes de las raíces de Allium Cepa al finalizar el bioensayo.....	69
Tabla 5.2. Parámetro Turgencia y coloración.....	70
Tabla 5.3. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco vs. [312.5ppm].....	70
Tabla 5.4. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [625ppm].....	71
Tabla 5.5. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [1250ppm].....	72
Tabla 5.6. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [1875ppm].....	73
Tabla 5.7. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [2500ppm].....	74
Tabla 5.8. Cálculo del coeficiente de inhibición.....	76
Tabla 5.9. Alteraciones en las fases de mitosis de las raíces en el control negativo (Blanco).....	79
Tabla 5.10. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [312.5ppm].....	81
Tabla 5.11. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [625ppn].....	83
Tabla 5.12. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [1250ppm].....	85
Tabla 5.13. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces en la solución [1875ppm].....	86
Tabla 5.14. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [2500ppm].....	87
Tabla 5.15. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [2500ppm].....	88
Tabla 5.16. Supervivencia y mortalidad de Artemia Salina frente a las diferentes concentraciones de fungicida preparadas.....	90

Índice de tablas (continuación)

Tabla 5.17. Porcentaje de mortalidad en el control negativo.....	91
Tabla 5.18. Probits Empíricos obtenidos a partir del porcentaje de mortalidad para cada concentración.....	93
Tabla 5.19. Cálculo de Probit calculado.....	96
Tabla 5.20. Determinación de Chi cuadrado, X^2	97
Tabla 5.21. Cálculo del error estándar del $\text{Log}_{10} \text{DL}_{50}$	99
Tabla 5.22. Mortalidad y supervivencia de Artemia Salina.....	101

Índice de figuras

Figura 1. Hojas afectadas por una enfermedad.....	15
Figura 2. Hojas afectadas por una enfermedad.....	16
Figura 3. Cultivo cosechado dañado.....	16
Figura 4. Pérdida de la vistosidad.....	16
Figura 5. Pérdida del cultivo durante el almacenamiento.....	16
Figura 6. a. Fungicida de contacto, b. Fungicida sistémico, c. Fungicida sistémico.....	18
Figura 7. Estructura química del fungicida.....	21
Figura 8. Cebolla Marrón.....	30,
Figura 9. Cebolla Dulce.....	30
Figura 10. Cebolla Morada.....	30
Figura 11. Cebolla Chalota.....	31
Figura 12. Cebolleta.....	31
Figura 13. Cebollino.....	31
Figura 14. Artemia Salina en estado adulto.....	32
Figura 15 Distribución mundial de Artemia Salina.....	32
Figura 16. Morfología de Artemia, hembra adulta y detalle de las antenas desarrolladas en un macho adulto.....	34
Figura 17. Ciclo de vida de Artemia salina.....	36

Índice de diagramas

Diagrama 1. Preparación de las raíces para observar mitosis en el microscopio.....	61
Diagrama 2. Metodología para la determinación de la CI_{50}	66
Diagrama 3. Metodología para la determinación de la DL_{50}	67

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo del coeficiente de inhibición.....	75
Ecuación 2. Transformación a las unidades probits.....	89
Ecuación 3. Porcentaje mortalidad.....	90
Ecuación 4. Porcentaje de mortalidad.....	93
Ecuación 5. Cálculo de la pendiente.....	95
Ecuación 6. Probit calculado.....	95
Ecuación 7. Contribución al Chi-Cuadrado.....	97
Ecuación 8. Grados de libertad.....	98
Ecuación 9. Cálculo del error estándar del logaritmo de la DL_{50}	98
Ecuación 10. Cálculo del error estándar de la DL_{50}	99
Ecuación 11. Cálculo de intervalos de confianza.....	100
Ecuación 12. Cálculo de la desviación estándar Reed – Muench.....	103

Índice de gráficos

Gráfico 5.1. Promedio del crecimiento de las raíces Vs. cada concentración.....	77
Gráfica 5.2. Concentración Vs. porcentaje de inhibición.....	77
Gráfica 5.3. Tendencia de muerte de Artemias Salinas a las diferentes concentraciones.....	92
Gráfico 5.4. Promedios de muerte por cada concentración.....	93
Gráfico 5.5. Cálculo de la DL_{50}	94
Gráfico 5.6. Determinación de la DL_{50} usando el método gráfico de Reed-Muench.....	102
Gráfico 5.7. Determinación de intercuartiles de la DL_{50}	104

*"Todas las cosas son veneno y nada es sin veneno, sólo la dosis hace al
veneno."*

Paracelso

CAPÍTULO I.
Aspectos Generales

1.1. Introducción

Los plaguicidas permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y el ganado, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos. *Vondozeb 80WP* es un plaguicida que se encarga de controlar diversos hongos que pueden atacar los cultivos y por lo tanto representar un daño económico para los agricultores.

No obstante la importancia económica de *Vondozeb 80WP*, es necesario destacar que por ser un producto químico, su aplicación indiscriminada y sin control en tierras agrícolas nicaragüenses puede ocasionar daños al ambiente y al hombre manifestándose en intoxicaciones de grado diverso y en efectos nocivos tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros.

Es por la problemática antes mencionada que se hace importante que las autoridades nicaragüenses que permiten la comercialización de este producto se basen en el requerimiento de bioensayos para examinar sus efectos no sólo en el organismo que se desea atacar y en la planta o animal hospedadores, sino también en otros organismos a los que se puede llegar, ya sea directamente o a través de la cadena alimenticia.

En este trabajo monográfico se realizaron dos bioensayos utilizando *Artemia Salina* y *Allium Cepa* como bioindicadores, para evaluar el potencial citotóxico y genotóxico del fungicida *Vondozeb 80WP* después de 24 y 72h de exposición, respectivamente. Para ello se hizo necesario determinar el valor de la DL₅₀ (Dosis Letal que provocó la muerte de la mitad de la población de *Artemias Salinas* utilizadas en el bioensayo) del fungicida; también se hizo necesario observar el daño que provocaba la aplicación de concentraciones conocidas de *Vondozeb 80WP* sobre las raíces de bulbos de *Allium Cepa*, tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico.

1.2. Objetivos

Objetivo General

Determinar la toxicidad y genotoxicidad del fungicida *Vondozeb 80WP*, aplicando los bioensayos de *Allium cepa* y *Artemia salina* en el laboratorio de Biología, Febrero-Abril 2015

Objetivos Específicos

1. Analizar los parámetros macroscópicos de *Allium cepa* después de 72 horas de exposición al fungicida *Vondozeb 80WP*.
2. Calcular el valor de la CI_{50} en el crecimiento de las raíces de los bulbos de *Allium Cepa*.
3. Identificar genotoxicidad en las raíces de *Allium cepa* después de 72 horas mediante la técnica de montaje de división celular.
4. Determinar la DL_{50} mediante la aplicación del bioensayo de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición, utilizando el método de regresión de análisis Probits y el método Reed-Muench.

1.4. Justificación

Los plaguicidas utilizados en la agricultura son sin duda el grupo de agroquímicos más peligroso al que puede estar expuesta la población en general (Klaassen & III, 2005), y esto se debe a que los fabricantes de plaguicidas utilizan las leyes sobre secretos comerciales para negar al público el acceso a la información sobre la composición de sus productos. En tanto los fabricantes no coloquen etiquetas completas en sus productos, los consumidores no tendrán la información que necesitan para protegerse de productos tóxicos.

Debido a que *Vondozeb 80WP* es un fungicida, y por lo tanto pertenece a este grupo peligroso de agroquímicos, y además es ampliamente utilizado en la industria agrícola nicaragüense; se realizaron pruebas para evaluar la toxicidad y genotoxicidad de este producto químico utilizando *Allium cepa* y *Artemia salina*, como bioindicadores, y de esta forma darse cuenta en qué grado está expuesta a toxicidad la población nicaragüense al hacer uso de este fungicida.

Se aplicaron los dos bioensayos en conjunto, porque *Allium Cepa* se encargará de indicar de manera cualitativa si *Vondozeb 80WP* es capaz de producir alteraciones genéticas y *Artemia Salina* indicará la concentración a la cual este fungicida puede tener efectos negativos sobre los seres expuestos.

Por otro lado el hacer uso de bioensayos representa una gran ventaja, ya que a diferencia de las pruebas analíticas rutinarias de laboratorio con equipos sofisticados, que demandan varias semanas para su realización e incurren en elevados costos para llevarlos a cabo y aun así no proporcionan información sobre posibles respuestas tóxicas, los bioensayos son altamente sensibles y los organismos sometidos a prueba son de fácil disponibilidad comercial, como lo son los bulbos de *Allium cepa* (cebolla) y los quistes secos de *Artemia salina*.

1.5. Antecedentes

En los últimos años, el uso de plantas (como *Allium Cepa*) y otros organismos pequeños (como *Artemia Salina*) para el biomonitoreo de agentes genotóxicos en el ambiente han tenido un fuerte incremento; ya que éstos son buenos indicadores de efectos citogenéticos y mutagénicos; por lo que han sido consideradas como sistemas de prueba para evaluar toxicidad y han sido incluidas en el programa Gene-Tox (Valencia-Quintana, et al., 2013).

En 2005, González, Presa, Latorre y Lurá de la Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológica en Santa Fe, Argentina, aplicaron un ensayo para la **Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia salina**. Los extractos fúngicos fueron clasificados, según el porcentaje de mortalidad de *Artemia Salina* hallado, como: no tóxico (NT), levemente tóxico (LT), tóxico (T) y muy tóxico (MT). En los tipos T y MT se investigó la presencia de micotoxinas. Seis extractos resultaron de tipo T (8,5%). *Penicillium brevicompactum* Dierckx, aislado de un embutido, fue el único MT, debido principalmente a la presencia de ocratoxina A y de otros dos metabolitos no identificados.

En 2010, Arencibia-Carballo, Tizol-Correa y Rodríguez en el Centro de Investigaciones Pesqueras de la ciudad de La Habana, Cuba realizaron un estudio donde se determinó la **Toxicidad de nauplios de Artemia a dos piretroides de uso comercial** (insecticidas piretroides, cipermetrina y permetrina); reportándose los valores de 4,72 y 26,7 µg/mL de CL₅₀ para 24 h respectivamente. El protocolo experimental descrito es apropiado para evaluar el efecto tóxico de compuestos químicos. Además concluyó que los resultados en el uso de pruebas con *Artemia* demuestran su versatilidad práctica y economía para la utilización en las evaluaciones de los mismos tóxicos.

En 2012, Cumpa, M; Díaz, O.; Tenicela, P. y Velezvilla, G. de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), El Agustino, Lima, Peru de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNNM) del Laboratorio de Ecofisiología

Animal (LEFA), aplicaron un ensayo para la **Detección del efecto tóxico de un fungicida mediante bioensayo de Artemia Salina L.** El fungicida sometido a prueba fue Clotrimazol (Roxfarma ®), comúnmente usado para el tratamiento de infecciones (de humanos como de otros animales), a distintas concentraciones ($C_1=100 \text{ mg L}^{-1}$), ($C_2 = 50 \text{ mgL}^{-1}$), ($C_3 = 25 \text{ mgL}^{-1}$), ($C_4 = 12.5 \text{ mgL}^{-1}$), ($C_5 = 6.25 \text{ mgL}^{-1}$), ($C_6 = 3.125 \text{ mgL}^{-1}$), ($C_7 = 1.563 \text{ mgL}^{-1}$). Llegaron a la conclusión que a las 24 horas, las concentraciones a 100 mg/L son altamente tóxicas (%mortalidad=100%), a las 48 horas todas las concentraciones son altamente tóxicas (% mortalidad = 75%).

En 2013, Jaramillo C, Martelo E. y Duarte R. de la Universidad de Cartagena Campus de Zaragocilla determinaron la **Toxicidad aguda de pesticidas organoFosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad.** En este estudio se evaluó la concentración letal media (CL_{50}) de diecisiete pesticidas organofosforados usando Artemia franciscana. El compuesto que presentó mayor toxicidad fue el fentión con CL_{50} de 6,26 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h de exposición y de 0,11 $\mu\text{g/mL}$ a las 48h y aquellos con menor toxicidad fueron: clorpirifos y malatión con valores de CL_{50} mayores de 100 $\mu\text{g/mL}$. (Jaramillo, 2013)

En 2013, Valencia-Quintana y Sánchez Alarcón de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México, Facultad de Agrobiología; Gómez-Arroyo, Cortés Eslava y Villalobos-Pietrini de la Universidad Nacional Autónoma de México, del Centro de Ciencias de la Atmósfera; Waliszewski de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México, Centro de Investigaciones Biomédicas y Fernández de la Universidad Veracruzana, Veracruz, México, Facultad de Biología analizaron publicaciones que evaluaban la **Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales**, entre los vegetales sometidos a pruebas toxicológicas estaban los bulbos de *Allium Cepa* (Cebolla).

En el estudio de **Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales** los grupos de plaguicidas más evaluados son los organofosforados, seguidos por los carbamatos, los piretroides y las triazinas. En cuanto a la categoría de plaguicidas

sobresalen los herbicidas, secundados por los insecticidas y los fungicidas. Con relación a las alteraciones producidas por los plaguicidas en sistemas vegetales resaltan los efectos aneugénicos tales como daños al huso que se reflejan como C-mitosis y efectos clastogénicos como fragmentos y puentes. Asimismo se ha analizado el efecto de estos compuestos sobre el índice mitótico, siendo inhibidores en la mayoría de los casos. Otro tipo de alteraciones como los cromosomas pegajosos también son inducidas. En menor proporción, algunos estudios abordan la inducción de micronúcleos, de intercambio de cromátidas hermanas, de cometas y de efectos mutagénicos, encontrándose respuestas positivas en la mayoría de los casos.

Es importante mencionar que en revisiones bibliográficas consultadas de fuentes nacionales e internacionales no se encontró información donde ambos bioensayos hayan sido aplicados en conjunto en un mismo estudio para demostrar actividad tóxica de productos fitosanitarios.

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

CAPÍTULO II.

Marco de Referencia

*evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

GENERALIDADES DEL TÓXICO SOMETIDO A PRUEBA

2.1.1. Pesticidas

El hombre ha intentado desde la antigüedad controlar por distintos medios los microorganismos, plantas, vertebrados e invertebrados que ponían en peligro los alimentos cultivados o almacenados, así como la salud de las personas. Uno de los primeros agentes químicos utilizados con este propósito fue el azufre, empleado como fumigante en China hace tres mil años.

2.1.1.1. Definición

Según la definición de la Environmental protection Agency (EPA) de Estados Unidos, ***un pesticida (plaguicida) se puede definir como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se emplea para prevenir, destruir, repeler o mitigar una plaga. El término plaga abarca a los animales, las plantas o los microorganismos que son nocivos, destructivos o molestos.*** (Klaassen & III, 2005)

El pesticida es un producto químico fitosanitario de origen natural o sintético u organismo vivo, y puede utilizarse solo, combinado o en mezclas para la protección de los cultivos y productos agrícolas.

2.1.2. Clasificación

Nótese que algunas de las sub-divisiones se encuentran en letra cursiva y negrita, y esto para destacar que el tipo de plaguicida a evaluar pertenece a esta sub-division en la categoría.

Los plaguicidas se pueden clasificar según:

El tipo de organismo que se desea controlar

Esta es la categoría más importante de pesticidas (Grau, 2003)

- Insecticidas: Control de insectos
- Acaricidas: Control de ácaros
- ***Fungicidas: Control de hongos y levaduras***
- Bactericida: Control de bacterias
- Antibiótico: Control de bacterias

- Herbicidas: Control de hierba y maleza
- Rodenticida: Control de roedores
- Molusquicida: Control de molusco

El grupo químico del principio activo

- Compuestos organofosforados
- Compuestos carbamatos
- Compuestos organoclorados
- Piretroides derivados del bupiridilo
- Triazinas
- **Ditiocarbamatos**
- Derivados del ácido fenoxiacético
- Derivados de la cumarina
- Derivados del cloronitrofenol
- Compuestos organomercuriales, entre otros

Su concentración

- Plaguicida técnico

La máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado.

- **Plaguicida formulado**

Mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como "inertes", cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas.

El modo de acción

- **De contacto:** Actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga.
- **De ingestión:** Debe ser ingerido por la plaga para su acción efectiva.

- **Sistémico:** Al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa.
- **Fumigante:** Se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción.
- **Repelente:** Impide que las plagas ataquen.
- **Defoliante:** Causa la caída del follaje de las plantas.

Su composición química

- **Compuestos inorgánicos:** Estos son compuestos que carecen de carbono. Como los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
- **Compuestos orgánicos:** Son aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura química, la mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas, por lo que se conocen como botánicos.
- **Biológicos:** Se llama así a los virus, microorganismos o sus metabolitos, formulados como insumos, que pueden controlar a una plaga en particular.

Según el uso al que se destinan

- **Agrícolas:** Uso en diversas extensiones, en sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal.
- **Forestales:** Uso en bosques y maderas
- **Urbanos:** Uso exclusivo en áreas urbanas, industriales, áreas no cultivadas, drenes, canales de riego, lagos, presas, lagunas y vías de comunicación.
- **Jardinería:** Uso en jardines y plantas de ornato.

- Pecuarios: Uso en animales o instalaciones de producción intensiva o extensiva cuyo producto será destinado al consumo humano o a usos industriales. Incluye el uso en animales domésticos.
- Domésticos: Uso en el interior del hogar.
- Industriales: Se utiliza como materia prima en el proceso industrial para la formulación de plaguicidas o productos de uso directo.

Su persistencia al medio ambiente

- Persistentes: más de un año y menos de veinte
- **Poco persistentes:** de cuatro a veintiséis semanas
- No persistentes: menos de cuatro semanas de acción

Su toxicidad aguda

O.M.S.

Esta se basa principalmente en la toxicidad por vía oral en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor DL₅₀ (Dosis Letal Media) que es la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de prueba y se expresa en términos de mg/kg del peso del cuerpo del animal (UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Sistema de Bibliotecas - Biblioteca Central 'Pedro Zulen', 2007).

Tabla 2.1 Clasificación de los plaguicidas según toxicidad aguda expresada en DL₅₀ (mg/Kg)

Clase	Por vía oral		Por vía dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia Sumamente tóxico	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
Ib Muy Toxico	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
II				
Moderadamente tóxico	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000
III Poco tóxico	Más de 500	Más de 2000	Más de 1000	Más de 4000

Fuente: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.pdf

CYTED

Tabla 2.2 Clasificación toxicidad según CYTED

I Extremadamente tóxico	1-10 µg/ml
II Altamente tóxico	10-100 µg/ml
III Moderadamente tóxico	100-500µg/ml
IV Ligeramente tóxico	500-1000µg/ml
V Prácticamente no tóxico	1000-1500µg/ml
VI Relativamente inocuo	>1500µg/ml

Fuente: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/view/76>

2.1.3. Fungicidas

Debido a que este trabajo monográfico pretende evaluar la toxicidad y genotoxicidad del fungicida *Vondozeb 80WP*, se debe abordar algunas generalidades de este tipo de agroquímico.

2.1.3.1. Definición

Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas, capaz de impedir el crecimiento y la reproducción de los hongos (Klaassen & Ill, 2005). Éstos, comúnmente, son utilizados como un producto formulado que consiste de un ingrediente activo más ingredientes inertes que mejoran la acción del producto.

2.1.3.2. Importancia

Las enfermedades son comunes en las plantas, a menudo producen un impacto económico significativo en el rendimiento y calidad, lo que nos indica que el manejo de enfermedades es un componente esencial en la producción de la mayoría de los cultivos (McGrath, 2004). En un sentido general, existen tres razones principales por las cuales se utilizan los fungicidas:

- Para controlar a la enfermedad durante el establecimiento y desarrollo de un cultivo.
- Para incrementar la productividad de un cultivo y reducir sus daños. Los cultivos alimenticios enfermos pueden producir menos si sus hojas, necesarias para la fotosíntesis, son afectadas por una enfermedad (Figuras 1 y 2). Los daños pueden afectar las partes comestibles del cultivo (Figura 3) o, en el caso de cultivos ornamentales, pueden perder su vistosidad



Figura 1. Hojas afectadas por una enfermedad

(Figura 4), en todos los casos se puede afectar el valor comercial del cultivo.



Figura 2. Hojas afectadas por una enfermedad



Figura 4. Pérdida de la vistosidad



Figura 3. Cultivo cosechado dañado

- Para mejorar el período de almacenamiento y la calidad de las plantas y los productos cosechados. Las pérdidas por enfermedades ocurren después de la cosecha, durante el almacenamiento (Figura 5). Los hongos a menudo echan a perder (hacen inutilizable) frutas, hortalizas, tubérculos y semillas almacenadas.



Figura 5. Pérdida del cultivo durante el almacenamiento

2.1.3.3. Características

Un fungicida activo debe cumplir las siguientes características:

- Mostrar una toxicidad baja para la planta pero alta para ese hongo concreto.
- Ser activo por sí mismo o tener la capacidad de convertirse (por enzimas de la planta o el hongo) en un intermediario tóxico.
- Ser capaz de penetrar en las esporas micóticas o en el micelio en desarrollo para alcanzar el lugar de acción.
- Formar sobre la superficie de la planta un depósito protector y duradero que resista la luz solar, la lluvia y el viento de la intemperie.

2.1.3.4. Clasificación

Los fungicidas se categorizan de varias formas basadas en diferentes características. Las características utilizadas más comúnmente y sus categorías se describen a continuación.

