

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DETERMINACIÓN CL50 96 HORAS DE CIPERMETRINA Y MALATIÓ N PARA
AUSTRALOHIEROS FACETUS EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

Por

María Noelia RODRÍGUEZ VILLALBA

Ignacio CHIFTEIAN ROSSO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

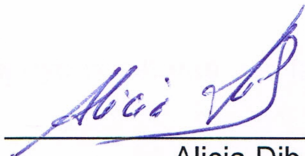
URUGUAY

2018

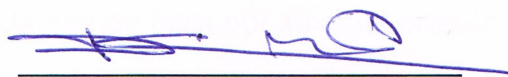
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

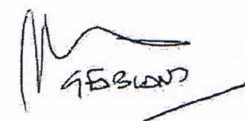
Presidente de mesa:


Alicia Dib

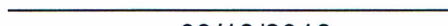
Segundo miembro (Tutor):


Daniel Carnevia (tutor)

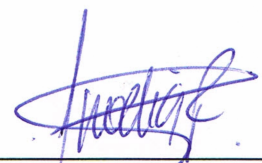
Tercer miembro:

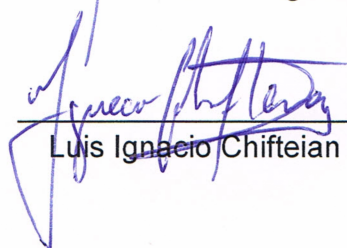

Graciela Fabiano

Fecha:


03/12/2018

Autores:


Maria Noelia Rodriguez Villalba


Luis Ignacio Chifteian Rosso

AGRADECIMIENTOS

- A **nuestras familias**, por el esfuerzo y el apoyo constante a lo largo de toda nuestra carrera.
- A nuestro tutor **Daniel Carnevia** por confiar en nosotros para realizar esta tarea y guiarnos en su proceso. A los ayudantes de tesis por su colaboración en la actividad práctica.
- A nuestros **compañeros y amigos** por estar presentes. A **Facultad de Veterinaria e Instituto de Pesca** por brindarnos las instalaciones para realizar los ensayos experimentales y así poder culminar con la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	Página 2
3. AGRADECIMIENTOS	Página 3
4. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	Página 5
5.RESUMEN	Página 6
6. SUMMARY	Página 7
7. INTRODUCCIÓN	Página 8
8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Página 13
8a. <i>Plaguicidas y peces</i>	Página 13
8b. <i>Ecosistemas Acuáticos y análisis del impacto ambiental en Uruguay</i>	Página 17
11. HIPÓTESIS	Página 20
12. OBJETIVO GENERAL	Página 20
13. MATERIALES Y MÉTODOS	Página 21
13a. <i>Materiales de laboratorio</i>	Página 21
13 b <i>Metodología</i>	Página 22
14. RESULTADOS	Página 24
15. DISCUSIÓN	Página 30
16.CONCLUSIONES	Página 33
17.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	Página 34

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resultados de los bioensayos de intoxicación de *Australoheros facetus* con dosis crecientes de Cipermetrina en agua.

Tabla 2. Tasas de mortalidad de *Australoheros facetus* para varias concentraciones de cipermetrina en agua.

Figura 1. Curva que relaciona la tasa de mortalidad de *Australoheros facetus* con la concentración de cipermetrina en el agua

Figura 2. Curva que relaciona la tasa de mortalidad de *Australoheros facetus* con la concentración de malatión en el agua.

RESUMEN

En Uruguay existe mucha preocupación respecto a los plaguicidas de uso agrícola, generalmente asociado al aumento en la agricultura intensiva. En la actualidad hay más de 300 sustancias químicas registradas como plaguicidas. Cuando estos plaguicidas ingresan a los ecosistemas acuáticos pueden desencadenar problemas de contaminación que afectan diversos componentes de la biota. Los peces son buenos indicadores biológicos para monitorear la contaminación ambiental de ecosistemas acuáticos. El presente trabajo tiene como objetivo determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀, 96 horas) para dos plaguicidas de uso común en Uruguay: la cipermetrina y el malatión, utilizando como especie indicadora al pez autóctono *Australoheros facetus*. Se realizaron ensayos de toxicidad aguda según metodología recomendada por la *United States Environmental Protection Agency* (US, EPA). En base a los resultados se ve que *A. facetus* es mucho más sensible a la cipermetrina (CL₅₀ 96= 0,1114 ± 0,0218 mg/L) que al malatión (CL₅₀96 =7,5182 ± 0,9209 mg/L). Si bien *A. facetus* resultó más resistente que otros peces a la cipermetrina, su resistencia al malatión fue intermedia entre valores encontrados para otros peces.

SUMMARY

*In Uruguay there is a lot of concern with agricultural pesticides, generally associated with the increase in intensive agriculture. Currently there are more than 300 chemicals registered as pesticides. When these pesticides enter aquatic ecosystems, they can trigger pollution problems that affect various components of the biota. Fish are good biological indicators to monitor the environmental pollution of aquatic ecosystems. The objective of this work is to determine the Lethal Concentration 50 (LC50, 96 hours) for two insecticides used in Uruguay: cypermethrin and malathion, using the native fish *Australoheros facetus* as a species. Acute toxicity tests were performed according to the methodology recommended by the United States Environmental Protective Agency. Based on the results it is seen that *A. facetus* is much more sensitive to cypermethrin ($LC_{50\ 96} = 0.114 \pm 0.0218$ mg / L) than to malathion ($LC_{50\ 96} = 7.5182 \pm 0.9209$ mg / L). Although *A. facetus* was more resistant than other fish to cypermethrin, its resistance to malathion was intermediate between values found for other fish.*

INTRODUCCIÓN

Dada la creciente preocupación por conservar el medio ambiente, y la evolución de la legislación a este respecto es necesario ampliar los conocimientos sobre estos temas.

El Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) es el organismo estatal que regula todo lo referente al uso de plaguicidas en Uruguay. El Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) determina las condiciones aplicables para proteger el ambiente, así como la producción, exportación e importación de sustancias químicas (Neme y col. 2010).

Uruguay es un país rico en recursos hídricos asociado principalmente al uso de suelos y a la actividad agropecuaria, de ahí la utilidad de conocer los efectos de esta interacción. Los principales problemas de contaminación están en manejo de efluentes y aplicación de herbicidas y plaguicidas, tanto en animales como en plantaciones (Ríos, 2010). En nuestro país el uso de plaguicidas es el método más utilizado para combatir plagas a nivel agrícola y veterinario. Esto supone un riesgo de intoxicación para las personas que trabajan utilizando estas sustancias. Los puestos de trabajo relacionados a estos están vinculados a la forestación, hortifruticultura, floricultura, invernáculos, ganadería, industria arrocera, control de diversas plagas, aplicación en cultivos extensivos y la industria química (CEUTA, 2006). En un estudio realizado por Alonzo y col. (1999) entre 1996 y 1997 la mayor parte de los casos de intoxicaciones agudas debidas a plaguicidas ocurrieron en el departamento de Montevideo. En cuanto a las principales causas asociadas a la intoxicación aguda se destacaron claramente los accidentes, luego causas intencionales y por último como consecuencia del manejo asociado con el trabajo, clasificado como intoxicaciones ocupacionales. Dentro de las sustancias causantes de intoxicaciones sobresalen claramente los plaguicidas organofosforados, seguidos de los piretroides. En aquel momento los organoclorados ocupaban un sexto puesto, al día de hoy se encuentran prohibidos en nuestro país.

