UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

CENTRO EULA CHILE

INFORME FINAL

Determinación del posible impacto de la cipermetrina y deltametrina en el medio marino y su efecto en *Mytilus chilensis*.

ABRIL, 2013

Tabla de contenido

1 INTRODUCCIÓN 4
2 OBJETIVO 1: "REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE INFORMACIÓN ECOTOXICOLÓGICA EN ORGANISMOS MARINOS CON LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS CIPERMETRINA Y DELTAMETRINA". 5
2.1 Alcance 5
2.2 Metodología 5
2.3 Resultados 6
2.3.1 Cipermetrina 6
2.3.2 Deltametrina 20
3 OBJETIVO 2: "DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA DE PIRETROIDES EN LA ETAPA LARVAL DE MYTILUS CHILENSIS Y SUS EFECTOS EN LA FIJACIÓN, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS". 27
3.1 Evaluación de toxicidad aguda y crónica de piretroides en la etapa larval de *Mytilus chilensis* bajo condiciones controlada. 27
3.1.1 Cipermetrina 27
3.1.2 Deltametrina 32
3.2 Experimentos/bioensayos de toxicidad crónica de piretroides sobre el metabolismo de larvas veliger en *Mytilus chilensis*. 37
3.2.1 Metodología 37
3.2.2 Resultados del Estudio 40
3.2.3 Discusión y Conclusiones 44
4 OBJETIVO 3: "EVALUACIÓN DE EXPOSICIÓN, DETERMINACIÓN DE DISPERSIÓN Y DILUCIÓN DE PIRETROIDES". 46
4.1 MODELACION DE PIRETROIDES 46
4.1.1 Modelo de Fugacidad 46
4.1.2 Metodología 46
4.1.3 Resultados 48
4.2 MONITOREO AMBIENTAL DE PIRETROIDES EN CENTROS DE CULTIVOS 49
4.2.1 Área de Estudio 49
4.2.2 Metodología de Análisis 54
4.2.3 Resultados 55

5 OBJETIVO 4: “ESTUDIO GONADAL EN MYTILUS CHILENSIS” 56
5.1 METODOLOGÍA 56
5.1.1 Procesamiento tisular y tinción 56
5.1.2 Cipermetrina 57
5.1.3 Deltametrina 60
6 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO 64
7 REFERENCIAS 66
ANEXO OBJETIVO 1 71
ANEXO OBJETIVO 2 79
ANEXO OBJETIVO 3 83

1 INTRODUCCIÓN

Los piretroides sintéticos cipermetrina y deltametrina han sido ampliamente utilizados para el control de plagas en cultivos de animales, siendo de alta eficacia a muy bajas concentraciones. La utilización requerida por la industria del salmón de estos productos es básicamente usar estos ingredientes activos en formulaciones de ciertos medicamentos para tratar infestaciones provocadas por el piojo de mar *Caligus rogercresseyi* en la etapa de engorda en los centros de cultivo.

En Chile, a la fecha no se han realizado estudios acerca del efecto de la cipermetrina y deltametrina sobre los mitílidos. No obstante, se han sugerido diferentes hipótesis, entre las cuales se hace mención a que la menor captación de semillas de mitílidos generada en el último tiempo, podría ser consecuencia de complicaciones fisiológicas que afectan los desoves a causa de la posible toxicidad de los piretroides usados en la industria salmonera.

La subsecretaria de Pesca mediante el presente estudio espera dilucidar a nivel experimental la hipótesis mencionada con anterioridad. El cual tiene como objetivo general el "Determinar el posible impacto de la cipermetrina y deltametrina en el medio marino y su efecto en *Mytilus chilensis".* Para lograr el objetivo general, el presente estudio cuenta con los objetivos específicos que a continuación se detallan.

1. Revisar detalladamente la literatura internacional disponible a la fecha sobre los estudios del efecto de cipermetrina y deltametrina en organismos acuáticos.
2. Determinar la toxicidad aguda y crónica de la cipermetrina y deltametrina en la etapa larval de *M. chilensis* y su efecto en la fijación de las mismas, bajo condiciones controladas.
3. Determinar la dispersión y dilución de cipermetrina y deltametrina en el medio natural después del tratamiento de un centro.
4. Determinar el efecto de la cipermetrina y deltametrina en el desarrollo gonadal de *M. chilensis.*

2 OBJETIVO 1: "REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE INFORMACIÓN ECOTOXICOLÓGICA EN ORGANISMOS MARINOS CON LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS CIPERMETRINA Y DELTAMETRINA".

2.1 Alcance

Los ensayos de toxicidad con organismos acuáticos son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional y empleados en muchos países, como herramienta para el monitoreo y control de la contaminación acuática. Es usual encontrar trabajos donde se considere una gran cantidad de ensayos que involucre una serie de organismos correspondientes a diversos niveles tróficos (Castro *et al*., 2002). Los bioensayos evalúan los efectos tóxicos de la contaminación en organismos vivos, en la práctica cuantifican la relación concentración-efecto de compuestos químicos o mezclas complejas, por medio de respuestas biológicas medidas bajo condiciones controladas y estandarizadas, es así como podemos encontrar bioensayos agudos y/o crónicos.

Los piretroides son un grupo de pesticidas artificiales desarrollados para controlar insectos. Este surgimiento fue un intento del hombre por igualar efectos insecticidas de las piretrinas naturales, las cuales se venían utilizando desde 1850. Compuestos piretroides se caracterizan por ser sustancias químicas de muy baja solubilidad en agua y volatilidad, sin embargo su carácter hidrofóbico (log Kow > 6) permite deducir su afinidad por la parte orgánica disponible en el ambiente (Hazardous Substances Data Bank, 1999), siendo un factor importante a considerar en el momento de realizar pruebas de toxicidad.

2.2 Metodología

Mediante el apoyo de la base de datos ECOTOX (USEPA) se efectuó una búsqueda detallada de las publicaciones realizadas hasta la fecha sobre efectos adversos de los compuestos piretroides en organismos marinos. ECOTOX cuenta con la entrega de información pública mediante la pagina web www.epa.gov/ecotox. Este sitio web incluye enlaces para muchos documentos y otras herramientas ecotoxicológicas disponibles.

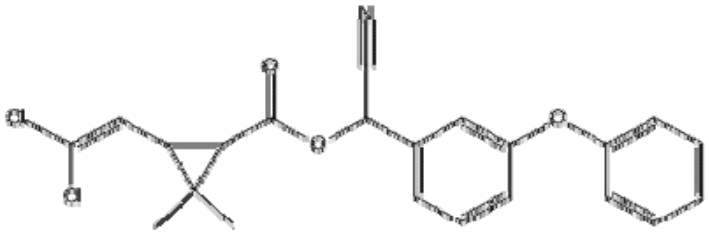
Posteriormente, luego del *"screening"* completo entregado por ECOTOX se procedió a efectuar la búsqueda detallada de artículos científicos de interés mediante la base de datos ISI WEB OF KNOWLEDGE; WEB OF SCIENCE, GOOGLE SCHOLAR y SCIENCE DIRECT, teniendo acceso directo a artículos científicos publicados en revistas de corriente principal, además de consultar en aquellas revistas indexadas en SCIELO. La información clasificada y analizada con un particular énfasis en efectos descritos de compuestos

piretroides (cipermetrina y deltametrina) sobre mitílidos, en distintos estadios de desarrollo.

2.3 Resultados

2.3.1 Cipermetrina

Estructura química:



En la Tabla 1, se presentan algunas características físico-químicas de cipermetrina como persistencia, log Kow y potencial de bioacumulación, entre otras.

Tabla 1. Características físico-químicas de cipermetrina.

Parámetro	Valor Documento	Referencia
Número de Registro CAS	52315-07-8	Tomlin, (1994) The Pesticide Manual (A World Compendium), 10th Edition, BCPC, Cambridge, UK.
Formula Molecular	$C_{22}H_{19}C_{l2}NO_3$	Tomlin (1994)
Peso Molecular (g/mol)	416.3	Tomlin (1994)
Presión de Vapor (Pa) a 20˚C	2.3×10^{-7}	Tomlin (1994) – también seleccionado por Siebers y Mattusch (Chemosphere, 33 (8), 1597-1607, 1996)
Solubilidad Agua (mg/l)	0.01	Kidd, H and James, DR (1991) The Agrochemical Handbook 3rd ed Cambridge 1991
Coeficiente Partición (log Kow)	Log P = 6.3	WHO 1989

Factor de Bioconcentración en Peces (log FBC)	2.63	Haitzer M. *et al.* (1998) *Chemosphere* 37, 1335-1362
Hidrólisis en agua 25ºC	14 días	Chapman & Cole (1982). *Env Sci Health* B17 487-504 1982.
Persistencia en sedimentos	5 días	Leahey, J.P. 1985.

Los efectos de las sustancias químicas en el ambiente, dependen de variados factores atribuibles a su toxicidad intrínseca, pero también a factores ambientales que modulan su biodisponibilidad y persistencia. Es importante determinar entonces si después de la aplicación normal del producto, especies no blanco de acción al plaguicida puedan ser afectadas bajo condiciones de campo ya sea por toxicidad aguda o crónica. Por otro lado, sustancias químicas pueden tener múltiples modos de acción. Esto es importante desde el punto de vista de las investigaciones ecotoxicológicas (Barata & Baird, 2000), ya que las concentraciones de estas sustancias generan diferentes efectos, que pueden causar diversas alteraciones en los organismos que habitan el ecosistema (Calow *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 2001).

Al igual que otros piretroides, cipermetrina es tóxico en peces en condiciones de laboratorio (WHO, 1989). En invertebrados acuáticos, se observa un amplio rango de susceptibilidad al compuesto (Stephenson, 1982) particularmente en crustáceos decápodos marinos, demostrado una elevada susceptibilidad a concentraciones de 0,05 µg/L. (Zitko *et al.*, 1979).

2.3.1.1 Bioensayos en Organismos Marinos

Crustáceos

Toxicidad en *Mysidopsis bahía*: el propósito de este estudio fue estimar la toxicidad aguda y crónica de cipermetrina (49.59 mg/ml., concentración de ingrediente activo) en camarones (*M. bahía*). La toxicidad aguda (CL_{50}) es definida como la concentración letal en la cual el 50% de la población expuesta muere. Por otro lado, la toxicidad crónica puede ser definida por la concentración de efecto no observado (NOEC) que corresponde a la mayor concentración del compuesto ensayado a la cual se exponen los organismos y no causa el efecto evaluado. *M. bahía* fue expuesto a concentraciones nominales en un rango de 0.03 – 20.0 ng/L. Después de las 96 horas de exposición a cipermetrina, se determinó el CL_{50} para cipermetrina de 0.69 (0.23 – 1.40) ng/L y un NOEC de 0.16 ng/L.

Moluscos

Toxicidad en *Crassostrea gigas*: el propósito de este estudio fue estimar la toxicidad aguda y crónica de cipermetrina (51.17 mg/ml., concentración de ingrediente activo) en ostras (*C. gigas*). La toxicidad aguda (CE_{50}) es definida como la concentración efectiva en la cual el 50% de la población de ostras presenta anormalidad en sus embriones por un tiempo de exposición de 24 horas. *C. gigas* fue expuesta a concentraciones nominales en un rango de 32.0 – 3200.0 µg/L. Después de las 24 horas de exposición a cipermetrina, se determinó la CE_{50} para cipermetrina en *C. gigas* fue de 1395.2 µg/L, con un NOEC de 32.0 µg/L.

Organismos meiobentónicos

Toxicidad en *Corophium volutator*: el propósito de este estudio fue estimar la toxicidad aguda y crónica de cipermetrina (51.17 mg/ml., concentración de ingrediente activo) en anfípodos marinos. *C. volutator* fue expuesto a concentraciones nominales en un rango de 0.0005 – 0.05 µg/L a 240 horas de exposición. Después de 10 días de exposición a cipermetrina, la CL_{50} fue de 0.0024 (0.0007 – 0.0086) µg/L y el NOEC de 0.0008 µg/L.

Toxicidad en *Corophium volutator* (ensayo en sedimento): el propósito de este estudio fue estimar la toxicidad aguda y crónica de cipermetrina (51.17 mg/ml., concentración de ingrediente activo) en anfípodos. *C. volutator* fue expuesto a concentraciones nominales en un rango de 2 – 200 mg/kg sedimento de cipermetrina. Después de los 10 días de exposición a cipermetrina, la CL_{50} fue de 42.10 (18.40 – 96.35) mg/kg sedimento y el NOEC fue de 20 mg/kg sedimento.

