



## The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

### TOXIC EFFECT OF LUFENURON ON SIX BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL QUALITY

### EFFECTO TÓXICO DEL LUFENURÓN SOBRE SEIS BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL

Jefferson Iván Manrique-Guillén<sup>1</sup>; José Iannacone<sup>1,2</sup> & Lorena Alvariano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Laboratorio de Parasitología, Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima, Perú.

### ABSTRACT

Lufenuron is an insecticide from the group of benzylureas that interferes with the synthesis of chitin, causing an inhibition in insect moulting. Toxic effects of lufenuron on six environmental quality bioindicators were evaluated. Bioassays with lufenuron were developed on six bioindicators of environmental quality: 1) *Artemia franciscana* (Kellogg 1906), 2) *Carassius auratus* (Linnaeus 1758), 3) *Chlorella vulgaris* ( Beijerinck 1890), 4) *Daphnia magna* (Straus 1820), 5) *Eisenia foetida* (Savigny 1826) and 6) Soil microorganisms (Community indicator). The analysis of variance (ANDEVA) with Tukey's test was used, and with the Probit, the ecotoxicological parameters were calculated. The results were as follows: *A. franciscana* ( $LC_{50} = 11,41 \mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  at 48 h), *C. auratus* (NOEC= 0.061 mg i.a. $\cdot\text{L}^{-1}$  / LOEC= 0.122 mg i.a. $\cdot\text{L}^{-1}$  for the percentage of accumulated mortality at 26 d), *C. vulgaris* ( $IC_{50} < 2.46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  at 96 h), *D. magna* ( $LC_{50} = 0.05 \mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  at 48 h), *D. magna* (NOEC= 0.00005  $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  / LOEC= 0.0001  $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  for the number of live hatchlings at 21 d), *E. foetida* ( $LD_{50} = 206.31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$  at 14 d; NOEC < 21.2 mg i.a. $\cdot\text{Kg}^{-1}$  / LOEC= 21.2 mg i.a. $\cdot\text{Kg}^{-1}$  at 14 d) and soil microorganisms (NOEC= 1820 mg i.a. $\cdot\text{g}^{-1}$  / LOEC > 1820 mg i.a. $\cdot\text{g}^{-1}$  of nitrification). The following sequence of decreasing ecotoxicity mediated by the lethal and sublethal effects produced during the bioassays with the six bioindicators was observed: *D. magna* > *A. franciscana* > *C. vulgaris* > *C. auratus* > *E. foetida* > Soil microorganisms. *Daphnia magna* was the most sensitive bioindicator to lufenuron and the most resistant were soil microorganisms. Lufenuron had higher rates of mortality and inhibition in aquatic organisms than in terrestrial organisms. It was concluded that the six bioindicators chosen to evaluate the possible environmental damages of the insecticide lufenuron, made it possible to clarify that this compound mainly damages the aquatic food chain compared to terrestrial. Thus, aquatic ecosystems are more sensitive than terrestrials with a low risk.

**Key words:** bioassays – bioindicators – environmental quality – lufenuron

## RESUMEN

El lufenurón es un insecticida del grupo de las benzilureas que interfiere con la síntesis de quitina, causa una inhibición en la muda de los insectos. Se evaluaron efectos tóxicos del lufenurón sobre seis bioindicadores de calidad ambiental. Se desarrollaron los bioensayos con el lufenurón sobre seis bioindicadores de calidad ambiental: 1) *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), 2) *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), 3) *Chlorella vulgaris* ( Beijerinck, 1890), 4) *Daphnia magna* (Straus, 1820), 5) *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) y 6) Microorganismos de Suelo (Indicador comunitario). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Tukey, y con el Probit se calcularon los parámetros ecotoxicológicos. Los resultados fueron los siguientes: *A. franciscana* ( $CL_{50} = 11,41 \mu\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h), *C. auratus* (NOEC=  $0,061 \text{ mg ia}\cdot\text{L}^{-1}$  / LOEC=  $0,122 \text{ mg ia}\cdot\text{L}^{-1}$  para el porcentaje de mortandad acumulada a 26 d), *C. vulgaris* ( $CI_{50} < 2,46 \text{ mg ia}\cdot\text{L}^{-1}$  a 96 h), *D. magna* ( $CL_{50} = 0,05 \mu\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48h), *D. magna* (NOEC=  $0,00005 \mu\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$  / LOEC=  $0,0001 \mu\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$  para el numero de crías vivas a 21 d), *E. foetida* ( $DL_{50} = 206,31 \text{ mg ia}\cdot\text{Kg}^{-1}$  a 14 d ; NOEC <  $21,2 \text{ mg ia}\cdot\text{Kg}^{-1}$  / LOEC=  $21,2 \text{ mg ia}\cdot\text{Kg}^{-1}$  a 14 d) y Microorganismos de Suelo (NOEC=  $1820 \text{ mg ia}\cdot\text{g}^{-1}$  / LOEC >  $1820 \text{ mg ia}\cdot\text{g}^{-1}$  de nitrificación). Se observó la siguiente secuencia de ecotoxicidad decreciente mediado por los efectos letales y subletales producidos durante los bioensayos con los seis bioindicadores: *D. magna* > *A. franciscana* > *C. vulgaris* > *C. auratus* > *E. foetida* > Microorganismos del suelo. *Daphnia magna* fue el bioindicador más sensible al lufenurón y el más resistente fueron los microorganismos del suelo. El lufenurón presentó mayores porcentajes de mortandad e inhibición en los organismos acuáticos que en los terrestres. Se concluyó que los seis bioindicadores escogidos para evaluar los posibles daños ambientales del insecticida lufenurón, permitieron clarificar que este compuesto daña principalmente a la cadena trófica acuática en comparación a la terrestre. Por ende, los ecosistemas acuáticos son más sensibles que los terrestres que presentan un riesgo bajo.

**Palabras clave:** bioensayos – bioindicadores – calidad ambiental – lufenurón

## INTRODUCCIÓN

Dentro la amplia gama de plaguicidas se encuentran los reguladores del crecimiento de insectos (IGR), los cuales son insecticidas de tercera generación menos tóxicos y compatibles con el manejo de plagas de insectos que se desarrollaron para reducir la contaminación de los alimentos y el medio ambiente. Estos compuestos tienen un modo de acción específico en los insectos y una menor toxicidad contra vertebrados que los insecticidas convencionales. Los IGR incluyen compuestos que afectan a la muda y la metamorfosis al imitar la hormona juvenil (JH agonistas) o antagonizar la actividad por lo general JH (agonistas ecdiesteroides) o al interferir con la formación de la cutícula (síntesis de quitina) (Matsumura, 2010).

Dentro de los IGR se encuentra el plaguicida lufenurón, que es un inhibidor del desarrollo, el cual interfiere con la síntesis de la quitina,

probablemente a través de la interferencia enzimática, y causa inhibición en la muda de los insectos (Sun *et al.*, 2015). Perteneció al grupo de las benzoilureas, y se utiliza ampliamente en la agricultura para el control de larvas de lepidópteros y coleópteros en algodón, maíz y hortalizas; la mosca blanca de los cítricos y ácaros del moho en las frutas cítricas, además es de uso veterinario para el control de pulgas en animales domésticos (Bragada Silva *et al.*, 2003; Pérez-Moreno *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2014). Sin embargo, la posibilidad de entrar este plaguicida a través de la cadena alimentaria y producir efectos no deseados en organismos no objetivo, incluyendo los seres humanos, no se puede descartar (Das *et al.*, 2008; Pinakin *et al.*, 2011). Además, otros estudios demuestran que el lufenurón y otros insecticidas del grupo de las benzoilureas tienen efecto tóxico sobre organismos no destinatarios (Ikemoto *et al.*, 1992; Evangelista *et al.*, 2002; Rioboo *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2006; Farrag & Shalby, 2007; Duchet *et al.*, 2011; Marimuthu *et al.*, 2013; Brock *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2016). Por otra parte, el destino

final de los residuos de plaguicidas y su daño potencial para la salud humana sigue siendo generalmente menos conocido (Devine *et al.*, 2008).