Cuando los plaguicidas ingresan en ambientes acuáticos naturales producen diversos efectos sobre la fauna, uno de los cuales son los eventos de mortandad de

peces. Además del riesgo para los humanos, el uso de plaguicidas supone un riesgo alto para el ambiente. Los plaguicidas no solo producen un efecto local en el lugar de aplicación, sino que tienen un efecto importante en las aguas naturales, donde llegan por arrastre o derrames, dependiendo de la frecuencia de los eventos de lluvia y las prácticas de manejo. En este sentido es importante considerar el manejo desde la elección de los pesticidas hasta el momento en donde se realiza la aplicación (Paracampo, 2013).

Es necesario relevar las condiciones ambientales en el momento preciso y examinar peces muertos y/o moribundos para realizar un diagnóstico presuntivo. Existe un protocolo de procedimiento llamado “Procedimiento de documentación e investigación de campo para el diagnóstico de mortandades de peces” instrumentado por la Comisión Asesora del Río Uruguay (CARU) desde 1998 (Spinetti y Seigneur, 2009), en el que se releven condiciones del agua, de los peces y del entorno.

Los peces están expuestos a compuestos que ingresan a los cuerpos acuáticos por distintas vías, entre ellos los plaguicidas. Una vez que los plaguicidas llegan al agua, pueden ingresar al cuerpo del pez por consumo de alimentos contaminados o ser directamente absorbidos por la piel y las branquias. Cuando estos tóxicos ingresan dentro del organismo pueden acumularse en ciertos órganos del pez o ser transformados y eliminados a través de la orina y las heces. Cuando en un pez está ingresando durante algún tiempo un tóxico y se acumula en ciertos órganos o tejidos, se habla de bioacumulación (Ríos y col, 2010).

Por tanto, los peces están expuestos constantemente a diferentes compuestos químicos potencialmente tóxicos. Estos pueden provenir de efluentes domiciliarios (vertidos de saneamiento), industriales y de campos agrícolas (plaguicidas), pudiendo alcanzar los cursos de agua por vertido directo o por escurrimiento desde su cuenca. Cuando una sustancia ingresa al cuerpo del pez, se intenta degradarla y utilizarla como fuente de energía para crecer o cumplir actividades vitales como reproducción o locomoción. En caso de que no sean degradables o sean resistentes a la degradación (descomposición lenta), el pez mediante procesos de metabolización (utilizando órganos como el hígado) tratará de eliminar el compuesto a través de las heces y la orina. Si la cantidad de compuesto químico que ingresa al

pez es superior a su capacidad de transformarlo en energía o desecharlo, el organismo comenzará a acumularlo en sus tejidos. Si esto se prolonga en el tiempo el organismo puede ver reducidas o perder algunas funciones vitales, como por ejemplo: reducción de la capacidad de respuesta inmunológica aumentando la probabilidad de contraer infecciones por hongos, bacterias y/o virus; reducción en la cantidad de huevos por puesta o menor sobrevivencia de juveniles, llevando a una disminución de las poblaciones de peces. Esto puede suceder por interacciones directas de las sustancias con el organismo o porque la energía usualmente utilizada para funciones básicas (mantenimiento, crecimiento y reproducción) se deriva a la metabolización. Los efectos que experimentan los organismos al estar expuestos a contaminantes pueden manifestarse a corto plazo (horas o días), conocidos como efectos agudos, o a largo plazo (meses o años) denominados crónicos. Los efectos a cortos plazo ocurren generalmente por exposición a concentraciones elevadas de contaminantes, por ejemplo debido a derrames, lavado inadecuado de envases o maquinaria en cursos de agua, etc. Mientras que los efectos crónicos se deben a la exposición durante mucho tiempo a bajas concentraciones. Los organofosforados y carbamatos interfieren con el normal funcionamiento del sistema nervioso y generan efectos rápidos (Ríos y col, 2010).

Varios organismos acuáticos han sido utilizados para evaluar la calidad de las aguas superficiales. Los peces, debido a su sensibilidad frente a cambios ambientales y a que varias especies son de interés económico son a menudo utilizados como bioindicadores de contaminación. Algunas características de los peces facilitan su uso como indicadores de calidad ambiental:

- a) existe información sobre la historia de vida de numerosas especies,
- b) representan diversos niveles alimenticios (hay peces que se alimentan tanto de sedimento, de invertebrados acuáticos o de otros peces, abarcando los diferentes niveles de la cadena alimentaria),
- c) tienen gran superficie corporal en contacto con el agua (branquias y piel) lo que aumenta el contacto con los contaminantes presentes en el agua,
- d) pueden evaluarse fácilmente diversos efectos (mortalidad, pérdida de peso, pérdida de movilidad, etc.),
- e) pueden acumular contaminantes en sus tejidos (principalmente las especies que tienen altos contenidos de grasa como la carpa y el sábalo) y

- f) por su tamaño se puede extraer tejido suficiente (músculo, cerebro, branquias, hígado) para determinar contaminantes que están presentes en bajas concentraciones en el ambiente

Varias especies de peces autóctonos de la cuenca del Río de la Plata han sido utilizadas en estudios de calidad de agua. La castañeta (*Australoheros scitulus*) fue utilizada en la evaluación de efluentes de papeleras en arroyos suburbanos argentinos y como especie bioindicadora de cambios de uso del suelo en cuencas agrícolas y forestales uruguayas, el “limpia fondo” (*Corydoras paleatus*) como indicador de la toxicidad de plaguicidas organofosforados, la “madrecita” (*Cnesterodon decemmaculatus*) en estudios de contaminación de aguas por la Intendencia de Montevideo, el “overito” (*Jenynsia multidentata*) en la determinación de acumulación de metales pesados en tejido muscular en Argentina, “sábalos” y otros peces del Río Uruguay para estudios de contaminación en el citado río (Ríos y col, 2010).

En Uruguay existen periódicamente episodios de mortandad de peces en aguas naturales, los que tienen un gran impacto en la opinión pública y en la actividad de los pescadores artesanales. Si bien una parte importante de estos episodios se debe a alteraciones ambientales, siempre es necesario evaluar el papel de los contaminantes como causa o concausa de éstas mortalidades.