Movilidad en la planta

○ Contacto

Los fungicidas de contacto, llamados también protectores, actúan solamente sobre la superficie de la planta donde el fungicida ha sido depositado y evitan que los esporangios germinen y penetren a las células (Pérez & Forbes, S.f). Por ello se recomienda cubrir la mayor parte de la planta con este tipo de productos (Figura 6.a).

○ Sistémicos

Éstos son también llamados penetrantes y son absorbidos a través del follaje o de las raíces y se movilizan a toda la planta (dentro de la misma, Figura 6.b). Los fungicidas sistémicos afectan varias etapas de la vida del hongo.

Los sistémicos de movimiento xilemático aplicados al follaje se movilizan a lo largo de la hoja en donde se depositan, pero no pueden redistribuirse fuera de ésta, sin embargo, cualquier material depositado en los tallos puede moverse hacia las hojas (figura 6.c).

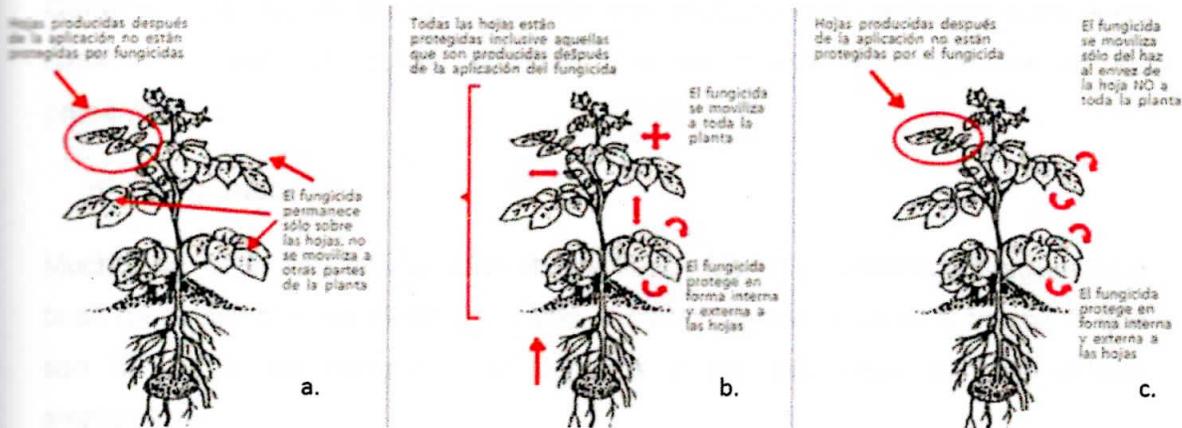


Figura 6. a. Fungicida de contacto, b. Fungicida sistémico, c. Fungicida sistémico

Según su Rango de actividad

- **Un punto**

Los fungicidas que actúan de manera única son activos sólo en un punto de una ruta metabólica en el patógeno o afectan una enzima o proteína esencial para el hongo. Debido a la especificidad en toxicidad de estos fungicidas, estos tienen muy poco efecto en la mayoría de los organismos, pueden ser absorbidos de manera segura por la planta, por lo que tienden a presentar propiedades sistémicas.

- **Múltiple puntos de acción.**

Típicamente los antiguos fungicidas de contacto presentan múltiples sitios de acción, por lo que usualmente afectan a muchos hongos en diferentes clases.

Según su grupo químico

Los fungicidas forman una extensa familia de agentes químicos con las estructuras más diversas, desde compuestos inorgánicos sencillos, como el azufre y el sulfato de cobre, hasta complejas moléculas orgánicas (Ubau, 2003). Químicamente, las moléculas orgánicas son aquellas que contienen átomos de carbono en sus estructuras, mientras que las moléculas inorgánicas no los presentan.

o Inorgánico

Muchos de los primeros fungicidas desarrollados fueron compuestos inorgánicos a base de azufre o iones metálicos como el cobre, estaño, cadmio y mercurio que son tóxicos a los hongos. Los cúpricos y los sulfurados aún se utilizan ampliamente.

o Orgánico

La mayoría de los fungicidas usado en la actualidad son compuestos orgánicos y por consiguiente contienen carbono. El término "orgánico" es utilizado aquí basado en la terminología química y difiere del término "orgánico" empleado para describir un sistema agrícola que procura ser holístico y aumenta la salud del agroecosistema.

Según su mecanismo de acción

o Protectores

Éstos se aplican a las plantas antes de que aparezca cualquier hongo fitopático y previenen la infección, bien mediante una actividad esporicida o bien modificando el ambiente fisiológico de la superficie de la hoja.

o Curativos

Éstos actúan penetrando en la cutícula de la planta y destruyendo el micelio del hongo joven (las hifas) que crece en la epidermis de la planta.

○ **Erradicadores**

Éstos evitan el crecimiento de los hongos una vez que han aparecido los síntomas, normalmente tras la esporulación, mediante la destrucción tanto de las esporas nuevas como de los micelios.

2.1.3.5. Legislación y salud pública

Las dos principales leyes que rigen a los fungicidas y otros plaguicidas en los Estados Unidos de América son, la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA, en inglés) y la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos (FFDCA, en inglés). (McGrath, 2004)

La Oficina de Programas de Plaguicidas de la EPA, es la responsable principal en la regulación de plaguicidas hoy en día. Todos los plaguicidas deben ser registrados antes de ser comercializados y utilizados en los Estados Unidos.

Para obtener un registro, los fabricantes de un plaguicida deben demostrar que éste no tiene el potencial de producir un impacto adverso al medio ambiente o en organismos para los cuales no está destinado, incluyendo a las personas. Ésto requiere llevar a cabo pruebas toxicológicas definidas e investigación de su destino en el ambiente.

2.1.4. Vondozeb 80WP

Se trata de un fungicida preventivo (protegiendo los cultivos de lesiones) con cierta acción acaricida y de amplio espectro, a base de Mancozeb, el cual pertenece al grupo químico de los alquilenbis (ditiocarbamatos), formulado como polvo mojable.

Actúa por contacto sobre una gran variedad de hongos causantes de enfermedades en diversos cultivos. Por el hecho de ser una materia activa con acción multi-sitio, actúa sobre varios genes de los hongos y evita la aparición de resistencias. (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007)

Su mecanismo de acción es la interrupción del ciclo de Krebs e inactivación de los grupos sulfhidrilos (esenciales en la fisiología celular de las zoosporas). Actúa en la producción de energía al reaccionar con grupos –SH de proteínas, principalmente enzimas, dentro de la célula. El zinc disminuye la fitotoxicidad del maneb y mejora sus propiedades fungicidas.

2.1.4.1. Nombre químico y común

Según la CAS el nombre que le corresponde es: Mezcla de manganeso [[2-[[[2-(ditiocarboxi) amino] etil] carbamoditioato]] (2-)-kS,kS'] con [[2-[[[2-(ditiocarboxi) amino] etil] carbamoditioato]] (2-)-kS,kS'] zinc. Por otra parte la IUPAC lo nombra: etilenbis manganeso (ditiocarbamato) (polímero) complejo con sal de zinc. Otros sinónimos son: ((1,2-etandilbis(carbamoditioato))(2-)) sal de manganeso y zinc; Ácido etilenbis (ditiocarbámico) complejo de manganeso y zinc.

Algunos de los nombres con el que comúnmente se comercializa este fungicida son: Acarie M; Blecar MN; Crittox MZ; Dithane M-45; Dithane 945; Dithane M45; Dithane Ultra; Mancozebe; Mancozin; Manzate; Manzeb; Nemispor; Penncozeb; Sandozebe o Vondozeb plus. Las formulaciones pueden conseguirse en polvo humectable y concentrado emulsionable.

2.1.4.2. Fórmula y estructura química

La fórmula química del fungicida, *Vondozeb 80WP*, es $C_4H_6N_2S_4Mn + C_4H_6N_2S_4Zn$; con masa molecular: $266.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

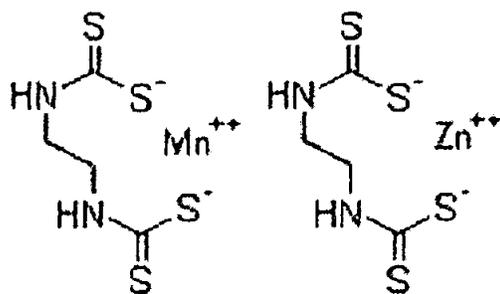


Figura 7. Estructura química del fungicida

2.1.4.3. Composición porcentual

Tabla 2.3 Composición porcentual Vondozeb 80WP

Ingrediente activo	Porcentaje en peso
Mancozeb:	80% (800 g/kg)
Complejo (polimérico) de etilenbis (ditiocarbamato) manganoso con sal cínquica.	
Ingredientes inertes	
Coformulante c.s.p	100% p/p (1 kg)

Fuente: Tomada de la etiqueta del producto

2.1.4.4. Campo de actividad

Vondozeb 80WP resulta ser eficaz en el control preventivo de enfermedades como: Mal de talluelo (*Rhizoctonia solani*), Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis var. difformis*), Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), Mildiu veloso (*Pseudoperonospora cubensis*), Mildiu veloso (*Pseudoperonospora spp.*), Antracnosis (*Colletotrichum spp*), Tizón temprano (*Alternaria solani*) y Tizón tardío (*Phytophthora infestans*); en cultivos de arroz, papa, rosas, crisantemo, cebolla, repollo, brócoli, coliflor, plátano, banano, café, cebada, calabaza, pepino, frijol, lechuga, melón, sandía, trigo, avena, pasto, tomate, uva, manzana, mango, papaya y melocotón.

2.1.4.5. Propiedades físicas y químicas del ingrediente activo

Tabla 2.4 Propiedades físicas y químicas

Estado físico	Polvo
Color	Amarillo grisáceo
Olor	Ligero olor a pescado
Punto de fusión	192 –204°C
Solubilidad	Hidrosolubilidad dispersable. Practicamente insoluble en otros disolventes
Presión de vapor	Intangible a 20°C.
Densidad aparente	0.5 kg/L

Fuente: Tomada de la etiqueta del producto

2.1.4.6. Destino en el ambiente

En el estudio ambiental e informaciones adicionales allegados por BARPEN INTERNATIONAL S.A. para el ingrediente activo grado técnico mancozeb estima que el tiempo de vida media en suelos DT_{50} es 6-15 días, dato menor de 21 días, lo que indica que se degrada muy rápidamente en el suelo y presenta baja persistencia en suelos. La constante de adsorción normalizada K_{oc} es de 2000 lo que muestra que esta sustancia presenta baja movilidad.

En agua subterránea se determina el potencial de lixiviación (GUS) a partir de la ecuación de Gustaffson con datos de DT_{50} suelos de 615 días y K_{oc} de 2000, el resultado de GUS oscila entre 0.5 a 0.82 indicando que el mancozeb no presenta potencial de lixiviación hacia aguas subterráneas. Y para agua superficial mancozeb presenta baja solubilidad de 2 mg/l. El tiempo de vida media DT_{50} en aguas es de 1-2 días, dato menor de 21 días, lo que indica que presenta baja persistencia en agua.

En el Aire mancozeb presenta una presión de vapor de 1.76×10^{-5} mPa a 25°C, lo que indica que es poco volátil, por lo tanto no presenta afectación a este comportamiento.

2.1.4.7. Toxicología

Según la clasificación toxicológica de la EPA, *Vondozeb 80WP* pertenece al grupo IV. Su toxicidad varía de moderada a alta para peces, anfibios y otros organismos acuáticos y de alta a prácticamente nula para el zooplancton. Es ligeramente tóxico para aves, pero no es tóxico para abejas y plantas. Normalmente no ofrece peligro

Tabla 2.5 Toxicidad aguda

Vía de administración	
DL ₅₀ Oral	DL ₅₀ Oral > 5000 mg/kg (rata)
DL ₅₀ cutánea	DL ₅₀ cutánea > 2000 mg/kg (conejo)
CL ₅₀ Inhalación	LC ₅₀ Inhalación: 5.2 mg/L mg/l (rata) (4 horas)

Fuente: http://www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

Tabla 2.6 Toxicidad Crónica

Efecto	
Corrosión o irritación cutáneas	No irrita la piel.
Daño a los ojos/irritación	No irrita los ojos.
Efectos carcinógenos	No muestra efectos cancerígenos en experimentos con animales

Fuente: http://www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

En el Aire mancozeb presenta una presión de vapor de 1.76×10^{-5} mPa a 25°C, lo que indica que es poco volátil, por lo tanto no presenta afectación a este comportamiento.

2.1.4.7. Toxicología

Según la clasificación toxicológica de la EPA, *Vondozeb 80WP* pertenece al grupo IV. Su toxicidad varía de moderada a alta para peces, anfibios y otros organismos acuáticos y de alta a prácticamente nula para el zooplancton. Es ligeramente tóxico para aves, pero no es tóxico para abejas y plantas. Normalmente no ofrece peligro

Tabla 2.5 Toxicidad aguda

Vía de administración	
DL ₅₀ Oral	DL ₅₀ Oral > 5000 mg/kg (rata)
DL ₅₀ cutánea	DL ₅₀ cutánea > 2000 mg/kg (conejo)
CL ₅₀ Inhalación	LC ₅₀ Inhalación: 5.2 mg/L mg/l (rata) (4 horas)

Fuente: http://www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

Tabla 2.6 Toxicidad Crónica

Efecto	
Corrosión o irritación cutáneas	No irrita la piel.
Daño a los ojos/irritación	No irrita los ojos.
Efectos carcinógenos	No muestra efectos cancerígenos en experimentos con animales

Fuente: http://www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

Tabla 2.7 Ecotoxicología

Organismo

CE₅₀/72h/algas 1.18 mg/l

CL₅₀/48h/dafnia 0.47 mg/l

CL₅₀/Peces/96h 0.2 mg/l

Fuente: http://www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

BIOINDICADORES DE TOXICIDAD

2.2.1. *Allium cepa*

2.2.1.1. Descripción botánica

La cebolla (*Allium cepa* L.), pertenece a la clase de las monocotiledóneas, familia Alliaceae, genero *Allium*. Es una planta bianual que produce bulbo, en condiciones normales, se cultiva como anual para recolectar sus bulbos y, cuando se persigue la obtención de semillas, como bianual.

2.2.1.2. Morfología y características

Tabla 2.8 Morfología *Allium Cepa*

Familia	Liliáceas
Nombre científico	<i>Allium cepa</i> L.
Planta	Bienal, a veces vivaz de tallo reducido a una plataforma que da lugar por debajo a numerosas raíces y encima a hojas, cuya base carnosas e hinchada constituye el bulbo.
Bulbo	Está formado por numerosas capas gruesas y carnosas al interior. Están recubiertas de membranas secas, delgadas y transparentes, que son base de las hojas. La sección longitudinal muestra un eje caulinar llamado corma, cónico, provisto en la base de raíces fasciculadas.
Sistema radicular	Raíces blanca, espesa y simple.
Tallo	El tallo que sostiene la inflorescencia es derecho, de 80 a 150 cm de altura, hueco, con inflamiento ventrudo en su mitad inferior.
Hojas	Envainadoras, alargadas, fistulosas y puntiagudas en su parte libre.
Flores	Pequeñas, verdosas, blancas o violáceas, que se agrupan en umbelas.

Fuente: http://www.utm.mx/edi_antiores/Temas38/2NOTAS%2038-4.pdf

2.2.1.3. Crecimiento

La planta es bianual, de polinización cruzada, se desarrolla a partir de una semilla hasta formar bulbo maduro y posteriormente bajo condiciones propicias de clima se produce la floración y división de bulbos (Laguna Davila & Pauth Martinez, 2007). Alcanza una altura y diámetro promedios de 35 cm y 1.5 – 2 cm, respectivamente.

El verdadero tallo se encuentra situado en la base del bulbo, de él brotan las yemas, las hojas y las raíces. La hoja o falso tallo es tubular, erecta, semicilíndrica de color verde y en algunos casos posee una sustancia cerosa. Después que aparece la primera hoja, las demás se desarrollan sucesivamente durante uno a diez días; bajo condiciones favorables puede llegar a formar de 15 a 18 hojas, según el cultivo y la época de siembra. Estas hojas se van entrelazando unas con otras y formando un llamado falso tallo.

El bulbo es el órgano donde se acumulan las sustancias nutritivas de reserva, es una consecuencia de movilización de carbohidratos entre las bases de las hojas más jóvenes. Los principales factores que influyen en su formación son: fotoperíodo, temperatura, altos niveles de nitrógeno y riego.

El sistema radicular es muy superficial, alcanza una profundidad de 45 cm su mayor volumen de raíces se ubica en los primeros 30 cm, la parte basal del bulbo está formado por una placa de tallos donde se forman las raíces adventicias y más adelante en el desarrollo de la planta se forman raíces a los lados de la placa basal.

Debido a que la cebolla tiene una sola raíz primaria, el desarrollo de la planta depende de la formación de raíces adventicias, que están comúnmente desintegrándose y siendo reemplazadas por nuevas.

El ciclo de vida de las plantas de cebolla es de mediana complejidad, no solo por ser un cultivo bianual, sino por la gran cantidad de factores que regulan el paso de la fase de crecimiento vegetativo a la de formación de bulbos.

Cuando la semilla germina, emergen las raíces primarias y la parte baja del cotiledón se elonga rápidamente, se vuelve de color verde y toma la posición erecta. En este momento sale del tallo la primera raíz adventicia y la primera hoja crece a través de la vaina tubular del cotiledón.

La germinación y la emergencia de las plántulas están determinadas por la temperatura del suelo y la disponibilidad de agua. La temperatura óptima para la germinación de las semillas está entre 20 y 25 °C. En estas condiciones las plántulas brotan entre los ocho y diez días después de la siembra.

El proceso de crecimiento de la planta de cebolla continúa a una tasa constante de una hoja nueva por semana, hasta alcanzar el número característico de la variedad o hasta que cambios en el periodo luminoso o algún otro factor externo activen la forma del bulbo. Conforme avanza la formación del bulbo, las hojas viejas se secan, de tal forma que a la cosecha las primeras hojas han desaparecido o permanecen como escamas secas en el exterior del bulbo.

Al final de la etapa de formación de los bulbos, ocurre una pérdida de turgencia en la región del cuello y las hojas colapsan. En este punto, las plántulas de cebolla entran en un periodo de dormancia, cuya duración varía dependiendo del cultivar. Este es el momento óptimo de la cosecha.

2.2.1.4. Tipos de cebollas

Cebolla blanca

La cebolla blanca se conoce desde hace varios miles de años y es actualmente una variedad de cebolla muy común en las dietas gastronómicas de prácticamente todo el mundo (Fuencampo XXI, 2010). Tiene un sabor ligeramente ácido y un característico picor que varía en intensidad dependiendo de la variedad y la forma de cultivo.

Cebolla amarilla o marrón.

Tienen una forma globosa, con el color que les da nombre, y su sabor tiene un toque picante y ácido. Las variedades de cebollas amarillas o marrones tienen la característica de ofrecer un tiempo de conservación mayor que el resto, siempre y cuando se respete la conservación en lugares frescos y secos.



Figura 8. Cebolla Marrón

Cebolla dulce

Se les llama Cebollas Dulces a las diferentes variedades de cebolla cuya característica principal es su escaso picor. El picor es un rasgo muy característico de las cebollas, que depende directamente de la variedad de cebolla y de sus capacidades para acumular compuestos sulfurados en sus células.



Figura 9. Cebolla Dulce

Cebolla roja o morada

Las cebollas conocidas como "rojas" o "moradas", que están disponibles todo el año, deben su nombre al llamativo color de su piel, en tonos rojos tirando a púrpuras y de su propia carne blanca con algunos matices rojizos. Tiene un bulbo grande y globoso, que es el que se aprovecha en la cocina.



Figura 10. Cebolla Morada

Chalota o escalonia



Figura 11. Cebolla Chalota

Originaria de Asia Central, de la misma forma que la mayoría de los tipos de cebolla, los bulbos de las chalotas son rojizos, ovalados y con un grosor más pequeño que otros tipos. En su interior se encuentran sus característicos dientes, similares a los de los ajos, con un sabor entre el ajo y la cebolla, y un ligero picor.

Cebolleta

La cebolleta es realmente un estado de crecimiento, el momento en el que el vegetal tiene las hojas más desarrolladas y comienza a formarse el bulbo. Su forma es alargada y fina, con un sabor más delicado que el de la cebolla convencional.



Figura 12. Cebolleta

Cebollino



Se trata de una hierba aliícea que no tiene bulbo o bien lo tiene de tamaño muy pequeño. Se e considera al cebollino como un buen desinfectante con acción antibacteriana y un alimento rico en vitaminas y minerales.

Figura 13. Cebollino

Rakkyo

El rakkyo es una variedad de cebolla cultivada y explotada especialmente en Asia y Oceanía, principalmente en Japón, Nueva Zelanda y China. Tiene un tamaño muy pequeño en comparación con otras variedades de cebolla (unos 4 centímetros de diámetro).



Figura 14. Rakkyo

2.2.1.5. Abundancia

En Nicaragua, la cebolla ocupa un lugar importante en la dieta nicaragüense y su cultivo es muy popular en las regiones del norte del país. Actualmente, se estima que el 90% de la producción de cebolla proviene de los departamentos de Matagalpa, Jinotega y Estelí y en menor escala en otros sectores del país. La superficie cultivada en el país durante 2003 fue de 1500 ha con una producción nacional de 30,000 tn y un rendimiento de 20 ton/ha.