Los bioindicadores ambientales son organismos no destinatarios cuya presencia o fisiología permiten conocer algunas circunstancias del lugar. Por ejemplo, nos ayudan a conocer si hay alteraciones a nivel de las cadenas tróficas, permitiéndonos saber la calidad ambiental de una zona estudiada; además estos organismos son fáciles de coleccionar, criar, reproducir y cuantificar algún efecto que se desee evaluar (Iannacone *et al.*, 2003, 2005, 2011a; Nasr & Badawy, 2015; Ruiz-Suarez, 2015). Por esta razón, se tiene la necesidad del estudio de la toxicidad del lufenurón, debido a que no hay mucha información publicada acerca de bioensayos con organismos no destinatarios "bioindicadores ambientales" (Sabra & Mehana, 2015; Valderrama *et al.*, 2015) para optar por mejores alternativas para combatir las plagas que afectan la agricultura, como la sanidad de animales domésticos, además de los posibles riesgos de contaminación del agua y suelo que contribuirían a posibles daños a la salud humana y ambiental en el Perú (Schaaf, 2015).

Sin embargo, hay escasa información sobre efectos de ecotoxicidad aguda y crónica del lufenurón en organismos bioindicadores, siendo los siguientes ordenados alfabéticamente, los que son utilizados en ecotoxicología:

(1) *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) es una especie de pequeño crustáceo, braquiópodo perteneciente al orden Anostraca que habita en aguas con altas concentraciones de sal (Pino & Lazo, 2010; Iannacone *et al.*, 2016).

(2) *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) es un ciprínido que raramente supera los 30 cm de longitud. Es un pez que puede subsistir en condiciones muy desfavorables como contaminación de aguas, falta de oxígeno y temperaturas gélidas, que no pueden soportar otras especies (Iannacone *et al.*, 2014; EPA, 2016b).

(3) *Chlorella vulgaris* ( Beijerinck, 1890) es una microalga que presenta una tasa de crecimiento rápido, la cual es ideal para la producción, ya que es muy resistente a las duras condiciones y a los

invasores (EPA, 2012; Iannacone *et al.*, 2014).

(4) *Daphnia magna* (Straus, 1820) es un crustáceo de agua dulce que mide 2 mm en el caso del macho y 6 mm la hembra. Tiene la particularidad de vivir solamente bajo condiciones ambientales muy determinadas (estenoicos), los que los hace útiles como indicadores de las condiciones ambientales (Escobar-Malaver & Londoño-Pérez, 2010; Duchet *et al.*, 2011; EPA, 2016a).

(5) *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) son oligoquetos terrestres miden de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 mm de diámetro, y pesa hasta aproximadamente 1,4 g de color rojo oscuro, poseen respiración cutánea y no toleran la luz solar (Hernández *et al.*, 1997; Iannacone & Alvariano, 2005).

(6) Microorganismos de suelo (Indicador comunitario) son las comunidades microscópicas descomponedoras de restos orgánicos transformándolos en compuestos inorgánicos, cerrando el ciclo de los elementos. Constituyen cerca del 85% de la fracción viva del suelo. Muchos son nitrificadores mediante la vía autótrofa o heterótrofa (Both *et al.*, 1990; De Boer *et al.*, 2001; Norton, 2008).

De esta manera, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto tóxico del lufenurón sobre seis bioindicadores de calidad ambiental

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Lufenurón (RS) -1- [2,5-dicloro-4 (1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi) fenil] -3- (2,6-difluorobenzoil), PM= 511.1502. Se utilizó la formulación concentrada-emulsionable (MAGISTRAL® 50 EC, RED SUN CORPORATION, China). Se realizaron diluciones con agua embotellada y de clorinada (Iannacone *et al.* 2011b).

### Ensayos Toxicológicos

#### *Artemia franciscana* (toxicidad aguda)

Los huevos enquistados para eclosionar en condiciones de laboratorio se obtuvieron del

acuario “Neptuno” procedente de Lima, Perú. Una vez obtenidos los nauplios II de *A. franciscana* se procedió a realizar los bioensayos preliminares de toxicidad aguda por 8 h de exposición para determinar las concentraciones de los ensayos definitivos (Iannacone *et al.*, 2016). Para los ensayos definitivos se siguieron las recomendaciones de Iannacone *et al.* (2016) para las pruebas de toxicidad aguda con *A. franciscana*. Sin embargo, se realizaron algunos ajustes según el procedimiento estandarizado en nuestro Laboratorio para una adecuada obtención de la Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>). Para la prueba de toxicidad aguda se utilizaron 8 concentraciones (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 µg de i.a.·L<sup>-1</sup>) donde se utilizó un total de 240 individuos de *A. franciscana* para el plaguicida lufenurón; distribuyéndose al azar diez nauplios de II estadio en cada envase de 30mL de capacidad con 20mL de solución y en cada una de las cuatro replicas por cada dilución. Los nauplios II no fueron alimentados durante el bioensayo. Se contaron el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 h y 48 h de exposición (Iannacone *et al.*, 2016).

#### *Carassius auratus* (toxicidad crónica)

Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 210 EPA (2016b). Se emplearon individuos provenientes del acuario “Neptuno” de Lima, Perú que tenía un cultivo estable y saludable por más de dos años. Se cultivaron en el Laboratorio en un medio denominado ADAM y se aclimataron en el Laboratorio por dos semanas previas al bioensayo. La alimentación de las larvas fue a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario y de *A. franciscana*. La frecuencia de recambio fue tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron de 20 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 1000 mL, con 800 mL de medio de cultivo. Los bioensayos iniciaron con huevos en estado embrionario-temprano de desarrollo. La eclosión de los huevos y la supervivencia fue evaluada diariamente. Los embriones, las larvas y los juveniles muertos se retiraron de los envases para evitar que su descomposición pueda afectar a los supervivientes. Se empleó como medio de ensayo agua embotellada y declorinada. Se aplicaron sobre

los huevos, las siguientes cinco concentraciones decrecientes del lufenurón en agua embotellada: 0,122; 0,061; 0,031; 0,0001 y 0,00005 mg de i.a.·L<sup>-1</sup> con cuatro réplicas por concentración y un total de 40 huevos por concentración. Los bioensayos se iniciaron colocando huevos individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad fue de 26 días. Al final del ensayo, en *C. auratus* se evaluó: 1) mortandad acumulada (embriones, larvas y juveniles), 2) N° días que inicia la eclosión de los huevos, 3) longitud y peso de los sobrevivientes (juveniles), 4) número de larvas deformadas y 5) comportamiento anormal (nado anormal e hiperventilación). Para la validez del ensayo, el éxito en la eclosión tuvo que ser sobre 80% y el éxito en la post-eclosión de 70% en el bioensayo (Iannacone *et al.*, 2014).

#### *Chlorella vulgaris* (toxicidad crónica)

La muestra concentrada inicial se obtuvo de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú. Se empleó *C. vulgaris* a una concentración inicial de 40000 células·mL<sup>-1</sup> al inicio del bioensayo. Se utilizaron cinco concentraciones (2,46; 4,92; 9,84; 19,68 y 39,37 mg de i.a.·L<sup>-1</sup>). Se realizó el aislamiento, cultivo y caracterización de esta especie de microalga. Se emplearon tubos de ensayo de 12mL a los que se agregó 10mL de volumen de prueba de cada concentración.