En el marco de un proyecto para el desarrollo de bioensayos con peces para la evaluación de agroquímicos y otros contaminantes de los ecosistemas acuáticos y con el fin de llevar a cabo un atlas histopatológico de lesiones típicas que se está desarrollando en el Instituto de Investigaciones Pesqueras, se seleccionaron varios agroquímicos para su estudio. Dentro de éstos agroquímicos se eligieron para este estudio dos tipos de plaguicidas, uno de la familia de los piretroides (cipermetrina) y un organofosforado (malatión) por ser usados comúnmente en la agroindustria. Se tomó como referencia la “castañeta” o “chanchita” (*Australoheros facetus*) como pez de laboratorio para realizar los estudios por ser una especie fácil de producir en laboratorio y estar presente en todas las aguas dulces del país. Estas características lo hacen muy apto para utilizarlo como indicador biológico de contaminación de aguas.

Para la realización del presente trabajo científico de Tesis de Grado se seleccionó dentro del proyecto general, la determinación de la concentración letal 50 (96 horas) de cipermetrina y malatión para *Australoheros facetus*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

PLAGUICIDAS y PECES

Los plaguicidas se pueden clasificar según dos tipos de criterio: de acuerdo al tipo de uso encontramos insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, etc., y de acuerdo a su estructura química encontraremos los organofosforados, organoclorados, piretroides, amidas, fenoles.

Los agrotóxicos o pesticidas son definidos por la International *Unión of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como sustancias empleadas para la prevención, destrucción y control de plagas. Actualmente más de 1600 agrotóxicos con más de 100 clases químicas son usados a nivel mundial en la producción de alimentos. Esto supone más de 1700 ingredientes activos y más de 350 derivados de éster que son usados en las fórmulas de pesticidas (Santana y Cavalcante, 2016). Se estima que menos del 0,1% de los productos fitosanitarios aplicados en los cultivos alcanza solamente a su organismo blanco; por tanto la inmensa mayoría tiene la capacidad potencial de afectar otros organismos y afectar el ambiente (Schlegel, 2009)

El destino de un plaguicida en el ambiente depende de los procesos de retención, transporte y degradación, además de su interacción con otras sustancias, los cuales modifican la cantidad y efectividad del mismo. Además siempre están influenciados por las características del suelo y las propiedades fisicoquímicas del plaguicida (Cheng, 1990; Aparicio y col, 2015). Los parámetros físico-químicos que se utilizan para evaluar el comportamiento de la sustancia en el ambiente son: la solubilidad en el agua, presión de vapor, volatilidad, estabilidad en agua, fotodegradación y propiedades ácido base, las que son características de cada molécula de pesticida.

En los peces las vías de intoxicación comienzan por los sitios de contacto con el agua: vía branquial y dérmica; siendo la vía oral y el tracto gastrointestinal una importante ruta de absorción también. A través de estas vías, ya sea por difusión pasiva, difusión facilitada, filtración por canales de membrana, transporte activo y/o endocitosis se produce la absorción. Una vez ingresado al medio interno se distribuye en órganos específicos donde los compuestos químicos producen daño biológico directo. En general se produce el almacenamiento en lugares donde el

animal tiene alto tenor lipídico y es movilizado cuando el animal utiliza sus reservas lipídicas (como en situaciones de estrés donde se necesita mucha energía para mantener la homeostasis del organismo). Algunos compuestos son eliminados directamente sin sufrir alteraciones pero muchos son biotransformados para derivados más hidrofílicos por aumento de su polaridad, para luego ser eliminados. Por otro lado la biotransformación también puede generar productos más tóxicos y más reactivos perjudiciales para el organismo. La toxicidad de un producto está determinada por la toxicodinámica y la toxicocinética. El hígado es el principal órgano involucrado en la metabolización de tóxicos, y cierta actividad extrahepática ocurre en el riñón, intestino y branquias de los peces (Marques Santana y col, 2016).

La toxicidad aguda refiere al daño ocurrido dentro de un periodo corto luego de la exposición a un tóxico. Se presenta en forma de concentración letal media y es la expresión derivada de una dosis que es letal para el 50% de los organismos expuestos en un periodo definido (en general 48 o 96 horas). Esta toxicidad aguda depende de la cantidad de sustancia absorbida y el tiempo de exposición a ella en el ambiente. La toxicidad crónica es la capacidad de producir daños tras una exposición prolongada a pequeñas dosis. Hay estudios de toxicidad de 60-90 días y otros de 2 años (Correa, 2011).

CIPERMETRINA

Las piretrinas son plaguicidas naturales obtenidos de ciertas especies de crisantemos, sustancias que en la actualidad han sido reemplazadas por productos de síntesis (piretroides), más estables y con mejor efecto residual que los naturales. En la búsqueda de piretroides poco tóxicos para los mamíferos, altamente eficaces en bajas dosis para la lucha contra insectos y de baja persistencia ambiental, estas sustancias han ido evolucionando desde los productos de primera generación (aletrina) hasta los actuales de cuarta generación (cipermetrina, decametrina). Estas sustancias son de uso agropecuario, urbano e industrial.

La Cipermetrina es un derivado sintético del ácido crisantémico, siendo su nombre químico: alfa-ciano-3-fenoxi-bencil éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil) ciclopropanocarboxílico. La vida media en el suelo rico en materia orgánica es de 2 a 4 semanas. Por ser poco soluble persiste mucho tiempo en la película superficial del agua y se deposita poco en los sedimentos de ecosistemas acuáticos (INCHEM,

1989). Tiene una clasificación toxicológica 3 según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y aclaración de que son sumamente tóxicos para peces y abejas.

Su mecanismo de acción se basa en la prolongación de la permeabilidad al sodio durante la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas, lo que produce descargas repetidas. Dimitrovic (2000) cita cuatro mecanismos de acción: (1) inactivación de los canales de sodio, (2) inhibición de la Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPasa, (3) inhibición de la calmodulina, y (4) por unión a los receptores GABA. Los piretroides se absorben relativamente bien por tracto gastrointestinal y por branquias, siendo un poco menor la absorción a través de la piel de los peces. Se biotransforman rápidamente por esterasas y oxidasas microsomales hepáticas y los productos son eliminados en su mayoría por el riñón. Los síntomas de intoxicación son incoordinación, temblores, hiperexcitabilidad, convulsiones y falla respiratoria (Henao y Nieto, 2004).

MALATIÓN

Los organofosforados son plaguicidas compuestos por sustancias orgánicas artificiales que contienen un átomo de fósforo unido a cuatro de oxígeno o a tres de oxígeno y uno de azufre. Se caracterizan por ser muy tóxicos pero de baja estabilidad química (por lo que son biodegradables en la naturaleza) y de escasa acumulación en los tejidos. El malatión es un organofosforado sintético de tercera generación que tiene baja persistencia en el ambiente y alta efectividad plaguicida. Su nombre químico es 2-(dimetoxifosforotiol-sulfonil) butanodioato de dietilo. Es fotosensible y se degrada en el suelo por acción bacteriana, mientras que en el agua se degrada por acción directa y por acción bacteriana. Actúa por contacto, ingestión e inhalación, tiene gran efecto de choque y bajo poder residual incluso en el ambiente. Actúa enlazándose en forma covalente con la acetilcolinesterasa en la sinapsis, inhibiendo la hidrólisis de la acetilcolina, y produciendo entonces una estimulación sostenida del efector colinérgico. Es de uso agropecuario, industrial y urbano. Su clasificación toxicológica es 2 (OMS). Los síntomas de intoxicación son parálisis de la musculatura y estimulación con posterior depresión del sistema nervioso central (Badii y Varela, 2008).