2.2.2. Artemia salina

2.2.2.1. Aspectos generales

Artemia spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, de colores carmelitas y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda (debido a las funciones locomotoras, respiratorias y filtradoras que ejercen) y de orden Anostraca (debido a la ausencia de caparazón rígido). Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados "monos de mar" o "brine shrimp" en inglés. (Sarabia Álvarez, 2002)



Figura 14. Artemia Salina en estado adulto

El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones

partenogénicas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y *Prosdocimi*, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales) y *Artemia* partenogénica.

2.2.2.2. Clasificación científica *Artemia Salina* Leach

Tabla 2.10 Clasificación científica

Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Clase	Crustaceae
Sub-clase	Branchiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i>
Especie	<i>Artemia Salina</i>

Fuente: (Sarabia Álvarez, 2002)

2.2.2.3. Ecología

La *Artemia Artemia* habita exclusivamente en ecosistemas hipersalinos, entre 60-300 ppt, caracterizados por su escasa diversidad biológica y por la casi ausencia de predadores. Los habitats naturales comprenden salinas y lagos salados, temporales y permanentes, situados en zonas costeras o en entornos continentales.

Las *Artemias Salina*, permiten confirmar su gran capacidad de adaptación y tolerancia a muy diversas condiciones ecológicas, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados.

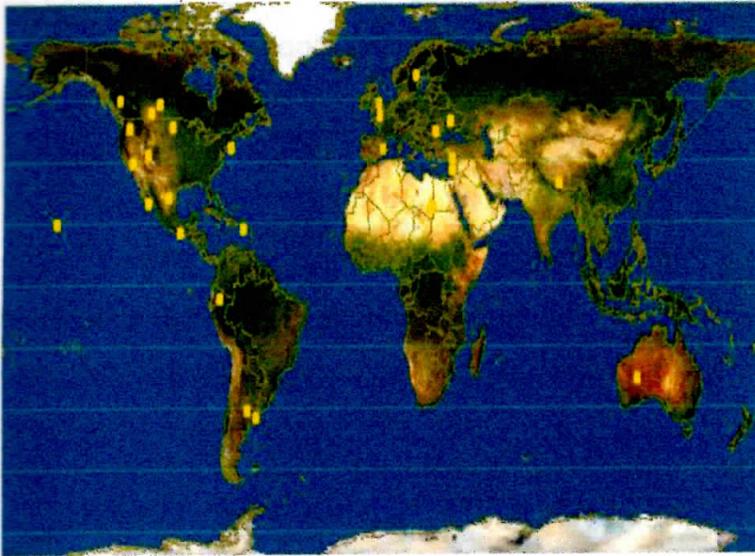


Figura 15 Distribución mundial de *Artemia Salina*

2.2.2.4. Biología de *Artemia*

Como rasgos morfológicos característicos destacan las siguientes (Figura 10): una cabeza formada por cinco segmentos fusionados, en la que se observan los ojos compuestos, un ocelo frontal entre aquellos, las anténulas o antenas secundarias, y las antenas, también llamadas antenas verdaderas, y que en el caso de los machos se hipertrofian en apéndices prensiles.

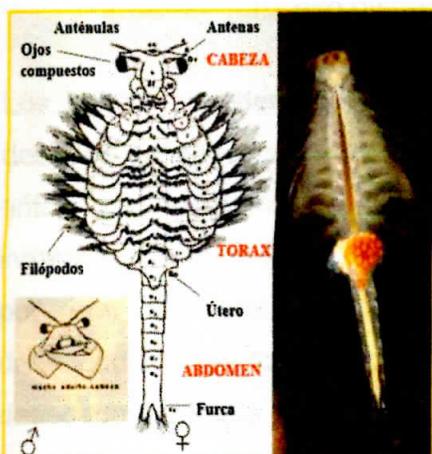


Figura 16. Morfología de *Artemia*, hembra adulta y detalle de las antenas desarrolladas en un macho adulto.

El tórax lo constituyen once segmentos, cada uno de ellos dotado de un par de apéndices foliáceos aplanados, llamados filópodos o toracópodos. El abdomen está constituido por ocho segmentos ápodos, genitales los dos primeros, y el último, llamado telson, provisto de la furca caudal.

2.2.2.5. Reproducción

La *Artemia* presenta dos tipos de reproducción: bisexual, anfigónica o zigogenética, con presencia de machos y hembras, y partenogenética, donde la presencia de machos es testimonial. Ambas modalidades se excluyen y no se ha encontrado ninguna cepa o variedad que pueda alternar cíclicamente ambas formas.

Tanto en las poblaciones bisexuales como en las partenogenéticas las hembras pueden dar lugar a dos tipos de huevos:

- a) los que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, por lo que resultan en un nauplio completamente formado (proceso ovovivíparo); y
- b) los que detienen su desarrollo en el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cubriéndose de un corion resistente procedente de las glándulas de la cáscara y quedando en forma de quiste o huevo cístico, de duración o de "invierno" (proceso ovíparo).

Los últimos, pueden dar una eclosión inmediata con aparición de nauplios poco después de haber sido emitidos por las hembras (llamados quistes subitáneos), o entrar en estado criptobiótico o de día pausa. En este caso, no eclosionan inmediatamente, y deben ser activados para ello. Esta activación viene condicionada por una deshidratación previa, debida a los procesos osmóticos que se desencadenan en medios constituidos por fuertes salmueras, o a causa de la acción desecadora del aire y el sol.

Los quistes son emitidos por las hembras adultas en condiciones críticas para la supervivencia de la población como son la falta de alimento, elevadas salinidades, deficiencias en niveles de oxígeno, etc., que pueden darse en los lagos salados y explotaciones salineras donde habitan.

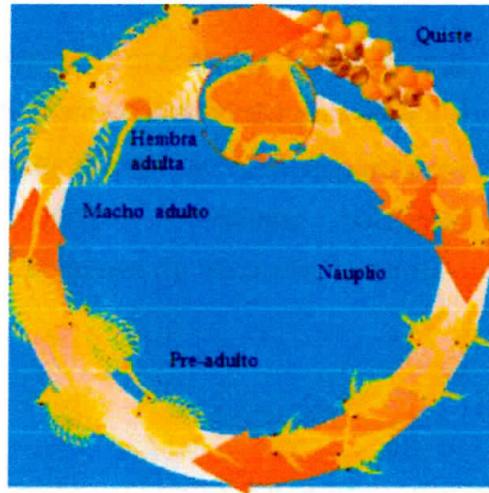


Figura 17. Ciclo de vida de *Artemia salina*

Cuando los quistes deshidratados son rehidratados de nuevo en agua de baja salinidad, con adecuados niveles de aireación e iluminación, los embriones enquistados continúan su desarrollo hasta eclosionar en forma de nauplio completamente formado. En los casos más favorables pueden superarse los 400 descendientes por puesta.

2.2.2.6. Importancia

La *Artemia salina*, sobre todo en la etapa nauplios, es utilizada en la acuicultura como alimento vivo para el crecimiento comercial (en incubadoras) de muchas especies de peces y mariscos.

Se utiliza para tratar diversas enfermedades endocrinas y reumáticas. El agua salada y el barro del lago Ursu heliotermal contienen hormonas liberadas por *Artemia salina*: estrógeno y progesterona y se utilizan para tratar enfermedades ginecológicas como infertilidad.

La resiliencia de estos animales los hace ideales para el análisis de muestras en ensayos de toxicidad.

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

Aunque inicialmente la *Artemia salina* era utilizada en ensayos de toxicidad que involucraban compuestos bioactivos de extractos de plantas, hoy en día podemos ver extendido su uso a otros ensayos que buscan detectar la toxicidad nuevos productos naturales, metabolitos tóxicos producidos por hongos, complejos metálicos, pesticidas, hidrocarburos e incluso, sobre algunos materiales de restauración dental.

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

BIOENSAYOS

Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la investigación y determinación de toxicidad de muestras ambientales o de cualquier compuesto químico, es la utilización de bioensayos. Éstos se pueden realizar sobre diferentes matrices como agua, suelo, sedimentos, elutriados, o sustancias con diferente grado de solubilidad en agua.

2.3.1. Definición

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres (Silva, Torrejón, Bay-Schmith, & Larrain, 2003). Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio.

Los bioensayos son por definición, pruebas en las que se usan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia de dichas sustancias con respecto a los organismos.

Los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones ambientales constantes. Además se dispone de grupos de control (que no se exponen al tóxico). Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

El estímulo que recibe el organismo puede ser químico, mecánico, físico, eléctrico, etc. La respuesta son los efectos que produce el estímulo a los organismos. La respuesta o efecto tóxico a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del

crecimiento, multiplicación de la población, alteración del comportamiento, cambios morfológicos, genéticos, cromosómicos, fisiológicos o histológicos.

La respuesta a los estímulos va a estar en función de varios factores, estos pueden ser: cantidad de tóxico, temperatura ambiental, tiempo de exposición, factores fisiológicos, naturaleza de los individuos.

Los efectos para obtener buenos resultados, deben estar bien controlado y los factores que influyen deben estandarizarse de tal manera que si un bioensayo se realiza en otro lugar, debe de dar la misma respuesta.

2.3.2. Objetivo

El objetivo de un bioensayo de toxicidad es determinar las concentraciones a las que una sustancia, material o efluente es capaz de provocar una respuesta medible, que normalmente es letal, para una población sometida a condiciones controladas en un laboratorio.

El método de respuesta cuantitativa es el mejor para el análisis experimental o sea, medir la supervivencia numérica porcentual, y determinar la relación entre la concentración y el efecto. Los datos cuantitativos permiten la evaluación estadística de los resultados de la curva de concentración mortalidad para cada uno de los períodos de tiempo y expresan el error del mismo.

Los períodos de exposición se determinan, antes de comenzar el bioensayo y generalmente son de 24 a 96 horas; pero algunos materiales en este tiempo no ofrecen el valor umbral a partir del cual no ocurre un incremento significativo de la mortalidad y por tanto requieren de un período mayor de experimentación.

Como alternativa es bueno, que los períodos de observación no sean limitados al tiempo de exposición de los ejemplares al contaminante, sino que se prolonguen a 5 ó 10 días más para incluir los efectos colaterales y tratar de comprender qué pasaría

7. Factor de dilución entre las dosis.

2.3.5. Ventajas

Los bioensayos in vitro han ganado aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, son costo-efectivos, simples y rápidos. Estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad.

2.3.6. Bioensayos en este estudio

2.3.6.1. Bioensayo para la estimación de la toxicidad usando *Allium Cepa*.

En las últimas décadas, se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas como organismos de prueba. La utilización de bioensayos con plantas constituye una herramienta disponible y valiosa en la identificación, monitoreo, control y evaluación de los efectos de contaminantes tóxicos potenciales en el ambiente.

Entre las pruebas a corto plazo con plantas que más se han utilizado para la evaluación toxicológica ambiental, se encuentran la prueba de toxicidad usando *Allium Cepa*. *Allium test* es un bioensayo para detectar contaminantes y sustancias potencialmente tóxicas para la salud. Se sugiere el empleo de la prueba como un bioensayo normado para el monitoreo ambiental.

Principio de la prueba

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium Cepa*) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones

generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación (FISKESJÖ G. , 1969).

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, luego de un período de 72 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control y también calculando la Cl_{50} .

El *Allium cepa test* es importante debido a que es un excelente modelo in vivo, donde las raíces crecen en contacto directo con las sustancias de interés, ofreciendo, así, información valiosa para evaluar el mecanismo que tiene un agente y los efectos sobre el material genético como los efectos clastogénicos (inducción de rupturas cromosómicas en la división celular) y aneugénicos (alteración en las estructuras de la célula, como el huso mitótico). Además los datos obtenidos pueden ser extrapolados para toda la biodiversidad de animales y plantas.

Diversos estudios han demostrado su potencialidad diagnóstica significativa y los resultados de este ensayo se ajustan bien a una batería de pruebas compuesta por organismos procariontes y/o eucariontes.

Es aplicable a los siguientes tipos de muestras:

- Aguas naturales (lagos, ríos y pozos).
- Agua potable (agua de grifo diferentes tuberías).
- Aguas residuales domésticas e industriales, incluyendo lodos y lixiviados.
- Sustancias químicas solubles en agua y con sustancias químicas insolubles en agua y solventes

Ventajas

Como parte integral del ecosistema, las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos y sus células tienen una estructura similar a las del hombre, sufren mitosis y meiosis.

Fiskesjö resumió algunas de las ventajas en utilización del bioensayo con Allium Cepa, entre las que se encuentran:

- La dinámica de crecimiento de la raíz es más sensible a los contaminantes que otros sistemas de ensayos disponibles.
- Las cebollas son de fácil manipulación y almacenaje.
- Las fases de la mitosis son muy claras en la cebolla.
- Tiene un número de cromosomas estable.
- La diversidad en la morfología cromosómica.
- Cariotipo estable.
- Proporciona una respuesta clara y rápida a las sustancias genotóxicas.
- Los daños cromosómicos espontáneos ocurren raramente.

Por otra parte, la toxicidad (CI_{50} para la media del crecimiento de la raíz) puede ser obtenida dentro de la prueba; buena correlación con otros sistemas de prueba, es un ensayo simple, rápido, económico, técnicos pueden ser capacitados para realizar los ensayos y además del equipamiento normal del laboratorio, sólo se necesita de un microscopio con una cámara, si se quiere realizar la prueba citológica con las puntas de las raíces.

Parámetros

Diferentes parámetros de *Allium cepa* pueden ser usado como indicadores de daño. Éstos se pueden diferenciar según el proceso subyacente en:

Macroscópicos (Indicadores de toxicidad)

Los estudios de toxicidad general son realizados midiendo las longitudes de las raíces expuestas y cuantificando la inhibición en el crecimiento de dichas raíces expuestas, así como cambios en las características morfológicas de las mismas, tales como ganchos, tumores, necrosis, estrías, coloración y gelatinización (FISKESJÖ G. , 1969).

o Forma de la raíz

Este es un parámetro macroscópico, donde las raíces mostraron alta sensibilidad, con efectos significativos, inclusive a concentraciones muy bajas del tóxico sometido a prueba. Este parámetro es observado, mostrando hinchazón, quiebres o descoloración en las raíces.

o Longitud de las raíces

Es otro parámetro macroscópico, donde la disminución del crecimiento de la raíz indica la presencia de un tóxico. Si este crecimiento disminuye en un 45%, provoca efectos subletales en las plantas.

o Turgencia

La dureza de las puntas de las raíces; es un parámetro que señala el grado de toxicidad. En tratamientos que causa alta toxicidad de las raíces los cual se aflojaran y mueren, y por lo tanto este parámetro es especialmente, útil en las pruebas preliminares de las concentraciones para ser elegidos para el experimento.

Anafase: se separan los centrómeros hijos, y las cromátidas convirtiéndose en cromosomas hijos. Cada juego de cromosomas hijos migra hacia un polo de la célula. El huso mitótico es la estructura que lleva a cabo la distribución de los cromosomas hijos en los dos núcleos hijos. El movimiento se realiza mediante los microtúbulos cromosómicos, que se van acortando en el extremo unido al cinetocoro. Los microtúbulos polares se deslizan en sentido contrario, distanciando los dos grupos de cromosomas hijos.

Telofase: comienza cuando los cromosomas hijos llegan a los polos de la célula. Los cromosomas hijos se alargan, pierden condensación, la envoltura nuclear se forma nuevamente a partir del retículo endoplásmico rugoso y se forma el nucleolo de nuevo.

o **Aberraciones cromosómicas**

Las aberraciones cromosómicas (parámetro microscópico) están caracterizadas por cambios, ya sea en la estructura de los cromosomas así como en el número total de los mismos, lo cual puede ocurrir por la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos.

Para evaluar las diferentes anomalías cromosomales, muchos tipos de aberraciones cromosómicas son consideradas en diferentes etapas del ciclo celular (profase, metafase, anafase y telofase).

2.3.6.2. Bioensayo de citotoxicidad usando *Artemia Salina*

Principio

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*, desarrollada en 1982 por Meyer y Col. El procedimiento consiste en exponer durante 24 horas nauplios de *Artemia salina* a compuestos activos y/o extractos de plantas, para determinar valores de concentración letal 50 (DL₅₀) (SÁNCHEZ & NEIRA, 2005) y de

esta manera predecir efectos cito tóxicos. Sin embargo, los valores obtenidos de CL_{50} , no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.

Ventajas

El bioensayo de toxicidad usando *Artemia Salina*, presenta grandes ventajas frente a otros ensayos analíticos de rutina, y entre ellas se pueden mencionar:

- Este bioensayo posee la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros
- Una prueba toxicológica sencilla, poco costosa porque no necesita equipamiento especial ni se requieren técnicas asépticas, rápida (24 horas), y solo se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos).
- Correlación con otras pruebas biológicas.
- El organismo utilizado en el bioensayo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados confiables.
- Las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario.
- Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.
- Por último, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental.

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

CAPÍTULO III.

Hipótesis

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

Cuando se exceden las dosis recomendadas del fungicida *Vondozeb 80WP*, éste presenta actividad tóxica, genotóxica y citotóxica, que se evidencia con la inhibición de las raíces y aberraciones cromosomales en los bulbos de cebolla *Allium cepa* y en la mortalidad de *Artemia salina*.

Artemia salina
Allium cepa

En este capítulo se mencionan los diferentes procedimientos desarrollados en la elaboración del proyecto. La metodología a seguir para la elaboración de bioensayos de toxicidad durante toda la investigación se desarrolló en 2 fases para *Allium Cepa* y 2 fases para *Artemia Salina*, tal como se explica en los diagramas 2 y 3 respectivamente.

4.1. Descripción del ámbito de estudio

El estudio fue realizado en el Pabellón 50, Laboratorio 1 del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, Unan-Managua, en el periodo comprendido Febrero - Abril 2015.

4.2. Tipo de estudio

Estudio experimental, transversal, cuantitativo.

Es experimental, debido que se desea comprobar el efecto que produce un tóxico sobre un bioindicador y requiere dos condiciones: muestra y grupo control.

Es transversal ya que implica la recolección de datos, en un momento determinado del tiempo y en una área geográfica o institución.

Es cuantitativo porque examina datos de manera numérica y permite demostrar hipótesis por medio de resultados estadísticos.

4.3. Población y muestra

4.3.1. Población

La población del estudio está constituida por el fungicida Vondozeb 80WP, así como los bulbos de cebolla *Allium Cepa* L., variedad chalotas y nauplios de *Artemia Salina*.

4.3.2. Muestra

El tamaño de la muestra fue de 48 bulbos de cebolla *Allium Cepa* L. variedad chalota, y 83 nauplios de *Artemia Salina*. Además se escogieron intencionalmente 10 g de Fungicida *Vondozeb 80WP* con número de registro UPL -07E-2014.

4.3.2.1. Criterios de inclusión

Gramos de Fungicida *Vondozeb 80WP* que estuvieran contenidos en el empaque con número de registro UPL – 07E - 2014.

Bulbos de cebolla variedad chalota de forma ovalada y sin golpes;.

Nauplios de *Artemia Salina* con 48 horas de haber eclosionado.

4.3.2.2. Criterios de exclusión

Gramos de Fungicida *Vondozeb 80WP* que no estuvieran contenidos en el empaque con número de registro UPL – 07E - 2014.

Bulbos de cebolla que no pertenecieran a la variedad chalota o que estuvieran en mal estado.

Artemias Salinas que no estuvieran en el estadio de nauplios.

4.4. Variables y Operacionalización

4.4.1. Variable independiente

Concentración de *Vondozeb 80WP* aplicada en los bioensayos

4.4.2. Variables dependientes

Aberraciones cromosómicas, longitud de las raíces, muerte de organismos (*Artemia Salina*).

4.4.3. Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES
Crecimiento de las raíces	Es el desarrollo de las raíces (sistema radicular), que ayudan a los bulbos de cebolla a crecer.	Milímetros (mm)
Aberraciones cromosómicas en mitosis	Se trata de alteraciones en la estructura de los cromosomas, y se refieren a cambios en la forma y/o tamaño de un cromosoma.	Fragmentos acéntricos, cromosomas errantes o rezagados, anafases desorganizadas, puentes anafásicos y telofásicos, células alargadas y células binucleadas
Muerte de los organismos	Efecto terminal que resulta de la extinción del proceso homeostático en un ser vivo.	Inmovilidad por más de 10 segundos después de la exposición al tóxico.

4.4.3. Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES
Crecimiento de las raíces	Es el desarrollo de las raíces (sistema radicular), que ayudan a los bulbos de cebolla a crecer.	Milímetros (mm)
Aberraciones cromosómicas en mitosis	Se trata de alteraciones en la estructura de los cromosomas, y se refieren a cambios en la forma y/o tamaño de un cromosoma.	Fragmentos acéntricos, cromosomas errantes o rezagados, anafases desorganizadas, puentes anafásicos y telofásicos, células alargadas y células binucleadas
Muerte de los organismos	Efecto terminal que resulta de la extinción del proceso homeostático en un ser vivo.	Inmovilidad por más de 10 segundos después de la exposición al tóxico.

