

Trabajo Original

Ecotoxicología

Toxicidad aguda del Herbicida químico Glifosan en larvas de la rana cubana: *Osteopilus septentrionalis*.

María Elisa Alea Reyes¹, Onelio Carballo Hondal², José Trujillo Hernández³,
María Antonia Torres Alemán.

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Calle 222 y 27 La Coronela. La Lisa. Ciudad de La Habana Cuba. Teléfono 250-11-70. e-mail: alea@oc.minjus.cu; mariatorres@infomed.sld.cu

²Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta ave y 248, Barlovento, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono 537-2097875. e-mail: oneliach2006@yahoo.com.br

³ Centro Nacional de Ecotoxicología. Avenida 31 y 114. Marianao. Ciudad de La Habana. Cuba. e-mail: ecotox@infomed.sld.cu

Resumen

El Glifosan, herbicida químico postemergente de acción sistémica, está compuesto por un 41% de Glifosato agente activo en forma de sal de isopropilamina, y un 59% de aditivos como surfactantes, solventes y adyuvantes.

Existe abundante bibliografía sobre la toxicidad de diversas formulaciones que contienen Glifosato agente activo, sobre organismos acuáticos, siendo escasa la referida al Glifosan Formulación Final. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad del Glifosan sobre larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis*.

Se desarrolló un sistema de ensayo estático de 96 horas de duración, donde se evaluó el Glifosan Formulación Final y el Glifosato agente Activo a las concentraciones de 15; 17; 19; 22; 25 y 28 mg/L y 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 y 100 mg/L , respectivamente.

Las variables analizadas fueron las siguientes: Observación de signos de toxicidad mortalidad y la LC50.

Durante el tiempo de ensayo se pudo observar la presencia de signos de toxicidad en los grupos tratados con Glifosan Formulación Final a las concentraciones de 19; 22 y 25 mg/L. Mientras que a la concentración de 28 mg/L se observó un 100% de mortalidad, con valores de LC50 a las 96 horas de 20,817 mg/L para larvas de rana *Osteopilus septentrionalis* en estadio 25 (E-25).

El Glifosato agente activo a las concentraciones evaluadas no produjo signos de toxicidad ni mortalidad para larvas de ranas *O.septentrionalis*.

Palabras clave: *Osteopilus septentrionalis*, Glifosan, Herbicida, Toxicidad Aguda.

Abstract

The Glyphosan is a chemical herbicide of post-emergence systemic action, whose formulation contains 41% active substance Glyphosate as isopropilamine salt and 59% of additives such as surfactants, solvents and adyuvants.

The toxicity of different formulated products containing Glyphosate to aquatic organisms has been widely reported, however it was considered as low with respect to the end formulation Glyphosan. Therefore, the aim of this study was to determine the toxicity of Glyphosan to larvae of frog, *Osteopilus septentrionalis*.

A system of static test of 96 hours was development, where the final formulation Glyphosan and active substance Glyphosate were evaluated at concentrations of 15, 17, 19, 22, 28 mg/L and 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100 mg/L respectively.

The analyzed variables were as follows: observation for signs of toxicity, LC50 and mortality.

During the time of testing, the presence of signs of toxicity was revealed in the cluster treated with end formulation Glyphosan at concentrations of 19, 22 and 25 mg/L, and showed 100% of mortality in larvae of *Osteopilus septentrionalis* at concentration of 28 mg/L with an LC50 of 20.817 mg/L at 96 hours in stage 25.

The toxicity and mortality data showed that the active substance Glyphosate was non toxic to larvae of *O. septentrionalis* at assay concentrations.

Keywords: *Osteopilus septentrionalis*, Glyphosan, herbicide, acute toxicity.

Introducción

La actividad agropecuaria en el mundo en los últimos años, ha experimentado un incremento en el rendimiento de las cosechas asociado al aumento de la producción de sustancias químicas o biológicas, con el fin de combatir diversas plagas, lo que conlleva al aumento de la liberación de dichas sustancias al medio ambiente.