El malatión técnico o comercial no es un plaguicida puro, sino que presenta impurezas como los trimetil fosfatos y el maloxón, subproducto mucho más tóxico que el compuesto original, generando una respuesta más variable que con otros plaguicidas. Por esta razón la toxicidad en peces va de ligera a alta, dependiendo de la especie y del compuesto. El maloxón es un metabolito producido por la oxidación del malatión, en los organismos o en el suelo, siendo 40 veces más tóxico que el malatión (Montenegro, 2001).

CASTAÑETA

La castañeta, chanchita, acará o chata, habita en la parte sur de la cuenca del río Paraná en Argentina, todas las cuencas de Uruguay y cuencas costeras del sur de Brasil. Es un pez óseo perteneciente al orden Perciformes, familia *Cichlidae*, género *Australoheros*, especie *facetus*. Es un pez de hasta 30 cm de largo, con un cuerpo robusto y redondeado. Comprimido lateralmente, de perfil alto y aleta dorsal de base muy ancha con 5 a 7 radios espinosos. El extremo posterior de la aleta dorsal y anal es más largo en los machos. Su color es variable, normalmente tienen bandas verticales oscuras sobre fondo verdoso, pero en época de cría quedan casi negros con fondo marrón o naranja, también se oscurecen cuando se muestran agresivos. Habitan en lagos estanques ríos y arroyos donde hay poca corriente de agua y agua estancada. Son omnívoros, se alimentan de plantas, gusanos, larvas de insectos, moluscos y cangrejos. La castañeta vive emparejada de por vida y desova con temperaturas de 25 a 30 grados. La hembra pone 300 a 1000 huevos y luego de nacidos, los alevinos pueden ser adheridos a hojas de plantas cercanas a la superficie, siendo cuidados ferozmente hasta por ocho semanas. Estos peces pueden ser consumidos por lo que se introdujeron en algunos países asiáticos, siendo su carne muy sabrosa. Sin embargo su valor mayor es como pez ornamental, criándose por acuaristas de varias partes del mundo (Teixeira de Melo y col, 2011; Serra y col, 2014).

Charles Darwin (1809-1882) colectó 5 especies de peces nuevas para la ciencia en Maldonado, Uruguay, entre abril y julio del año 1833, 4 de ellas *Australoheros facetus*, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Jenynsia lineata* y *Cheirodon interruptus* ubicados exactamente en la Laguna del Diario en Maldonado, Uruguay (Calviño, 2007). *Cnesterodon decemmaculatus* y *Australoheros facetus* fueron determinados

como especies tolerantes y moderadamente tolerantes respectivamente a los cambios en la calidad del agua (Texeira de Mello, 2007), por tanto son especies útiles como bioindicadores en análisis ecotoxicológicos como los que presentamos en este trabajo.

ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL EN URUGUAY

Para valorar la contaminación en sistemas acuáticos existen varios factores importantes, uno de los cuales es la renovación y movimiento del agua a estudiar. En este sentido podemos considerar sistemas lóticos (como ríos y arroyos donde el agua corre) y sistemas lénticos (como lagos y lagunas donde hay poca corriente de agua). El comportamiento de los plaguicidas varía en ambos casos, impactando más en ambientes lénticos.

Desde hace casi 50 años y como resultado de la renovación conceptual sobre la conservación del medio ambiente, en los países industrializados se adopta como herramienta de prevención y contralor la Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) (Thorton, 2000). Las ERA son similares a las Evaluaciones de Impacto Ambiental (EIA) sin embargo las primeras tienen tanto características prospectivas como preventivas, mientras que las EIA son principalmente preventivas. Por tanto las ERA permiten evaluar actividades o agentes actuales o del pasado. En Europa la ERA es requerida para comercializar o producir sustancias químicas. Este tipo de análisis tiene tres etapas fundamentales que son: (a) la formulación del problema: se plantean hipótesis sobre posibles efectos de las actividades humanas sobre el ambiente; (b) el análisis de riesgo: se caracterizan las posibles formas de exposición al agente y sus efectos ecológicos; y por último (c) con todos estos datos se determina el riesgo y si es o no aceptable (de acuerdo a límites preestablecidos). Los plaguicidas son evaluados mediante modelos de alto nivel de precisión llamados FOCUS, donde se evalúa la exposición mediante las concentraciones reales.

Trabajos como el que presentamos en esta tesis (bioensayo con monoespecie en condiciones de laboratorio) no representan la real complejidad de los sistemas si bien puede ser utilizado en una primera etapa de la ERA. Por tanto se intenta utilizar

más estudios de campo, ensayos con varias especies, o estudios de microcosmos y mesocosmos que son sistemas intermedios entre los de laboratorio y los de campo (Sánchez, 2002).

En Uruguay existe mucha preocupación con respecto a los plaguicidas de uso agrícola, generalmente asociado al aumento en la agricultura intensiva y al uso extendido de glifosato. Si bien es un hecho que la importación de plaguicidas está creciendo año a año, son pocos los estudios de pesticidas en el ambiente. Existen datos de la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) de la presencia de residuos de DDT y lindano en peces de la zona de Salto Grande, que provienen de un muestreo preliminar con pocos ejemplares. Hay algunos datos sobre la detección de efectos del azinfosmetil (organofosforado) sobre la enzima colinesterasa en peces de una cañada, que luego fueron estudiados en laboratorio con mojarras, las cuales soportaron dosis mayores a las establecidas en la literatura, tal vez por generación de resistencia (CEUTA, 2006; Eguren, 2006).

En Uruguay al año 2006 estaban registradas más de 300 sustancias químicas utilizadas como herbicidas, plaguicidas y fungicidas . Entre los años 2000 y 2007 las importaciones de cipermetrina se multiplicaron 15 veces llegando a 33 toneladas anuales mientras que las de malatión se mantuvieron casi constantes rondando las 10 toneladas al año (Cárcamo, 2010).

Los organismos responsables de controlar nuestros ecosistemas acuáticos, agua, salud y ambiente son la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA, MGAP) encargada de regular la actividad pesquera y acuícola; la Dirección General de Sanidad Animal (DGSA, MGAP) que autoriza y regula los agrotóxicos; el Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT, MSP) que clasifica las sustancias químicas según su toxicidad; el Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) controlando el impacto ambiental, la OSE. que regula la calidad y uso del agua potable; la Prefectura Nacional Naval que apoya las actividades de contralor de la DINARA y las Intendencias Departamentales que entienden sobre los cuerpos de agua para recreación.

Para realizar control de la contaminación en ecosistemas naturales podemos valernos de la monitorización ambiental y de la monitorización biológica.