4.5. Material y método

4.5.1. Materiales para recolectar información

Revistas de Artículos Científicos

Fichas de cita textual

Fichas bibliográficas

Libros

4.5.2. Materiales para procesar la información

- ✓ Sistema operativo Windows 7, versión ultimate.
- ✓ Microsoft Excel 2007
- ✓ Microsoft Word 2010
- ✓ Microsoft PowerPoint 2010
- ✓ Mapas
- ✓ Tablas
- ✓ Gráficos
- ✓ Diagramas
- ✓ Imágenes

4.5.3. Material y métodos a utilizar

4.5.3.1. Materiales

Los materiales y equipos utilizados durante los bioensayos son los que se mencionan a continuación:

Nombre	Marca	Capacidad
Tubos de ensayo de vidrio de Erlenmeyers	Pyrex	12 cm de largo y 5 cm de diámetro
Vasos de precipitados.	Pyrex	3L 1L 500mL
Vidrio Reloj		250mL
Placas petry		
Pipetas volumétricas y graduadas	Pyrex	10mL 20mL.
Matraz aforado	Pyrex	50 mL 100mL
Probetas	Pyrex	100mL
Agitadores de Vidrio		
Pipetas automáticas	COMECTASA	50 μ L, 100 μ L, 200 μ L
Puntas para micropipetas.	Sorenson TM	50 - 100 μ L
Goteros		
Pipetas Pasteur		
Bulbos de látex para pipetas Pasteur.		
Peras para pipetas		
Espátulas		

4.5.3. Material y métodos a utilizar

4.5.3.1. Materiales

Los materiales y equipos utilizados durante los bioensayos son los que se mencionan a continuación:

Nombre	Marca	Capacidad
Tubos de ensayo de vidrio de	Pyrex	12 cm de largo y 5 cm de diámetro
Erlenmeyers	Pyrex	3L 1L 500mL
Vasos de precipitados.	Pyrex	250mL
Vidrio Reloj		
Placas petry		
Pipetas volumétricas y graduadas	Pyrex	10mL 20mL.
Matraz aforado	Pyrex	50 mL 100mL
Probetas	Pyrex	100mL
Agitadores de Vidrio		
Pipetas automáticas	COMECTASA	50 μ L, 100 μ L, 200 μ L
Puntas para micropipetas.	Sorenson TM	50 - 100 μ L
Goteros		
Pipetas Pasteur		
Bulbos de látex para pipetas pasteur.		
Peras para pipetas		
Espátulas		

Manguera delgada para bombas de acuario.
Recipiente plástico.
Gradillas o soportes improvisados para tubos de ensayo
Bisturí.
Asa en punta.
Reglilla para hacer mediciones en cm o mm.
Placa de 96 micropozos.
Guantes de látex.
Mascarilla.
Papel Parafilm.
Papel aluminio.
Papel toalla

4.5.3.2. Reactivos

Nombre	Fórmula química
Dimetilsulfóxido	C_2H_6OS
Orceína	$C_{28}H_{24}N_2O_7$
Ácido acético	CH_3COOH
Ácido Clorhídrico	HCl
Alcohol etílico 98%	CH_3CH_2OH
Acido acético glacial	CH_3COOH
Metanol	CH_3OH
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Agua destilada.	H_2O

4.5.3.3. Equipos

Nombre	Marca
Microscopio estereoscópico.	OLYMPUS
Microscopio	OLYMPUS
Balanza analítica.	CRYSTOL
Bombas para acuario.	
Controlador de temperatura ambiente (equipo de aire acondicionado)	
Refrigerador (4± 2 °C).	
Placa de calentamiento	
Calculadora	Casio
Cámara digital	BenQ
Memoria USB 16 GB	ADATA
Laptop	acer

4.5.3.4. Método (Fase experimental)

Para desarrollar las fases del trabajo monográfico, fue necesario contar con cada uno de los materiales y equipos de laboratorio mencionados en el apartado anterior.

Bioensayo con Allium Cepa, Método Fiskesjo modificado

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio 1 del Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua.

Para la obtención de los resultados en el bioensayo de toxicidad usando *Allium Cepa* fueron utilizados 48 bulbos de cebolla, variedad chalote, escogidos en el Mercado Municipal de Granada. El tóxico fue el fungicida *Vondozeb 80WP*, cuya formulación era polvo mojable (WP) en presentación de 1Kg.

☞ Toxicidad

Antes de que los bulbos fueran utilizados para el bioensayo, se les extrajo las catáfilas exteriores y el disco inferior fue limpiado de raicillas sin destruir los primordios que serían expuestos a las soluciones de *Vondozeb 80WP* a ensayar.

Se sumergieron totalmente todos los bulbos, al mismo tiempo, en un recipiente con agua tibia durante 15 min, de tal forma que éstos fueran desinfectados. Transcurrido los 15 min, los bulbos fueron colocados sobre un papel toalla para eliminar el exceso de agua.

Posteriormente se prepararon las soluciones de *Vondozeb 80WP* a concentraciones de 312.5, 625, 1250, 1875, 2500 ppm (*diríjase al anexo 7 para ver cálculos*). Las pruebas se realizaron en tubos de ensayo de vidrio de 12 cm de longitud x 5 cm de diámetro. Se rotularon los tubos del 1-8 para anotar cualquier anomalía en particular que pudiera ocurrir en cada bulbo de cebolla correspondiente a ese tubo. Las gradillas fueron rotuladas con la concentración correspondiente a la solución contenida en los tubos y C para el control, siendo un total de 48 bulbos experimentales.

Cada 12 horas se monitorearon los tubos de ensayo que contenían la solución ensayada y la cebolla, para asegurarse que las raíces estuvieran siempre en contacto con el líquido, ya que hay pérdida de éste por absorción o evaporación. En caso de pérdida, con ayuda de una pipeta Pasteur se rellanaron los tubos de ensayo con el líquido correspondiente, y se pipeteó por aproximadamente 10s dentro del tubo de ensayo para mantener la solución homogenizada y al mismo tiempo oxigenarla.

Para evaluar la toxicidad, genotoxicidad y citotoxicidad se analizó el crecimiento de las raíces de los bulbos de cebollas que tenían que estar en contacto con la solución a evaluar durante 72 h, cuidando, siempre, que la zona radicular quedara inmersa en el líquido, tal como lo muestra la *imagen en el anexo 4*.

Seguidamente, con una regla se midieron todas las raíces de los bulbos de cebolla para cada una de las diferentes concentraciones (entre 9 – 10 raíces por cada concentración); y se obtuvo el promedio de longitudes que fue utilizado para el cálculo de los porcentajes de crecimiento de las raíces expuestas a *Vondozeb 80WP* respecto a los controles.

➤ Genotoxicidad

Una vez finalizada las 72 h de exposición de las raíces a cada solución, se cortaron con la ayuda de un bisturí aproximadamente 10 raíces de cada concentración, tomándose las de mejor aspecto y se colocaron en un tubo de ensayo con fijador Carnoy, con la finalidad de preservar la estructura integral de los cromosomas, y se conservaron a una temperatura de 4°C.

Las condiciones se mantuvieron constantes durante todo el ensayo, la temperatura fue de 22°C y los bulbos se mantuvieron en una caja de madera envuelta con plástico negro, para protegerlos de la luz y de las corrientes de aire.

Al día siguiente tal como lo indica el método de Fiskesjo modificado en la sección de la división celular, fueron analizadas las raíces que estuvieron sumergidas en el líquido control. Éstas fueron colocadas sobre un vidrio reloj al cual se le adicionó agua

destilada y se dejó en reposo durante 5 min, proceso que se repitió 3 veces, luego las raíces se trasladaron a otro vidrio reloj el cual contenía una solución de HCl 50% y se dejó en reposo durante 15 minutos, seguidamente las raíces fueron colocadas en otro vidrio reloj con agua destilada durante 5 min, y nuevamente el proceso se repitió 2 veces, tal como lo muestra el diagrama 1. Este proceso se repitió para las raíces de cada concentración.

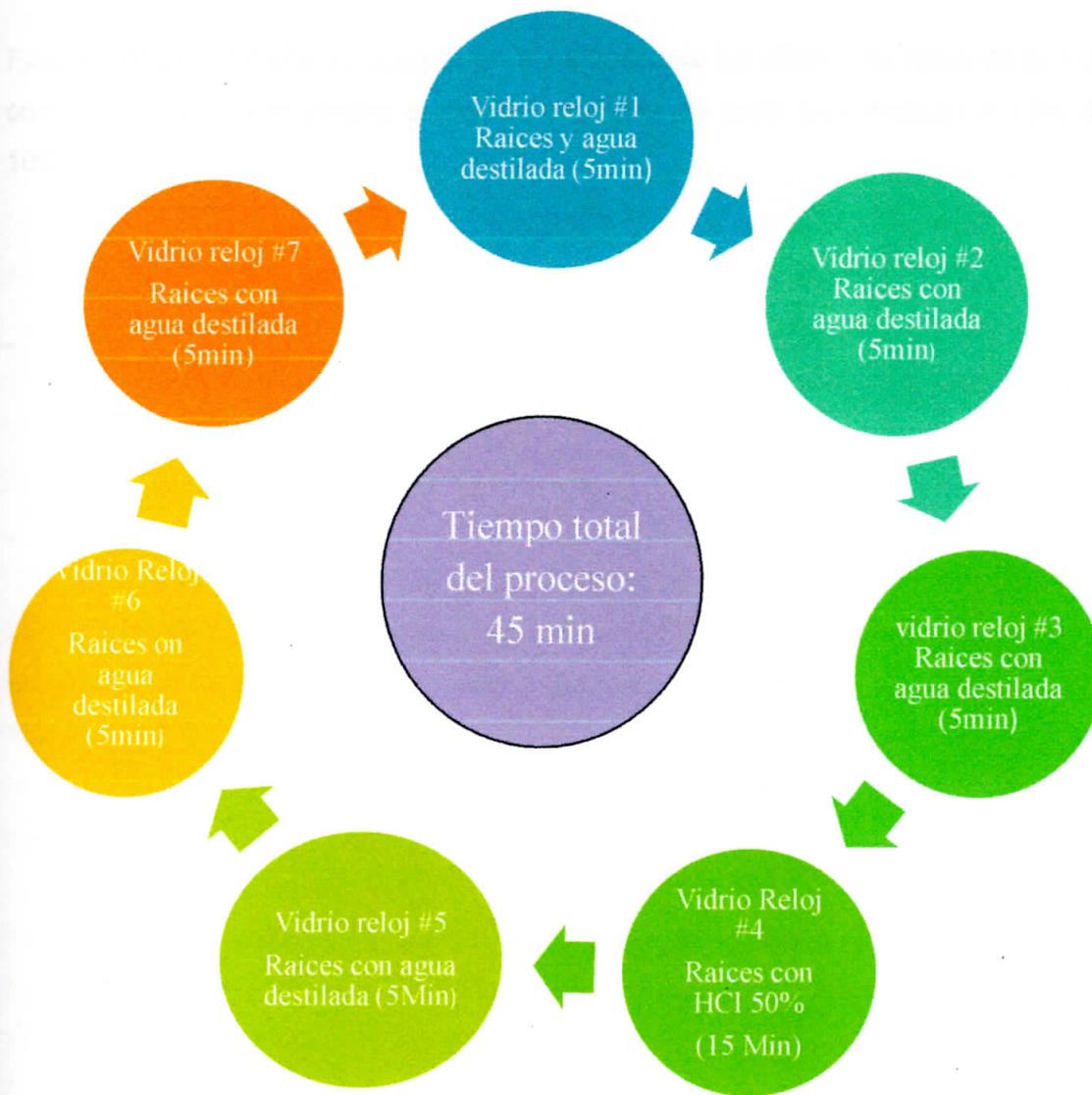


Diagrama 1. Preparación de las raíces para observar mitosis en el microscopio

Luego, se realizaron 6 preparados para cada concentración. En cada uno se colocó la zona meristemática de las raíces, los últimos 2 o 3 mm de las puntas (de color más blanco), las cuales habían sido previamente lavadas, en un portaobjeto con una gota de ácido acético 50% y una gota de orceína acética y se dejó teñir por 5 min, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, se aplicó la técnica de "squash" (la cual consiste en ejercer un poco de presión con el dedo índice de la mano para formar una monocapa celular) y con ayuda de papel absorbente se retiró el exceso de tinte.

Finalmente se procedió a observar en el microscopio las diferentes fases de la mitosis, con el objetivo de encontrar cualquier anomalía de fase (observación a 10x, 40x y 100x).

Bioensayo con Artemia Salina

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio 1 del Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua. Para la obtención de los resultados en el bioensayo de toxicidad con *Artemia Salina* fueron utilizados quistes secos de *Artemia Salina*, proporcionados por el Laboratorio de Biología. El tóxico fue el fungicida *Vondozeb 80WP*.

El estadio de prueba seleccionado fue el de nauplio, (0,45 mm) alcanzado en un periodo de 48 horas. Para la obtención de ese estadio se hidrataron en agua de mar; (proveniente de Huehuate), previamente esterilizada por 1 h; 5g de quistes (pesados en una balanza analítica de precisión 0.0001g) en un erlenmeyer de 500mL. La aireación fue suave y constante desde el fondo del erlenmeyer para mantener los quistes en suspensión. Se trabajó bajo condiciones de temperatura de 28 – 30°C.

A las 24 horas se observó la eclosión de los nauplios, los cuales se dejaron madurar durante 48 horas, tiempo establecido para la utilización en el bioensayo. Luego de 48 h, éstos fueron sometidos a toxicidad.

Para exponer los nauplios al tóxico se utilizaron placas de 96 micropozos de fondo plano; las cuales se rotularon con las diluciones preparadas. Para ellos se seleccionaron 8 concentraciones del fungicida en el orden de ppm, para el control negativo (Blanco) se utilizó agua de mar sin dilución del tóxico; el sulfato de cobre (II) pentahidratado fue utilizado como control positivo (Patrón de Referencia), para establecer el grado de sensibilidad que presentan los organismos prueba.

Para las concentraciones de prueba con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, se partió de una solución de 256 ppm, para esto se pesó 0.0256 g (25.6 mg) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y se disolvieron en 100ml de agua destilada. Haciendo uso de la ecuación de la dilución se obtuvieron concentraciones de 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ppm (*dirijase al anexo 8 para ver los cálculos*).

Para la muestra (*Vondozeb 80WP*) fueron 1250, **625**, **312.5**, 156.25, 78.125, 39.062, 19.531, 9.766 ppm. La solución madre se preparó pesando en una balanza analítica 0.0025g del fungicida y se agregó 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) con una micropipeta y finalmente se adicionaron 1900 μ L de agua de mar esterilizada. Los resultados experimentales de las diluciones marcadas en negrita, no fueron tomados en cuenta debido a que en las 3 primeras diluciones se obtiene una mortalidad del 100% de *Artemias Salinas*, por lo que para el análisis de los resultados no aporta información adicional al estudio (Domínguez, Carrero, Ramírez, Segovia, & Pino, 2009)

Después de preparada la solución madre se realizaron las diluciones hasta obtener las concentraciones deseadas. Para ello en la primera fila de la placa de micropozos se agregó 200 μ L de agua de mar (A₁, A₂, A₃), 200 μ L de sulfato cúprico pentahidratado (A₄, A₅, A₆,) y 200 μ L de solución madre preparada de *Vondozeb 80WP* (A₇, A₈, A₉). De la fila B – H se adicionó 100 μ L de agua de mar a cada micropozo. Las concentraciones de las disoluciones se montaron por triplicado, como lo muestra el *diagrama en el anexo 9*.

Todas las diluciones se hicieron en serie; para ello se tomaron 100 μ L de la solución en la primera fila (control negativo, control positivo y muestra, respectivamente) y fueron depositadas en la siguiente fila (se pipeteó 3 veces para homogenizar la solución) y así sucesivamente hasta completar los micropozos de la fila 8, de esta última se tomaron 100 μ L y fueron desechados en un beaker. Finalmente se colocaron 100 μ L de *Artemia salina* y fueron depositadas en todos los micropozos. Se emplearon no más de 30 nauplios (aproximadamente) por cada uno, como recomienda la literatura: "*Para el uso de Artemia en las pruebas toxicológicas y cualquier otro crustáceo pequeño el número de 30 animales máximo es lo recomendado* (Reish and Oshida, 1987)" (Arencibia Carballo & Tizol C, 2010). Así se dio por finalizado el montaje para la exposición al fungicida.

Después de 24 h fue necesario contar la cantidad de *Artemias Salinas* vivas y muertas para cada concentración, haciendo uso de un estereoscopio. Debido al tamaño del organismo y su rapidez para nadar se hace difícil el conteo de las *Artemias* vivas, por lo

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

que solamente se cuentan las muertas. El criterio para considerar la muerte de las *Artemias Salinas* fue la inmovilidad por más de 10s (Arencibia Carballo & Tizol C, 2010). Posteriormente se adicionaron 50 μ L de metanol a todos los micropozos, para provocar la muerte de todas, se dejó reposar por 15 minutos y se realizó un nuevo recuento, y por diferencia ($\text{muertas}_{(\text{metanol})} - \text{muertas}_{(24\text{h})}$) se obtiene la cantidad de *Artemias* vivas después de 24 h de exposición. El valor de la DL_{50} y los límites de confianza para las 24 h, se determinaron por el método Probit y el Método Reed - Muench.

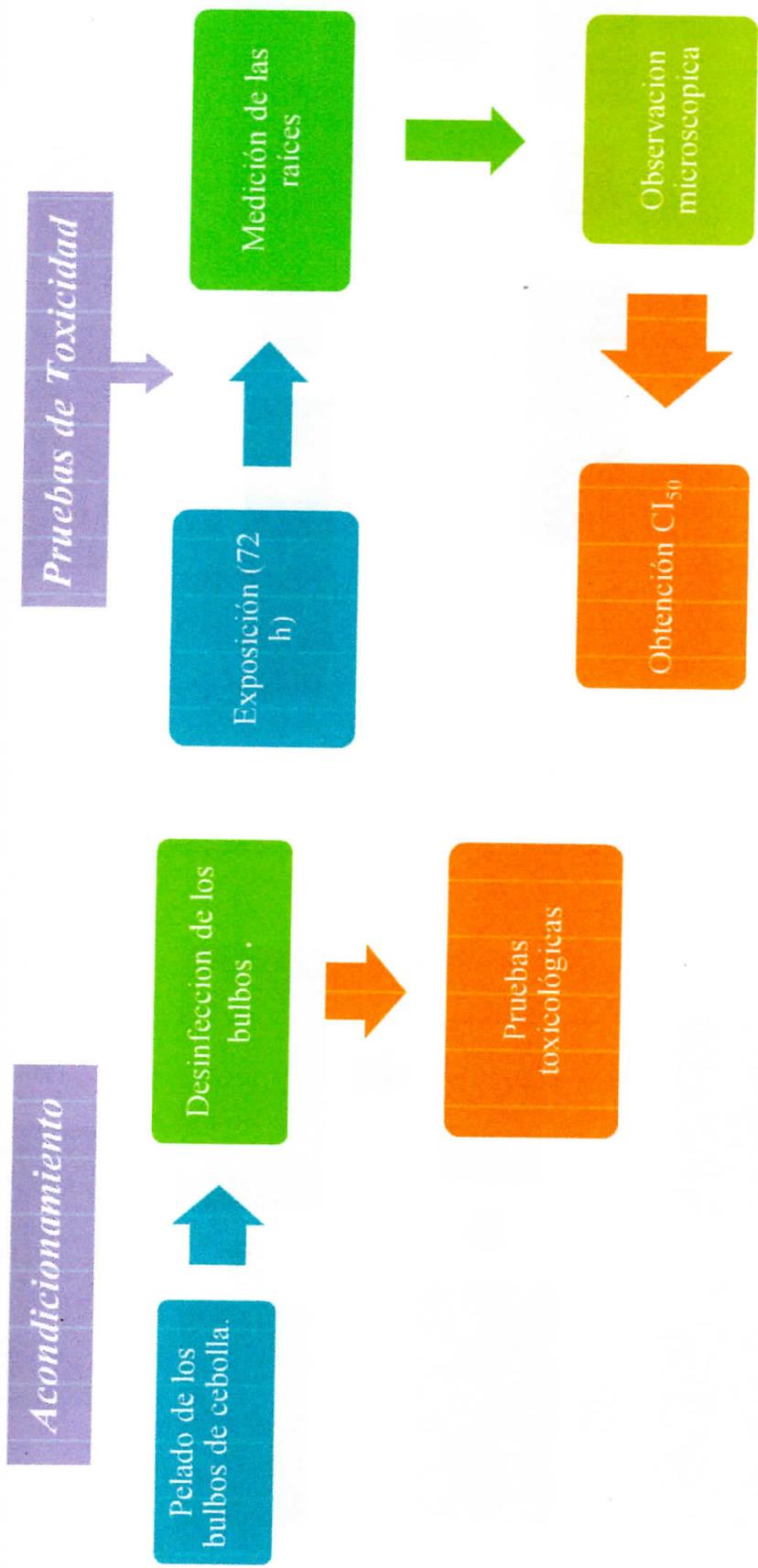
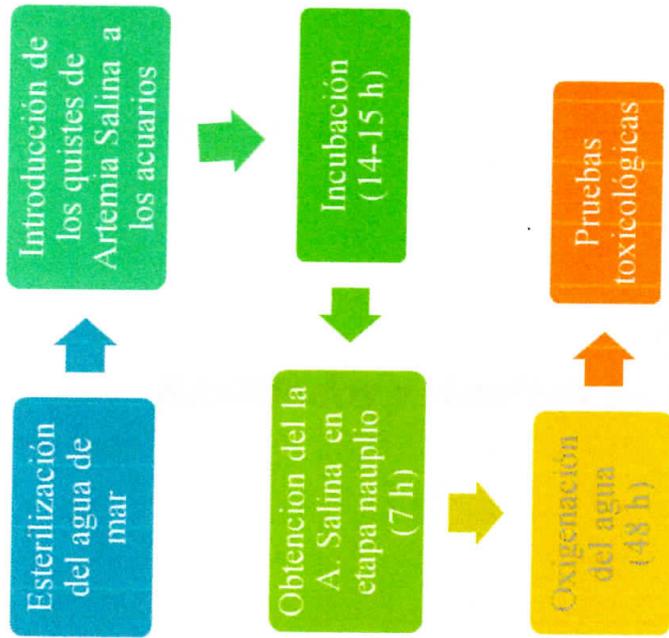