El uso indiscriminado de estos productos lleva consigo un riesgo potencial para los seres humanos y el medio ambiente, principalmente por las consecuencias drásticas que han ocasionado en la biodiversidad de los agroecosistemas.^{1,2}

La valoración del riesgo ambiental de plaguicidas es regulada por un proceso que debe seguirse para obtener la autorización y comercialización de estos productos en el mercado, que fue introducido por primer vez en Europa, con la aprobación de la Directiva 91/414/EEC y modificada recientemente en la legislación vigente, la Directiva 2001/36/CE, que está constituida por una serie de procedimientos destinados a conocer la toxicidad, ecotoxicidad y el comportamiento ambiental de cada producto químico o biológico de interés, para ser registrado como sustancia activa y autorizado su uso como producto formulado en el ámbito nacional, como establece la Comunidad Europea.³

La determinación de la ecotoxicidad se ha convertido en uno de los aspectos más importantes a evaluar, cuando se trata de contaminación en un ecosistema. Para estas determinaciones se utilizan diferentes bioensayos con organismos acuáticos y terrestres, siendo estos los mejores bioindicadores de cualquier efecto de toxicidad en el medio ambiente.

Existe una amplia bibliografía acerca de los efectos tóxicos que provocan dichos productos al hombre y al medio ambiente, siendo los organismos acuáticos los más vulnerables a su exposición, lo que ha despertado el interés de investigadores cubanos en la realización de estudios ecotoxicológicos, y de esta forma evaluar el impacto ambiental de estas formulaciones en ecosistemas acuáticos.

El Glifosan presenta acción herbicida sobre malezas en diferentes cultivos, como plátano, arroz, caña de azúcar, entre otros, y se presenta generalmente en forma de concentrado soluble (CS48), para su estudio, fue dividido en dos subgrupos: Glifosato

agente activo en forma de sal de isopropilamina al 95% de pureza y Glifosan Formulación Final que integra al primero en un 41%, en conjunto con un 59% de aditivos.⁴

El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad del Herbicida químico Glifosan sobre larvas de ranas de la especie *Osteopilus septentrionalis* como organismo de ensayo, según lo regulado por la EPA.^{5,6,7,8}

Materiales y Métodos

En este estudio se empleó como sustancia de ensayo la Formulación Final Glifosan utilizada en la agricultura como Herbicida, y el Glifosato agente activo presente en la misma.

Para el estudio se utilizó larvas de la rana cubana *Osteopilus septentrionalis*, especie con abundante representatividad ecológica, miembro de la cadena trófica, con buena disponibilidad y adecuabilidad para pruebas de laboratorios y adecuada información sobre su biología y ecología.^{6,7,8}

Los huevos de *O.septentrionalis* se colectaron de su ambiente natural en estanques plásticos, entre vegetación espesa, simulando las condiciones de hábitat de la especie. Fueron adaptados a las condiciones de laboratorios y luego de eclosionados las larvas fueron seleccionadas para los experimentos.⁸

Las larvas utilizadas para las pruebas fueron sanas, sin malformaciones en su cuerpo, encontrándose en el estadio 25 según clasificación de Gosner 1960⁹, con peso corporal entre 0,008-0,020 g, considerándose el criterio de que al existir diferencias entre las tallas, las mayores no deberán ser el doble de las más pequeñas.

Las condiciones ambientales para el período de adaptación y del ensayo coinciden manteniendo los siguientes parámetros: Iluminación: Fotoperíodo de 12 horas X 12 horas, Temperatura: 23-25°C, pH de la solución: 6,5-8,5, dureza del agua: 10-300 mg CaCO₃/L.

Diseño experimental

El ensayo se desarrolló en un sistema estático para la determinación de la toxicidad provocada por el Glifosan Formulación Final y el Glifosato agente activo, sobre larvas de ranas *Osteopilus septentrionalis*.