La monitorización ambiental es la evaluación directa de la contaminación por identificación, medición y toma de muestras de agua, aire y suelo. Son muestreos que siguen un protocolo para garantizar el procesamiento en el laboratorio donde frecuentemente se usan métodos llamados “multiresiduos” que determinan de forma simultánea y selectiva compuestos de diversas familias químicas. Otras formas de estimaciones puede realizarse por estudios de exposición de organismos vivos (colocación de jaulas de peces en ríos o lagos) o el estudio de organismos bentónicos filtradores que concentran sustancias.

La monitorización biológica por su parte consiste en la determinación de concentraciones de plaguicidas en diversos tejidos y fluidos de organismos vivos expuestos a los tóxicos (Ramírez y Lacasaña, 2001).

HIPÓTESIS

- ❖ Tanto la cipermetrina como el malatión son letales para los peces.
- ❖ Existe correlación entre la concentración de cipermetrina o malatión y el porcentaje de mortandad de peces expuestos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Determinar la toxicidad de cipermetrina y malatión para *Australoheros facetus* en condiciones de laboratorio.

Objetivos particulares

- ❖ Determinar CL50 96 horas para malatión y cipermetrina.
- ❖ Describir la sintomatología de la intoxicación aguda por estos tóxicos.
- ❖ Comparar la sensibilidad para ambos plaguicidas en esta especie y con otras especies de peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó cabo en el Instituto de Investigaciones Pesqueras Dr. Víctor Bertullo, consistiendo en bioensayos a nivel de laboratorio utilizando la especie autóctona, *Australoheros facetus*, criada en el bioterio propio.

Materiales de laboratorio

Instalación: Se utilizaron 9 acuarios de vidrio en total de 20 litros cada uno, el primero de ellos control negativo común a ambos plaguicidas, seguido de 4 acuarios para cipermetrina y 4 para malation provistos de filtro mecánico y salida de aire suministrada por turbina.

Cada acuario tiene un calefactor con termostato regulado para mantener una temperatura de alrededor de 25 °C.

Peces: *Australoheros facetus* obtenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Pesqueras (I.I.P.) provenientes de un mismo desove para minimizar la variabilidad genética. Tamaño entre 4 y 6 cm (juveniles). Se utilizaron 5 peces por acuario, alcanzando un número de 20 peces por cada ensayo, con un total de 60 peces para cipermetrina y 60 para malation mas 5 peces del control negativo común a ambos plaguicidas, 125 peces totales a lo largo de todo el trabajo de investigación.

Planillas para registro de datos: confeccionadas para la experiencia según Anexo 1.

Plaguicidas utilizados:

Cipermetrina:

Origen: India

Forma: concentrado emulsionante

Nombre comercial: Cipermetrina 25 agritec

Laboratorio: Agritec S.A

Principio activo: cipermetrina

Porcentaje en peso: 26.3 %

Contenido en volumen: 250 gramos /litro de principio activo.

Malatión:

Origen:Uruguay

Forma: concentrado emulsionante

Nombre comercial: Mercaptothion Beltrame

Laboratorio: Beltrame & cia

Principio activo: malatión

Grupo químico: órgano fosforado

Porcentaje en peso: 50 %

Contenido en volumen: 515 gramos/litro de principio activo.

Metodología

Para determinar la CL50, 96 horas, se utilizó la metodología recomendada por la *Environmental Protection Agency* de Estados Unidos (US EPA, 2002).

Se solicitó la autorización a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), siguiendo el protocolo sugerido para la utilización de vertebrados en ensayos de laboratorio.

Se realizaron 3 bioensayos experimentales tipo test estático (sin cambio de agua) según la siguiente metodología:

En cada bioensayo se utilizaron 4 concentraciones crecientes de cada toxico, las cuales se fueron ajustando según la sintomatología observada.

Se utilizaron 9 acuarios en total de 20 litros cada uno distribuyendo 5 peces seleccionados al azar por acuario, 1 acuario común para ambos plaguicidas como control negativo, 4 acuarios para cipermetrina y 4 para malation.

Luego de un día de adaptación se procedió a colocar en dichos acuarios concentraciones crecientes de cada tóxico (según bibliografía de otros peces), dejando uno como control negativo.

Se obtuvieron en el total de bioensayos 12 concentraciones para malation y 12 para cipermetrina con las cuales se realizó el cálculo de la CL₅₀ 96hrs. Se utilizó en el primer ensayo un rango mayor de concentración del tóxico y en los dos siguientes ensayos se trabajó ajustando las concentraciones para luego determinar la CL₅₀ 96 horas.

Para cipermetrina se utilizó las siguientes concentraciones:

0,01, 0,03, 0,06, 0,06 0,08, 0,1, 0,1 0,15, 0,2, 0,4 0,6 y 1 mg/l.

Para malatión se utilizó las siguientes concentraciones :

0,1, 1, 4, 5, 6, 8, 8,10,10, 12, 15, 15 mg/l.

Registro de parámetros: se controló diariamente la temperatura.

Registro de respuesta en peces: se registró dos veces por día signos clínicos de los peces y se registraron las muertes.

Dichos peces no fueron alimentados durante los días de ensayo, ni tampoco recibieron ningún tipo de medicación.

Cálculo de CL₅₀ 96 horas: Según recomendación y metodología propuesta por US EPA (2002) se utilizó como metodología de cálculo el método Probit por transformación logarítmica; utilizando el programa estadístico Statgraphic Centurión.

Aceptabilidad: Solo se aceptaron experiencias donde el grupo control presentó una sobrevivencia mayor al 90%.

RESULTADOS

CIPERMETRINA

Los resultados de los ensayos de toxicidad con cipermetrina se muestran en la Tabla 1.

La sintomatología observada es coherente con una depresión del sistema nervioso: primero se observó letargia, luego pérdida de equilibrio y finalmente peces agonizantes apoyados lateralmente en el fondo. La Tabla 2 muestra las tasas de mortalidad obtenidas con cada concentración del tóxico.

Tabla 1. Resultados obtenidos del total de 3 bioensayos de intoxicación de *Australoheros facetus* con dosis crecientes de Cipermetrina en agua expresados en mg/l y ordenados de menor a mayor en un periodo de 96hrs.

mg/l	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0	5 SS	5SS	5SS	5SS	5SS
0,01	5SS	5SS	5SS	5SS	5SS
0,03	1A4SN	1M4SS	4SS	4SS	4SS
0,06	5SS	5SS	5SS	5SS	5SS
0,06	5SS	5SS	5SS	5SS	5SS
0,08	1M1A3SS	4SS	4SS	4SS	4SS
0,1	5SN	5SS	5SS	1M4SS	4SS
0,1	2M3SS	1M1A1SS	1M1SS	1SS	1SS
0,15	1M4A	3M1A	1SS	1SS	1SS
0,2	2M3A	3M			
0,4	5A	5M			
0,6	5M				
1	5M				

Referencias: (M) muertos, (A) agonizantes, (SN) signos nerviosos, (SS) sin sintomatología clínica.