Las lecturas fueron hasta 96 h de exposición en cel·mL<sup>-1</sup>, obteniéndose la concentración de inhibición media (CI<sub>50</sub>) a 96h en base a conteos de densidad con microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer (EPA, 2012; Iannacone *et al.*, 2014).

#### *Daphnia magna* (toxicidad aguda)

Las hembras maduras y ovíparas se obtuvieron del acuario “Neptuno” procedente de Lima, Perú. Los cultivos parciales con las hembras partenogénicas se mantuvieron a 21 ±2°C y a un fotoperiodo de 12:12 con luz blanca fluorescente 18W - 3500k. El oxígeno disuelto se mantuvo sobre 8 mg·L<sup>-1</sup>. Para la prueba de toxicidad aguda se empleó cinco concentraciones (9,26; 4,63; 2,31; 1,15 y 0,57 µg de i.a.·L<sup>-1</sup>) y cohortes de neonatos (<24 h de nacidos). La duración de la prueba fue de 48 h de exposición. A cada envase circular de 30 mL se agregó 20 mL de cada una de las concentraciones, a los cuales se transfirió diez neonatos. Se usó como criterio de mortandad la

carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 15 seg de observación al microscopio estereoscópico (Iannacone *et al.*, 2014).

#### *Daphnia magna* (toxicidad crónica)

Las hembras maduras y ovíparas se obtuvieron del acuario “Neptuno” procedente de Lima, Perú. Para el ensayo de toxicidad crónica se utilizaron las siguientes cinco concentraciones decrecientes del lufenurón en agua embotellada: 0,122; 0,061; 0,031; 0,0001 y 0,00005  $\mu\text{g}$  de i.a. $\cdot\text{L}^{-1}$ . La alimentación de las hembras-neonatas fue a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario. La frecuencia de recambio del medio fue tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron 5 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 300mL, con 200mL de medio de cultivo. Los bioensayos se iniciaron con un neonato de menos de 24 h, sin aireación. Se emplearon como medio de ensayo agua embotellada y de clorinada con dos gotas de alimento. Se emplearon cinco concentraciones y un total de 10 neonatos por concentración. Los neonatos fueron colocados individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad crónica fue de 21 días. Al final del ensayo, el número de crías vivas producidas por hembra viva fue evaluada. Los juveniles producidos por los adultos hembras que murieron durante el ensayo fueron excluidos del análisis. En adición, se determinó el número y la mortandad de los padres al momento de producción de la primera camada y la longitud de las hembras a los 21 días de exposición. Para la validez del ensayo, la mortandad en el control no fue mayor al 20 % y produjo como promedio por envase más de 60 crías vivas al final del bioensayo.

#### *Eisenia foetida* (toxicidad aguda)

Los oligoquetos para nuestro ensayo se obtuvieron de la Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú. La colecta, aclimatación y cría del oligoqueto *E. foetida* siguió lo descrito por (Iannacone & Alvaríño, 2005). Las pruebas ecotoxicológicas con los oligoquetos se realizaron con cohortes de especímenes de *E. foetida* que se obtuvieron del envase de cultivo masivo. Se utilizaron en los ensayos, lombrices de longitud total entre 9 a 11 cm con clitelo. Los bioensayos de toxicidad se realizaron en envases cilíndricos de plástico de 12

cm de altura y 10 cm de diámetro y con un área superficial de 79,53  $\text{cm}^2$ , empleando aproximadamente 140 g de suelo más 70 g de humus de lombriz como sustrato en donde se incorporó el lufenurón en ensayos estáticos de 7 días de exposición. Las lombrices fueron colocadas en estos envases bajo condiciones de oscuridad para evitar el efecto de fotólisis del producto químico. Las lombrices fueron lavadas en agua destilada y luego secadas en papel absorbente para eliminar el exceso de agua durante las lecturas. Los ensayos agudos fueron considerados válidos cuando la mortandad no sobrepasó el 10% y un incremento de peso mayor de 20% en el grupo control. En los ensayos agudos fueron considerados muertos los organismos que al ser pinchados con un alfiler entomológico, durante 10 segundos de observación no realizaron ningún movimiento coordinado. Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de temperatura de  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  y las concentraciones fueron cinco (402; 201; 100,5; 50,3 y 21,2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) con tres réplicas por concentración. El fotoperiodo empleado fue de oscuridad total y la humedad relativa fluctuó entre 75% y 80%. (Iannacone *et al.*, 2014).

#### Microorganismos de suelo (toxicidad crónica)

Este bioensayo tuvo como condiciones ambientales una temperatura:  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa del 70%. Se usaron cinco concentraciones de lufenurón (110; 220; 450; 910 y 1820  $\text{mg}$  de i.a. $\cdot\text{g}^{-1}$  de suelo artificial) y un control, con cinco réplicas por concentración a 120 h de exposición. Se realizó la cobertura con parafilm® a las unidades del ensayo bajo oscuridad total. El pH se mantuvo a  $6\pm 2$ . El suelo artificial siguió lo señalado según el protocolo de la EPA. El suelo artificial tuvo la siguiente caracterización: pH=7,16; C.E=1,56  $\text{dS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{CaCO}_3= 4,1\%$ ; Materia orgánica= 9,1; P=13,7 ppm; K=372 ppm; Clase Textural: Arenoso (92%); Limo (4%); Arcilla (4%) y CIC=4,16. Para evaluar la nitrificación en las comunidades microbianas del suelo, se agregó 80mL de KCl a 1N a cada unidad de muestra y por un lapso de una hora en movimiento frecuente. Seguidamente se filtró y se añadió un sachet de kit Hanna de medición de nitratos por el método colorimétrico, en unidades de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , y posterior transformación a  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de suelo. Se realizaron cinco replicas por concentración (Iannacone *et al.*, 2014).

### Procesamiento y análisis de datos

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evalúa a través de un análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey. Los datos fueron previamente normalizados (transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno). Las Concentraciones Letales (efectiva) (inhibición) media [CL(E)(I)<sub>50</sub>] fueron determinados empleando el programa Probit versión 1,5. Se determinaron los valores de NOEC (Concentración más alta de efectos no observables) y el LOEC (Concentración más baja de efectos observables). Se usó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.0 versión 20 para Windows XP para calcular los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de 0,05.

### Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos en animales siguieron los protocolos estándares de las 3Rs (reemplazar, reducir y refinar) aprobados para la experimentación animal, minimizando el dolor

durante la experimentación, principalmente en los peces (Pardo, 2005).

## RESULTADOS

### Toxicidad aguda del lufenurón en *Artemia franciscana*

Las ocho concentraciones de lufenurón evaluadas en los bioensayos con *A. franciscana*, muestran mortalidad a las 24 h y 48 h de exposición. La Tabla 1 nos indica los porcentajes de mortalidad de con *A. franciscana* obtenidos por acción de ocho concentraciones en orden creciente del lufenurón empleadas a 24 h y 48 h de exposición. La prueba de Tukey nos indicó que existen diferencias estadísticas entre el porcentaje de inhibición del control con las concentraciones de lufenurón evaluadas (Tabla 1). Fue determinada la CL<sub>50</sub> del lufenurón a 24 h y 48 h de exposición. Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a las 24 h y 48 h.