2.3.1.2 Información en Literatura

Los sedimentos acuáticos proporcionan un hábitat para muchos organismos que juegan una rol clave en los ecosistemas acuáticos. Comunidades microbianas, algas bentónicas, hongos y protozoos forman la base de las cadenas tróficas acuáticas dándole un funcionamiento importante en el flujo de nutrientes y contaminantes, es por esto que, efectos negativos en los sedimentos acuáticos a causa de la presencia de pesticidas como la cipermetrina puede afectar seriamente el ecosistema.

Crustáceos

Los crustáceos marinos son particularmente vulnerables y susceptibles a los efectos tóxicos de piretroides (Fairchild *et al*., 1992). Aunque los piretroides son considerados, en general, insecticidas de menor riesgo, pueden mostrar una prolongada vida media en el

ambiente dependiendo de las condiciones del medio y/o conjunción con otros factores (Estesen *et al*., 1979). Estudios de laboratorio revelan la sensibilidad de camarones marinos a la exposición a cipermetrina con valores de CL_{50} entre 0.0012 µg/L y 0.11 µg/L (Clark *et al.*, 1989; Cripe, 1994). Medina *et al.*, 2004, analizó el efecto de cipermetrina en comunidades marinas planctónicas. La aplicación de cipermetrina en la columna de agua mostró una rápida disipación lo que generaría efectos negativos sobre la composición de organismos zooplanctónicos. Hill (1985), en un estudio con camarones (*Mysidopsis bahia*) determinó que la CL_{50} (96 hrs.) es de 0.005 µg/L. Burrigde *et al.* (2000) evaluó los efectos de cipermetrina en el crustáceo *Homarus americanus*. En este estudio se observó que adultos (estado IV) fueron afectados a las concentraciones más altas y a los tiempos más prolongados, pero no hubo mortalidades. Por otro lado distintos estadios larvales y postlarvales del crustáceos *Homarus americanus*, reportaron CL_{50} (48 hrs.) en estado I (0.18 µg/L.), estado II (0.12 µg/L.), estado III (0.006 µg/L.) y primer estado postlarval (0.12 µg/L.) sin diferencias significativas entre estadios.

Estudios con otros crustáceos y peces marinos son reportados en la Tabla 2, donde se observa que el rango de CL_{50} para crustáceos marino va desde 0.005 µg/L para el camarón *Mysidopsis bahia* y 0.20 µg/L para el cangrejo *Uca pugilator*.

Tabla 2. Toxicidad de cipermetrina en crustáceos.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	Referencia
Mysidopsis bahia	0.005	Hill, 1985
Mysidopsis bahia	0.056	ERL/GB
Palaemonetes pugio	0.016	Clark *et al.*, 1987
Penaeus duorarum	0.036	Hill, 1985
Homarus americanus	0.040	Mcleese *et al.*, 1980
Crangon septemspinosa	0.010	Mcleese *et al.*, 1980
Uca pugilator	0.20	Hill, 1985
Homarus americanus (I)*	0.18	Burrigde *et al.,* 2000
Homarus americanus (II)*	0.12	Burrigde *et al.,* 2000
Homarus americanus (III)*	0.006	Burrigde *et al.,* 2000
Homarus americanus (postlarva)*	0.12	Burrigde *et al.,* 2000

a=48 horas b=96 horas (crecimiento de la concha) *Estadios

Moluscos

La bioacumulación de cipermetrina también podría ser posible en moluscos marinos causando efectos perjudiciales en la salud de los organismos. Por lo tanto, *Mytilus edulis* ha sido sugerido como especie de monitoreo biológico en la exposición y efectos de cipermetrina por Davies *et al.* (2001). Ensayos toxicológicos utilizados para constatar el efecto de cipermetrina en moluscos consisten en medir la estabilidad de la membrana lisosomal en los eritrocitos para evaluar el estado de salud de los organismos (Lowe & Pipe, 1994). Otro estudio con *Mytilus edulis* realizado por Gowland *et al*. (2002) mostró que exposiciones a una concentración nominal de 1000 µg/L de cipermetrina, no generaría efectos en la membrana lisosomal de los eritrocitos, sin embargo se observaron cambios en el comportamiento de las conchas, concordando con resultados obtenidos por Kontreczky *et al.* (1997) en *Anodonta cygnea*. La explicación de esto estaría dada por dos mecanismos de acción; primero que al absorber cipermetrina, esta actuaría directamente en las fibras del músculo aductor causando involuntariamente el cerrado de la valvas, y la segunda explicación sería que los propios moluscos detecten la presencia de cipermetrina y voluntariamente cierran sus valvas para no seguir filtrando (Davenport, 1977).

Para el caso moluscos como la ostra *Crassostrea virginica* se registró un CE_{50} (96 hrs.) de 370 µg/L, basándose en el crecimiento del tamaño de la concha, mientras que en *Crassostrea gigas* se determinó un CL_{50} (48 hrs.) de 2300 µg/L, basándose este estudio en el desarrollo larval. La Tabla 3 muestra las CL_{50} en moluscos reportados por diferentes autores.

Tabla 3. Toxicidad de cipermetrina en moluscos marinos.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	Referencia
Crassostrea virginica	370	Hill, 1985
Crassostrea gigas	>2300	Hill, 1985
Mya arenaria (larva)	>10000[a]	Pahl and Opitz 1999
Crassostrea gigas	>1001[b]	Boyle et al., 1995b
Unio elongatulus eucirrus	59,2	Kroprucu et al., 2010

a= 12 hrs. b= 48 hrs.

Equinodermos

Equinodermos como erizos y estrellas de mar han sido organismos de prueba para ensayos de toxicidad. En larvas del erizo *Strongylocentrotus droebachiensis* se ha observado letalidad a concentraciones de >10000 µg/L a 12 hrs. de exposición del compuesto cipermetrina (Pahl and Opitz 1999). Por otro lado, para la estrella de mar *Asterias rubens* fue reportado una CL_{50} de >1000 µg/L a 96 hrs. de exposición (Knigh et al., 1995b). La Tabla 4 muestra las CL_{50} en equinodermos reportados por diferentes autores.

Tabla 4. Toxicidad de cipermetrina en equinodermos.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	Referencia
Strongylocentrotus droebachiensis	>50	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
Strongylocentrotus droebachiensis (Larva)	>10000[a]	Pahl and Opitz 1999
Asterias rubens	>1000	Knigh et al., 1995b

a= 12 hrs

Peces

Con respecto a peces marinos las CL_{50} más bajas reportadas en literatura están dadas por la especie *Salmo salar* una CL_{50} de 2.0 µg/L (McLeese et al., 1980), mientras que *Cyprinodon variegatus* mostró una CL_{50} de 1.0 µg/L (Hill, 1985). La Tabla 5 muestra las CL_{50} en peces reportados por diferentes autores.

Tabla 5. Toxicidad de cipermetrina en peces marinos.

Especies	**CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)**	**Referencia**
Gasterosteus aculeatus	8,1	Laboratorio de Toxicología Env. Canada.
Cyprinodon variegatus	1	Hill, 1985
Salmon salar	2	McLeese et al., 1980
Scophtalmus maximus	>1000[a]	Boyle et al., 1995a
Scophtalmus maximus	15[b]	Boyle et al., 1995a

a= 24 hrs. b=48 hrs.

2.3.1.3 Comparación Ecotoxicológica

Toxicidad aguda:

Cipermetrina presenta un amplio registro de pruebas de toxicidad aguda (Figura 1), en el cual se determina la concentración que genera la mortalidad del 50% de los organismos expuestos a una concentración dada (CL50%). Dentro de esta prueba de toxicidad se encuentran organismos representantes de crustáceos (C), anélidos (A), equinodermos (E), bivalvos (B) y peces (P).

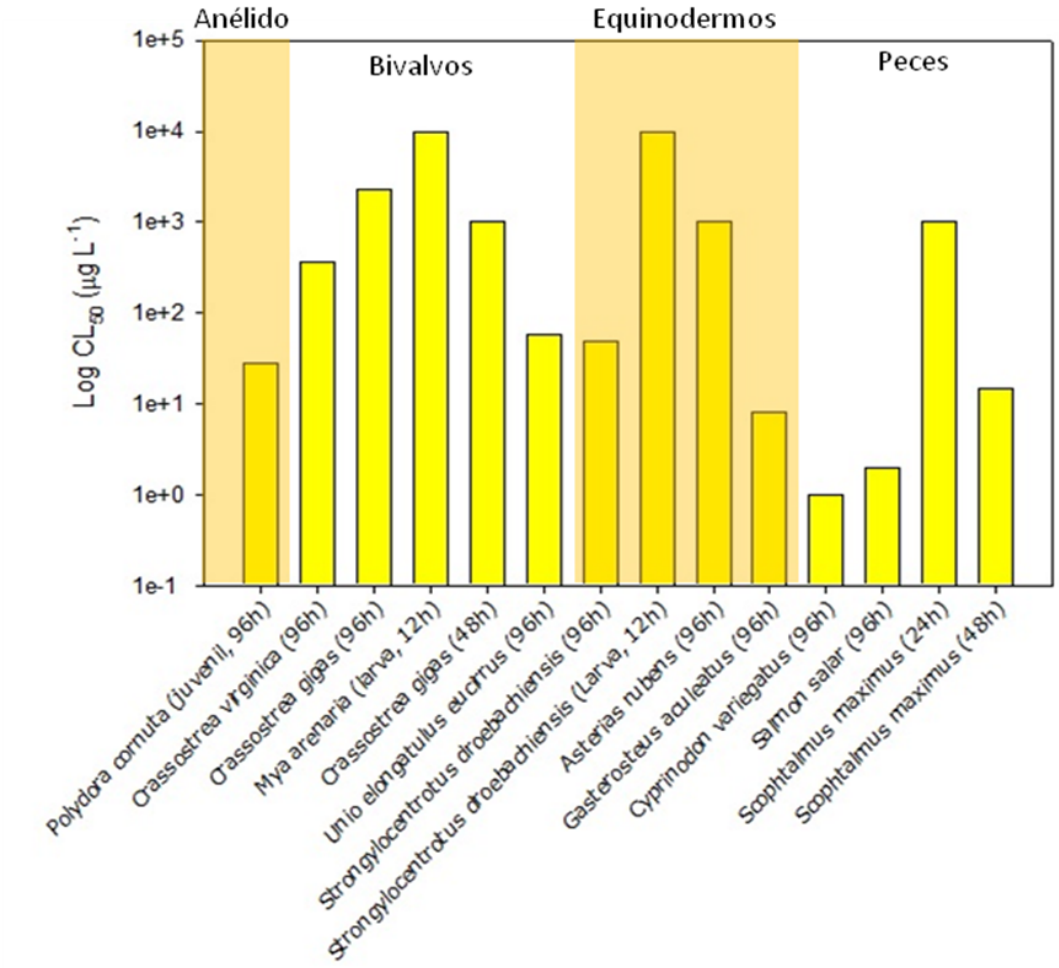


Figura 1. Representación gráfica de toxicidad aguda (CL50) para diferentes organismos marinos.

Información ecotoxicológica sobre organismos crustáceos son entregados en la Figura 2. Dentro de este grupo son considerados estudios realizados con copépodos, langostas, camarones, cirripedios y anfípodos. Además de la determinación de CL50 se incluyó dentro de esta gráfica la concentración efectiva donde se produce un efecto esperado en el 50% de los organismos expuestos a una concentración dada (ej. Inmovilidad, CE50).