Tabla 2. Tasas de mortalidad de *Australoheros facetus* para el total de 3 bioensayos con concentraciones crecientes de cipermetrina en agua.

mg/l	Tasa Mortalidad
0	0
0,01	0
0,03	0,2
0,06	0
0,06	0
0,08	0,2
0,1	0,8
0,1	0,2
0,15	0,8
0,2	1
0,4	1
0,6	1
1	1

Luego de realizar un análisis Probit empleando el método de máxima verosimilitud se concluye que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de cipermetrina y la tasa de mortalidad, con un nivel de confianza del 95 % dado que el análisis de desviaciones da una $p = 0,0000$.

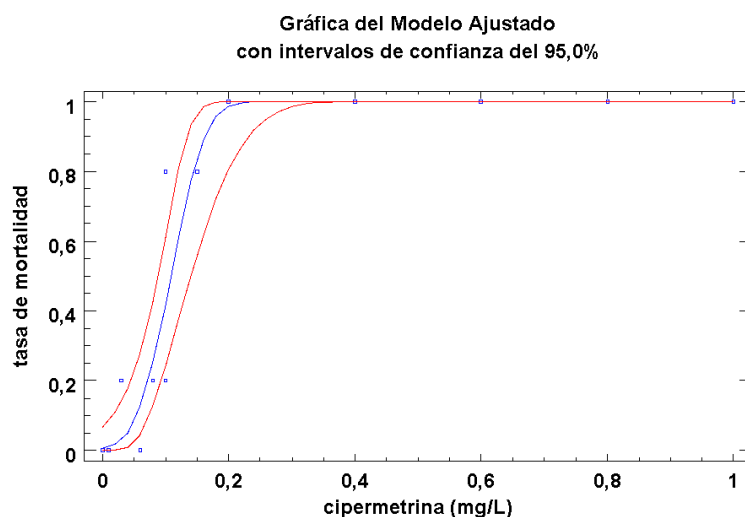
El modelo encontrado es:

$\text{Log de Tasa mortalidad} = -2,3615 + 21,4959 * \text{concentración cipermetrina en mg/L}$

Este modelo explica en 91,39 % de la variación de la variable. La curva ajustada se muestra en la figura 1.

La Concentración Letal 50, 96 horas es: $0,1114 \pm 0,0218 \text{ mg/L}$

Fig. 1. Curva que relaciona la tasa de mortalidad de *Australoheros facetus* con la concentración de cipermetrina en el agua.



MALATIÓN

Los resultados de los ensayos de toxicidad con malatión se muestran en la tabla 3. La sintomatología observada es similar a la anterior, caracterizándose por letargia, pérdida de equilibrio y peces agonizantes. La tabla 4 muestra las tasas de mortalidad obtenidas con cada concentración del tóxico.

Tabla 3. Resultados obtenidos del total de 3 bioensayos de intoxicación de *Australoheros facetus* con dosis crecientes de Malatión en agua expresados en mg/l y ordenados de menos a mayor en un periodo de 96 hrs.

mg/l	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0	5 SS	5SS	5SS	5SS	5SS
0,1	5SS	5SS	5SS	5SS	5SS
1	5SS	5SS	5SS	5SS	5SS
4	5SN	5SN	5SN	5SS	5SS
5	5SS	5SN	5SN	5SN	5SS
6	5SN	5SS	5SS	5SS	5SS
8	1M4SN	3M 1SN	1M		
8	1M4SN	3M1A	1M		
10	4M1A	1M			
10	5SS	1A4SN	3M2A	2SN	2SS
12	3M2A	2M			
15	2M3SN	3M			
15	1M4A	4M			

Referencias: (M) muertos, (A) agonizantes, (SN) signos nerviosos, (SS) sin sintomatología clínica.

Tabla 4. Tasas de mortalidad de *Australoheros facetus* resultado del total de 3 bioensayos con concentraciones crecientes de Malatión en agua.

mg/l	Tasa Mortalidad
0	0
0,1	0
1	0
4	0
5	0
6	0
8	1
8	1
10	1
10	0,8
12	1
15	1

Luego de realizar un análisis Probit empleando el método de máxima verosimilitud se concluye que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de malatión y la tasa de mortalidad, con un nivel de confianza del 95 % dado que el análisis de desviaciones da una $p= 0,0000$.

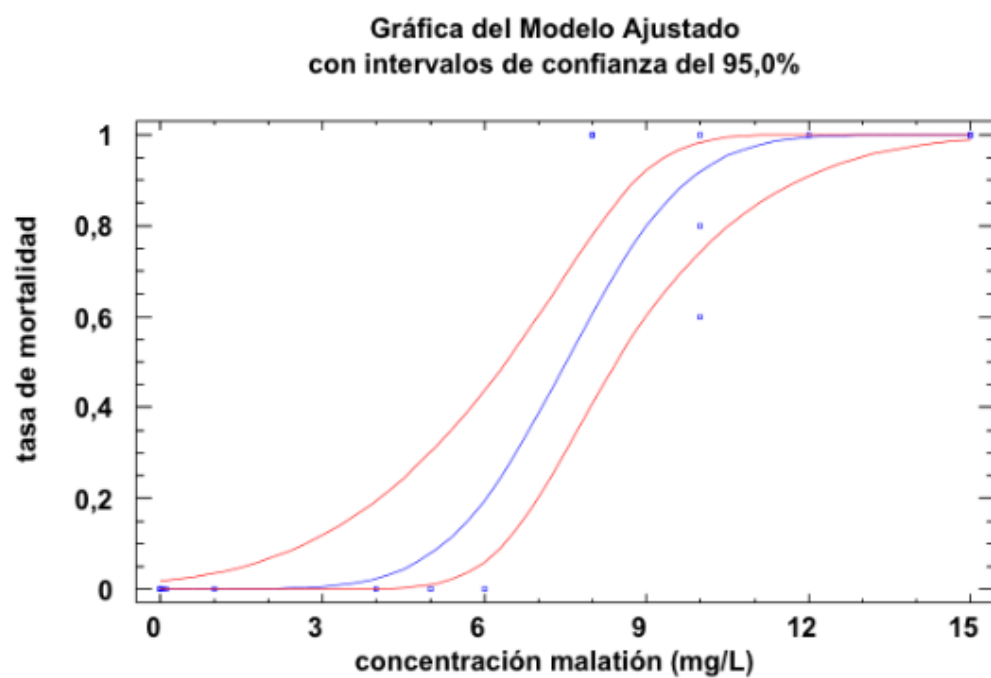
El modelo encontrado es:

Log de Tasa mortalidad = $-4,2526 + 0,5656 \cdot \text{concentración malatión en mg/L}$

Este modelo explica en 81,10 % de la variación de la variable. La curva ajustada se muestra en la figura 2.

La Concentración Letal 50, 96 horas es: $7,5182 \pm 0,9209 \text{ mg/L}$

Fig. 2. Curva que relaciona la tasa de mortalidad de *Australoheros facetus* con la concentración de malatión en el agua.



DISCUSIÓN

Tanto las instalaciones empleadas como los peces demostraron ser aptos para bioensayos de toxicidad. La metodología recomendada por US EPA (2002) permitió emplear un número reducido de peces para llegar a los resultados.