Diagrama 2. Metodología para la determinación de la CI₅₀

Eclosión



Pruebas de Toxicidad

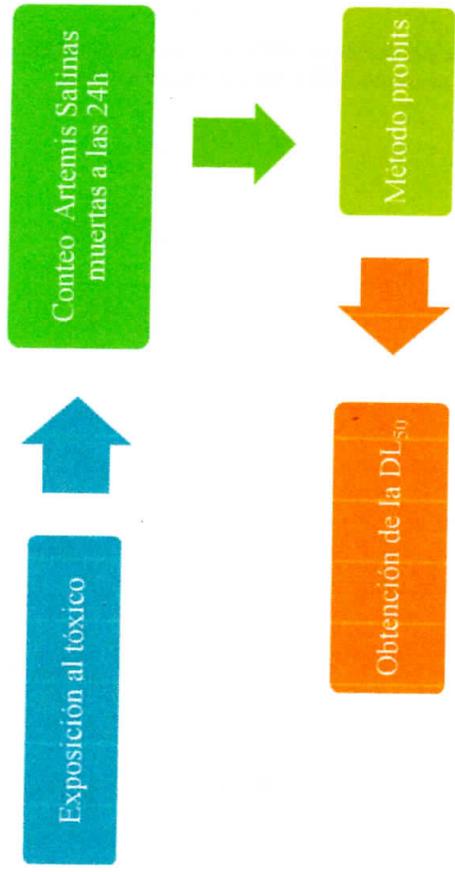


Diagrama 3. Metodología para la determinación de la DL₅₀

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad: Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

***CAPÍTULO V.
Resultados y Análisis de los Resultados***

5.1. Bioensayo Allium Ceba

Datos obtenidos durante el experimento

Tabla 5.1. Longitudes de las raíces de Allium Ceba al finalizar el bioensayo

Muestra	[ppm]	Longitud de las raíces (mm)							
		Réplicas							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Control	0	4.2	5.3	6	0	0	6.3	3.9	1
1	312.5	2.5	4.5	1.7	2.5	1.7	6.6	5.6	6.9
2	625	2.3	4.3	2.3	6.1	4.5	2.3	0	5.7
3	1250	4.2	2.7	1	2	2	1	0	2.1
4	1875	3.3	1	1.2	0.6	2.2	3.8	0	0.5
5	2500	1.4	1	1	0	2	0	0.7	0

Evaluación del fungicida

Toxicidad

1- Turgencia, color y forma de la raíz

Para evaluar la toxicidad se observaron y analizaron diferentes parámetros macroscópicos. Para el parámetro turgencia se asignaron valores del 1 a 5 para caracterizar la dureza de las raíces. Al igual que en el parámetro turgencia, para el parámetro de cambio de color se asignaron valores del 1 -5 para caracterizar la coloración de las raíces; los valores se muestran en la tabla 5.2.

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; *Allium cepa*, *Artemia Salina*; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

Tabla 5.2. Parámetro Turgencia y coloración

Valor	Grado de turgencia	Blanca
1	Muy Duras	Amarillenta
2	Duras	Amarilla
3	Semiduras	café
4	Blandas	Negruzca
5	Muy blandas	Negra

Tabla 5.3. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco vs. [312.5 ppm]

Parámetro	Foto raíces en el Blanco Horas de exposición		Foto raíces [312.5 ppm] Horas de exposición	
	72h	Valor	72h	Valor
Turgencia		1		2
Forma de la Raíz		Rectas		Rectas
Cambio de Color		1		1

A pesar de que no hay diferencia en la forma y el color de las raíces expuestas a la solución 312.5 ppm con respecto a las que crecieron en el Blanco, se puede apreciar que exponerlas al fungicida genera daños en algunos bulbos de cebolla.

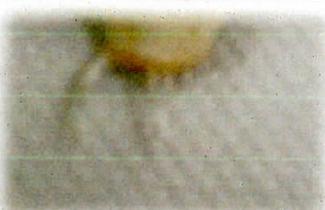
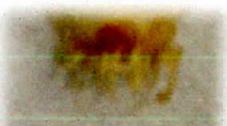
Parámetro	Foto raíces en el Blanco Horas de exposición		Foto raíces concentración [625ppm] Horas de exposición	
	72h	Valor	72h	Valor
Turgencia		1		2
Forma de la Raíz		Rectas		Rectas
Cambio de Color		1		1

La dosis recomendada por el fabricante del fungicida corresponde a 625ppm, es por ello que a esta concentración, tal como lo muestra la tabla 5.4, no se logran apreciar grandes cambios en las raíces de los bulbos de *Allium Cepa*, debido a que esta concentración resulta ser beneficiosa para la planta donde es aplicada.

Tabla 5.5. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [1250ppm]				
Parámetro	Foto raíces en el Blanco Horas de exposición		Foto raíces concentración [1250ppm] Horas de exposición	
	72h	Valor	72h	Valor
Turgencia		1		3
Forma de la Raíz		Rectas		Dobladas
Cambio de Color		1		2

La tabla 5.5 muestra cambios en los parámetros macroscópicos de las raíces sumergidas en la solución 1250ppm en comparación con las sumergidas en el blanco, evidenciando que el fungicida a esta concentración resulta dañino para los organismos expuestos.

Tabla 5.6. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [1875ppm]

Parámetro	Foto raíces en el Blanco Horas de exposición		Foto raíces concentración [1875ppm] Horas de exposición	
	72h	Valor	72h	Valor
Turgencia		1		3
Forma de la Raíz		Rectas		Dobladas
Cambio de Color		1		3

Aumentar 3 veces la dosis recomendada ocasiona quiebres, dobles, mucha fragilidad y coloración en las raíces de Allium Cepa. Parte de la coloración de las raíces se debe al color de la solución en la que están sumergidas; sin embargo el oscurecimiento de las mismas es producto de exposiciones prolongadas a altas concentraciones de tóxico. La tabla 5.6 muestra cambios bruscos negativos en forma de las raíces, indicando que a medida que se aumentan las concentraciones de este fungicida, mayores daños son observados en los organismos utilizados como bioindicadores.

Tabla 5.7. Análisis de los parámetros macroscópicos Blanco Vs. [2500ppm]				
Parámetro	Foto raíces en el Blanco Horas de exposición		Foto raíces concentración [2500ppm] Horas de exposición	
	72h	Valor	72h	Valor
Turgencia		1		—
Forma de la Raíz		Rectas		—
Cambio de Color		1		—

La tabla 5.7 no muestra información sobre la forma, color y turgencia de las raíces, debido a que la alta concentración del tóxico no permite la elongación de la raíz, y por tanto no es posible obtener suficiente material radicular para caracterizar las raíces expuestas a la concentración **2500ppm**.

Aunque no se desarrolló material radicular para ser analizado, a manera de inquietud personal, se decidió exponer durante 120 horas más, los bulbos de cebollas sumergidos en la concentración **2500ppm**; sin embargo los resultados macroscópicos y microscópicos no fueron tomados en cuenta para redactar las conclusiones del trabajo, ya que según Fiskesjo la raíz debe de estar sumergida solamente durante 72 h. En la foto del *Anexo 15* se muestra el crecimiento de las raíces sumergidas en diferentes concentraciones por 192h y puede apreciarse mejor como la forma y color de las raíces cambia a medida que se aumenta la concentración del fungicida.

2- Crecimiento de las raíces: longitud de las raíces luego de 72 h de exposición.

Se calculó el promedio de las longitudes de las raíces para las 8 réplicas, su desviación estándar y el coeficiente de inhibición. Los datos para el cálculo de estos valores se colocaron en la tabla 5.8 teniendo en cuenta las siguientes variables:

- ↻ Concentración del tóxico estudiado, [ppm]
- ↻ Longitud de las raíces, (mm)

Las variables anteriores fueron obtenidas durante la realización del bioensayo y para obtener el porcentaje del efecto de inhibición se realizó la siguiente operación:

$$CI = \frac{L_c - L_t}{L_c} \times 100\%$$

Ec. 1

CI = Coeficiente de inhibición

L_c = Longitud del control

L_t = Longitud del tratamiento

Los valores obtenidos (dirijase al anexo 10.1 para ver cálculos) para los parámetros analizados en las raíces de *Allium Cepa* expuestas a distintas concentraciones de Vondozeb 80WP se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.8. Cálculo del coeficiente de inhibición

Muestra	[ppm]	Longitud de las raíces (mm)								Promedio (\bar{X})	Desviación estándar (SD)	% de inhibición
		Réplicas										
		1	2	3	4	5	6	7	8			
Control negativo (Blanco)	0	4.2	5.3	6	0*	0*	6.3	3.9	1	4.7 (0.5mm -13mm)	1.8	0.0
1	312.5	2.5	4.5	1.7	2.5	1.7	6.6	5.6	6.9	4 (0.5mm -10mm)	2.1	14.8
2	625	2.3	4.3	2.3	6.1	4.5	2.3	0*	5.7	3.9 (0.5mm -9mm)	1.6	17.0
3	1250	4.2	2.7	1	2	2	1	0*	2.1	2.1 (0.5mm -7mm)	1.0	55.3
4	1875	3.3	1	1.2	0.6	2.2	3.8	0*	0.5	1.8 (0.5mm-6mm)	1.3	61.7
5	2500	1.4	1	1	0*	2	0*	0.7	0*	1.2 (0.5mm -4mm)	0.5	74.5

Para obtener el promedio de crecimiento no fueron tomadas en cuenta las réplicas donde no hubo crecimiento.

La gráfica 5.1 muestra el promedio del crecimiento de las raíces con respecto a cada concentración; la línea de tendencia indica que a mayor concentración mayor inhibición del crecimiento de la zona radicular de los bulbos de cebollas, indicando que a medida que se aumenta la dosis en la aplicación de este fungicida, deja de ser beneficioso para el cultivo aplicado para convertirse en una sustancia tóxica.

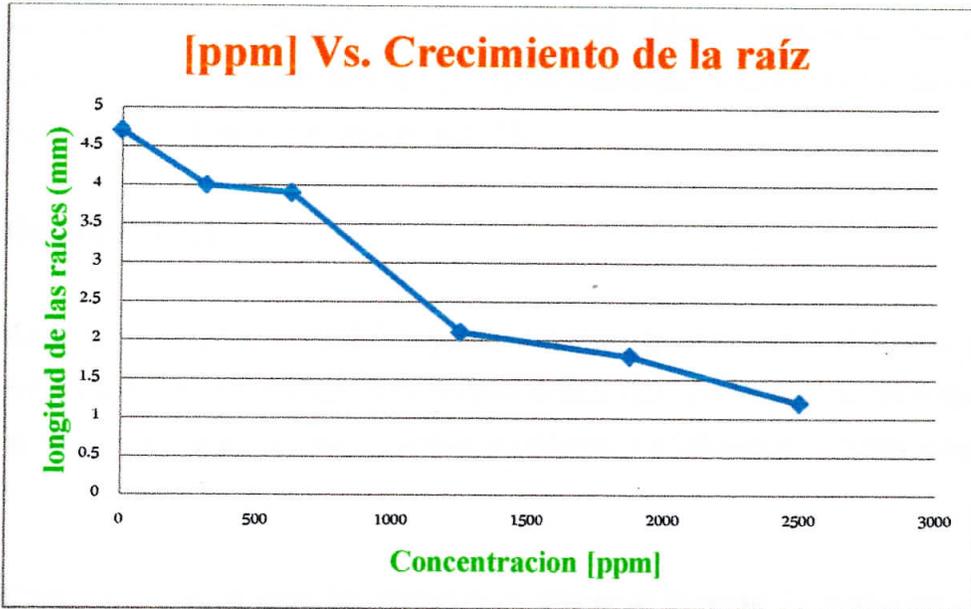


Gráfico 5.1. Crecimiento de las raíces para cada concentración

Con los valores de inhibición se construyó la gráfica 5.2 de concentración versus porcentaje de inhibición (dosis – respuesta) y se calculó el CI_{50} , como la concentración que presenta valores por debajo del 50% de los valores observados en el control.

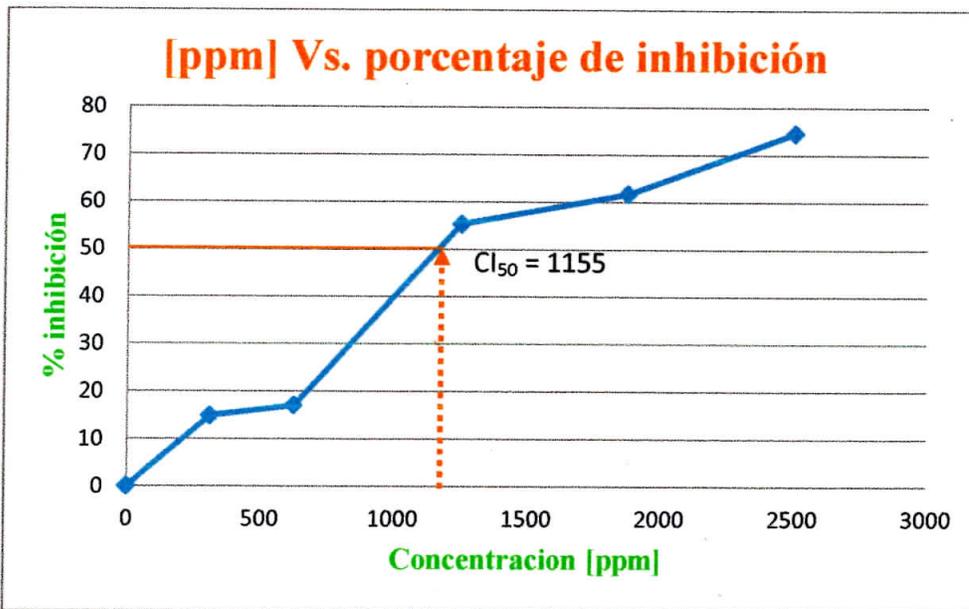


Gráfico 5.2. Porcentajes de inhibición para cada concentración preparada en el estudio

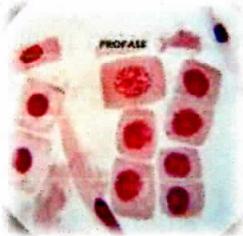
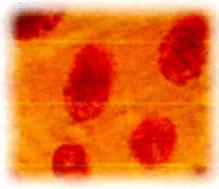
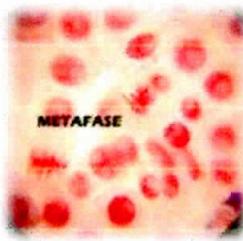
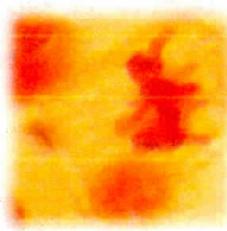
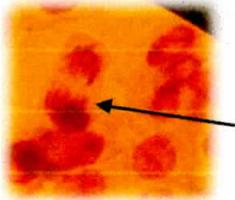
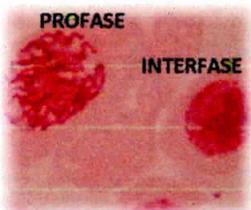
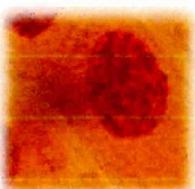
La gráfica 5.2 muestra que *Vondozeb 80WP* presenta actividad tóxica a concentraciones superiores a 1155 ppm, haciéndose evidente su toxicidad a través de la inhibición de la raíces mayor al 50%.

Genotoxicidad

Aquí se realizaron análisis mayoritariamente de anafases/ telofases, considerándose las siguientes anomalías: fragmentos acéntricos, cromosomas errantes o rezagados, anafases desorganizadas, puentes anafásico y telofásicos, células alargadas y células binucleadas.

Como es de esperarse las raíces que crecieron durante 72 horas en agua de la llave (sin *Vondozeb 80WP*) presentan fases de la mitosis sin alteraciones. En todas las raíces observadas bajo el microscopio se encontraron profases, metafases, anafases y telofases normales tal como lo muestra la tabla 5.9, donde se comparan las fotos de una división celular normal (según la bibliografía) y las fotos capturadas en la observación bajo microscopio.

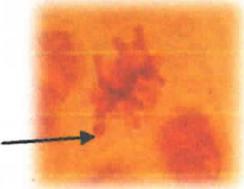
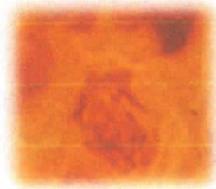
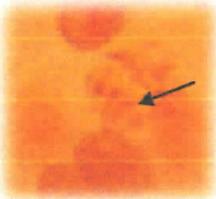
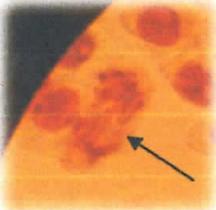
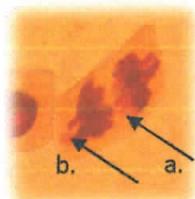
Tabla 5.9. Alteraciones en las fases de mitosis de las raíces en el control negativo (Blanco)

Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas durante el bioensayo	Tipo de Alteración en mitosis
[0] (agua de la llave)	Profase			No hay aberración (profase normal)
	Metafase			No hay aberración (Metafase Normal)
	Anafase			No hay aberración (Anafase normal)
	Telofase			No hay aberración (Telofase normal)
	Interfase			No hay aberración (Interfase normal)

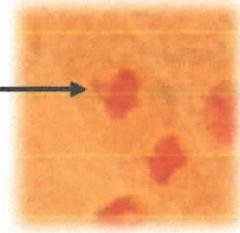
La tabla 5.10 hace una comparación entre la división celular de raíces que crecen en condiciones idóneas (sin toxicidad) y las raíces que crecen a exposiciones de 312.5 ppm de *Vondozeb 80WP*. Debido a la presencia de una sustancia tóxica, como lo es el fungicida en estudio, a nivel microscópico se logran observar alteraciones en las fases de la división celular en *Allium cepa* (puentes y fragmentos anafásicos, cromosomas rezagados, etc.); tales alteraciones denotan la actividad genotóxica del fungicida; aún a concentraciones bajas.

A partir de la tabla 5.10 hasta la tabla 5.14 se podrá notar, que a medida que se aumenta la concentración del fungicida, las alteraciones en el ciclo celular se hacen más frecuentes; indicando que exposiciones continuas a elevadas concentraciones del fungicida alteran la genética de los seres vivos.