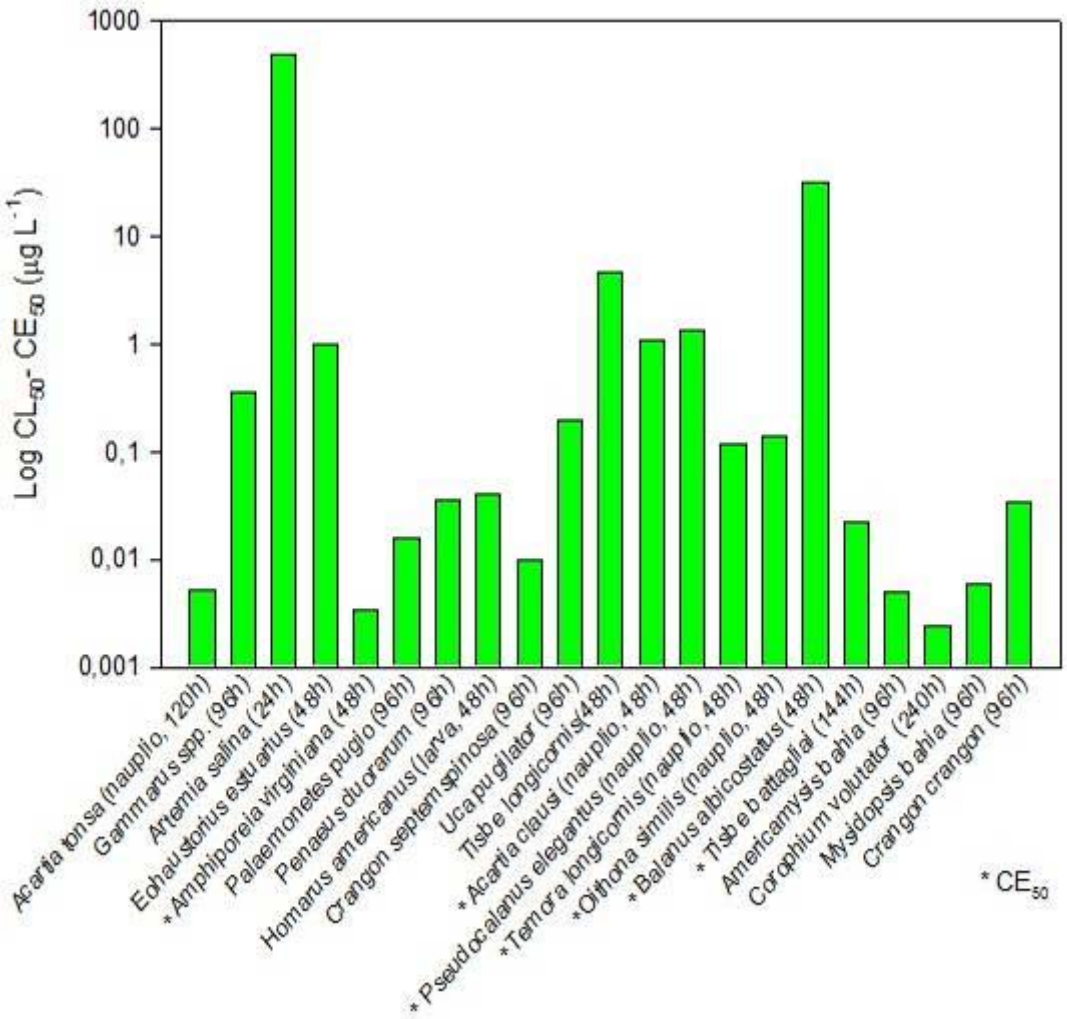


Figura 2. Representación gráfica de la toxicidad aguda en crustáceos marinos en ensayos de laboratorios realizados con cipermetrina. (*) Indica aquellos ensayos donde se determino la concentración efectiva, siendo su respuesta la inmovilidad en aquellos organismos ensayados.

Si se observa la escala logarítmica de concentraciones gran parte de los organismos crustáceos marinos presentan una mayor vulnerabilidad a niveles de exposición de ng/L, en comparación con otros representantes marinos. Por otro lado, ensayos realizados con sedimento y dosis administradas a organismos marinos como anélidos, anfípodos y langostas son representados en la Figura 3. El poliqueto *Arenicola marina* fue el único representante de los anélidos para esta gráfica.

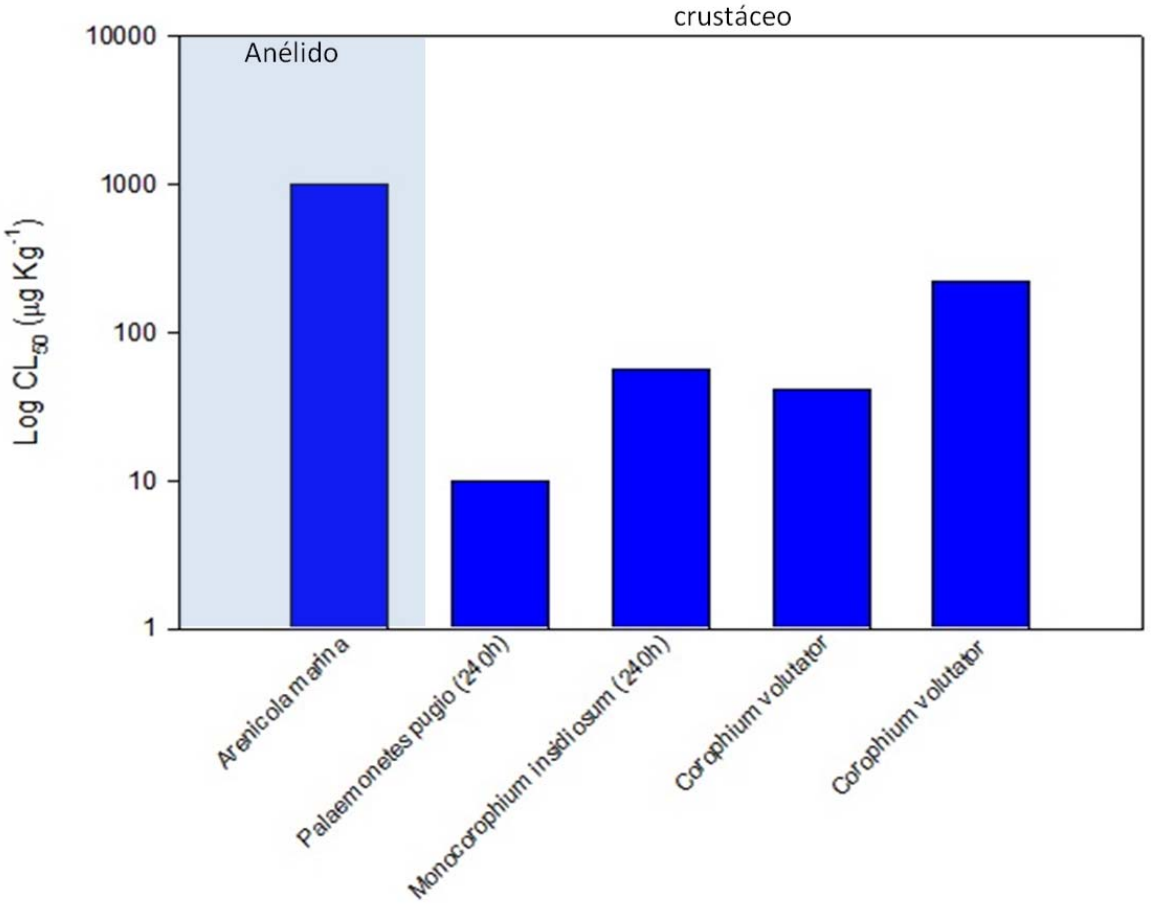


Figura 3. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos agudos (CL50, µg kg^{-1}) realizados con dosis administradas en sedimento y alimento en organismos marinos.

Toxicidad Crónica:

Mayormente estudios enfocado para evaluar toxicidad crónica de cipermetrina en organismos marinos está relacionada principalmente en la evaluación repreoductiva y alimenticia en crustáceos, generalmente copépodos (Barata et al., 2002; Willis and Ling, 2004). Otros estudios, con organismos bivalvos se relacionan al efecto en la apertura de valvas (Gowland et al., 2002b; Ait Ayad, et al., 2011), además de evaluación de estrés oxidativo (Gowland et al., 2002a; Kröprücü et al., 2010). Figura 4 muestra ensayos crónicos con representantes marinos tales como bivalvos, peces y equinodermos.

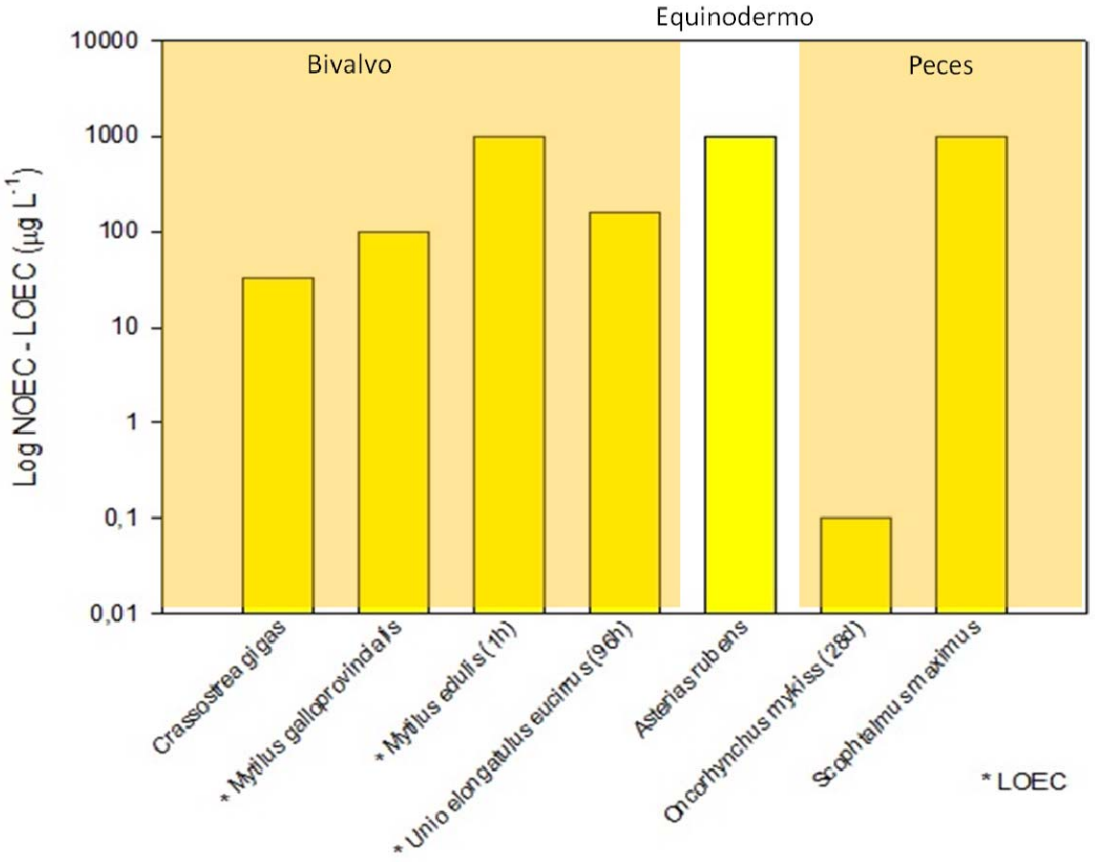


Figura 4. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos crónicos (NOEC Y LOEC) en bivalvos, peces y equinodermo.

La toxicidad crónica en crustáceos revela que muy bajas concentraciones se ven afectados representantes de crustáceos marinos, observándose concentraciones menores a 0,01 µg L^{-1}. El camarón *Mysidpsis bahia* (Aufderheide, 1999) y el copépodo *Acartia tonsa* (Milson, 1999a) son organismos de ensayos que mostraron ser mayomente afectados por cipermetrina (Figura 5).