Piretroides

En cuanto a la toxicidad de piretroides en peces se toma una escala decreciente de DELTAMETRINA>CIPERMETRINA>FENVALETRATO>PERMETRINA (Haya, 1989). Como la mayoría de los piretroides la cipermetrina resulta altamente tóxica tanto a campo como en laboratorio. Para peces de agua dulce (Parma De Croux y col. 2002) estiman una CL50 entre 0.4 y 2.8 mg/L.

Para *Cichlasoma dimerus* se hallaron valores de CL50-96 horas de cipermetrina de 18,87 ug/L (16,97-20,95) ubicándose en un rango de sensibilidad medio comparado con otras especies (Dimitrovic, 2000).

Un estudio de toxicidad de cipermetrina realizado en *Cnesterodon decemmaculatus* utilizando concentraciones entre 0,6 y 7,8 ug/L muestra que en la concentración más alta se evidenciaron signos de estrés con alteraciones en la cantidad y amplitud de los movimientos operculares indicando dificultad para respirar normalmente. La mortalidad fue del 7% con la menor concentración y con la mayor fue del 100%. El análisis Probit reveló que para *Cnesterodon decemmaculatus* la CL50 24 hs es de 2.62 ug/L y la CL50 96 hrs fue de 1.84 ug/L (Parma De Croux y col, 2002)

Paracampo (2013) trabajando con *Cnesterodon decemmaculatus* estudió la toxicidad para cipermetrina en el agua de escorrentía de arroyos de la pampa encontrando una CL50 de 0,43 ug/L, la que resultó de menor magnitud que la obtenida en laboratorio, interpretándose la diferencia como resultado de la interacción entre el pesticida, la materia orgánica y los sólidos suspendidos en el arroyo. Además se evaluó la persistencia de toxicidad según el momento de aplicación en el cultivo. En estos trabajos que comparan la toxicidad para peces en condiciones de laboratorio con las halladas en experimentos de campo se consiguen elementos de mejor aplicación para evaluaciones ecotoxicológicas.

Otros investigadores también estudiaron la toxicidad relativa de insecticidas comparando ensayos de laboratorio y de campo. Empleando juveniles de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a piretroides, endosulfán y clorpirifós, encontraron que cuando se realizaron estudios de campo en limnocorrales los resultados fueron muy diferentes a los de laboratorio, presentando CL₅₀ menores. Estos autores postulan que la materia orgánica suspendida en el agua de los ecosistemas naturales interactúa con los insecticidas. Se encontró una toxicidad relativa decreciente de endosulfan, clorpirifós y cipermetrina (Aparicio y col., 2017; Carriquiriborde, 2017).

En nuestro caso la CL₅₀ 96 horas encontrada (0,11 mg/L) fue superior a la encontrada para *C. dimerus* y *C. decemmaculatus* (0,02 mg/L y 0,0004 - 0,002 mg/L respectivamente), por lo que *A. facetus* sería más resistente a este tóxico.

Organofosforados

En cuanto al malatión se encontro en un trabajo realizado en Egipto resultados de CL₅₀ 96hs para *Tilapia nilotica* y *Cyprinus carpio* de 1,98 mg/L y 16,6 mg/L respectivamente, por lo que la susceptibilidad de las distintas especies puede diferir bastante (Hasan y col, 1993).

Reddy y Bashamohideen (1988), informan que para *Cyprinus carpio*, la toxicidad del malatión expuesto en laboratorio es de una DL₅₀ igual a 9,8-10,04 mg/L con una concentración máxima de seguridad de 3.2 mg/L.

Beyers y col (1994) establecieron CL₅₀ estimadas mediante análisis probit para malatión en dos especies de la familia Cyprinidae, el pez piel roja (*Ptychocheilus lucius*) y el cola de caballo (*Gila elegans*) en 9,14 mg/L (8,36-10,0) y 15,3 mg/L (14,4-16,4) respectivamente.

El cangrejo *Chasmagnathus granulata* es una especie muy característica del “cangrejal”, comunidad que va desde el litoral de Brasil incluyendo Uruguay y Argentina y son importantes como alimento de peces de interés comercial que se desarrollan en el estuario. Se establecieron las DL₅₀ en 96hs en condiciones de laboratorio, tomando dos anchos de caparazón diferentes, obteniendo los valores de

13 ug/L (el más fino) y 19 ug/L (el más ancho) y un valor único para ambos anchos utilizando deltametrina de 0,27 ug/L. Se compararon con los hallados por Vittozi y De Angelis en 1991 para peces de interés comercial como *Cyprinus carpio* (0,6 ug/L), *Salmo gairdneri* (1,4 ug/L) y *Poecilia reticulata* (0,15 ug/L) resultando, como era de esperar, el cangrejo más sensible al malatión que los peces. (Ferrero y col, 2001).

Nuestra investigación encontró para *A. facetus* una CL₅₀ 96 hs de 7,52 mg/L que resulta intermedia entre valores encontrados para *T. nilótica* (1,98 mg/L y para *C. carpio* 9,8-16,6 mg/L). Por otro lado parecería que la deltametrina es mucho más tóxica ya que arrojó valores de CL₅₀ 96 hs entre 0,0006 y 0,0014 mg/L en diferentes especies de peces.

CONCLUSIONES

- Según los resultados obtenidos podemos concluir que tanto la cipermetrina como el malatión son letales para los peces y producen sintomatología nerviosa similar.
- Existe una correlación positiva entre la concentración de ambos tóxicos en el agua y el porcentaje de mortandad en peces.
- La especie en estudio (*Australoheros facetus*) resultó ser mucho más sensible a la cipermetrina ($CL_{50} = 0,1114 \pm 0,0218$ mg/L) que al malatión ($CL_{50} = 7,5182 \pm 0,9209$ mg/L).
- *A. facetus* resultó más resistente que otros peces a la cipermetrina y su resistencia al malatión fue intermedia entre valores encontrados para otros peces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonzo M.C., Heuhs L., de Ben S. (1999). Estudio epidemiológico de las intoxicaciones por plaguicidas en Uruguay – Fase piloto del proyecto del PISQ/OMS sobre armonización de registro de datos y análisis de la exposición humana a plaguicidas. Ministerio de Salud Pública. Dirección General de Salud. División Epidemiología. Departamento Protección de Salud. Salud Ambiental. Área Seguridad Química.
2. Aparicio V., Gonzalo E., Costa J. (2017). Plaguicidas en el ambiente. Buenos Aires, INTA 156p.
3. Aparicio V., De Gerónimo E., Hernández K., Pérez D., Portocarrero R., Vidal C. (2015). Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. Buenos Aires, INTA. 73p.
4. Badii M.H., Varela S.(2008). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente CULCyT 5(28):5-17
5. Beyers D.W., Carlson C.A., Keefe T.J. (1994). Toxicity of carbaryl and malathion to two federally endangered fishes as estimated by regression and ANOVA. Environmental Toxicology and Chemistry 13(1):101-107
6. Burger J. (1997). Methods for and approaches to evaluating susceptibility of ecological systems to hazardous chemicals. Environ. Health. Perspect. 105: 843-848.
7. Calviño P. (2007). Precisión sobre la localidad tipo de cuatro especies de peces de aguas continentales colectadas por Charles Darwin, en Maldonado, Uruguay. Bol. Killi Club Argent. (BIBKCA) 13: 40-51.
8. Cárcamo M.I. (2010). Agrotóxicos hunden pesca artesanal de agua dulce-RAPAL, Uruguay.
Disponible en: www.rapaluruquay.org/agrotoxicos/Uruguay/agrotoxicos_hunden.htm
Fecha de consulta: 15/8/18