Tabla 5.10. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [312.5ppm]

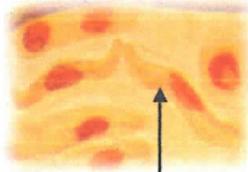
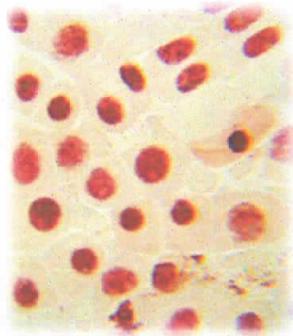
Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas en el bioensayo	Tipo de Alteración en mitosis
[312.5 ppm]	Metafase			Cromosomas rezagados
	Anafase			Anafase irregular con quiebres, fusiones y retardos cromosómicos
				Puente anafásico
				Puente anafásico
				a. Puente anafásico y b. Fragmento en anafase

Telofase

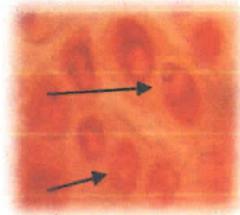


Fragmento en telofase

Otros



Células alargadas

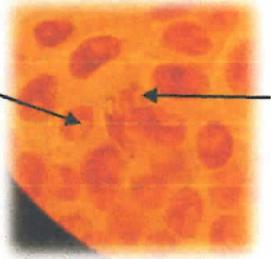
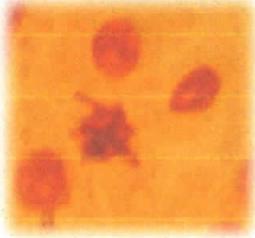
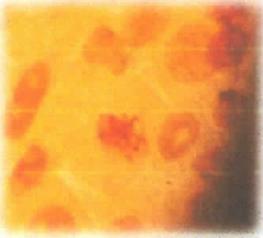
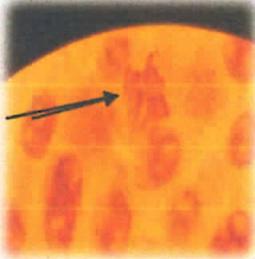


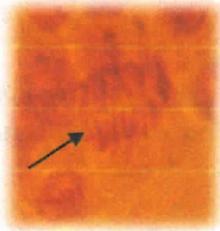
Células binucleadas



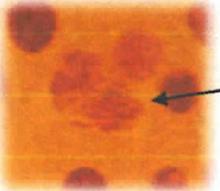
Forma anormal de los cromosomas

Tabla 5.11. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [625ppn]

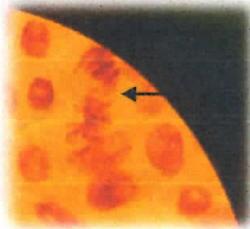
Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas durante el bioensayo	Tipo de Alteración en mitosis
[625ppm]	Metafase			Anomalías en Metafase
			Fragmentos en metafase	
			Desorden en metafase	
Anafase			Fusión en anafase	



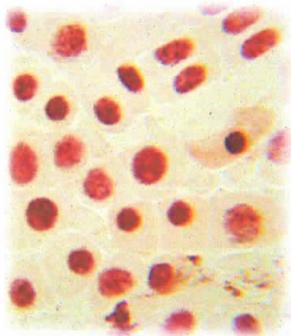
Puente
anafásico



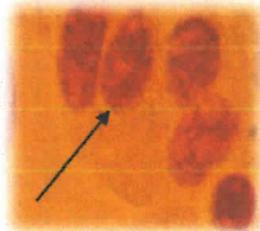
Cromosomas
rezagados en
anafase



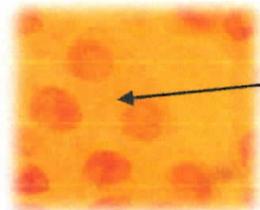
Desorden en
Anafase



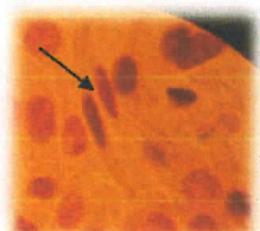
Otros



Células
binucleadas

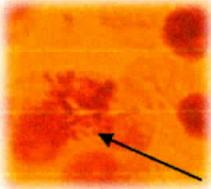
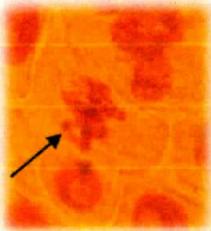
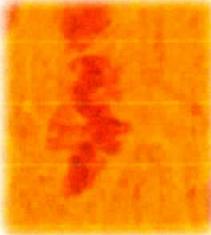
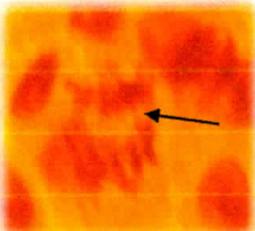
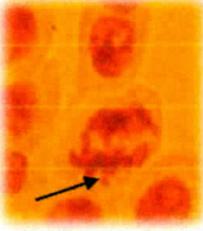


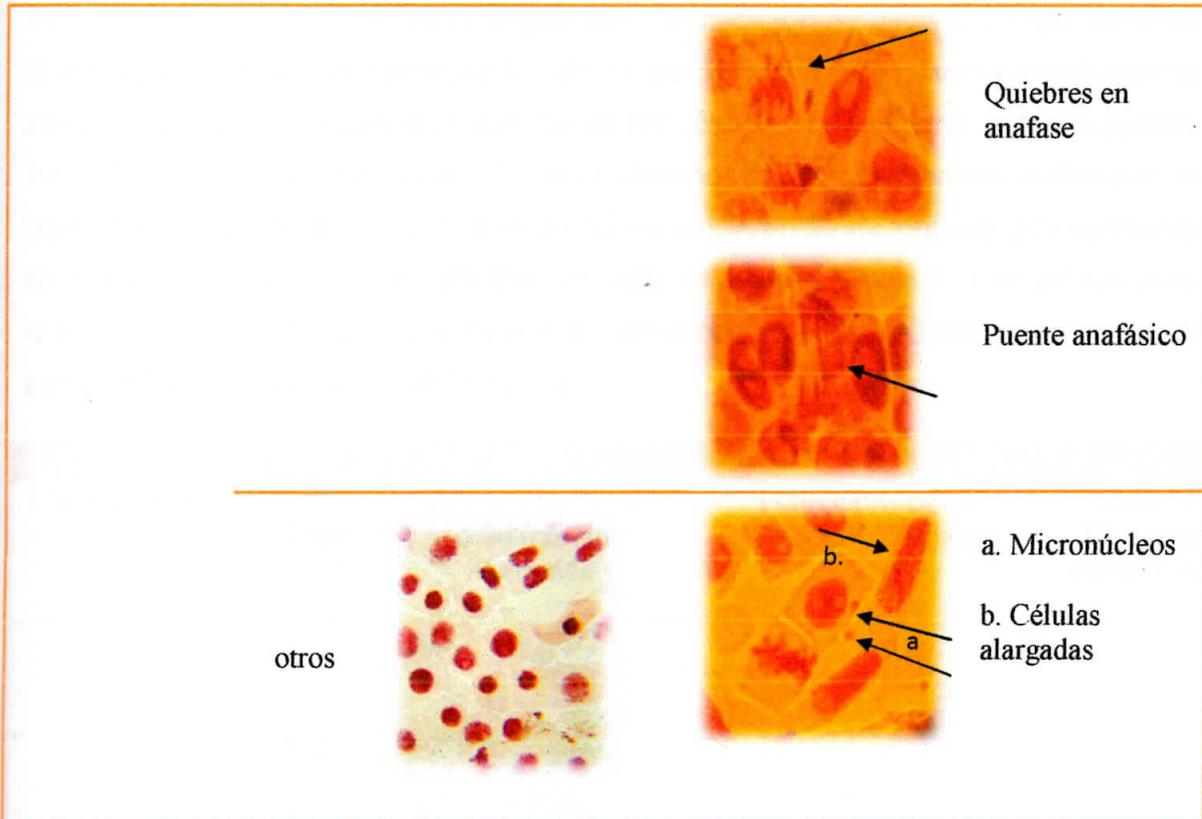
Célula
binucleada



Células
alargadas

Tabla 5.12. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [1250ppm]

Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas durante el bioensayo	Tipo de Alteración en mitosis
[1250ppm]	Metafase			Metafase Pegajosa
				Metafase Pegajosa
				Desorden en metafase
[1250ppm]	Anafase			Anafase pegajosa
				Quiebre en anafase



La tabla 5.13 presenta solo un tipo de alteración en las fases de mitosis, y esto es debido al poco crecimiento radicular de las cebollas expuestas a esta concentración, por lo que no era suficiente longitud para obtener el ápice de la raíz y poder observar al microscopio los daños genéticos.

Tabla 5.13. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces en la solución [1875ppm]

Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Foto capturada durante el bioensayo	Tipo de Alteración en mitosis
[1875ppm]	Otros			Forma anormal de las células

Para la tabla 5.14 no se muestra ningún tipo de alteración en mitosis, ya que debido a la alta concentración del fungicida, la raíz no creció lo suficiente como para obtener la zona apical y poder observar la división de las células. Por el motivo antes expuesto, los bulbos de cebolla expuestos a la concentración 2500ppm fueron expuestas por un lapso de 120 horas; de tal forma que las raíces crecieran a una longitud que permitiera observar al microscopio las alteraciones que se podían producir. Las alteraciones encontradas se muestran en la tabla 5.15; sin embargo estos resultados no formarán parte de las conclusiones de este trabajo

Tabla 5.14. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [2500ppm]

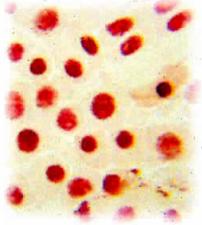
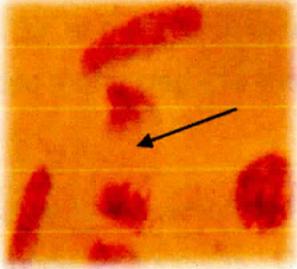
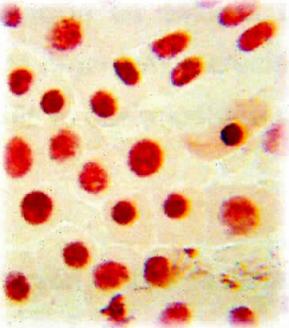
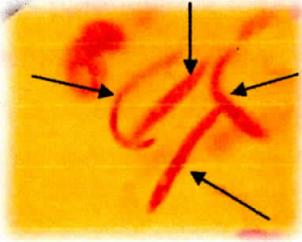
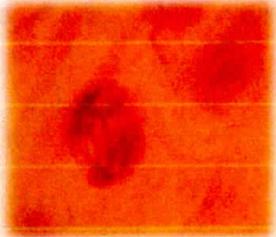
Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas durante el bioensayo (72h)	Tipo de Alteración encontrada
2500ppm	Telofase		_____	_____
	Otros		_____	_____

Tabla 5.15. Alteraciones encontradas en las fases de mitosis de las raíces a [2500ppm]

Concentración	Fase celular	Fotos de las fases celulares sin alteración	Fotos capturadas durante el bioensayo (192h)	Tipo de Alteraciones encontradas
	Telofase			Telofase anormal
4X	Otros			Forma anormal de las células
				Anomalía

5.2. Bioensayo Artemia Salina

5.2.1. Método de los Probits

Con los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda del fungicida *Vondozeb 80WP*, se procedió a utilizar el método Probit, que es el método más usado para el establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad y la estimación de la DL_{50} .

El método se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. Dicho método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población en estudio, transformando la dosis a una escala logarítmica y el porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de la sustancia a unidades Probit; lo cual mostrará una relación dosis- respuesta de forma S o sigmoidea normal.

El Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p) (Castillo, 2004), y la ecuación generada es de la forma:

$$Y = a + bx$$

Ec. 2

$$Y \text{ (expresado en unidades probit)} = z + 5$$

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

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

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

$$x_5 = \log_{10} DL_{50}, \text{ entonces } DL_{50} = 10^{x_5}$$

Datos obtenidos durante el experimento

La tabla 5.16. muestra todos los datos recolectados durante el bioensayo; esta información fue utilizada para determinar la DL₅₀.

Tabla 5.16. Supervivencia y mortalidad de *Artemia Salina* frente a las diferentes concentraciones de fungicida preparadas

Concentración [ppm]	Log [ppm] (x)	Artemias Salinas Vivas			Artemias Salinas Muertas		
		Control Negativo	Control Positivo	Muestra	Control Negativo	Control Positivo	Muestra
1250	3.096	5	6	0	0	9	18
156.25	2.193	7	12	2	0	0	9
78.125	1.892	10	12	2	0	0	9
39.062	1.591	11	18	4	0	0	8
19.531	1.290	8	10	11	0	0	6
9.766	0.989	10	12	8	0	0	6

Aceptabilidad de los resultados

Antes de proceder a los análisis, se debía demostrar que los datos recolectados durante el bioensayo eran aceptables. Para que los datos recolectados fueran aceptados y considerados confiables, la mortalidad en el control negativo (agua) no debía exceder el 10% (Castillo, 2004)

Se procedió a construir la tabla 5.17 con los siguientes datos:

- ☞ Concentración de la sustancia, [ppm]
- ☞ Numero de organismos vivos usados en el control negativo (Blanco)
- ☞ Numero de organismos muertos en el Blanco después de 24h de exposición.
- ☞ Porcentaje de mortalidad en el control negativo

Los primeros 3 corresponden a datos experimentales recolectados durante el bioensayo y el último dato se obtiene con una sencilla regla de tres:

$$\%mortalidad = \frac{\text{organismos muertos}}{\text{organismos vivos usados}} \times 100$$

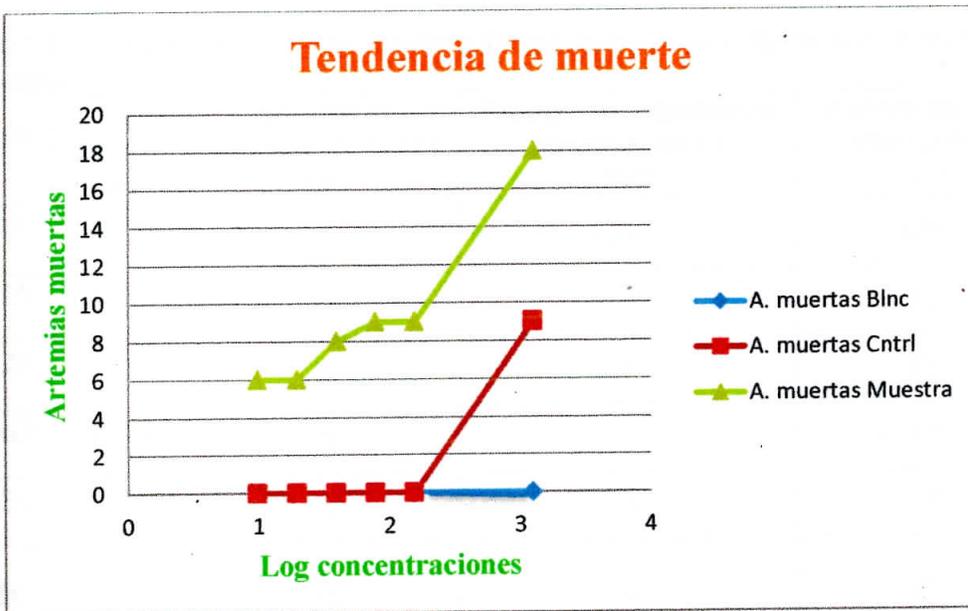
Ec.3

Tabla 5.17. Porcentaje de mortalidad en el control negativo (Blanco)

Concentración [ppm]	Organismos vivos (Blanco)	Organismos muertos (Blanco)	% Mortalidad
1250	5	0	0
156.25	7	0	0
78.125	10	0	0
39.062	11	0	0
19.531	8	0	0
9.766	10	0	0

Tal como lo muestra la tabla 5.17, los resultados son confiables puesto que la mortalidad en el control negativo es 0% para cada concentración (*diríjase al anexo 10.2 para ver cálculos*).

Con los datos tabulados en la tabla 5.16 se realizó el gráfico 5.3, que muestra la tendencia de muerte de las *Artemias salinas* sometidas a análisis. El gráfico muestra que la cantidad de *Artemias salinas* muertas en el control negativo cero, y esto se debe a que las condiciones en las que se desarrolla el organismo son óptimas para su supervivencia. Sin embargo cuando los organismos están en contacto con un tóxico entonces la mortalidad de estos aumenta al aumentar la concentración.



Gráfica 5.3. Tendencia de muerte de *Artemias Salinas* a las diferentes concentraciones.

Cálculo de la DL_{50}

Para ello, primero se construyó la tabla 5.18 con los siguientes datos:

- Concentración de la sustancia (*Vondozeb 80WP*), [ppm]
- Logaritmo de las concentraciones anteriores, (x).
- Numero de organismos en cada concentración, (N). En este caso se realizaron 3 réplicas por lo que "N" correspondía a la media de los organismos usados en las réplicas.
- Numero de organismos muertos en cada concentración, (r). El dato tabulado, también, corresponde a la media de los organismos muertos en las réplicas.
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración, (P).
- Probit empírico, (PE).

Los cuatro primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Porcentaje de mortalidad se calculó por la ecuación 4 (*diríjase al anexo 10.3 para ver cálculos*) y el Probit empírico se obtiene de la tabla de Probites con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones (*diríjase al anexo 11 ver tabla*).

La gráfica 5.4 muestra un máximo de 18 individuos muertos por cada 18 individuos sometidos a estudio (mortalidad 100%), y como mínimo 6 individuos muertos por cada 14 individuos sometidos a estudio (mortalidad 43%) a las 24 h de exposición.

Posteriormente, también a partir de los datos tabulados, se elaboró la gráfica 5.5., colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje y el Probit empírico, y se ajustó la regla a través de estos puntos. En el gráfico 5.5 se trazó una línea a partir del Probit 5.0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina *m* y el antilogaritmo de este valor correspondía a la DL₅₀. Para poder conocer el punto exacto donde se corta la línea trazada, fue necesario dibujar la gráfica en papel milimetrado (anexo 17), cuyo valor correspondía a *m*=1.42, por lo tanto: DL₅₀ = 26.302 ppm..

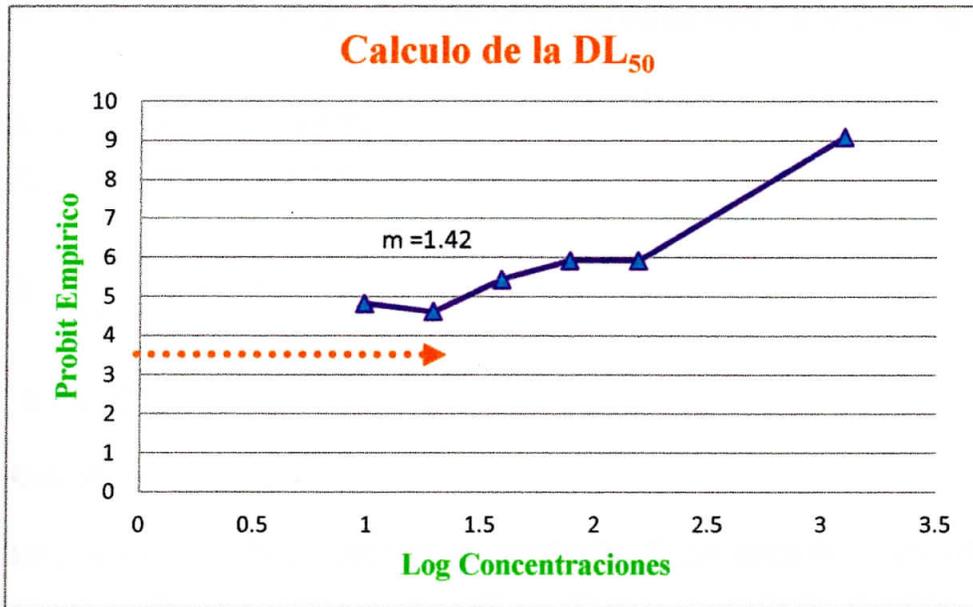


Gráfico 5.5. Cálculo de la DL₅₀

Cálculo de la pendiente, "S"

Para calcular el Probit esperado o calculado, se encontró el valor de la pendiente de la recta **S** correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit. Para calcular el valor de la pendiente, se tomó el porcentaje donde se halló el mayor y menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores.

$$S = \frac{(X_{mayor} - X_{menor})}{(PE_{mayor} - PE_{menor})} \quad \text{Ec. 5}$$

Siendo:

X_{mayor} = Mayor concentración

X_{menor} = Menor concentración

PE = Probit empírico correspondiente a cada concentración respectivamente.

$$X_{menor} = 0.989 \quad PE = 4.82$$

$$X_{mayor} = 3.096 \quad PE = 9.09$$

$$S = \frac{(3.096 - 0.989)}{(9.09 - 4.82)}$$

$$S = 0.493$$

Cálculo de $Y_{calculado}$

Una vez calculado el valor de la pendiente, S, se calcularon los valores del Probit calculado (Y) para cada concentración, utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = 5 + \frac{(x-m)}{S} \quad \text{Ec. 6}$$

Los resultados obtenidos se colocaron en la columna correspondiente de la tabla 5.19 y estos últimos datos permitirán calcular el efecto esperado (*dirijase al anexo 10.4 para ver cálculos*).

Tabla 5.19. Cálculo de Probit calculado

Log [ppm] (x)	Numero de organismos por [] "N"	Numero de organismos muertos por [] "r"	Mortalidad "P"	Probit Empírico "PE"	Probit Calculado "Y"
3.096	18	18	100	9.09	8.399
2.193	11	9	82	5.92	6.567
1.892	11	9	82	5.92	5.957
1.591	12	8	87	5.44	5.346
1.290	17	6	35	4.61	4.736
0.989	14	6	43	4.82	4.125

Prueba de Hipótesis (CHI – Cuadrado, X^2)

La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre dos variables, la concentración de la sustancia tóxica (*Vondozeb 80WP*) y la respuesta en unidades Probit, es la prueba de CHI-cuadrado (X^2). Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

(H_0) .- Hipótesis nula; los datos modelan una línea probit, por lo tanto la recta está bien ajustada.

(H_a) .- Hipótesis alternativa; los datos no modelan una línea probit

Los datos para el cálculo de este valor se colocaron en la tabla 5.20 teniendo en cuenta las siguientes variables:

- ☞ Concentración del tóxico estudiado, [ppm].
- ☞ Logaritmo decimal de la concentración, (x).
- ☞ Probit calculado o esperado, (Y).
- ☞ Número de organismos usados en el bioensayo, (N).
- ☞ Mortalidad Observada, (r).