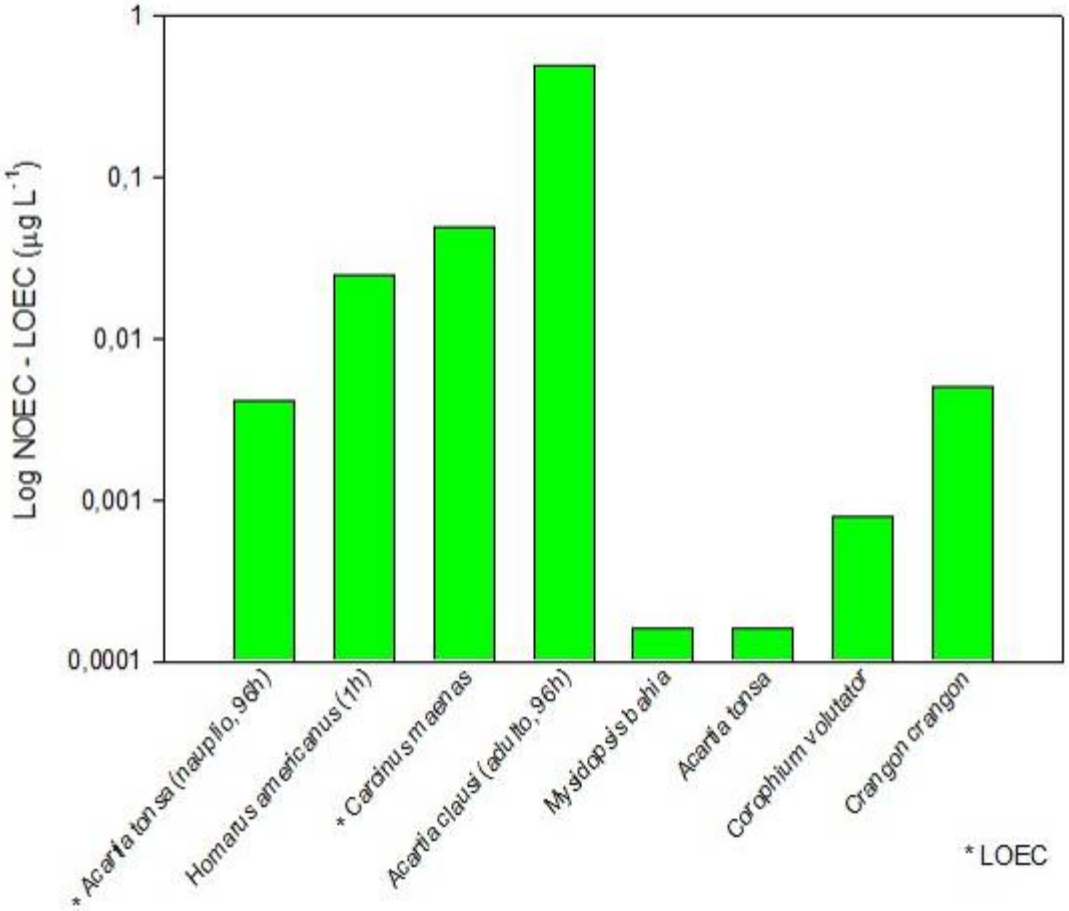


Figura 5. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos crónicos (NOEC Y LOEC) en crustáceos marinos.

En aquellos ensayos realizados en sedimento se observa muestra que el anfípodo marino *Corophium volutator* presenta alta sensibilidad frente a dosis de 20 µg Kg^{-1} (Milson, 1999b). Distinto fue para el poliqueto *Arenicola marina* que presentó un NOEC de 1 mg Kg^{-1} después de 10 días de exposición (SEPA 1998). En la Figura 6 son mostrados aquellos ensayos crónicos para organismos marinos.

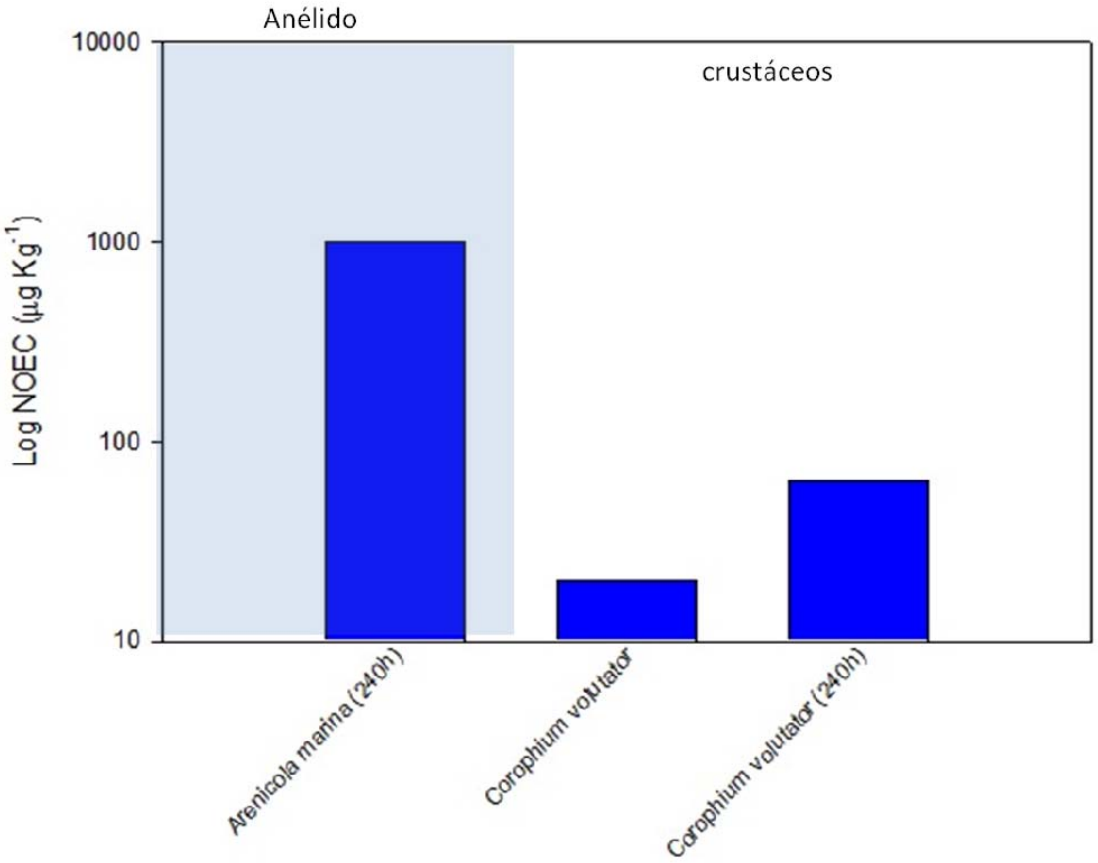


Figura 6. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos crónicos (NOEC Y LOEC) en sedimento.

2.3.1.4 Toxicidad de Cipermetrina según su formulación

La consideración de diversos enantiomeros dentro de compuestos piretroides ha demostrado la relación con su toxicidad en organismos (Liu *et al.*, 2005 & Leicht *et al.*, 1996). Sin embargo, en la mayoría de la literatura existente la enantioselectividad de piretroides no ha sido adecuadamente considerada.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los piretroides se utilizan en mezclas racemicas, el conocimiento del comportamiento ambiental de cada uno de los piretroides enantiómeros es de gran valor en la mejora de nuestra comprensión sobre los riesgos ecotoxicológicos asociados, beneficiando el estudio para otros compuestos quirales (Sujie *et al.*, 2006).

Para los animales de sangre caliente la toxicidad de los piretroides es baja, sin embargo para abejas y organismos acuáticos son sumamente tóxicos. Los valores de DL_{50} (Dosis letal donde 50% de una población muere) varían de acuerdo al isómero y su mecanismo de acción; por lo tanto, cada isómero debe tener una conformación espacial definida y

pequeñas variaciones de ella modifican notablemente la toxicidad. En general, se acepta que los isómeros *cis* son de mayor toxicidad que los *trans*, por lo que el conocimiento en la relación *cis*/*trans* de cada compuestos es de suma importancia a la hora de evaluar, procurándose mantener lo más baja posible, sin reducir su eficiencia (Milhaud *et al.*, 1982).

De aquellos productos comerciales usado por la industria del salmón se encuentra formulación de cipermetrina EXCIS (*cis* 40: *trans* 60) la cual se ha comprobado ser menos efectiva en los tratamientos contra el "piojo de mar", es por ello que se han buscados otras alternativas con una mayor eficiencia. Una de ellas es la formulación BETAMAX en donde cipermetrina se presenta en la proporción de *cis* 80: *trans* 20, siendo esta reformulación farmacológicamente más activa. En la Tabla 6 se aprecia toxicidad aguda y crónica evaluada para el producto EXCIS en diversos organismos marinos.

Tabla 6. Toxicidad de formulación EXCIS (1% de cipermetrina) en invertebrados marinos.

Especies	LC_{50}/ EC_{50} (µg/L.)	NOEC (µg/L.)	Referencia
Scophtalmus maximus	> 1000[b] 15.0[c]	1000 ND	Boyle, McHenery & Knight, 1995a
Skeletonema costatum	> 1000[d]	1000	Boyle, McHenery & Knight, 1995b
Asterias rubens	> 1000[e]	1000	Knigh, Boyle &, McHenery, 1995c
Arenicola marina	> 1000[*]	1000*	Knigh, Boyle &, McHenery, 1995b
Crassostrea gigas	> 1000[c]	1000	Boyle, McHenery & Knight, 1995b
Acartia tonsa	1.19[b] 0.89[c]	0.2 0.2	Knigh, Boyle &, McHenery, 1995a
Mysidopsis bahia	0.01[b] 0.006[e]	0.003 0.003	Boyle, Knight & McHenery, 1995a
Crangon crangon	0.47/0.16[a] 0.034/0.034[e]	0.05 0.005	Boyle & McHenery, 1995
Corophium volutator (sedimento)	225*	64*	Boyle, Knight & McHenery, 1995d
Corophium volutator (sin sedimento)	0.213[e] 0.169[f]	0.11 0.11	Boyle, Knight & McHenery, 1995c

a=3 horas b=24 horas c=48 horas d=72 horas e=96 horas f= 240 horas * µg/Kg.

Niveles de toxicidad para las diferentes formulaciones de isómeros en cipermetrina son mostrados en la Figura 7.

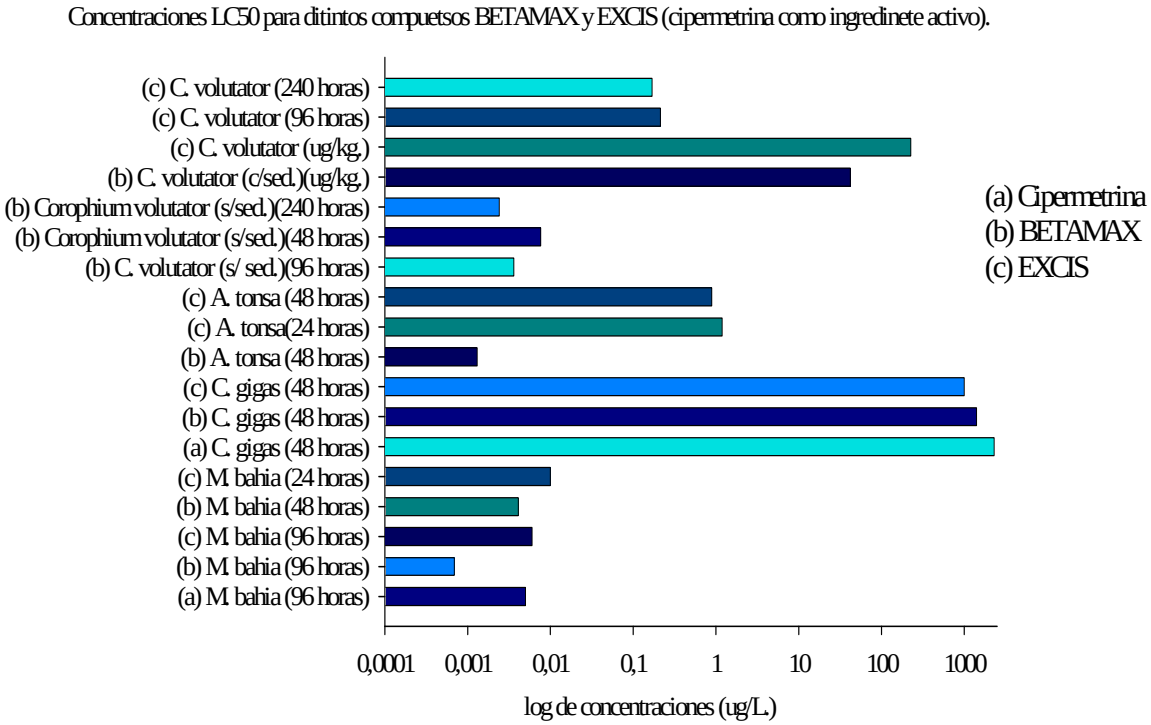
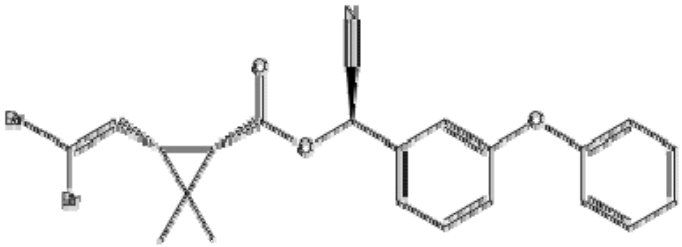


Figura 7. Toxicidad de diferentes formulaciones: CIPERMETRINA (ingrediente activo), BETAMAX (80:20) y EXCIS (40:60).