**Tabla 1.** Efecto del lufenurón sobre la mortalidad de *A. franciscana* a 24h y 48h de exposición.

Concentración µg i.a.·L <sup>-1</sup>	% Mortalidad	
	24h	48h
0	0 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>
1,56	2,7 <sup>abc</sup>	27,2 <sup>b</sup>
3,12	0 <sup>a</sup>	36,3 <sup>bc</sup>
6,25	10,8 <sup>abc</sup>	39,3 <sup>bcd</sup>
12,5	18,9 <sup>bcd</sup>	57,5 <sup>cde</sup>
25	8,1 <sup>abc</sup>	63,6 <sup>de</sup>
50	19,4 <sup>cd</sup>	58,3 <sup>ef</sup>
100	23,6 <sup>cd</sup>	90,4 <sup>fg</sup>
200	27,2 <sup>d</sup>	100 <sup>g</sup>
NOEC	<50	<1,56
LOEC	100	1,56
CL <sub>50</sub>	235,24	11,41
F	8,83	33,55
Sig	0,00	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). CL<sub>50</sub> = Concentración letal media. LOEC = Concentración más baja de efectos observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables. F = Prueba de Fisher. Sig = Nivel de significancia.

### Toxicidad crónica del lufenurón en *Carassius auratus*

Durante la evaluación del efecto crónico del lufenurón en el porcentaje de mortandad acumulada de los embriones, larvas y juveniles de *C. auratus* durante los 26 d de exposición, solo se observó diferencias estadísticamente significativas

entre el control y la mayor concentración de lufenurón (0,122 mg i.a. $\cdot$ L<sup>-1</sup>) para la mortandad. Los resultados en general indican que el lufenurón no produce efectos adversos en la eclosión de los huevos, longitud de los peces sobrevivientes, peso de estos, larvas “fry” o alevines y en el comportamiento juveniles (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto del lufenurón en la mortandad crónica acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *Carassius auratus* (Cyprinidae) “Goldfish” con comportamiento anormal a exposición.

Concentración mg i.a. L <sup>-1</sup>	% Mortandad crónica acumulada	Días en que inicia la eclosión	Longitud promedio de peces sobrevivientes (mm)	Peso promedio de peces sobrevivientes (g)	N° de larvas “fry” deformadas	% de juveniles con comportamiento anormal
control	0 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0,00005	0 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0,0001	0 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>	7,0 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0,031	2,85 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>	7,0 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2,63 <sup>a</sup>
0,061	5,71 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0,122	25,71 <sup>b</sup>	3,9 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	2,63 <sup>a</sup>
LOEC (mg i.a. L <sup>-1</sup> )	0,122	>0,122	>0,122	>0,122	>0,122	>0,122
NOEC (mg i.a. L <sup>-1</sup> )	0,061	0,122	0,122	0,122	0,122	0,122

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los valores (% de mortandad crónica acumulada, N° de días en que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y % de juveniles con comportamiento anormal) son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). LOEC = Concentración más baja de efectos observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables. La mortandad acumulada incluyó la mortandad embrionaria, de larvas y de juveniles. El Comportamiento anormal incluyó en conjunto el nado anormal y la hiperventilación. Además incluye a los peces (larvas y juveniles) muertos. Los valores del control se ajustaron a cero con la fórmula de Abbott.

### Toxicidad crónica del lufenurón en *Chlorella vulgaris*

Las cinco concentraciones de lufenurón evaluadas en los bioensayos con *C. vulgaris*, mostraron que hay efecto inhibitorio en el crecimiento de la microalga entre las 24h y 96h de exposición.

La Tabla 3 nos indica los porcentajes de inhibición del crecimiento algal de *C. vulgaris* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenurón empleadas a 24 h y 96 h de

exposición. La prueba de Tukey nos muestra que existe diferencia estadística entre el porcentaje de inhibición del control con las concentraciones evaluadas (Tabla 3). Fue determinada la concentración de inhibición media del lufenurón a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h (CI<sub>50</sub> = 17,15 mg i.a. $\cdot$ L<sup>-1</sup>; 15,45 mg i.a. $\cdot$ L<sup>-1</sup>; <2,46 mg i.a. $\cdot$ L<sup>-1</sup>; <2,46 mg i.a. $\cdot$ L<sup>-1</sup> respectivamente) (Tabla 3). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC de las concentraciones a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición.

Toxicidad aguda del lufenurón en *Daphnia magna*  
La Tabla 4 nos indica los porcentajes de mortandad de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenurón empleada a 24 h y 48 h de exposición. La prueba de Tukey nos indicó que existen diferencias estadísticas entre el porcentaje de mortandad del

control con las concentraciones evaluadas (Tabla 4). Fue determinada la concentración letal media del lufenurón sobre *Daphnia magna* a 24 h y 48 h de exposición (Tabla 4). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a las 24 h y 48 h de exposición.

**Tabla 3.** Efecto del lufenurón sobre la inhibición del crecimiento algal de *Chlorella vulgaris* a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición.

Concentración mg i.a.·L <sup>-1</sup>	% Inhibición			
	24h	48h	72h	96h
0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2,46	20 <sup>a</sup>	37,66 <sup>ab</sup>	54,96 <sup>ab</sup>	56,38 <sup>b</sup>
4,92	32,77 <sup>ab</sup>	40,99 <sup>ab</sup>	65,06 <sup>b</sup>	68,74 <sup>bc</sup>
9,84	53,90 <sup>bc</sup>	45,71 <sup>ab</sup>	77,26 <sup>b</sup>	75,11 <sup>bc</sup>
19,68	65,39 <sup>c</sup>	66,42 <sup>ab</sup>	81,77 <sup>b</sup>	79,89 <sup>c</sup>
39,37	77,87 <sup>c</sup>	78,96 <sup>b</sup>	87,13 <sup>b</sup>	81,84 <sup>c</sup>
NOEC	4,92	19,68	2,46	<2,46
LOEC	9,84	39,37	4,92	2,46
CI <sub>50</sub>	17,15	15,45	<2,46	<2,46
F	19,35	3,93	7,20	42,38
Sig	0,00	0,024	0,002	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de inhibición del crecimiento algal son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). CI<sub>50</sub> = Concentración de inhibición media. LOEC = Concentración más baja de efecto observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables. F = Prueba de Fisher. Sig = Nivel de significancia.

**Tabla 4.** Efecto del lufenurón sobre la mortandad de *D. magna* a 24 h y 48 h de exposición.

Concentración µg i.a.·L <sup>-1</sup>	% Mortandad	
	24h	48h
0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0,57	35 <sup>ab</sup>	90 <sup>b</sup>
1,15	37,5 <sup>ab</sup>	90 <sup>b</sup>
2,31	45 <sup>b</sup>	93,3 <sup>b</sup>
4,63	55 <sup>b</sup>	96,7 <sup>b</sup>
9,26	57,5 <sup>b</sup>	93,3 <sup>b</sup>
NOEC	<1,15	<0,57
LOEC	2,31	0,57
CL <sub>50</sub>	5,66	0,05
F	5,73	10,12
Sig	0,002	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). CL<sub>50</sub> = Concentración letal media. LOEC = Concentración más baja de efectos observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables. F = Prueba de Fisher. Sig = Nivel de Significancia.