La prueba se llevó a efecto siguiendo las Guías ASTM y ANFITOX, cumpliendo con las regulaciones de las buenas prácticas de laboratorio para este ensayo.¹⁰

La duración del estudio fue de 96 horas y la ruta de exposición de las sustancias de ensayo fue directamente en el agua de dilución, mezclándose y dejando reposar una hora, para lograr uniformidad y homogeneidad en la solución.

Transcurrido el tiempo las larvas son introducidas en los recipientes de ensayo, cuidando de que no se dañen y sufran el menor estrés posible.

Se realizó un estudio preliminar en la Formulación Final y el agente activo a la concentración de 100 mg/L. No se pudieron observar signos de toxicidad en el Glifosan Formulación Final, debido a la ocurrencia de un 100% de mortalidad en el grupo tratado, por lo que se realizaron curvas a concentraciones menores.

Se utilizaron concentraciones de 0,01;0,1;1,0;10,0 y 100 mg/L para el control negativo y el agente activo, y concentraciones de 15,17,19,22,25 y 28 mg/L para la Formulación Final.

Las larvas se distribuyeron aleatoriamente, 20 por grupos a razón de 10 larvas en cada réplica, en frascos de 400 mL .

Las observaciones se realizaron durante las 96 horas que duró el ensayo, donde los criterios para definir ocurrencia de mortalidad fueron: Pérdida de movimiento y falta de reacción al contacto suave, para mayor seguridad pueden observarse las larvas en el estereoscopio.

Si se observan signos de toxicidad, los criterios para definir este parámetro fueron los siguientes: Pérdida del equilibrio (Pe), Pérdida del reflejo (Pr), Arqueamiento en la cola (Ac) y Natación errática (Ne).

Para la determinación de la LC50 se utilizó el programa Probit de la EPA y el Dunnett para la significación estadística.^{11,12}

Resultados y Discusión

Durante el ensayo no se observaron signos de toxicidad ni mortalidad en los grupos control negativo y Glifosato agente activo, a concentraciones entre 0,01 y 100 mg/L, resultados que coinciden con los reportados en la literatura en diferentes especies de ranas como *Lymnodinastes dorsalis*, *Heleioporus eyrei* y *Crinia insignifera*, al ser expuestas al Glifosato agente activo, obteniendo valores de LC50 a las 48 horas de 400, 373 y 466 mg/L respectivamente.

Varios autores plantean que el Glifosato agente activo en concentraciones adecuadas, no es capaz de provocar toxicidad en diversos organismos, pero si el mismo es incorporado a formulaciones en conjunto con surfactantes, se plantea que los últimos son los responsables de la toxicidad de dichas formulaciones sobre organismos acuáticos preferentemente.^{13,14,15,16,17}

Sin embargo el comportamiento del Glifosan Formulación Final sobre larvas de rana *O.septentrionalis* fue diferente, permitiendo observar la presencia de signos de toxicidad y mortalidad, durante el tiempo de duración de la prueba. Siendo necesario realizar tres curvas de ensayo a diferentes niveles de concentración.

En la curva número uno a las concentraciones de 0,01;0,1;1,0;10,0 y 100 mg/L con factor de espaciamiento de 0,1, no se observó signos de toxicidad en ninguna de las larvas expuestas, pero en la concentración de 100 mg/L se observó un 100% de mortalidad, surgiendo así la curva número dos, con valores de concentración de 10;16;25;40;63 y 100 mg/L con factor de espaciamiento de 0,5, según muestra la tabla 1, donde a valores de 25 mg/L se produjo más del 50% de mortalidad, y las larvas sobrevivientes presentaron signos de toxicidad como pérdida del equilibrio, natación errática y pérdida del reflejo, mientras que a concentraciones superiores a 25 mg/L se observó un 100% de mortalidad.

TABLA 1. Signos de toxicidad y por ciento de mortalidad en larvas a las 96 horas expuestas al Glifosan.