2.3.2 Deltametrina

Estructura química:



En la Tabla 7, se presentan algunas características físico-químicas para deltametrina como persistencia, log Kow y potencial de bioacumulación, entre otras.

Tabla 7. Características físico-químicas de deltametrina.

Parámetro	Valor Documento	Referencia
Número de Registro CAS	52918-63-5	WHO, 1990
Formula Molecular	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	WHO, 1990
Peso Molecular (g/mol)	505.2	WHO, 1990
Presión de Vapor (Pa) a 25°C	2.0×10^{-6}	Hartley & Kidd 1987
Solubilidad Agua (mg/L)	< 0.0002	Tomlin (1994)
Coeficiente Partición (log Kow)	6.20	Tomlin (1994)
Factor de Bioconcentración en Peces (log FBC)	2.70	Devillers et al. 1996
Hidrólisis en agua 25ºC, pH 9	2-4 días	Tomlin (1994); Muir et al. 1985
Persistencia en sedimentos	23 días	Tomlin (1994)

Deltametrina es el nombre común para un insecticida piretroide sintético clasificado como piretroide Tipo II, desarrollado en 1974 (Elliott *et al.*, 1974). El nombre original, decametrina, fue cambiado a deltametrina en 1980 para evitar confusiones con otros productos. Se caracteriza por ser un polvo cristalino insoluble en agua (solubilidad menor a 0,2 µg/L), pero si soluble en solventes orgánicos. Este compuesto está formado por un solo isómero. Dentro de sus características físico-químicas no es una sustancia volátil y tampoco tiene propiedades alcalinas o ácidas por lo que la constante de disociación del agua es irrelevante. Este producto es indicado como agente antiparasitario en la profilaxis

y tratamiento de la parasitosis del piojo de mar (*Caligus* spp. y *Lepeophtheirus sp.)* que es uno de los mayores problemas en la industria del salmón. Algunos procesos que deciden el destino de la deltametrina en el ambiente incluyen la hidrólisis, fotolisis, biodegradación, bioacumulación, entre otros.

Deltametrina presenta características lipofílicas que permiten bioconcentrarse en organismos acuáticos, en tanto, su coeficiente Kow alto (6.20) indica su potencial bioacumulación. Sin embargo, también es conocido que se metaboliza rápidamente. Muir et al., (1985) trató al pez de la especie *Pimephales promelas* con deltametrina radioactiva a concentraciones de 5 a 50 ng/g de deltametrina en sedimento, las concentraciones encontradas fueron 248-907 veces más alta en tejido de pez que en el agua, 24 horas después del tratamiento. Se han realizado algunos estudios de residuos y farmacocinética en especies blanco como *Salmo salar* en donde se documenta que deltametrina es rápidamente eliminada de los tejidos luego de haber recibido el tratamiento por baño (Köprücü *et al.*, 2006), atribuyendo esto a la efectiva metabolización del compuesto por peces y a la biodisponibilidad reducida de deltametrina en carbonos orgánicos y coloides suspendidos (WHO, 1990).

2.3.2.1 Ensayos en Organismos Marinos

Los ensayos de toxicidad con organismos acuáticos son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional y empleados en muchos países, como herramienta para el monitoreo y control de la contaminación acuática. Es usual encontrar trabajos donde se considere una gran cantidad de ensayos que involucre una serie de organismos correspondientes a diversos niveles tróficos (Castro *et al*., 2002). Los bioensayos evalúan los efectos tóxicos de la contaminación en los organismos vivos. En la práctica cuantifican la relación concentración-efecto de compuestos químicos o mezclas complejas, por medio de respuestas biológicas medidas bajo condiciones controladas y estandarizadas.

El comportamiento de deltametrina es diferente en los distintos compartimentos ambientales, degradándose y generando compuestos, menos tóxicos. En cuerpos de agua se elimina por adsorción a los sedimentos (Extoxnet, 1999) siendo una fuente de contaminación y toxicidad para los organismos acuáticos, particularmente en peces e invertebrados acuáticos.

Crustáceos

Los crustáceos marinos son particularmente vulnerables y susceptibles a los efectos tóxicos de piretroides (Fairchild *et al*., 1992). Aunque piretroides son considerados insecticidas de menor riesgo, pueden mostrar una prolongada vida media en el ambiente dependiendo de las condiciones del medio y/o conjunción con otros factores (Estesen *et al*., 1979). Estudios de laboratorio revelan la sensibilidad del copépodos marinos *Tisbe*

battagliai en sus diferentes etapas de desarrollo donde mostró mayor sensibilidad en su etapa adulta con una CL_{50} de 0.0106 µg/L a 144 hrs de exposición a deltametrina (Barata et al., 2002). Por otro lado, para el camarón *Americamysis bahía* se determinó a través de ensayos agudos de toxicidad CL_{50} de 0,017 µg/L a 96 hrs de exposición (Office Pestide Program). Estudios realizados por el laboratorio de ecotoxicología de la Universidad de Concepción aun no publicados a través de ensayos con organismos marinos revelan concentraciones tóxicas (CL_{50}) en el copépodo *Tisbe longicornis* y anfípodo *Monocorophium insidiosum* de 8,02 µg/L y 7,8 µg/Kg, respectivamente.

Bajo condiciones de laboratorio, sedimentos contaminados con deltametrina con 1 mg/kg fue letal para los camarones *Palaemonetes pugio* y *Penaeus duorarum*, mientras que a una concentración de 0.1 mg/kg fue letal en un 85% para *Palaemonetes pugio* y un 28% en *Penaeus duorarum*, mostrando ser mucho más sensibles el camarón *Palaemonetes pugio* durante los 10 de días de exposición (Clark *et al*., 1989) (Tabla 8).

Tabla 8. Toxicidad de deltametrina en crustáceos.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	Referencia
Tisbe battagliai (Nauplio)	0,0151	Barata et al., 2002b
Tisbe battagliai (adulto)	0,0106ª	Barata et al., 2002b
Tisbe battagliai (huevos)	0,0887ª	Barata et al., 2002b
Tisbe battagliai	0,0581**[a]	Barata et al., 2002b
Tisbe battagliai	0,0138**[a]	Barata et al., 2002b
Tisbe battagliai	0,0378**[a]	Barata et al., 2002b
Americamysis bahia	0,018	Office Pestide Program
Americamysis bahia	0,017	Office Pestide Program
Americamysis bahia	0,037	Office Pestide Program
Tisbe longicornis	8,02[b]	*En estudio
Monocorophium insidiosum	7,8[c]	*En estudio. Sedimento (µg/Kg)
Palaemonetes pugio	1000[c]	Clark *et al*., 1989 Sedimento (µg/Kg)
Penaeus duorarum	1000[c]	Clark *et al*., 1989 Sedimento (µg/Kg)

** Inmovilidad a= 144 hrs. b= 48 hrs. C=240 hrs.

<u>*Peces*</u>

La Organización mundial de la salud (WHO, 1990), publicó un reporte de datos de toxicidad aguda para deltametrina en peces catalogándola como altamente tóxica con un LC_{50} (96 hrs.) que oscila entre 0.4 y 2.0 µg/L. Además reportó la toxicidad aguda para deltametrina en *O. mykiss*, *Salmo salar* y *Salmo trutta* como 0.39-2.20, 0.59-1.97 y 4.7 µg/L, respectivamente.

De acuerdo a información técnica la deltametrina produce un 50% de mortalidad en *O. mykiss* a concentraciones de 6 a 8 µg/L durante 96 horas de exposición. Autores señalan que exposiciones de entre 0.25 – 50 µg/L de deltametrina en *Oncorhynchus mykiss* pueden ocasionar un 100% de mortalidad de los peces a una concentración de 50 µg/L a un tiempo de exposición de 4 horas, obteniendo un CL_{50} (96 hrs.) de 0.6961 µg/L, estos resultados muestran que la deltametrina solubilizada en agua es altamente tóxica para *O. mykiss*.

Köprücü *et al.* (2006) observó respuesta anormal en el comportamiento de los peces para todas las concentraciones mayores a 0.5 µg L^{-1} de deltametrina, las cuales fueron perdiendo el equilibrio, nados erráticos, nados en la superficie del agua con el fin de tragar aire desde ese lugar y algunos sin movilidad en la profundad del acuario. En adición a esto, Kumaragura y Beamish (1981) afirman que la toxicidad aguda de estos pesticidas en los peces fue negativamente correlacionada con la temperatura, por lo tanto en un ambiente acuático donde la temperatura del agua disminuye puede aumentar el impacto tóxico en los peces (Moore and Waring, 2001).

En literatura se puede encontrar diferencias en la toxicidades agudas de peces con deltametrina (Köprücü *et al.*, 2006). En la Tabla 9 se aprecian especies de peces y la concentración de deltametrina que afecta letalmente el 50% de estos individuos a las 48-96 horas de ensayo ecotoxicológico.

Tabla 9. Resumen de toxicidad aguda de deltametrina en peces.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	Referencia
Oncorhynchus mykiss	1,65[a]	Ural and Saglam, 2005
Oncorhynchus mykiss	0,39	Mestres and Mestres, 1992
Oncorhynchus mykiss	0,5-1,97	Bradbury and Coats, 1989
Oncorhynchus mykiss	0,39-2,20	WHO, 1990
Salmo salar	0,5-1,97	Bradbury and Coats, 1989
Salmo salar	0,6-1,97	WHO, 1990
Salmo trutta	4,7	WHO, 1990

a=48 hrs.

Moluscos

Kontreczky *el al.*, (1997), uso el molusco *Anodonta cygnea* (almeja) como bioindicador en la detección de toxicidad de deltametrina en organismos acuáticos, evidenciando efecto adverso en el comportamiento filtrador del molusco. A bajas concentraciones (1 – 5 µg/L) funciones como la expulsión del agua por sifón exhalante y actividad de las valvas, no fueron influenciadas o ligeramente incrementadas, mientras que a altas concentraciones (10 – 50 µg/l) ambas funciones fueron disminuidas, llegando a la conclusión que el efecto inhibitorio de deltametrina sobre la almeja fue dependiente de la concentración. En tanto,

otro estudio ha reportado para la ostras *Crassostrea virginica* (WHO, 1990) una CL_{50} para deltametrina de 12 µg/L (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de toxicidad aguda de deltametrina en moluscos.

Especies	CL_{50} (96 hrs.) (µg/L)	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	Referencia
Crassostrea virginica	12			WHO, 1990
Anodonta cygnea			1	Kontreczky et al., 1997
Anodonta cygnea			10	Kontreczky et al., 1997
Anodonta cygnea			10	Kontreczky et al., 1997
Unio elongatulus eucirrus		1,6		Koprucu et al., 2008
Unio elongatulus eucirrus	6600			Koprucu and Seker, 2008

2.3.2.2 Comparación Ecotoxicológica

Toxicidad aguda:

Información ecotoxicológica registrada para deltametrina con organismos marinos fue mucho más escasa en comparación a la información referente a cipermetrina, siendo la mayor cantidad de estudios referentes a organismos de agua dulce. En la Figura 8 se observan ensayos ecotoxicológicos agudos y crónicos en organismos marinos.

De la información obtenida, crustáceos marinos como el copépodo *Tisbe battagliai* y el cangrejo *Americamysis bahia* son mayormente sensibles a bajas concentraciones de deltametrina, en comparación al representante de bivalvos *Unio elogatulus* y *O. mykiss*.