Toxicidad crónica del lufenurón en *Daphnia magna*

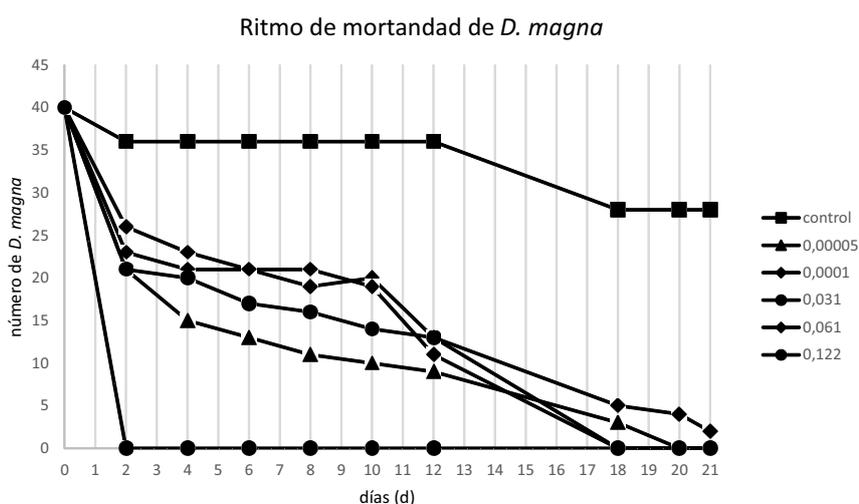
Se evaluó el efecto crónico del lufenurón con el número de crías vivas de los cladóceros *D. magna* durante los 21 d de exposición, encontrándose solo crías vivas en el control y las dos primeras concentraciones, siendo la concentración de 0,0001  $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  estadísticamente diferente a la del control. De igual forma al evaluar el efecto crónico del lufenurón sobre la mortandad de los padres

durante los 21 días del bioensayo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las cinco concentraciones de lufenurón. En cuanto a la longitud de las hembras, se obtuvieron diferencias significativas para el control con las 2 primeras concentraciones evaluadas: 0,00005  $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  y 0,0001  $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tabla 5). La figura 1 permite visualizar el ritmo de mortandad de *D. magna* durante la duración total del ensayo.

**Tabla 5.** Efecto del lufenurón en el número de crías vivas, en la mortandad de los padres y en la longitud de las hembras de *Daphnia magna* a 21 días de exposición.

Concentración $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$	N° crías vivas promedio	% Mortandad de los padres	Longitud de hembras (mm)
control	81,1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>
0,00005	83,5 <sup>a</sup>	75 <sup>b</sup>	4,5 <sup>b</sup>
0,0001	26,8 <sup>b</sup>	91,6 <sup>b</sup>	4,4 <sup>c</sup>
0,031	0 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>
0,061	0 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>
0,122	0 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>
NOEC ( $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,00005	<0,00005	<0,00005
LOEC ( $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,0001	0,00005	0,00005

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). LOEC = Concentración más baja de efectos observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables.



**Figura 1.** Ritmo de mortandad de *D. magna* durante los 21 días de exposición con las cinco concentraciones ( $\mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de lufenurón y el control.

Toxicidad crónica del lufenurón sobre *Eisenia foetida*

La Tabla 6 nos indica los porcentajes de mortandad de *E. foetida* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del lufenurón

empleadas a 7 días y 14 días de exposición. Se determinó la dosis letal media del lufenurón sobre *E. foetida* a 7 d y 14 d de exposición (Tabla 6). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a 7d y 14d de exposición.

**Tabla 6.** Efecto del lufenurón sobre la mortandad de lombriz de tierra *Eisenia foetida* a 7 días y 14 días de exposición.

Concentración mg·kg <sup>-1</sup>	% Mortandad	
	7 d	14 d
0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
21,2	30 <sup>bc</sup>	36,6 <sup>b</sup>
50,3	43,3 <sup>bc</sup>	43,3 <sup>b</sup>
100,5	23,3 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
201	26,6 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>
402	50 <sup>c</sup>	43,3 <sup>b</sup>
NOEC	<21,2	<21,2
LOEC	21,2	21,2
DL <sub>50</sub>	448,01	206,31
F	13,73	16,44
Sig	0,00	0,00

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). DL<sub>50</sub>= Dosis letal media. LOEC= Concentración más baja de efectos observables. NOEC = Concentración más alta de efectos no observables. F= Prueba de Fisher. Sig= Nivel de significancia.

Toxicidad crónica del lufenurón por formación de nitratos en los microorganismos del suelo (Indicador comunitario).

En el bioensayo con los microorganismos del suelo no se observó inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a ninguna de las cinco concentraciones evaluadas. Por ende, no se determinó una concentración efectiva media del lufenurón a 120 h de exposición (Tabla 7). Se determinaron los valores de NOEC y LOEC a las 120h de exposición. La Tabla 7 nos indica la concentración de nitratos obtenida por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del

lufenurón empleadas a 120 h de exposición en las comunidades microbianas del suelo.

## DISCUSIÓN

La toxicidad del lufenurón depende de la duración, intensidad de exposición, formulación y susceptibilidad del organismo o comunidad bioindicadora evaluada. En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico del plaguicida lufenurón sobre seis bioindicadores de calidad ambiental. Las rutas de exposición para cada bioindicador

**Tabla 7.** Efecto del lufenurón sobre las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición.

[c] de lufenurón mg i.a.·g <sup>-1</sup> suelo	[c] de nitratos a 120 h en el suelo (ug·g <sup>-1</sup> de suelo)
0	1,10 <sup>a</sup>
110	1,05 <sup>a</sup>
220	0,88 <sup>a</sup>
450	1,18 <sup>a</sup>
910	0,94 <sup>a</sup>
1820	1,04 <sup>a</sup>
LOEC	>1820
NOEC	1820

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que la [c] de nitrato a 120 h en el suelo son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). LOEC= Concentración más baja de efectos observables. NOEC= Concentración más alta de efectos no observables.

**Tabla 8.** Resumen de los parámetros ecotoxicológicos obtenidos en los bioensayos con lufenurón a los seis bioindicadores de calidad ambiental.

Modelo biológico	CL <sub>50</sub> /DL <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	NOEC	LOEC	Unidades	Período	Ag	Cro	Tipo de organismo
<i>Chlorella vulgaris</i>		<2,46	<2,46	2,46	mg i.a.·L <sup>-1</sup>	96 h		X	A
<i>Artemia franciscana</i>	11,41		<1,56	1,56	µg i.a.·L <sup>-1</sup>	48 h	X		A
<i>Daphnia magna</i>	0,05		<0,57	0,57	µg i.a.·L <sup>-1</sup>	48 h	X		A
<i>Daphnia magna</i>	-	-	0,00005	0,0001		21 d		X	A
			<0,00005	0,00005	µg i.a.·L <sup>-1</sup>				
<i>Carassius auratus</i>	-	-	0,061	0,122		26 d		X	A
			0,122	>0,122					
			0,122	>0,122	mg i.a.·L <sup>-1</sup>				
			0,122	>0,122					
			0,122	>0,122					
Microorganismos de suelo	-	-	1820	>1820	mg i.a.·g <sup>-1</sup>	120 h		X	T
<i>Eisenia foetida</i>	206,31		<21,2	21,2	mg i.a.·Kg <sup>-1</sup>	14 d		X	T

Las casillas marcadas con "X" indican que tipo de ensayo se realizó para cada modelo biológico. CL<sub>50</sub>= Concentración letal media. DL<sub>50</sub>= Dosis letal media. CI<sub>50</sub>= Concentración de inhibición media. LOEC= Concentración más baja de efectos observables. NOEC= Concentración más alta de efectos no observables. A= Acuático. T= Terrestre. Ag= Ensayo agudo. Cro= Ensayo crónico.

difieren, y además sus procesos metabólicos y bioquímicos también son distintos cuando se le somete a un plaguicida (Iannacone *et al.*, 2011ab). El lufenurón es más tóxico en los ambientes acuáticos en comparación con los terrestres (Badawy *et al.*, 2013). Esto se explica por la alta toxicidad en los organismos acuáticos como los descritos por Mayer *et al.* (2013), donde resaltan la efectividad del lufenurón para tratar peces en un estanque infestados con el crustáceo ectoparásito *Argulus* sp. Sin embargo, estos autores advierten que se debe tener precaución con respecto a la contaminación ambiental del agua con el lufenurón, debido a que podría causar efectos perjudiciales en los crustáceos de agua dulce que viven en el medio ambiente circundante. Brock *et al.* (2016) mencionan que los sedimentos actúan como sumideros para los plaguicidas lipófilos que pueden persistir allí, lo que puede conducir a efectos tóxicos en los organismos bentónicos, siendo uno de estos plaguicidas lipofílicos, el lufenurón.