Concentraciones mg/L	Mortalidad (%)	Signo de toxicidad
Control negativo	0	0
10	0	0
16	0	0
25	70	Pe, Ne, Pr
40	100	-
63	100	-
100	100	-

Donde:

Pe: Pérdida del equilibrio **Ne:** Natación errática **Pr:** Pérdida de reflejo

Debido a los resultados anteriores fue necesario realizar la curva de ensayo número tres, utilizando tres grupos con dos réplicas cada uno, con valores de concentración de 15; 17; 19; 22; 25 y 28 mg/L y factor de espaciamento de 0,05.

Los signos de toxicidad mostrados en la tabla 2, comenzaron a manifestarse a la concentración de 17 mg/L, con predominio de natación errática, manteniéndose en la concentración de 19 mg/L, pero el aumentar el nivel de concentración aparecieron nuevos signos de toxicidad, siendo más severos a 25 mg/L, mientras que a la concentración de 28 mg/L fue imposible observarlos por ocurrir un 100% de mortalidad a las 24 horas de exposición en los tres grupos de ensayo.

Tabla 2. Signos de toxicidad en larvas a las 96 horas expuestas al Glifosan

Grupos	Concentraciones mg/L						
	Control	15	17	19	22	25	28
1	0	0	Ne	Ne	Ne,Pr,Pe	Ne,Pr,Pe,Ac	-
2	0	0	Ne	Ne	Ne, Pr	Ne,Pr,Pe,Ac	-
3	0	0	Ne	Ne	Ne,Pr,Pe	Ne,Pr,Pe,Ac	-

Donde:

Pe: Pérdida del equilibrio **Ne:** Natación errática **Pr:** Pérdida de reflejo
Ac: Arqueamiento de la cola

La aparición de las primeras larvas muertas se observaron a la concentración de 17 mg/L en el primer grupo de ensayo, mientras que en el resto de los grupos aparecieron a la concentración de 19 mg/L, observándose un aumento en el número de larvas muertas en los tres grupos a medida que las concentraciones fueron superiores,

siendo más severa a 28 mg/L, con un 100 de mortalidad en todos los grupos, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Por ciento de mortalidad de las larvas expuestas al Glifosan a las 96 horas.

Grupos	Concentraciones mg/L						
	Control	15	17	19	22	25	28
1	0	0	40	60	85	90	100
2	0	0	0	5	25	90	100
3	0	0	0	25	75	95	100

El coeficiente de variación (CV) obtenido fue de 12,45%, considerándose bueno según la literatura reportada que plantea que un método ecotoxicológico cumple con esta propiedad cuando el CV es menor de 30%.

El valor de LC50 medio obtenido a las 96 horas para la Fomulación Final fue de 20,817 mg/L, resultando ser superior a valores reportados para otras formulaciones que contienen el mismo agente activo. Entre ellas se encuentra el Roundup y Touchdown, constituidos por un 41 y 49,9% de agente activo (Glifosato) respectivamente, que han sido estudiadas en la especie *Litoria moorei* obteniendo valores de LC50 a las 48 horas de 2,9 y 10,4 mg/L respectivamente para cada formulación¹⁴.

Existen reportes de estudios de toxicidad con la formulación Glifos, conteniendo un 41% de agente activo (Glifosato), en ranas de las especies: *Crinia insignifera*, *Lymnodinastes dorsalis*, *Heleioporus eyrei* y *Litoria moorei*, mostrando los siguientes signos de toxicidad: Deformaciones craneales, oculares, encorvamiento de la cola. Con valores de LC50 a las 48 horas entre 8,1-32,2.¹⁸

En la especie *S. nasicus*, la misma formulación provocó alteraciones en la estructura del cartílago branquial, destrucción del colágeno y un 100% de mortalidad a concentraciones superiores a 4,8 mg/L.¹⁹

El Glifosan en comparación con el resto de las formulaciones que contienen Glifosato agente activo, ha resultado ser menos tóxico para larvas de ranas *O.septentrionalis* en E-25, que las mencionadas formulaciones en diversas especies.