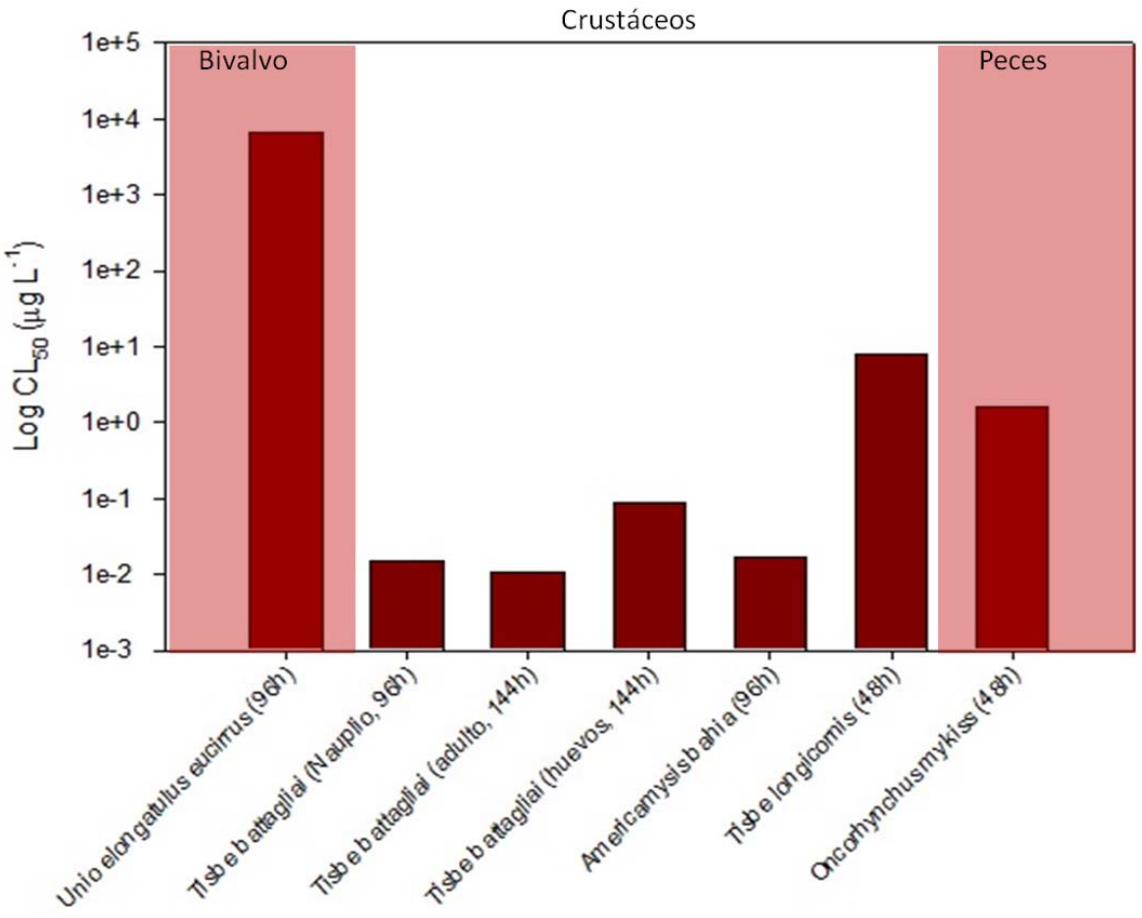


Figura 8. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos agudos en crustáceos, bivalvos y peces.

<u>Toxicidad crónica</u>:

De acuerdo a la información reportada se observa que datos crónicos de NOEC y LOEC a para moluscos bivalvos y crustáceos son menores a 10 µg/L (Figura 9). Por otro lado, ensayos con el cirripedio *Balanus amphitrite* se observa un NOEC menor de 0.01 µg/L, evaluándose el asentamiento de este cirripedio en sustrato (Cragg and Eaton, 1997).

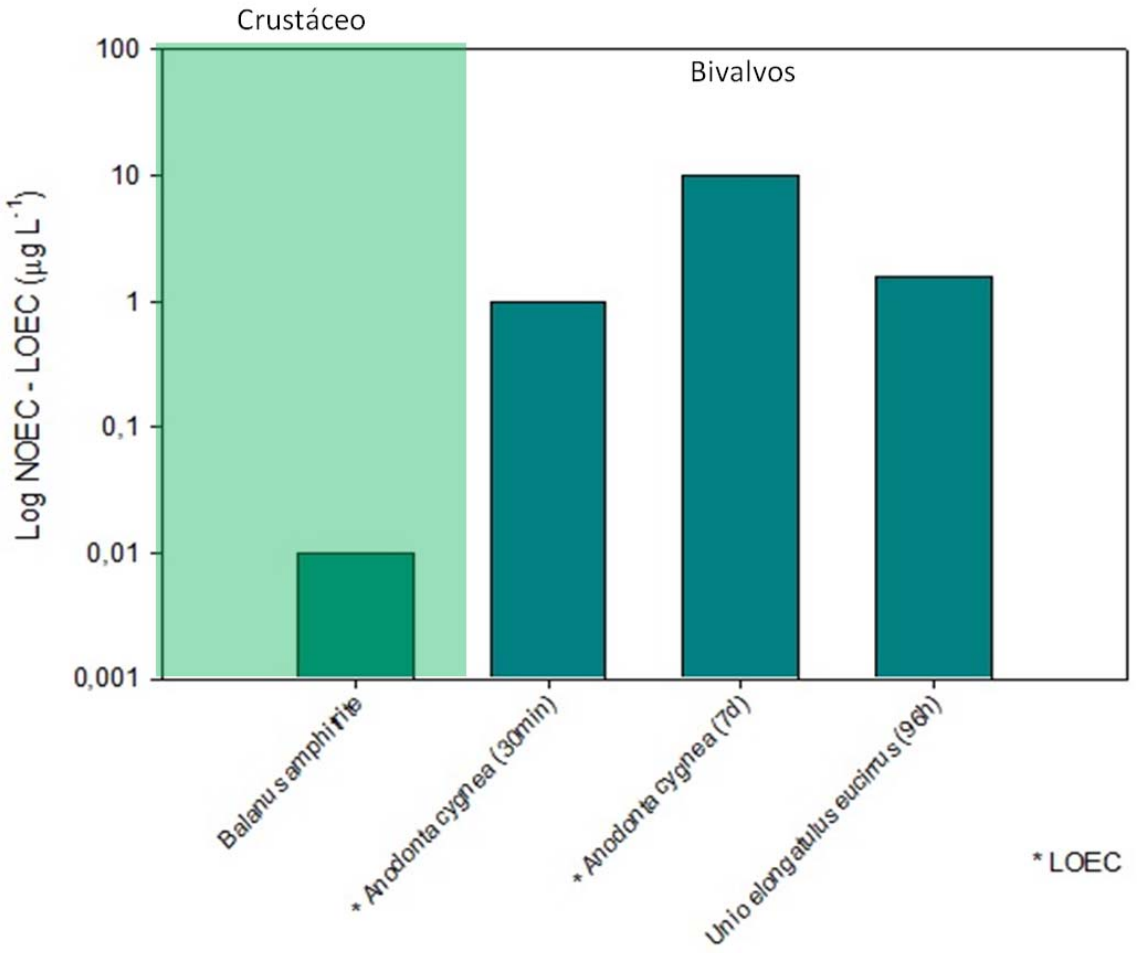


Figura 9. Representación gráfica de ensayos ecotoxicológicos crónica (NOEC y LOEC) en bivalvos y crustáceos marinos.

3 OBJETIVO 2: "DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA DE PIRETROIDES EN LA ETAPA LARVAL DE MYTILUS CHILENSIS Y SUS EFECTOS EN LA FIJACIÓN, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS".

3.1 Evaluación de toxicidad aguda y crónica de piretroides en la etapa larval de *Mytilus chilensis* bajo condiciones controlada.

En esta sección se analizan los bioensayos experimentales realizados con cipermetrina y deltametrina en condiciones de laboratorio con *Mytilus chilensis* y además se indican los resultados obtenidos en un ensayo donde se investigó el efecto metabólico de los piretroides en cuestión con larvas de la misma especie.

3.1.1 Cipermetrina

3.1.1.1 Ensayo Agudo

CODIGO MUESTRAS (INTERNO)	:	LB-BIOE-R02/1844-B
SOLICITADO POR	:	SUBSECRETARÍA DE PESCA
TIPO DE BIOENSAYO	:	Crónico
ESPECIE	:	*Mytilus chilensis* (bivalvo)
RESPUESTA MEDIDA	:	Inhibición de la fecundación
FECHA INICIO BIOENSAYOS	:	13 de noviembre 2012
TIEMPO DE EXPOSICION	:	80 minutos de exposición del espermio

<u>CONDICION DE LAS MUESTRAS PREVIO AL BIOENSAYO</u>

MUESTRA PROPORCIONADA POR	:	Centro EULA, UdeC.
TIPO DE MUESTRA	:	Caligicida, compuesto puro, estándar pro-análisis.
IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO	:	Cipermetrina
CONCENTRACIÓN DE USO	:	15 µg/L en jaula de salmones.
SOLVENTE REQUERIDO	:	Acetona

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

UNIDAD EXPERIMENTAL	:	Tubo de ensayo de vidrio
VOLUMEN SOLUCIÓN/ UNIDAD EXP.	:	5 ml
NUMERO REPLICAS	:	3
NUMERO DE TRATAMIENTOS	:	5 (Control; Control acetona; 0,001; 1; 100 µg/L)
AIREACION	:	Sin aireación
AGUA DE DILUCION	:	Agua de mar filtrada
SALINIDAD	:	33 ‰
OXIGENO DISUELTO	:	Saturado por aireación previa al ensayo
pH	:	8,1
TEMPERATURA DEL ENSAYO	:	14º C

RESUMEN DE LA METODOLOGIA DEL BIOENSAYO

Este bioensayo se basa en el protocolo de la US EPA (1994) para evaluar toxicidad con gametos de erizo, adaptado para gametos de moluscos bivalvos, exponiendo los espermios durante 60 minutos a la concentración de evaluación y luego mezclándolos con óvulos por 20 minutos más. Se cuantifica al microscopio la proporción de óvulos fecundados, comparando con un control de agua limpia. En esta especie, se esperó dos horas post-fecundación hasta embrión de dos blastómeros para asignar cualidad de fecundado a los óvulos por carecer de un cambio nítido e indiscutible derivado de la fecundación.

RESULTADOS

El resultado del bioensayo agudo con cipermetrina que estudia la inhibición en la fecundación, con gametos de *Mytilus chilensis*, se presenta en la Figura 10.

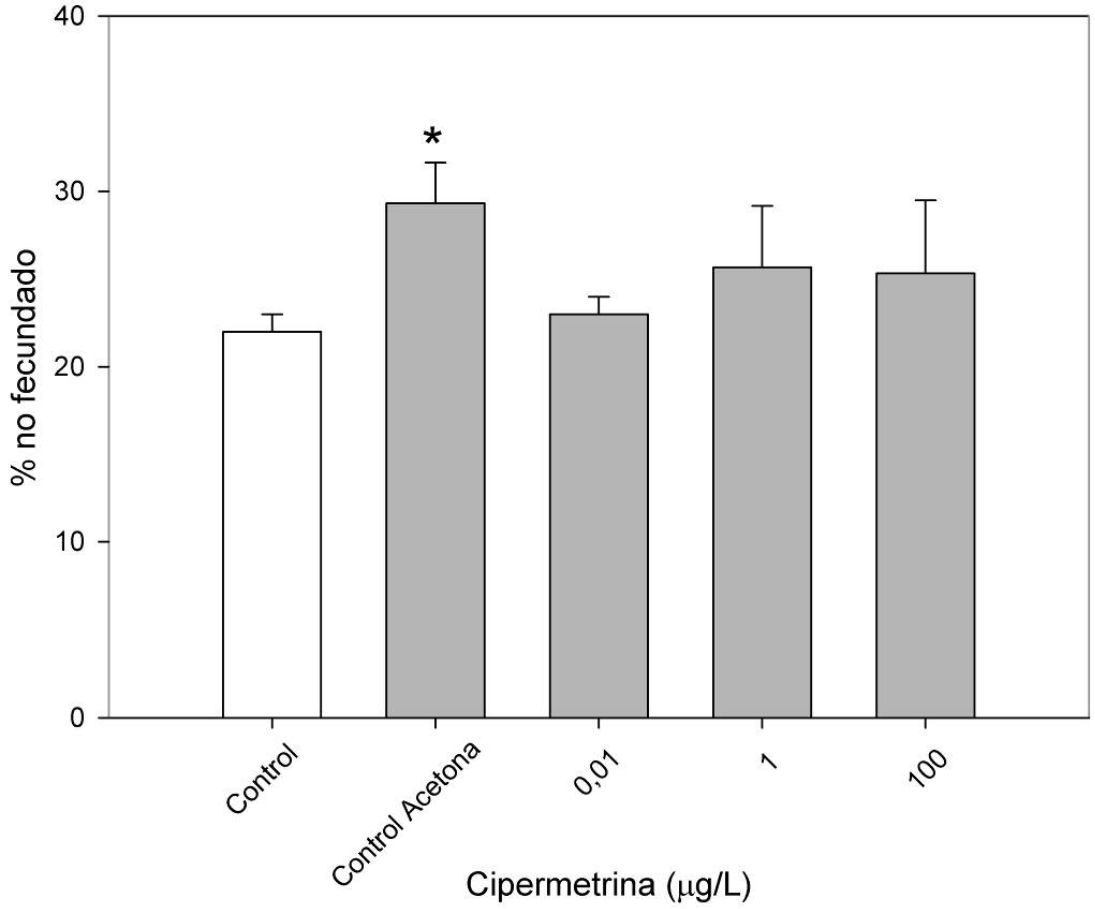


Figura 10. Porcentaje de óvulos no fecundados en *M. chilensis* expuestos a cipermetrina. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIÓN

La exposición de los espermios al rango de concentraciones de cipermetrina ensayado a 14 ºC no afecta significativamente su capacidad de fecundación comparado con el control agua (Anexo I). El resultado del control acetona muestra una leve reducción del porcentaje de óvulos fecundados comparado con el control agua. Sin embargo, en la concentración de 100 µg/L de cipermetrina donde la concentración de acetona es la misma que en el control acetona, la inhibición del solvente no se manifiesta. A la concentración de uso en pisciculturas (15 µg/L) no tendría efecto sobre la fecundación de *Mytilus chilensis*.