- Porcentaje del efecto esperado, (P').
- La mortalidad esperada, (NP').
- Desviación de la mortalidad

La contribución al Chi cuadrado de cada uno de los valores se calculó:

$$X^2 = \frac{(r - NP')^2}{Np'(1-p)} \quad \text{Ec. 7}$$

Los cinco primeros datos se obtuvieron de la tabla 5.19, el sexto dato se obtuvo de la tabla de los probits utilizando los valores de Y divididos entre 100 (*dirijase al anexo 12 para ver tabla*), la mortalidad esperada se calculó multiplicando el número de organismos en cada prueba (N) por el porcentaje del efecto esperado (P') y El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtuvo hallando la diferencia entre la mortalidad observada (r) y la mortalidad esperada (NP'). Los valores obtenidos se colocaron en las columnas correspondientes de la tabla 5.20

Tabla 5.20. Determinación de Chi cuadrado, X^2

	Log [ppm] "x"	Núm. de organismos "N"	Núm. de muertos "r"	Probit Calculado "Y"	Efecto Esperado "p"	Mortalidad Esperada "NP"	Desviación "r - NP"	Contribución al X^2 $\frac{(r - NP)^2}{Np(1-p)}$
0	3.096	18	18	8.399	0.998	17.964	0.036	0.0359
50	2.193	11	9	6.567	0.940	10.340	-1.340	2.895
25	1.892	11	9	5.957	0.830	9.130	-0.130	0.0108
52	1.591	12	8	5.346	0.631	7.573	0.427	0.065
51	1.290	17	6	4.736	0.391	6.647	-0.647	0.103
6	0.989	14	6	4.125	0.190	2.660	3.340	5.178
$\sum x^2 =$								8.873

Y para el cálculo de los grados de libertad (n):

$$n = K - 2 \quad \text{Ec.8}$$

donde K es el número de concentraciones utilizadas; entonces:

$$n = 6 - 4 = 2$$

Según *tabla Anexo 13*, para 4 grados de libertad el valor obtenido es 9.49. Al comparar con el valor tabulado; se obtiene

$$8.873 < 9.49$$

Así que se acepta la hipótesis nula: **"Los datos modelan una línea Probit y por lo tanto la recta está bien ajustada"**

Cálculo del Intervalo de Confianza

Para el cálculo de los límites fue necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la Dosis Letal para el 50% de los organismos se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$EE \log_{10} DL_{50} = \sqrt{S^2 \left[\frac{1}{\sum NP} + \frac{(m-\bar{x})^2}{\sum NP (x-\bar{x})^2} \right]} \quad \text{Ec. 9}$$

Para ello, se construyó la tabla 5.21 donde se incorporaron los siguientes datos:

- ☞ Logaritmo decimal de las concentraciones, (x).
- ☞ Numero de organismos por concentración, (N).
- ☞ Probits esperado o calculado, (Y).
- ☞ Factor p , el cual se obtuvo de la tabla en el *Anexo 14* usando el valor Y.
- ☞ Productos Np , Npx , Npx^2 , y la sumatoria correspondiente a cada producto, obtenidos de los datos de la misma tabla.

Tabla 5.21. Cálculo del error estándar del Log₁₀ DL₅₀

Log [ppm] "x"	Num. de organismos "N"	Probit Calculado "Y"	Factor "p"	Producto "Np"	Producto "Npx"	Producto "Npx ² "
3.096	18	8.399	0.006	0.108	0.334	1.035
2.193	11	6.567	0.269	2.959	6.489	14.230
1.892	11	5.957	0.471	5.181	9.802	18.546
1.591	12	5.346	0.616	7.392	11.760	18.711
1.290	17	4.730	0.616	10.472	13.508	17.426
0.989	14	4.125	0.471	6.594	6.521	6.449
				Σ = 32.706	48.414	76.397

Sustituyendo las variables en la ecuación 9:

$$S = 0.493$$

$$\sum Np = 32.706$$

$$\sum Npx^2 = 76.397$$

$$m = 1.42$$

$$\sum Npx = 48.414$$

$$\bar{x} = \frac{\sum Npx}{\sum Np} = 1.480$$

$$\sum NP (x - \bar{x})^2 = \sum Npx^2 - \frac{(\sum Npx)^2}{\sum Np}$$

$$\sum NP (x - \bar{x})^2 = 76.397 - 71.666 = 4.731$$

$$EE \log_{10} DL_{50} = \sqrt{S^2 \left[\frac{1}{\sum NP} + \frac{(m - \bar{x})^2}{\sum NP (x - \bar{x})^2} \right]} = \sqrt{0.493^2 \left[\frac{1}{32.706} + \frac{(1.42 - 1.480)^2}{4.731} \right]} =$$

$$EE \log_{10} DL_{50} = 0.0871$$

Así el error estándar de la Dosis Letal para 50% de los organismos es:

$$EE DL_{50} = \text{Log}_e 10 \cdot EE \log_{10} DL_{50} \cdot 10^m$$

Ec.10

∴

$$\text{Log}_e 10 = 2.3025$$

$$\text{EE Log}_{10} \text{DL}_{50} = 0.0871$$

$$10^m = 10^{1.42} = 26.302$$

Así:

$$\text{EEDL}_{50} = 5.274$$

Y como $\text{DL}_{50} = 26.302$ ppm, los intervalos de confianza se expresan:

$$\text{IC}_{95\%}: \text{DL}_{50} \pm \text{EE DL}_{50}$$

Ec. 11

$$\text{IC}_{95\%}: 26.302 \pm 5.274$$

$$\text{IC}_{95\%}: 26.302 + 5.274 = 31.576 \text{ ppm}$$

$$\text{IC}_{95\%}: 26.302 - 5.274 = 21.028 \text{ ppm}$$

$$\text{IC}_{95\%}: 21.028 < 26.302 < 31.576$$

En la etiqueta del producto (color amarillo) el fabricante indica que éste es moderadamente tóxico; sin embargo con los resultados obtenidos en el bioensayo con *Artemia Salina* se puede decir que, según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del CYTED (SÁNCHEZ & NEIRA, 2005); el tóxico evaluado se considera altamente tóxico, presentando una DL_{50} de 26.302 µg/mL.

5.2.2. Método Reed-Muench

Es un método estadístico en donde el punto final se determina por interpolación, a partir de las frecuencias acumuladas de respuestas positivas y negativas (Reed & Muench, 1938)

Para ello se colocaron los siguientes datos en la tabla 5.22:

- ☞ Concentración del tóxico, [ppm]
- ☞ Logaritmo de las concentraciones, (x)
- ☞ Total de organismos vivos por concentración, (N)
- ☞ Total organismos muertos por concentración, (r)
- ☞ Porcentaje de mortalidad

Posteriormente, se obtuvo la acumulación de organismos vivos, sumando desde la dilución más alta a la más baja; y la acumulación de organismos muertos, sumando desde la dilución más baja a la más alta. El porcentaje de mortalidad se obtuvo utilizando la ecuación 4 (*dirijase anexo 10.3 para ver calculos*).

Tabla 5.22. Mortalidad y supervivencia de *Artemia Salina*

[ppm]	Log [ppm]	Organismos vivos	Organismos muertos	Acumulado vivo	Acumulado muertos	% Mortalidad
1250	3.096	0	18	0	56	100
156.250	2.193	2	9	2	38	81.818
78.125	1.892	2	9	4	29	81.818
39.062	1.591	4	8	8	20	66.666
19.531	1.290	11	6	19	12	35.294
9.766	0.989	8	6	27	6	42.857

Cálculo de la DL_{50} por el Método Reed- Muench

Existen dos formas para determinar la DL_{50} utilizando este método:

1- Método grafico

Trazando en un papel milimetrado los datos de las columnas acumulados vivos y acumulados muertos, y el antilogaritmo del punto donde ambas líneas se interceptan correspondía a la DL_{50} , tal como lo muestra el grafico 5.6.

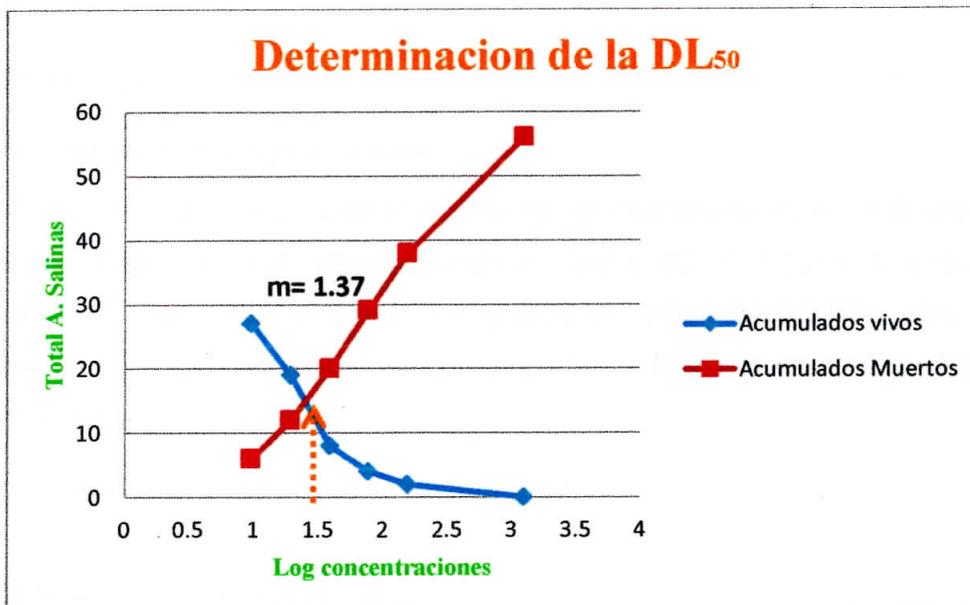


Gráfico 5.6. Determinación de la DL_{50} usando el método gráfico de Reed-Muench

Para determinar el punto exacto de corte de la recta, se elaboró la gráfica en papel milimetrado (Anexo17).

Para este análisis, el punto donde ambas rectas se interceptan es 1.37 y el antilogaritmo de este valor corresponde a 23.44 por lo tanto:

$$DL_{50} = 23.44 \text{ ppm}$$

Cálculo de los límites de la desviación estándar para este método

Para calcular la desviación estándar Reed – Muench establece utilizar la ecuación:

$$SE DL_{50} = \sqrt{(0.79 h \frac{R}{N})} \quad \text{Ec. 12}$$

Donde:

0.79 = es un valor constante

$$h = \frac{IC_{75} + IC_{25}}{2}$$

$$R = IC_{75} - IC_{25}$$

N = número de nauplios usados

IC = intercuartiles al 25% de la muerte de los nauplios de *Artemia Salina* (IC_{25}) y al 75% de la muerte de los nauplios *Artemia Salina* (IC_{75}); dirijase al anexo 16 para ver cálculos. Para ellos se trazó una gráfica en papel milimetrado para determinar los puntos exactos; estos valores corresponden a $IC_{25} = 1.42$ y $IC_{75} = 2.22$; tal como lo muestra el gráfico 5.7

Sustituyendo los valores en la ecuación 12:

$$SEDL_{50} = \sqrt{[0.79 (1.82) (\frac{0.8}{83})]}$$

$$SEDL_{50} = 0.117$$

Y los resultados se expresan como:

$$\text{LogDL}_{50} \pm 2SEDL_{50} \quad \text{Ec. 13}$$

$$1.37 \pm 0.234$$

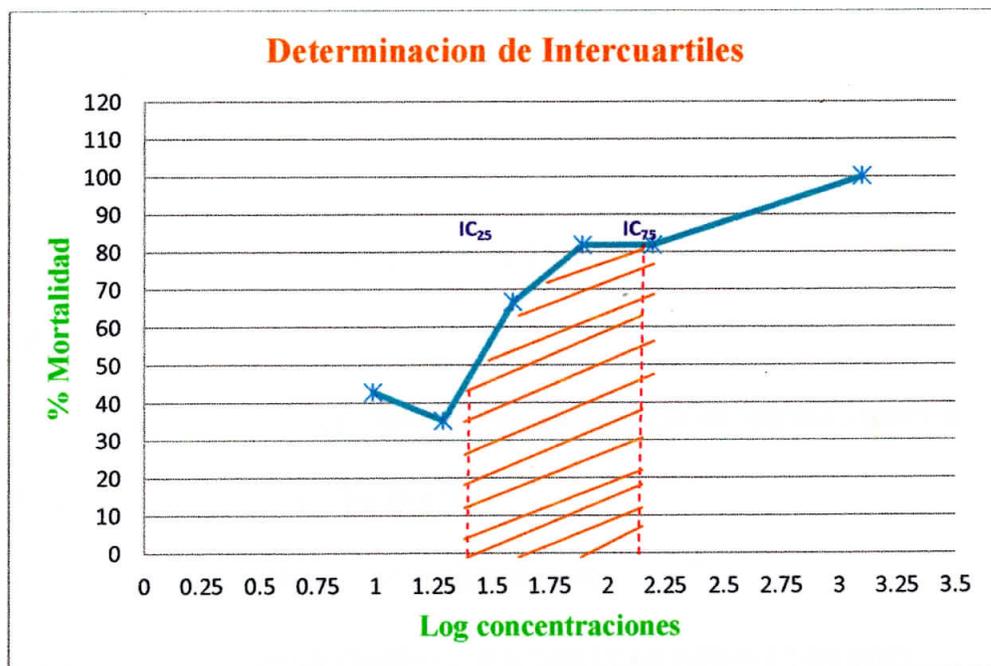


Gráfico 5.7. Determinación de intercuartiles de la DL₅₀

En el gráfico 5.7 el área sombreada indica que el valor de la DL₅₀ puede encontrarse en ese rango.

2- Método matemático de Reed-Muench

Otra forma de determinar la DL₅₀, es a través del método matemático de Reed-Muench (Navarro, Ávila, Mollinedo, Vila, & Ruiz, 2010), utilizando la siguiente ecuación

$$\text{Log DL}_{50} = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log A}$$

Ec.14

Así,

$$A = \text{Dosis superior} / \text{Dosis inferior}$$

$$B = 50 - \% \text{ inferior} / \% \text{ superior} - \% \text{ inferior}$$

La dosis inferior y dosis superior corresponden a las concentraciones menor y mayor preparadas para realizar el bioensayo; y el porcentaje superior y porcentaje inferior corresponde a los porcentajes de mortalidad de *Artemia Salina* en las concentraciones superior e inferior, este valor se obtiene en la última columna de la tabla 5.22.

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; *Allium cepa*, *Artemia Salina*;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

$$A = \frac{1250}{9.766} = 127.995$$

$$B = \frac{50 - 42.857}{100 - 42.85} = 0.124$$

$$\text{Log } DL_{50} = 0.989 + [(0.124) (2.107)] = 1.250$$

$$DL_{50} = 17.782$$

Los valores DL_{50} utilizando los tres métodos de cálculo corresponden a:

Probits Log DL_{50} : **1.42 = 26.302 ppm**

Reed-Muench Log DL_{50} : **1.37 = 33.884 ppm**

Fórmula matemática de Reed-Muench Log DL_{50} : **1.25 = 23.44 ppm**

Basados en la clasificación toxicológica de CYTED (tabla 2.2), las sustancias son consideradas altamente tóxicas si la DL_{50} está comprendida entre los valores 10 -100 $\mu\text{g / mL}$ (ppm); por lo que, según los resultados obtenidos, se puede afirmar que el fungicida *Vondozeb 80WP* resulta ser un producto de uso agrícola altamente tóxico y por ende perjudicial para la salud.

... de los organismos vivos, que se manifiesta en la alteración de su estructura y función...

... de los organismos vivos, que se manifiesta en la alteración de su estructura y función...

... de los organismos vivos, que se manifiesta en la alteración de su estructura y función...

... de los organismos vivos, que se manifiesta en la alteración de su estructura y función...

... de los organismos vivos, que se manifiesta en la alteración de su estructura y función...

CAPÍTULO VI.
Conclusiones

Conclusiones

- De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación de bioensayos es muy sensible a exposiciones del fungicida *Vondozeb 80WP*.
- En las pruebas con *Allium Cepa* con respecto a *Vondozeb 80WP*, indico que a concentraciones mayores a 1155 ppm se inhibe el 50% del crecimiento de las raíces, lo que indica que a concentraciones mayores a las recomendadas se produce un daño a los cultivos.
- El análisis de los cambios genéticos (cromosómicas) de las células de la cebolla indican que utilizar el plaguicida, inclusive en dosis recomendadas, produce daños a nivel de células, y a medida que aumenta la concentración del fungicida, se encuentran con mayor frecuencia y severidad eventos de malformación o aberración en la fase de mitosis. Al observar los cambios genéticos se puede concluir que la aberración cromosómica predominante es puente anafásico.
- La DL_{50} del fungicida *Vondozeb 80WP* es 26.302ppm con limites de confianza superior e inferior de 31.576 y 21.028 ppm respectivamente según método de los Probits. Lo que indica, según la clasificación de CYTED, que es altamente tóxico

La DL_{50} del fungicida *Vondozeb 80WP* es 23.44 y 33.884 ppm según el método gráfico y matemático de Reed-Muench, respectivamente, lo que indica, según la clasificación de CYTED, que es altamente tóxico

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Voridozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia-Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

CAPITULO VII. Recomendaciones

Recomendaciones

Para futuras investigaciones se recomienda:

- 1- Cultivar las cebollas que se utilizarán en el bioensayo bajo condiciones climáticas y de suelo controladas, para asegurarnos de la calidad de las mismas y obtener resultados más confiables.

A...
L...
A...
B...
C...
F...
A...
A...
M...
I...
A...
F...
A...
B...
B...
C...
M...
C...
C...
A...
C...
T...
C...
P...
P...
C...
D...
G...
M...

BIBLIOGRAFÍA

C...
D...
G...
M...

Bibliografía

- Amaya Robles, J. E., & Méndez García, E. F. (2012). Crecimiento de cebolla (*Allium cepa* L.) var. "Roja Arequipeña" en función de la fertilización NxK. *Scientia Agropecuaria* , 7-14.
- Andrioli, N. B. (2011). Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium Cepa*. (*Tesis Doctoral*) . Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Andrioli, N. B., Wulff, A. F., & Mudry, M. D. (2006). *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* , pp. 9-16,.
- Arencibia Carballo, G., & Tizol C, R. A. (2010). Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras* , pp. 47-53.
- Badii, M. H., & Landeros, J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT//Toxicología de Plaguicidas* , 21-33.
- Cáceda Quiroz, C. J. (s.f.). UNJBG. Recuperado el 02 de Marzo de 2015, de <http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/01011000706.pdf>
- Castillo, G. (2004). *ENSAYOS TOXICOLOGICOS Y METODOS DE EVALACION DE CALIDAD DEL AGUA. ESTANDARIZACION, INTERCALIBRACION, RESULTADOS Y APLICACIONES*. México: IMTA.
- CETESB. (1991). Bioensais Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais. *Serie Didáctica, PROCOP* , 1-75.
- Chicaiza, M., & SUQUILANDA, M. (2001). *Repuesta de cinco genotipos de cebolla perla (Allium Cepa L.) Atres distancias de siembra bajo manejo orgánico*. Tumbaco-Pichicha. *Rumipamba*15(1):85-86.
- CLARKSON, D. (1965). The affect of aliminium and some otrer trivalen metam cations on cell division in the root apices of *Allium Cepa*. *Ann.Bot.N.S, Vol.29, No.114: 309-315* .
- Direccion General de Educacion en Ciencia y Tecnología del Mar. (2009). *Direccion General de Educacion en Ciencia y Tecnología del Mar*. Recuperado el 05 de Febrero de 2015, de Direccion General de Educacion en Ciencia y Tecnología del Mar:

Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina; Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.

Fiskesjö, G. (1878). Dags införa övre gräns för koppar i dricksvatten . *Miljöaktuellt nr.8* , 78:3.

FISKESJÖ, G. (1975). Rapport om ett biologiskt test (Allium test) ut fört med vatten från Braan och Höje a i Skane. *Vatten 31* , 304-316.

FISKESJÖ, G. (1969). Some results with Allium tests with organic mercury halogenides. *Hereditas 62: 314-322* .

Fiskesjö, G. (1985). *The Allium test as a standard in environmental monitoring*. Suecia: *Hereditas 102: (99-112)*.

Fuencampo XXI. (2010). Recuperado el 3 de Marzo de 2015, de empresa Fuencampo XXI: <http://www.cebollaeblog.com>

GAMEZ ROJAS, C. M., & RAMIREZ R, E. J. (2008). *Lasalle*. Recuperado el 18 de Febrero de 2015, de Lasalle: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14062/T41.08%20G145d.pdf?sequence=1>

González, A. M., Presa, M., Latorre, M. G., & Lurá, M. C. (2005). Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia Salina. *Revista Iberoamericana de Micología* , 59 - 61.

Grant, W. (1982). *Mutation Research*. 99.

Grau, M. D. (2003). *toxicología ambiental Evaluación de riesgo para la salud humana*. España: McGraw Hill.

Gustavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA, Harkin JM. (2000). Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical and toxicity identification evaluation analysis. *Environm Toxicol* , (15): 421-430.

Huberman E. and Sachs L. (1976). *Mutability of different genetic loci in mammalian cells metabolically activated carcinogenic polycyclic hydrocarbons*. USA: Proc. Nat. Acad. Sci 188-192.

Jaramillo, B. E. (2013). Toxicidad aguda de pesticidas organofosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad. *Revista facultad de ciencias agrarias* .

Jimenez- Martin . (s.f.).

Jimenez-Martin, G.; Gonzalez, A. y J.A. Lopez. (1965). New method of labeling cells. En *J. Cell Biol.* 26 (págs. 305-309).