9. Carriquiriborde, P. (2017). Evaluación de riesgo ecológico de plaguicidas en ecosistemas acuáticos pampeanos: impactos estimados sobre la comunidad de peces. En Aparicio V., Gonzalo E. y Costa J. (eds.) Plaguicidas en el ambiente. Buenos Aires, INTA p:11-32.
10. Carriquiriborde, P.(2009). Laboratory to field extrapolation in assessment. , IX Congreso SETAC Latinoamerica Society of Environmental Toxicology and Chemistry Branch Latin- American, Lima, Peru.
11. Carriquiriborde, P.; Díaz, J.; Mugni, H.; Bonetto, C.; Ronco, A. (2007). Impact of cypermethrin on stream fish populations under field use in biotech-soybean production. Chemosphere, 68: 613–621
12. CEUTA (2006). Agrotóxicos en uruguay : miradas desde los afectados. Montevideo, Red ONG Ambientalistas-DINAMA-MVOTMA. 38p.
13. Cheng, (1990). Status of the rule in Kaon Decay. International Journal of Modern Physics A 4:495-582.
14. Correa, A. (2011). Manual de Registro de Plaguicidas de Centroamérica. Roma, FAO, 55p.
15. Dimitrovic H. (2000). Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a cipermetrina en ensayos de toxicidad aguda. Corrientes, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. 4p.
16. Eguren.(2006). en CEUTA (ed.) Agrotóxicos en Uruguay : miradas desde los afectados. Montevideo, Red ONG ambientalistas-DINAMA-MVOTMA 58p.
17. Ferrero, A., Gutiérrez, M., Cervellini, P. (2001). Evaluación en laboratorio de la toxicidad aguda de los insecticidas malatión y deltametrina en *Chasmangathus granulata* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). Investigaciones marinas 29(1):107.
18. Haya, Katsuji (1989). Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates. Environmental toxicology and chemistry 8(5) 381-391
19. Henao S, Nieto O. (2004). Insecticidas organoclorados, piretrinas y piretroides. Medellín, INCAP-UNED, MDE-025. 48p.

20. Hassan I.M., Abdallah M.A., Naguib M.M., AbouDonia M.A. (1993). Toxicidad, distribución, acumulación y pérdida de cocción de malatión en tejidos de tilapia y peces comunes de carpa. *Grasas y Aceites* 44(6):339-344
21. INCHEM (1989). Cypermethrin, environmental health criteria 82. International Programme of Chemical Safety.
Disponible en: www.inchem.org/documents/ehc/ehc82.htm
Fecha de consulta : 9/18
22. Li Shao-nan, Fan De -fang (1996). Correlation between biochemical parameters and suceptibility of freshwater fish to malathion. *Journal of Toxicology and Enviromental Health*, 48: 413-418.
23. Marques Santana, L., Borges,Cavalcante, R. (2016). Transformações Metabolicas de Agrotóxicos em Peixes: Uma revisao. *The Electronic Journal of Chemistry*. Jul2016 Número especial 8(4):257-268
24. Montenegro R.A. (2001). Informe sobre los riesgos sanitarios y ambientales del malathion. Cordoba, Argentina. INCISO 9.2 RAP-AL Uruguay
25. Neme C., Ríos M., Zaldúa, N., Cupeiro S. (2010). Aproximación a la normativa vigente sobre plaguicidas y sus impactos ambientales. Montevideo, Vida Silvestre. 45p.
26. Paracampo, A. (2013). Toxicidad de pesticidas, ensambles de peces y su relación con las características limnológicas de los arroyos pampeanos. Tesis Doctorado en Ciencias Naturales, Univ. Nac. De La Plata. 174p.
27. Parma De Croux, M., Lotesta, A., Campana, M.(2002). Toxicidad aguda del piretroide cipermetrina en *Poeciliareticulata* y *Cnesterodondecemaculatus*. *Revista FABICIB* 6 (69-74)
28. Pathiradne A., Giorge S.G.(1998). Toxiciy of malathion to Nyle tylapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other enviromental contaminants aquatic toxicology 43:261-271
29. Ramírez, J.A., Lacasaña, M.(2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivo prevención de riesgos laborales*, 4(2):67-75

30. Reddy P.M., Beshamohiddeen M. (1988). Toxicity of Malathion to the fish Cyprinos Carpio. *Environment and Ecology* 1988.6:2 488-490. 6(2)488-490
31. Ríos M., Zaldúa N., Cupeiro S.,(2010). Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay Pág. 66 – 70.
32. Rios M., Zaldúa N., Oyhantacabal G., Suárez C., Martino D. (2010). Uso de plaguicidas y fertilizantes situación en Uruguay. Montevideo, Vida Silvestre. 9p.
33. Sánchez , P. (2002). Madrid. Valoración ecotoxicológica de la contaminación de origen agrario. Incorporación de bioensayos en los protocolos de evaluación del riesgo ambiental. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas P 1-7
34. Santana L., Cavalcante R. (2016). Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: Uma revisão. *Orbital: Electron. J. Chem.* 8:257-268.
35. Schelegel , C.R. (2009). Adecuación al área mediterránea de la evaluación de riesgo del medio ambiente de productos fitosanitarios. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Ecología Pág. 18
36. Serra S., Bessonart, J., Teixeira de Mello F. Duarte A., Malabarba L., Loureiro M. (2014). Peces del Río Negro. Montevideo, MGAP-DINARA. 208p.
37. Spinetti M. y Seigneur G. (2009). Programa de conservación de fauna íctica y los recursos pesqueros del Río Uruguay. Informe anual. C.A.R.U. P139
38. Texeira de Mello, F. (2007). Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del Río Santa Lucía. UDELAR. Facultad de ciencias. Programa maestría en ciencias ambientales. Pág. 44-45
39. Texeira de Mello, F.; Gonzalez-Bergonzoni, I., Loureiro M. (2011). Peces de agua dulce de Uruguay. PPR-MGAP. 188p.
40. Thornton J. (2000). Beyond risk: an ecological paradigm to prevent global chemical pollution. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 6: 318-330

41. US EPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washington, US Environmental Protective Agency. 256p.
42. Vitozzi L., De Angelis G. (1991). A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic toxicology* 19:167-204
43. Manual de plaguicidas de Centroamerica.
Disponibile en: www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/ecotoxicologia.
Fecha de consulta: 13/10/18