3.1.1.2 Ensayo Crónico

CODIGO MUESTRAS (INTERNO)	:	LB-BIOE-R02/1844-B
SOLICITADO POR	:	SUBSECRETARÍA DE PESCA
TIPO DE BIOENSAYO	:	Crónico
ESPECIE	:	*Mytilus chilensis* (bivalvo)
RESPUESTA MEDIDA	:	Inhibición del desarrollo larva D.
FECHA INICIO BIOENSAYOS	:	13 de noviembre 2012
TIEMPO DE EXPOSICION	:	6 días

CONDICION DE LAS MUESTRAS PREVIO AL BIOENSAYO

MUESTRA PROPORCIONADA POR	:	Centro EULA, UdeC.
TIPO DE MUESTRA	:	Caligucida, compuesto puro, estándar pro-análisis.
IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO	:	Cipermetrina
CONCENTRACIÓN DE USO	:	15 µg/L en jaula de salmones.
SOLVENTE REQUERIDO	:	Acetona.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

UNIDAD EXPERIMENTAL	:	Vaso de 50 mL
VOLUMEN SOLUCIÓN/ UNIDAD EXP.	:	30 ml
NUMERO REPLICAS	:	3
NUMERO DE TRATAMIENTOS	:	8 (Control; Control acetona; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 100 10; 100 µg/L)
AIREACION	:	Sin aireación
AGUA DE DILUCION	:	Agua de mar filtrada
SALINIDAD	:	33 ‰
OXIGENO DISUELTO	:	Saturado por aireación previa al ensayo
pH	:	8,1
TEMPERATURA DEL ENSAYO	:	14º C

RESUMEN DE LA METODOLOGIA DEL BIOENSAYO

Este bioensayo se basa en el protocolo de la US EPA (1994) para evaluar toxicidad con gametos de erizo, adaptado para gametos de moluscos bivalvos, exponiendo los espermios durante 60 minutos al elutriado y luego mezclándolos con óvulos por 20 minutos más. El bioensayo de embrio-toxicidad o de desarrollo embrión-larva cuantifica el porcentaje de larvas de charnela recta (larva D) desarrolladas anormales, a partir de

embriones (2 ó más células) incubados por 60 horas en una serie de concentraciones del pesticida a evaluar.

RESULTADOS

El resultado del bioensayo crónico con cipermetrina que estudia el desarrollo de larva D en *Mytilus chilensis*, con exposición a partir del embrión de dos células, se presenta en la Figura 11.

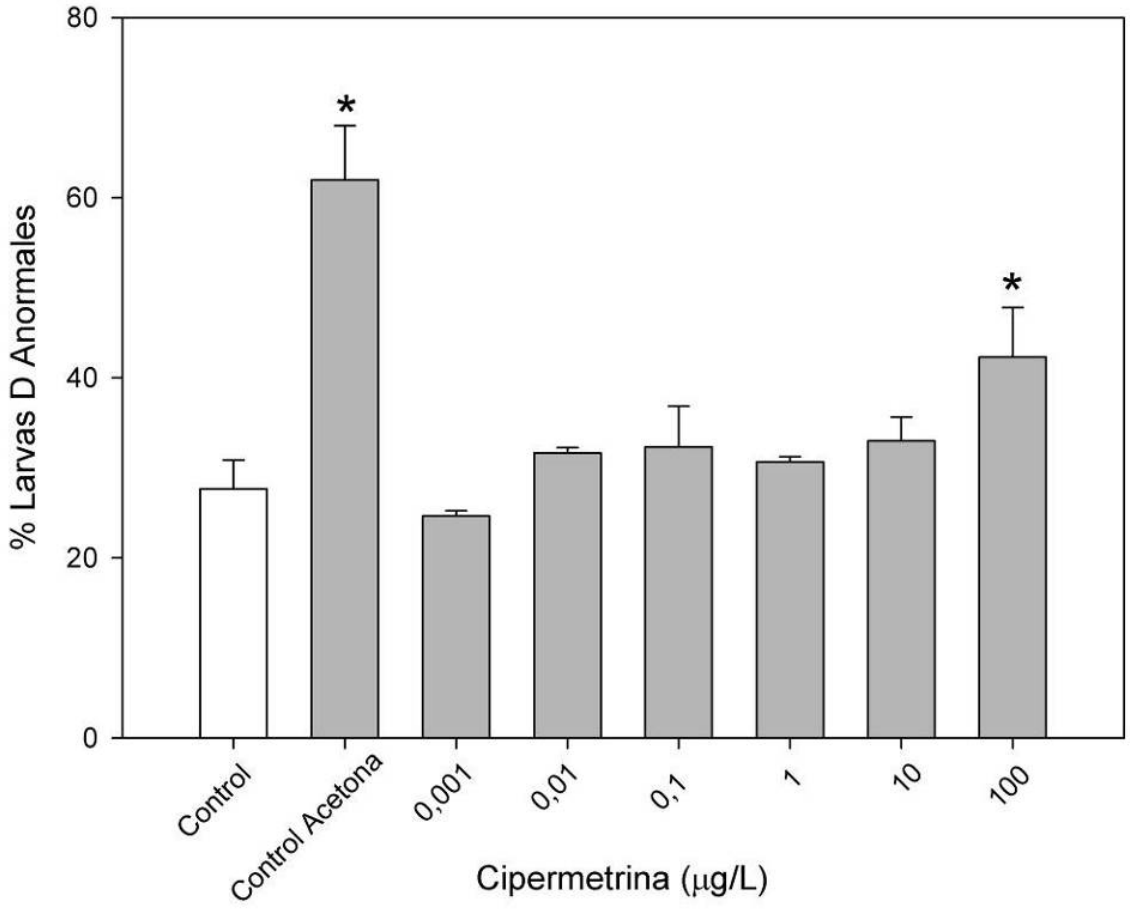


Figura 11. Porcentaje de larvas D de la especie *M. chilensis* en estado de desarrollo previos o anormales (trocófora, deformes) después de una exposición de 6 días a cipermetrina. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIÓN

La exposición del embrión a cipermetrina durante su desarrollo hasta la larva D no muestra diferencias significativas en el número de embriones anormales entre el control agua y el rango de concentración desde 0,001 a 10 µg/L de este compuesto (Anexo 1). El control acetona con 0,01 mL/L del solvente registró un 62 % de embriones anormales. Tanto el control acetona como la concentración más alta de cipermetrina ensayada (100 µg/L) son estadísticamente diferentes al control agua por una mayor proporción de embriones anormales. Es posible que el efecto inhibidor del desarrollo larval en esta última concentración de cipermetrina sea consecuencia de la acetona cuyo volumen es el mismo usado en el control acetona.

3.1.2 Deltametrina

3.1.2.1 Ensayo Agudo

CODIGO MUESTRAS (INTERNO)	:	LB-BIOE-R02/1844-C
SOLICITADO POR	:	SUBSECRETARÍA DE PESCA
TIPO DE BIOENSAYO	:	Crónico
ESPECIE	:	*Mytilus chilensis* (bivalvo)
RESPUESTA MEDIDA	:	Inhibición de la fecundación
FECHA INICIO BIOENSAYOS	:	13 de noviembre 2012
TIEMPO DE EXPOSICION	:	80 minutos de exposición del espermio

<u>CONDICION DE LAS MUESTRAS PREVIO AL BIOENSAYO</u>

MUESTRA PROPORCIONADA POR	:	Centro EULA, UdeC.
TIPO DE MUESTRA	:	Caliguicida, compuesto puro, estándar pro-análisis.
IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO	:	Deltametrina
CONCENTRACIÓN DE USO	:	2 µg/L en jaula de salmones.
SOLVENTE REQUERIDO	:	Acetona

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

UNIDAD EXPERIMENTAL	:	Tubo de ensayo de vidrio
VOLUMEN SOLUCIÓN/ UNIDAD EXP.	:	5 ml
NUMERO REPLICAS	:	3
NUMERO DE TRATAMIENTOS	:	5 (Control; Control acetona; 0,001; 1; 100 µg/L)
AIREACION	:	Sin aireación
AGUA DE DILUCION	:	Agua de mar filtrada
SALINIDAD	:	33 ‰
OXIGENO DISUELTO	:	Saturado por aireación previa al ensayo
pH	:	8,1
TEMPERATURA DEL ENSAYO	:	14º C

RESUMEN DE LA METODOLOGIA DEL BIOENSAYO

Este bioensayo se basa en el protocolo de la US EPA (1994) para evaluar toxicidad con gametos de erizo, adaptado para gametos de moluscos bivalvos, exponiendo los espermios durante 60 minutos al elutriado y luego mezclándolos con óvulos por 20 minutos más. Se cuantifica al microscopio la proporción de óvulos fecundados, comparando con un control de agua limpia. En esta especie se esperó dos horas post-fecundación hasta embrión de dos blastómeros para asignar cualidad de fecundado a los óvulos por carecer de un cambio nítido e indiscutible derivado de la fecundación.

RESULTADOS

El resultado del bioensayo agudo con deltametrina que estudia la inhibición de la fecundación, con gametos de *Mytilus chilensis*, se presenta en la Figura 12.