Los efectos tóxicos de estas formulaciones no están dirigidos solo a organismos acuáticos aunque estos han resultado ser los más vulnerables, los organismos terrestres y el hombre no están desprovistos de sufrir sus consecuencias.

Conclusiones

El Glifosato agente activo no provocó signos de toxicidad ni mortalidad a concentraciones menores de 100 mg/L de disolución, mientras que el Glifosan Formulación Final mostró signos de toxicidad y mortalidad en larvas de ranas *O.septentrionalis*, con valor de LC50 de 20,817 mg/L, clasificándose como ligeramente tóxico.

Referencias Bibliográficas

1. Peña E de la, Gomez EC. Evaluación toxicológica de los Plaguicidas y la Sanidad ambiental. Murcia: AET, 2000.
2. Uhart M, Zaccagnini ME. Manual de procedimientos operativos estandarizados de campo para documentar incidentes de mortalidad de fauna silvestre en agroecosistemas. Argentina: INTA ;1999.
3. Comision del consejo relativa a la comercializacion. Directiva 2001/36/CE. Diario Oficial jun20;2001.p.1-38
4. Glifosan48 herbicida postemergente. www.wagropick.com/glifosan.htm-20k
5. United Status Environmental Protection Agency. Usepa (1989). Short-Term Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organism. 2n Edition.
6. Alvarez Perez. EJ. MSc.et.al, (2006) -Tesis presentada en opción al grado científico de: Maestro en ciencias. Evaluación ecotoxicológica del Biofungicida Gluticid en medio acuático. Unuversidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Centro Nacional de Toxicología.
7. Carballo Hondal, O. MSc. et. al, (2003) -Tesis presentada en opción al grado científico de: Maestro en ciencias. Estudios ecotoxocológicos del Bionematicida Hebernem. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Centro Nacional de Toxocología.
8. Environmental protection Agency. Methods for acute toxicity test fish, macroinvertebrate, and amphibians . Ecol Res ser. EPA -660/3-75009/S1/: EPA;1975.
9. Gosner KL. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification. Herpetology 16:183-190
- 10.Herkovits. J, Pérez. Coll. C. Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio (ANFITOX). basado en Bufo arenarum. Test agudo (ANFIAGU). Crónico corto (ANFICOR). Crónico (ANFICRO) Y de Estadios Tempranos del Desarrollo (ANFIEMB). Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS);1995.42:24-30;43:50-55
- 11.Environmental Protection Agency. Dunett. Programa versión 1.5 Ecological

Monitoring Research /s.l/;EPA1989.

12. Knie J; A; Juhnke I, Schiller W. Results of Studies on Chemical Substances with Four Biotests. Dtsch. Gewaesserkd. Mitt. 1983 27(3);77-9.
13. Morell. Ignacio, candela. Lucila. (1998). Plaguicidas: Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Universidad Politécnica de Catalunya Books. google. com. cu/books?isbn84 8021 2403
14. Salomon. K. R. et. al, (2005) - Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de cultivos ilícitos mediante la espersión aérea con el herbiciada Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Colombia. <http://www.mindefensa.gov.co>
15. Bidwel. J R, Gorie, J R. (1995): Acute toxicity of a herbicide to selected frog species. Perth, Department of Environmental protection. Technical Series 79.
16. Mann. M. R, Bidwel. RJ, Tyler MJ. (2003). Toxicity of Herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: A case study from Western ustralia. www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=2004 3048500.
17. BCPC. 2002-2003. The e-Pesticide Manual. Tomlin CDS, Ed. Farnham. S, UK: British Crop Protection Council.
18. Lajmanovich. R, Lorenzatti. E, Maitre. MA.I, Peltzer. P. Comparative acute Toxicity of the commercial herbicide Glyphosate to neotropical tadpoles Scinax nacicus (ANURA: Hylidae). FEB. 2003; 12(4): 364-367.
19. Lajmanovich. R. C, Sandoval. M.T, Peltzer. P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in Scinax nacicus. Tadpoles exposed to Glyphosate formulations. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70:612-618

Recibido: 14/08/08

Aceptado: 29/08/08