*Daphnia magna* fue la especie más sensible al lufenurón con un valor de  $CL_{50} = 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h de exposición, lo cual se debe a que este plaguicida inhibe la síntesis de quitina en los artrópodos como señala Viñuela *et al.* (1991), y actúa específicamente sobre la cutícula y evitando la incorporación de las unidades de N-acetilglucosamina, en el polímero de quitina. Un estudio similar de Dantzger *et al.* (2015) registran que *Daphnia similis* Claus, 1876 fue el organismo más sensible a los efectos del diflubenzuron con un valor de  $CL_{50}$  de  $0,97 \times 10^{-3} \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h de exposición; así también Ikemoto *et al.* (1992) determinan que hay un exceso de toxicidad del diflubenzuron en *D. magna*. Por otra, parte Valderrama *et al.* (2015) muestran la sensibilidad de *Daphnia pulex* (Linnaeus 1758) frente a la degradación hidrolítica del clorpirifos (CPF) en ensayos de toxicidad a 24 h de exposición, donde se demostró la inmovilidad de la totalidad de los neonatos de *D. pulex*.

Duchet *et al.* (2011) registran que para ambas especies de *Daphnia* (*D. pulex* y *D. magna*), la exposición a las tres concentraciones de diflubenzuron (0,2; 0,4; 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) resultó en una disminución en el número de individuos supervivientes, y también afectó negativamente a la producción de neonatos. Además en *D. magna*,

se observó un efecto negativo significativo en la longitud del cuerpo. Los diversos estudios toxicológicos sobre el género *Daphnia* prueban que es muy sensible al ser expuesto a insecticidas de la misma naturaleza química como el lufenurón. La concentración de inhibición media ( $CI_{50}$ ) fue evaluada en la microalga *Isochrysis galvana* Parke 1949 a las 96 h de exposición y se observó un valor de  $0,97 \text{mg}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ , que evidencia una alta sensibilidad al bioplaguicida catahua *Hura crepitans* L. (Iannacone *et al.*, 2014). En nuestro bioensayo con la microalga *C. vulgaris* se observó que la  $CI_{50}$  al lufenurón es  $<2,46 \text{mg}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo altamente sensible a la inhibición del crecimiento como la microalga *I. galvana*. Ikemoto *et al.* (1992) determinaron que los compuestos buprofezin y diflubenzuron, los cuales son muy similares en la forma de acción del lufenurón (inhibidores de la síntesis de quitina), no son excesivamente tóxicos para *C. vulgaris*. Para otro modelo bioindicador de calidad ambiental, Dantzger *et al.* (2015) registran que la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov 1953) frente al diflubenzuron el valor de  $CI_{50}$  fue de  $58,90 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 168 h de exposición. En otros pesticidas, Ma *et al.* (2006) hallaron que la  $CI_{50}$  para *C. vulgaris* a 96 h de exposición frente al carbofurano fue de  $7,86 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Rioboo *et al.* (2002) después de 96 h de exposición a los herbicidas frente *C. vulgaris*, la terbutrina fue el inhibidor más fuerte del crecimiento, dando un valor de  $CI_{50}$  para el crecimiento dos veces menor que el isoproturon ( $CI_{50}$  terbutrina =  $0,057 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $CI_{50}$  isoproturon =  $0,116 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Estos estudios nos evidencian que el lufenurón frente a *C. vulgaris* tiene un efecto inhibitor como lo observado con otros pesticidas de otros grupos funcionales.

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de *Artemia franciscana* fue de  $11,41 \mu\text{g}\cdot\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h de exposición al lufenurón, según Dantzger *et al.* (2015) reportan que la especie *Artemia salina* (Linnaeus 1758) frente al diflubenzuron presentó un valor de  $CL_{50}$  de  $0,08 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 168 h o 7 d de exposición. Iannacone *et al.* (2016) evaluaron la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana*, en donde tres sustancias químicas fueron calificadas como muy tóxicas y presentaron los valores guía más bajos para la protección de la vida acuática, siendo sus  $CL_{50}$  a 48 h de exposición las siguientes: Triclosan ( $0,72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Cipermetrina ( $0,84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Clotrimazol ( $0,97$

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En comparación a los tres compuestos anteriores, el lufenurón frente a *A. franciscana* no parece ser tan tóxico, además el camarón salino fue menos susceptible en comparación al bioensayo con *D. magna*.

Soares *et al.* (2016) en el ensayo de toxicidad aguda con lufenurón a 96 h con *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) “Tambaqui”, muestran la presencia de hemorragias en los ojos, efectos en las aletas y el opérculo de peces expuestos entre 0,7 y 0,9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de lufenurón. Nuestros resultados de toxicidad crónica con *C. auratus* a 26 d de exposición muestra que no hay efectos significativos en otros parámetros crónicos como la eclosión de los huevos, longitud de los peces sobrevivientes, el peso, larvas “fry” o alevines, y en el comportamiento. Sin embargo, Sabra & Mehana (2015) señalaron que los peces son particularmente sensibles a la contaminación del medio ambiente acuático, debido a que son susceptibles a contaminantes como los insecticidas. Marimuthu *et al.* (2013) investigaron que la tasa de mortandad de las larvas de *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) “bagre africano” aumentó significativamente con el aumento de las concentraciones de buprofezina (0; 0,05; 0,5; 5; 25; 50 y 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) expuestas a 24 h y 48 h. Los valores de  $\text{CL}_{50}$  de 24 y 48 h de buprofezina para las larvas se estimaron en 5,70 y 4,64  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Se observaron malformaciones cuando los embriones y larvas expusieron a más de 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En el bioensayo con los microorganismos del suelo no se observó inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a ninguna de las cinco concentraciones evaluadas del lufenurón. Bending & Lincoln (2000) demostraron que cuando se mezclan concentraciones de 2-propenil-ITC y dimetil-sulfuro, no tuvieron efecto sobre la nitrificación cuando se aplicaron al suelo individualmente, pero la mezcla inhibió fuertemente la nitrificación. De Boer & Kowalchuk (2001) nos mencionan que la oxidación autotrófica de amonio es un proceso de dos etapas, consistente en la conversión de amonio en nitrito y su posterior conversión en nitrato. Estas dos etapas son llevadas a cabo por bacterias oxidantes de amoniaco (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB), respectivamente. Todos los AOB terrestres conocidos pertenecen a