- Kallqvist, T. and Ormerod, K. (1981). Ringtest med 48 mikrobielle toksikologiske metoder. En *Ekotoxikologiska metoder för akvatisk miljö* (pág. 57). Nordforsk: Rapport nr. 25.
- Kassab, A. L. (1994). *Cebola: do túmulo dos faraós as exigentes mesas modernas*. Sao Paulo: Brasil Agricola 2da edicion. Icone. 199p.
- KIHILMAN.B.A. (1966). *Accitons of chemicals on Dividing Cells*. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Klaassen, C. D., & III, J. B. (2005). *Fundamentos de toxicología*. Madrid: McGraw Hill, S.A.
- Laguna Davila, J. M., & Pauth Martinez, M. (2007). Tesis de Monografia. *Evaluacion del Metodo Para manejo de malezas que afectan al cultivo de cebolla (Allium Cepa L.) en el Valle de Sebaco*. Managua, Nicaragua.
- Laguna, T., & López, J. (Enero de 2004). *Inta Gob*. Recuperado el 8 de Febrero de 2015, de Inta Gob: <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/GUIA%20MIP%20cebolla.pdf>
- Levan A. and Ostergren G. (1943). The mechanism of c-mitotic action observations of the naphtalene series. *Hereditas* 29 , 381-443.
- Levan. (1938). The effect of colchicine on roots mitoses in Allium. *Hereditas* 24 , 471-486.
- LEVAN, A. (1945). Cytological reactions infuced by inorganic salt solution. *Nature* 156:751 .
- LINNAINMAA,K.,MERETIJA,T.,SORSA,M, and VAINIO,H. (1978). Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide on human lymphocytes and allium cepa. *Environ Health* , 156-162.
- Martin, M. J., & Camazano, M. s. (1984). Recuperado el Martes de Febrero de 2015, de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>
- McGrath, M. T. (2004). *Apsnet Org*. Recuperado el 15 de Febrero de 2015, de Apsnet Org: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Stactics and Chemometric for Analytical Chemistry*. Harlow, England: PEARSON.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2007). *Autoridad Nacional de Licencias Ambientales*. Recuperado el 21 de Marzo de 2015, de Autoridad Nacional de Licencias Ambientales: www.anla.gov.co/documentos/res_1322_240707.pdf

Morais Leme, D. & Marín Morales, M.A. . (2009). Allium cepa test in environmental monitoring a review on its application. *Mutation research*, 682 , 71-81.

Muñoz Solarte, D. M., & Guerrero Pepinosa, N. (2013). *Revistas. UCC*. Recuperado el 08 de Marzo de 2015, de Revistas. UCC: revistas.ucc.edu.co/index.php/me/article/download/112/113

Navarro, E., Ávila, J. A., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Ruiz, G. (2010). Valoración de la toxicidad aguda in vivo del ácido úsnico. *Revista Boliviana de Química* .

Pérez, W., & Forbes, G. (S.f). *Cipotato Org*. Recuperado el 15 de Febrero de 2015, de Cipotaato Org: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/003862.pdf>

Rank, J. & Nielsen, M. H. (1993). A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixture. *Hereditas* 118 , 49 - 53.

Rank, J. & Nielsen, M.H. . (1994). Evaluation of the Allium anaphase - telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation research*, 312 , 17-24.

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene* , 393 - 397.

Rodríguez, M. T. (2003). Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Revista cubana de Higiene y Epidemiología* v.41 , n.2-3.

RUIZ PÉREZ, O. (2008). *roderic.uv*. Recuperado el 24 de Febrero de 2015, de roderic.uv: roderic.uv.es/handle/10550/15835

SÁNCHEZ MARTÍN, M. J., & SÁNCHEZ CAMAZANO, M. (s.f.). *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*. Recuperado el 18 de Febrero de 2015, de Consejo Superior de Investigaciones Científicas: digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf

SÁNCHEZ, L., & NEIRA, A. (2005). BIOENSAYO GENERAL DE LETALIDAD EN Artemia Salina, A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANOLICO DE Psidium guajava. L y Psidium guineense. Sw. *Cultura Científica* , 41-45.

Sarabia Álvarez, R. (2002). Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia. Valencia , Burjassot.

*Evaluación de la toxicidad del fungicida Vondozeb 80WP, utilizando bioindicadores de toxicidad; Allium cepa, Artemia Salina;
Laboratorio de Biología, UNAN-Managua, Febrero-Abril 2015.*

ANEXOS

Anexo 1

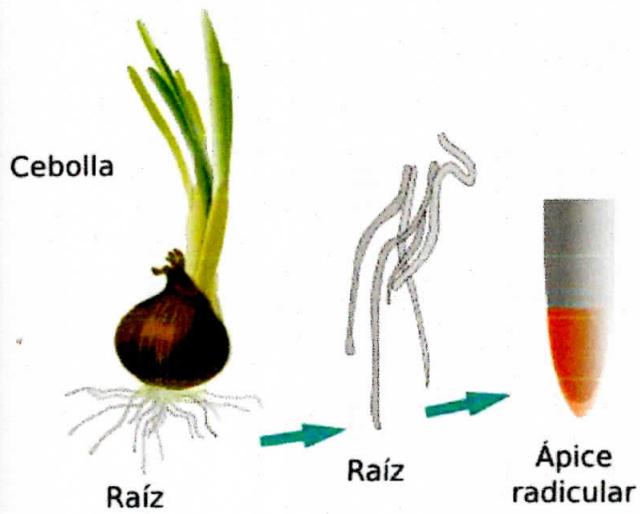
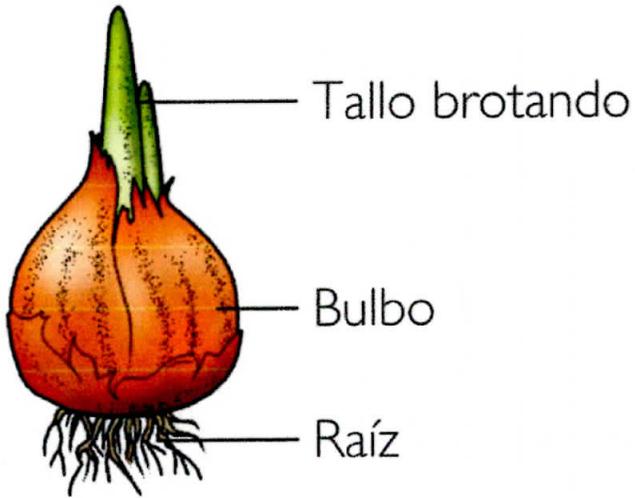


Figura. Partes del Allium Ceba

Anexo 3

Formato de recolección de datos, Artemia Salina

Artemias muertas												
[ppm]	Blanco				CuSO ₄ · 5H ₂ O				Muestra			
	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}
256												
128												
64												
32												
16												
8												
4												
2												

Artemias vivas												
[ppm]	Blanco				CuSO ₄ · 5H ₂ O				Muestra			
	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}
256												
128												
64												
32												
16												
8												
4												
2												

Anexo 4

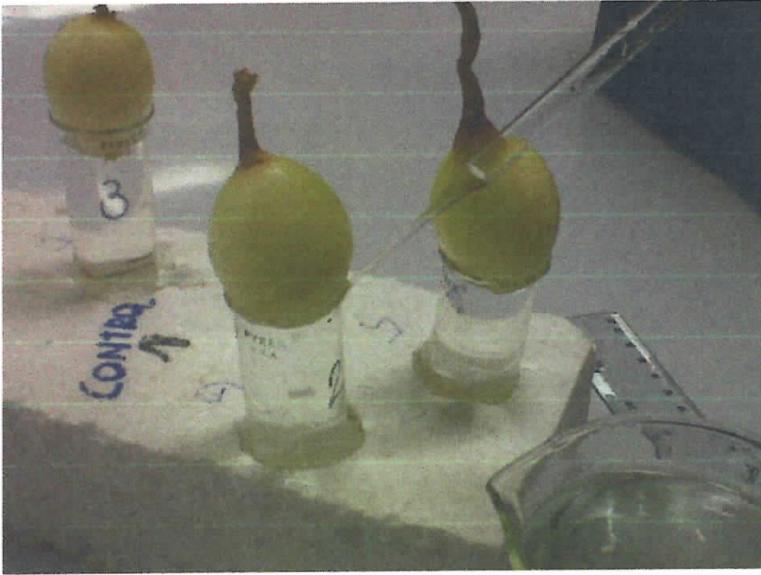


Figura. Zona radicular de la cebolla en contacto con el fungicida

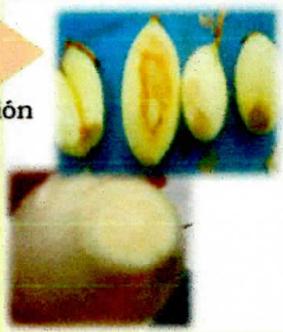
Anexo 5

Bioensayo: *Allium Cepa* Fase 1. Análisis Macroscópicos

Limpieza



Selección



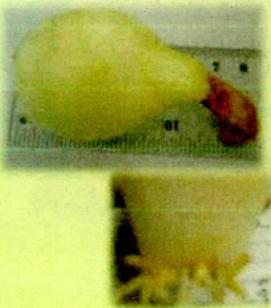
Desinfección



Preparación
Soluciones



Medición
de las
raíces



Exposición a
Vondozeb 80WP

Bioensayo: Allium Cepa
Fase 2. Análisis Microscópicos

Corte de las raíces



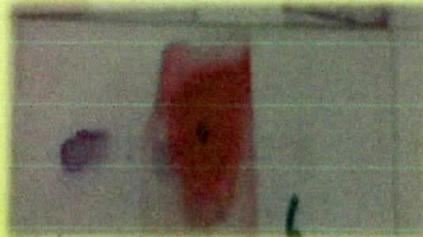
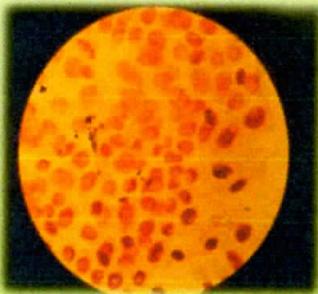
Lavado de las raíces



Tinción



Búsqueda de aberraciones cromosómicas



Anexo 6

Bioensayo: *Artemia Salina*



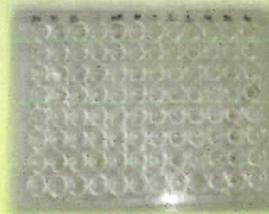
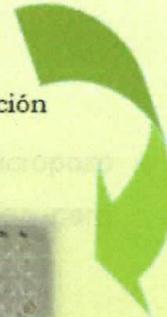
Esterilización del agua de mar



Eclosión de los quistes *Artemia Salina*

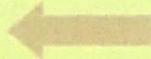


Preparación de la Solución Madre



Diluciones del toxico y Montaje del bioensayo 48

Conteo de Artemias vivas y muertas después de 24h.



Anexo 7

Preparación de las concentraciones de Sulfato de cobre (II) pentahidratado para el bioensayo de Artemia salina.

Para preparar la solución madre:

1- Se pesó 0.0256g del fungicida y se agregó 100mL de agua, y se obtuvo una solución cuya concentración es de: 0.000256g/mL; para expresarlos en ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$):

$$0.000256 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 0.256 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}} = 256 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 256\text{ppm}$$

2- De la solución madre preparada, se tomaron 100 μL , se depositaron en un micropozo de la placa utilizada en el bioensayo y se adicionaron 100 μL de agua de mar, para conocer la nueva concentración se hace uso de la ecuación de la dilución:

$$[]_1 V_1 = []_2 V_2$$

La concentración 1 corresponde a la solución madre, el volumen 1 corresponde al volumen que se toma de la solución madre, la concentración 2 es lo que se desea conocer y el volumen 2 es el volumen total contenido en el micropozo de la placa (100 μL agua + 100 μL que se toman de la solución madre).

$$[]_2 = \frac{[]_1 V_1}{V_2}$$

$$[]_2 = \frac{256 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 100\mu\text{L}}{200\mu\text{L}} = 128 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 128\text{ppm}$$

3- La misma operación se siguió para las siguientes diluciones:

$$[]_2 = \frac{128 \frac{\mu g}{mL} * 100 \mu L}{200 \mu L} = 64 \frac{\mu g}{mL} = 64 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{64 * 100 \mu L}{200 \mu L} = 32 \frac{\mu g}{mL} = 32 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{32 \frac{\mu g}{mL} * 100 \mu L}{200 \mu L} = 16 \frac{\mu g}{mL} = 16 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{16 \frac{\mu g}{mL} * 100 \mu L}{200 \mu L} = 8 \frac{\mu g}{mL} = 8 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{8 \frac{\mu g}{mL} * 100 \mu L}{200 \mu L} = 4 \frac{\mu g}{mL} = 4 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{4 \frac{\mu g}{mL} * 100 \mu L}{200 \mu L} = 2 \frac{\mu g}{mL} = 2 \text{ppm}$$

Anexo 8

Preparación de las concentraciones de Vondozeb 80WP para el bioensayo de Artemia salina

1- Se preparó la solución madre pesando en una balanza analítica 0.0025g (2.5mg) del fungicida y se agregó 100 μ L de DMSO con una micropipeta y finalmente se adicionaron 1900 μ L de agua de mar esterilizada, y se obtuvo una solución cuya concentración era de: 0.00125mg/ μ L; expresándolo en unidades μ g/mL (ppm):

$$0.00125 \frac{\text{mg}}{\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}} = 1250\mu\text{g/mL}$$

2- De la solución madre preparada, se tomaron 100 μ L, se depositaron en un micropozo de la placa utilizada en el bioensayo y se adicionaron 100 μ L de agua de mar, para conocer la nueva concentración se hace uso de la ecuación de la dilución:

$$[]_1 V_1 = []_2 V_2$$

La concentración 1 corresponde a la solución madre, el volumen 1 corresponde al volumen que se toma de la solución madre, la concentración 2 es lo que se desea conocer y el volumen 2 es el volumen total contenido en el micropozo de la placa (100 μ L agua + 100 μ L que se toman de la solución madre)

$$[]_2 = \frac{[]_1 V_1}{V_2}$$

$$[]_2 = \frac{1250 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 100\mu\text{L}}{200\mu\text{L}} = 625 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 625\text{ppm}$$

3- La misma operación se siguió para las siguientes diluciones:

$$[]_2 = \frac{625 \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 312.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 312.5 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{312.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 156.25 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 156.25 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{1256.25 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 78.125 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 78.125 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{78.125 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 39.062 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 39.062 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{39.062 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 19.531 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 19.531 \text{ppm}$$

$$[]_2 = \frac{19.531 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} = 9.766 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 9.766 \text{ppm}$$

Anexo 10

10.1 Cálculo de la Concentración Inhibitoria en las raíces de *Alium Cepa*

$$CI = \frac{4.7-4}{4.7} \times 100\% = 14.8$$

$$CI = \frac{4.7-3.9}{4.7} \times 100\% = 17.0$$

$$CI = \frac{4.7-2.1}{4.7} \times 100\% = 55.3$$

$$CI = \frac{4.7-1.8}{4.7} \times 100\% = 61.7$$

$$CI = \frac{4.7-1.2}{4.7} \times 100\% = 74.5$$

10.2 Cálculo del porcentaje de mortalidad en el control negativo

$$\%mortalidad = \frac{\text{organismos muertos}}{\text{organismos vivos usados}} \times 100$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{5} \times 100 = 0\%$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{7} \times 100 = 0\%$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{10} \times 100 = 0\%$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{11} \times 100 = 0\%$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{8} \times 100 = 0\%$$

$$\%mortalidad = \frac{0}{10} \times 100 = 0\%$$

10.3 Cálculo porcentaje de mortalidad en cada concentración de Vondozeb 80WP

$$P = \frac{r}{N} \times 100$$

$$P = \frac{18}{18} \times 100 = 100$$

$$P = \frac{9}{11} \times 100 = 81.8$$

$$P = \frac{9}{11} \times 100 = 81.8$$

$$P = \frac{8}{12} \times 100 = 66.66$$

$$P = \frac{6}{17} \times 100 = 35.29$$

$$P = \frac{6}{14} \times 100 = 42.85$$

Una vez finalizado los cálculos, redondear al entero más cercano y colocar en la columna correspondiente de la tabla.

10.4 Cálculo de Probit calculado: $Y_{\text{calculado}}$

$$Y = 5 + \frac{(x-m)}{s}$$

$$Y = 5 + \frac{(3.096 - 1.42)}{0.493} = 8.399$$

$$Y = 5 + \frac{(2.193 - 1.42)}{0.493} = 6.567$$

$$Y = 5 + \frac{(1.892 - 1.42)}{0.493} = 5.957$$

$$Y = 5 + \frac{(1.591 - 1.42)}{0.493} = 5.346$$

$$Y = 5 + \frac{(1.290 - 1.42)}{0.493} = 4.736$$

$$Y = 5 + \frac{(0.989 - 1.42)}{0.493} = 4.125$$

Anexo 11

Tabla. Relación entre el probit empírico y el porcentaje de mortalidad

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	.	2.67	2.65	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.65
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
z	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99 ^a	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.89	8.09

^a Valores entre 99.0 y 99.9

Para obtener el probit empírico, solo haga coincidir las columnas de acuerdo a los porcentajes de mortalidad obtenidos:

Ejemplo: 100%, 82% y 67%

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	.	2.67	2.65	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.65
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
z	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99 ^a	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.89	8.09

^a Valores entre 99.0 y 99.9

Anexo 12

Cálculo del porcentaje del efecto esperado, (P').

Se obtiene de la tabla de los Probits, utilizando los valores de Y (o los más cercanos) y seguidamente dividir entre 100.

Ejemplo:

8.399 - - - - coincide con el valor $99.8 \div 100$ - - - - 0.998

6.567 - - - - coincide con el valor $94 \div 100$ - - - - 0.94

5.957 - - - - coincide con el valor $83 \div 100$ - - - - 0.83

Y así sucesivamente hasta completar la tabla.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		267	295	312	325	336	345	352	359	366
10	372	377	382	387	392	396	401	405	408	412
20	416	419	423	428	429	433	436	439	442	445
30	449	450	453	456	459	461	464	467	469	472
40	475	477	480	482	485	487	490	492	495	497
50	500	503	505	508	510	513	515	518	520	523
60	525	528	531	533	536	539	541	544	547	550
70	552	555	558	561	564	567	571	574	577	581
80	584	588	592	595	599	604	608	613	618	623
90	628	634	641	648	655	664	675	688	705	733
%	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
99	732	737	742	746	751	756	765	775	788	809

* Valores entre 99.0 y 99.9

Anexo 13

Tabla. Valores de χ^2 para una $P = 0.05$ (Castillo, 2004)

Grados de libertad (n)	χ^2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

Para 4 grados de libertad el valor obtenido es 9.49.

Anexo 15

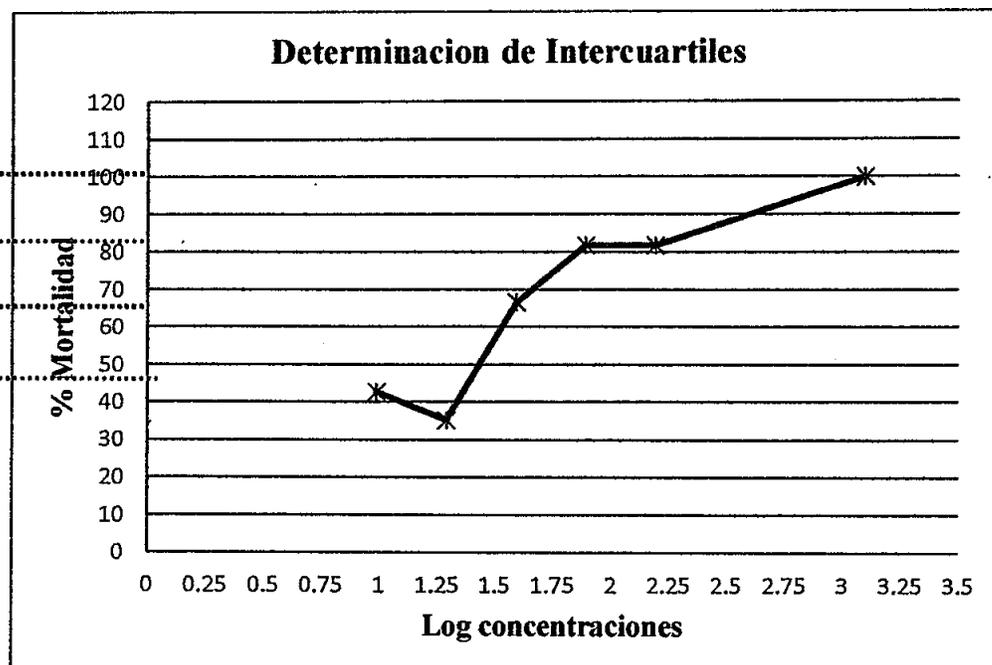
Figura. Comparación del daño radicular entre las cebollas expuestas a *Vondozeb 80WP* [4x] durante 192 h (A y B) y otra cebolla expuesta al control negativo, agua, durante 192h (C).



Anexo 16

Cálculo de los intercuartiles (IC_{25} ; IC_{75})

Para calcular los intercuartiles se debe de tener en cuenta el rango en el que oscila el porcentaje de mortalidad, en este caso (30% - 100%). Una vez determinado el rango, éste se divide en cuatro partes iguales (de ahí el nombre cuartil), en el caso de este estudio corresponde al valor 17.5. Luego se hace traza una línea a partir del intercuartil 25 y el punto donde toca la curva de mortalidad entonces corresponde al valor del IC_{25} ; la misma operación se aplica para la determinación de IC_{75} .



Anexo 17

Papel milimetrado usado para determinar los puntos exactos de intersección.