un grupo monofilético dentro de la subclase  $\beta$  de Proteobacteria, y la clasificación actualmente aceptada reconoce sólo dos géneros dentro de este grupo, *Nitrosospira* y *Nitrosomonas*. Además, una amplia gama filogenética de bacterias y hongos posee el potencial de nitrificación heterotrófica, y el rango de transformaciones incluye la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno, como por ejemplo *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Penicillium nigricans* (Bainier, 1930), *Clitocybe* sp., *Arthrobacter* sp., *Thiosphaera pantotropha* (Robertson & Kuenen, 1984), *Paracoccus denitrificans* (Davis 1969) y *Pseudomonas putida* (Trevida, 1889). Se podría inferir que algunas de las posibles especies de microorganismos de suelo nitrificadoras presentes en las muestras de suelo utilizadas en los bioensayos frente al lufenurón podrían ser las mencionadas anteriormente; además que son resistentes al lufenurón a las concentraciones ensayadas ( $\text{NOEC} = 1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ ;  $\text{LOEC} > 1820 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Con respecto al bioensayo realizado con *E. foetida*, se obtuvieron las dosis letales media ( $\text{DL}_{50}$ ) frente al lufenurón a 7 d ( $\text{DL}_{50} = 448,01 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) y 14 d ( $\text{DL}_{50} = 206,31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) de exposición. En otro trabajo de investigación, Badawy *et al.* (2013) delimitaron la toxicidad de tres reguladores de crecimiento de insectos (IGR) buprofezin, lufenurón, y triflumurón, en diferentes proporciones de aplicación y tiempos de exposición en lombrices maduras de la especie *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), indicando que el lufenurón fue el plaguicida más dañino para la maduración de lombrices de tierra, seguido en orden decreciente por buprofezina y triflumurón. Los estudios de toxicidad de Nasr & Badawy (2015) indicaron que el piriproxifeno fue más perjudicial para las lombrices maduras de la especie *A. caliginosa* en comparación a flufenoxurón con una  $\text{CL}_{50} = 42,63$  y  $60,66 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  después de cuatro semanas (28 d), respectivamente. Así relacionaron la tasa de crecimiento y las actividades enzimáticas de AChE (acetilcolinesterasa), PPO (polifenol oxidasa) y GST (glutatión-S-transferasa), proporcionando una fuerte evidencia de la participación de la contaminación por plaguicidas en los cambios bioquímicos de las lombrices de tierra, que pueden ser utilizados como bioindicadores de la contaminación del suelo por pesticidas, por lo cual

el oligoqueto *E. foetida* también puede llegar a ser un buen bioindicador de contaminación de suelos. Con compuestos organofosforados, Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón (2015) concluyeron que el malation y el metamidofos alteraron la morfología externa y provocan una baja significativa en el peso corporal y expresan contracción muscular en forma de cola enrollada en *E. foetida*. Wang *et al.* (2012) revisaron que el plaguicida lufenurón y un organofosforado, acefato, eran relativamente no tóxicos (es decir, todos los valores de  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) contra *E. foetida*. Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón (2015) concluyeron que malation y metamidofos, compuestos organofosforados, alteran la morfología externa provocando una baja significativa en el peso corporal y expresando contracción muscular en forma de cola enrollada en *E. foetida*.

Sánchez-Bayo *et al.* (2012) mencionan que las benzoilureas sistémicas del mercado, hexaflumurón, novalurón y teflubenzurón presentan un modo de acción que está restringido a los artrópodos, y que no son muy tóxicas para otros taxa de animales como moluscos y vertebrados. No obstante, Schaaf (2015) señala que el lufenurón es un insecticida que presentó una alta toxicidad, al medir el impacto ambiental teniendo en cuenta los siguientes factores: "ecotoxicología": categoría toxicológica, toxicidad en abejas, aves y peces; "Toxicidad humana": carcinogenicidad, neurotoxicidad, alteraciones endocrinas, genotoxicidad y capacidad irritativa; "Comportamiento ambiental": persistencia en el agua / sedimento, persistencia en el suelo y bioconcentración.

Farrag & Shalby (2007) concluyeron que el IGR, el lufenurón y el insecticida, profenofos causaron cambios histopatológicos e histoquímicos en *Rattus norvegicus* (Berkenhout 1769) y que no alcanzaron la normalidad después de un mes de recuperación. Por último, Pinakin *et al.* (2011) estudiaron el efecto del lufenurón en la embriogénesis de los vertebrados utilizando como modelo *Gallus domesticus* (Linnaeus 1758), llegando a la conclusión de que el regulador del crecimiento de insectos, lufenurón a una dosis muy baja fue embriotóxico y teratogénico a un organismo no diana, el pollo, lo que nos revela que la exposición a lufenurón en la cadena alimentaria

puede llevar a consecuencias indeseables en los vertebrados.

Se concluye finalmente, que se encontraron efectos tóxicos del lufenurón a 48 h de exposición mediante la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), que fue igual a  $11,41 \mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  en el camarón salino *A. franciscana*. Se calculó el efecto tóxico del lufenurón a 26 días de exposición mediante un ensayo de toxicidad crónica con *C. auratus*, en donde solo hay diferencias significativas en el porcentaje de mortandad acumulada (embriones, larvas y juveniles) entre el control y la mayor concentración empleada ( $0,122 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$ ). No hay diferencias significativas en relación a la eclosión de huevos, longitud de los peces sobrevivientes, su peso, número de larvas "fry" deformadas y porcentaje de juveniles con comportamiento anormal. Se determinó el efecto tóxico del lufenurón a 96 h de exposición mediante la concentración de inhibición media ( $CI_{50}$ ), que fue menor a  $2,46 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  en la microalga *C. vulgaris*. Se precisó el efecto tóxico del lufenurón a 48 h de exposición empleando un ensayo de toxicidad aguda, donde la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) es igual a  $0,05 \mu\text{g i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  para la pulga de agua *D. magna*. Se halló el efecto tóxico del lufenurón a 21 días de exposición utilizando un ensayo de toxicidad crónica con *D. magna*, que a partir de la concentración  $0,0001 \text{ mg i.a.}\cdot\text{L}^{-1}$  hay diferencias significativas en relación al número de crías vivas, porcentaje de mortandad de los padres y longitud de las hembras. Se delimitó el efecto tóxico del lufenurón a 14 días de exposición, siendo la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) igual a  $206,31 \text{ mg i.a.}\cdot\text{Kg}^{-1}$  en la lombriz de tierra *E. foetida*. Se establece el efecto tóxico del lufenurón en la nitrificación a cinco días (120 h) en las comunidades microbianas de suelo, donde no se observó ni inhibición ni estimulación en la formación de nitratos a partir de la concentración  $110 \text{ mg i.a.}\cdot\text{g}^{-1}$ . *Daphnia magna* fue el bioindicador más sensible al lufenurón, y el más resistente fue el bioindicador comunitario, microorganismos del suelo. El lufenurón presentó mayores porcentajes de mortandad e inhibición en los organismos acuáticos que en los terrestres. Los seis bioindicadores seleccionados para evaluar los daños ambientales del insecticida lufenurón, ayudaron a clarificar que este compuesto es tóxico principalmente a la cadena trófica acuática, en comparación con la terrestre.

Por ello se recomienda que lufenurón debe utilizarse con precaución, ya que puede ser altamente tóxico para los ambientes acuáticos especialmente, y también a los terrestres, afectando las cadenas tróficas y poniendo en peligro en consecuencia los ecosistemas donde también se encuentra el ser humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badawy, M.E.; Kenawy, A. & El-Aswad, A.F. 2013. Toxicity assessment of buprofezin, lufenuron, and triflumuron to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. International Journal of Zoology, 2013: Article ID 174523.
- Bending, G. D. & Lincoln, S.D. 2000. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. Soil Biology and Biochemistry, 32: 1261-1269.
- Braga da Silva, M.T; Correa Costa, E. & Boss, A. 2003. Controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. Ciencia Rural, Santa Maria, 33: 601-605.
- Brock, T.C.M.; Bas, D.A.; Belgers, J.D.M.; Bibbe, L., Boerwinkel, M. C., Crum, S. J. H. & Roessink, I. 2016. Effects of sediment-spiked lufenurón on benthic macroinvertebrates in outdoor microcosms and single-species toxicity tests. Aquatic Toxicology, 177: 464-475.
- Both, G.J.; Gerards S. & Laanbroek H.J. 1990. Enumeration of nitrite oxidizing bacteria in grassland soils using a Most Probable Number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure. FEMS Microbiology Ecology, 74: 277-286.
- Dantzger, D.D.; Vallim, J.H.; Marigo, A. & Aoyama, H. 2015. Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 10: 259-272.
- Das, P., Pal, R. & Chowdhury, A. 2008. Influence of biotic-abiotic factors on the degradation of novaluron in tropical soil. International Journal of Environmental Science & Technology, 5: 425-429.
- De Boer, W. & Kowalchuk, G.A. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. Soil Biology and Biochemistry, 33: 853-866.
- Devine, G.J.; Eza, D.; Oigusuku, E. & Furlong, M.J. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública, 25: 74-100.
- Duchet, C.; Inafuku, M.M.; Caquet, T.; Larroque, M.; Franquet, E.; Lagneau, C. & Lagadic, L. 2011. Chitinase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 800-810.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2012. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4500: Algal Toxicity. EPA 712-C-006. January 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2016a. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. EPA 712-C-16-013. October 2016.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2016b. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1075: Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test. EPA 712-C-16-007. October 2016.
- Escobar-Malaver, P.M. & Londoño-Pérez, R.D. 2010. Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia* (No. Doc. 23020) CO-BAC, Bogotá).
- Espinoza-Navarro, O. & Bustos-Obregón, E. 2015. Toxicidad y riesgo ambiental por efecto de insecticidas organofosforados sobre reproductor macho de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). International Journal of medical and surgical sciences, 2: 723-729.
- Evangelista, W.S. Silva-Torres, C.S. & Torres, J.B. 2002. Toxicity of lufenurón to *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, 31: 319-325.
- Farrag, A.R.H. & Shalby, S.E. 2007. Comparative histopathological and histochemical studies on IGR, lufenurón and profenofos insecticide albino rats. Journal of Applied

- Sciences Research, 3: 377-386.
- Hernández, J.A.; Rincón, M. & Jiménez, R. 1997. Comportamiento de la lombriz roja (*Eisenia fetida*) bajo condiciones de clima cálido. Revista de la Facultad de Agronomía de Luz, 14: 387-392.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003. Efectos toxicológicos del nim, rotenona y cartap sobre tres micro-avispa parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. Boletín de sanidad vegetal, Plagas, 29: 124-142.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2005. Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. Ecología Aplicada, 4: 91-104.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. & Mamani, N. 2011a. Toxicity estimation for mixtures of Furadán 4F® and Monofos® on *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 6: 23-29.
- Iannacone, J.; Alvarino, L.; Paredes, C.; Alayo, M.; Mamani, N.; Bonifacio, J. & Miglio, M.C. 2011b. Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta toxicológica Argentina, 19: 19-31.
- Iannacone, J.A.; Ayala, H.; Alvarino, L.; Paredes Espinal, C.; Villegas, W.; Alomia, J. & Santos S.N. 2014. Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). Revista de Toxicología, 31: 50-62.
- Iannacone, J.; Alvarino, L.; Riestra, V.V.; Ymaña, B.; Argota, G.; Fimia, F. & Castañeda, L. 2016. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). Revista de toxicología, 33: 31-38.
- Ikemoto, Y.; Motoba, K.; Suzuki, T. & Uchida, M. 1992. Quantitative structure activity relationships of nonspecific and specific toxicants in several organism species. Environmental toxicology and chemistry, 11: 931-939.
- Ma, J.; Lu, N.; Qin, W.; Xu, R.; Wang, Y. & Chen, X. 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. Ecotoxicology and Environmental safety, 63: 268-274.
- Marimuthu, K.; Muthu, N.; Xavier, R.; Arockiaraj, J.; Rahman, M.A. & Subramaniam, S. 2013. Toxicity of buprofezin on the survival of embryo and larvae of African catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). PloS one, 8: e75545.
- Matsumura, F. 2010. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. Pesticide biochemistry and physiology, 97: 133-139.
- Mayer, J.; Hensel, P.; Mejia-Fava, J.; Brandão, J. & Divers, S. 2013. The use of Lufenuron to treat fish lice (*Argulus* sp.) in Koi (*Cyprinus carpio*). Journal of Exotic Pet Medicine, 22: 65-69.
- Nasr, H.M. & Badawy, M.E. 2015. Biomarker Response and Biomass Toxicity of Earthworms *Aporrectodea caliginosa* Exposed to IGRs Pesticides. Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 5:332.
- Norton, J. 2008. *Nitrification in Agricultural soils. En: Nitrogen in Agricultural Systems.* Agronomy Monographs 49. Schepers, J.S. & Raun, W.R. (eds.). ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin. pp. 173-199.
- Pardo, C.A. 2005. Ética de la experimentación animal: directrices legales y éticas contemporáneas. Cuadernos de Bioética, 16: 393-418.
- Pérez-Moreno, I.; Zalom, F.G. & Marco, V. 2006. Effects of lufenuron on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval, and adult stages. Journal of Economic Entomology, 99: 427-431.
- Pinakin, W.; Deshpande, S.G. & Salokhe, S.G. 2011. Studies on the effect of the insect growth regulator lufenuron on embryogenesis of chick *Gallus domesticus* (white leghorn strain). International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 1: 82-88.
- Pino, P.O. & Lazo, J.F. 2010. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Revista de Protección Vegetal, 25, 34-43.
- Rioboo, C.; González, O.; Herrero, C. & Cid, A. 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine

- and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicology*, 59: 225-235.
- Ruiz-Suarez, E. J. 2015. *Estudio de microcrustáceos (Daphnia pulex y Artemia salina) como indicadores de toxicidad por causa del dicromato de potasio en la cuenca alta del río Bogotá*. [Tesis]. Universidad Militar Nueva Granada.
- Sabra, F.S. & Mehana, E.S.E.D. 2015. Pesticides Toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3: 40-60.
- Sánchez-Bayo, F. 2012. *Ecological Impacts of Insecticides*. INTECH Open Access Publisher. Disponible en: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/25669/InTech-Ecological\\_impacts\\_of\\_insecticides.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/25669/InTech-Ecological_impacts_of_insecticides.pdf)
- Schaaf, A.A. 2015. Valoración de impacto ambiental por pesticidas agrícolas. *Observatorio Medioambiental*, 18: 87-96.
- Soares, P.R.L.; de Andrade, A.L.C.; Santos, T.P.; da Silva, S.C.B.L.; da Silva, J. F.; dos Santos, A.R. & de Sá, F.B. 2016. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Collossoma macropomum*. *Chemosphere*, 161: 412-421.
- Sun, R.; Liu, C.; Zhang, H. & Wang, Q. 2015. Benzoylurea chitin synthesis inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63: 6847-6865.
- Valderrama, J. F.N.; Puerta, J.A.B.; Zuluaga, S.C.; Baena, J.A.P.; & Pérez, F. J. M. 2015. Degradación hidrolítica de clorpirifos y evaluación de la toxicidad del extracto hidrolizado con *Daphnia pulex*. *Revista Politécnica*, 10: 9-15.
- Vázquez, M.P.; Vázquez, P.P.; Galera, M.M. & Moreno, A.U. 2014. Comparison of two ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry: Evaluation of green parameters. *Journal of Chromatography A*, 1356: 1-9.
- Viñuela, A.E.; Marigil, F.B. & del Estal Padillo, P. 1991. Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 17: 391-400.
- Wang, Y.; Wu, S.; Chen, L.; Wu, C.; Yu, R.; Wang, Q. & Zhao, X. 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 88: 484-491.

Received December 28, 2017.

Accepted May 30, 2018.