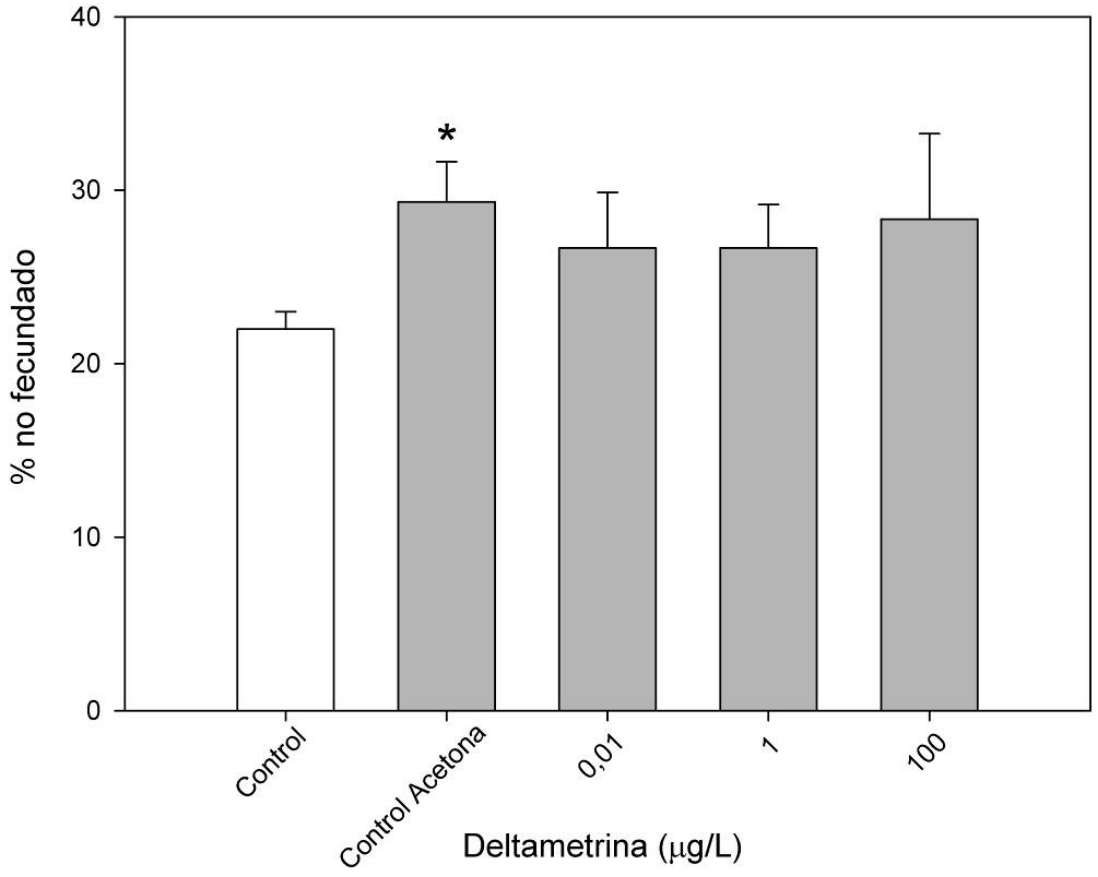


Figura 12. Porcentaje de óvulos no fecundados en *M. chilensis* expuestos a deltametrina. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIÓN

La exposición de los espermios al rango de concentraciones de deltametrina ensayado a 14 ºC no afecta significativamente su capacidad de fecundación comparado con el control agua (Anexo 1). El control acetona y las tres concentraciones probadas muestran un leve incremento del porcentaje de óvulos no fecundados comparado con el control agua. Solo el control acetona tiene una diferencia estadísticamente significativa con el control agua y podría el solvente estar influenciando el valor registrado en la concentración de 100 µg/L de deltametrina donde la concentración de acetona es la misma que en el control acetona. Pero la concentración de deltametrina en ese tratamiento es 100 veces superior a la inferior más próxima y no se aprecia una respuesta inhibitoria proporcional. En el rango de concentraciones usado que sobrepasa en 50 veces la dosis de uso en tratamiento de *Caligus* (2 µg/L) no se evidencia un efecto apreciable sobre la fecundación.

3.1.2.2 Ensayo Crónico

CODIGO MUESTRAS (INTERNO)	:	LB-BIOE-R02/1844-C
SOLICITADO POR	:	SUBSECRETARÍA DE PESCA
TIPO DE BIOENSAYO	:	Crónico
ESPECIE	:	*Mytilus chilensis* (bivalvo)
RESPUESTA MEDIDA	:	Inhibición del desarrollo larva D.
FECHA INICIO BIOENSAYOS	:	13 de noviembre 2012
TIEMPO DE EXPOSICION	:	6 días

CONDICION DE LAS MUESTRAS PREVIO AL BIOENSAYO

MUESTRA PROPORCIONADA POR	:	Centro EULA, UdeC.
TIPO DE MUESTRA	:	Caligicida, producto puro, estándar proanálisis
IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO	:	Deltametrina.
CONCENTRACIÓN DE USO	:	2 µg/L en jaula de salmones.
SOLVENTE REQUERIDO	:	Agua.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

UNIDAD EXPERIMENTAL	:	Vaso de 50 mL
VOLUMEN SOLUCIÓN/ UNIDAD EXP.	:	30 ml
NUMERO REPLICAS	:	3
NUMERO DE TRATAMIENTOS	:	8 (Control; control acetona; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µg/L)
AIREACION	:	Sin aireación
AGUA DE DILUCION	:	Agua de mar filtrada
SALINIDAD	:	33 ‰
OXIGENO DISUELTO	:	Saturado por aireación previa al ensayo
pH	:	8,1
TEMPERATURA DEL ENSAYO	:	14º C

RESUMEN DE LA METODOLOGIA DEL BIOENSAYO

Este bioensayo se basa en el protocolo de la US EPA (1994) para evaluar toxicidad con gametos de erizo, adaptado para gametos de moluscos bivalvos, exponiendo los espermios durante 60 minutos a la concentración de evaluación y luego mezclándolos con óvulos por 20 minutos más. El bioensayo de embrio-toxicidad o de desarrollo embrión-larva cuantifica el porcentaje de larvas de charnela recta (larva D) desarrolladas anormales, a partir de embriones (2 ó más células) incubados por 60 horas en una serie de concentraciones del pesticida a evaluar.

RESULTADOS

El resultado del bioensayo crónico con deltametrina que estudia el desarrollo de larva D en *Mytilus chilensis*, con exposición a partir del embrión de dos células, se presenta en la Figura 13.

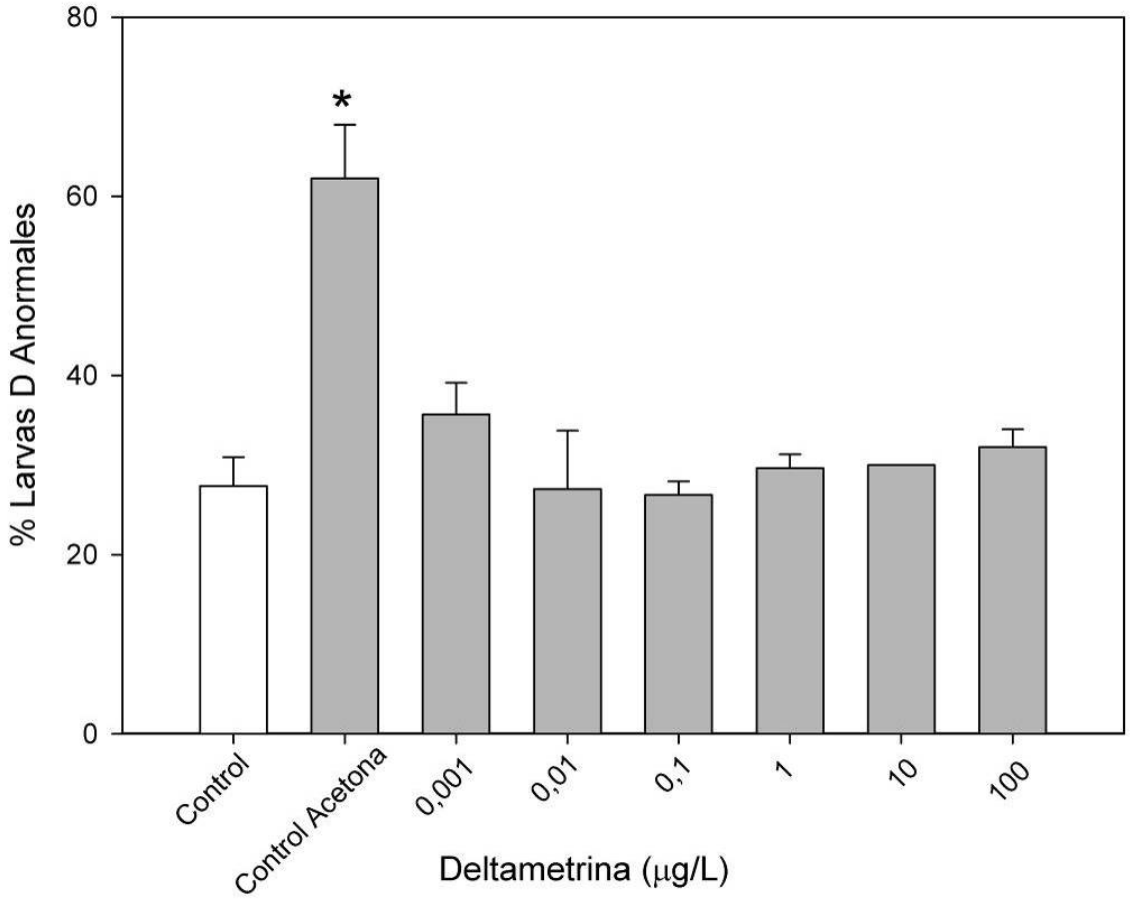


Figura 13. Porcentaje de larvas D de la especie *M. chilensis* en estado de desarrollo previos o anormales (trocófora, deformes) después de una exposición de 6 días a deltametrina. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIÓN

La exposición del embrión de *Mytilus chilensis* al estándar de deltametrina durante su desarrollo hasta la larva D muestra que en el rango de concentraciones evaluado entre 0,001 y 100 µg/L, el número de estados de desarrollo anormales no difiere estadísticamente de lo registrado en el control agua (Anexo I). El control acetona con la misma concentración del solvente que en el tratamiento de 100 µg/L de deltametrina, sí tuvo efecto con un promedio de 62 individuos anormales de 100 contabilizados. Sin embargo en el tratamiento de 100 µg/L de deltametrina con la misma cantidad de acetona que el control acetona, no evidencia efectos significativos respecto al control agua. Deltametrina, por lo tanto, no tendría efectos sobre el desarrollo del embrión hasta larva D a la concentración sugerida para control de *Caligus.*

3.2 Experimentos/bioensayos de toxicidad crónica de piretroides sobre el metabolismo de larvas veliger en *Mytilus chilensis*.

3.2.1 Metodología

Se realizó un bioensayo en el cual se expusieron larvas de dos estadios larvales (larva D y larva véliger) de *Mytilus chilensis* a seis diferentes concentraciones de cipermetrina y deltametrina. En estos experimentos, se mantuvieron constantes las variables de temperatura, salinidad, oxígeno y alimento, utilizando para la incubación agua de mar con alimento artificial (e.g. la haptófita, *Isochrysis galbana*, tamaño aprox. 5 µm).

3.2.1.1 Experimento con Alimento Artificial (dos estadíos larvales)

El diseño consistió en un tratamiento control que incluye sólo el alimento artificial, pero sin consumidores, y un tratamiento experimental, que incluye la oferta de alimento artificial más los consumidores (i.e. larvas de *M. chilensis*). Los tratamientos se realizaron en triplicado, tanto para controles como experimentales. Las larvas de *M. chilensis* se obtuvieron a través de producción en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción.

Se utilizaron botellas de policarbonato de 300 mL previamente lavadas con HCl para las incubaciones de 24 horas. Para experimentos con larvas D y véliger, se utilizó una concentración total de 20 larvas. La temperatura se mantuvo constante en baños termoregulados a 14 ºC y a una salinidad entre 33 y 34‰. Para estos experimentos se adicionó un inóculo del flagelado *Isochrysis galbana* a concentraciones de 5000 cels mL^{-1}, con el objeto de entregarles alimento a saturación (i.e. sobre los 300 µg L^{-1}) eliminando así el efecto ambiental de la variable 'alimento' en estos experimentos.

Se adicionó cipermetrina y deltametrina en dosis que permitieron lograr concentraciones de 0.2, 0.5, 1, 3, 5, y 10 µg L^{-1}. Las botellas experimentales y control fueron incubadas por 24 h, en condiciones de temperatura controlada (13 °C). Una botella similar al control fue preservada al tiempo inicial (T_0) de incubación para el análisis del alimento a través de análisis de pigmentos (i.e. Clorofila *a*). Una vez finalizado el tiempo de incubación se contabilizó el total de larvas en actividad de filtración, lo cual se registró para el cálculo de las tasas de aclaramiento e ingestión y se tomaron sub-muestras T_{final} de cada una de las botellas con los tratamientos, de forma similar que para el T_0, para análisis de clorofila a fig.1. Las concentraciones de clorofila a fueron estimadas utilizando un fluorómetro calibrado Turner 10AU de acuerdo a la metodología de Strickland & Parsons (1972). La tasa de aclaramiento e ingestión fueron estimadas para las diferentes concentraciones de deltametrina y cipermetrina, utilizando una modificación a las ecuaciones de Frost (1972). Este experimento se realizó para larva en estadio D (primeras 78 horas) y véliger (8 días de la fecundación) tanto para deltametrina y cipermetrina (Figura 14).

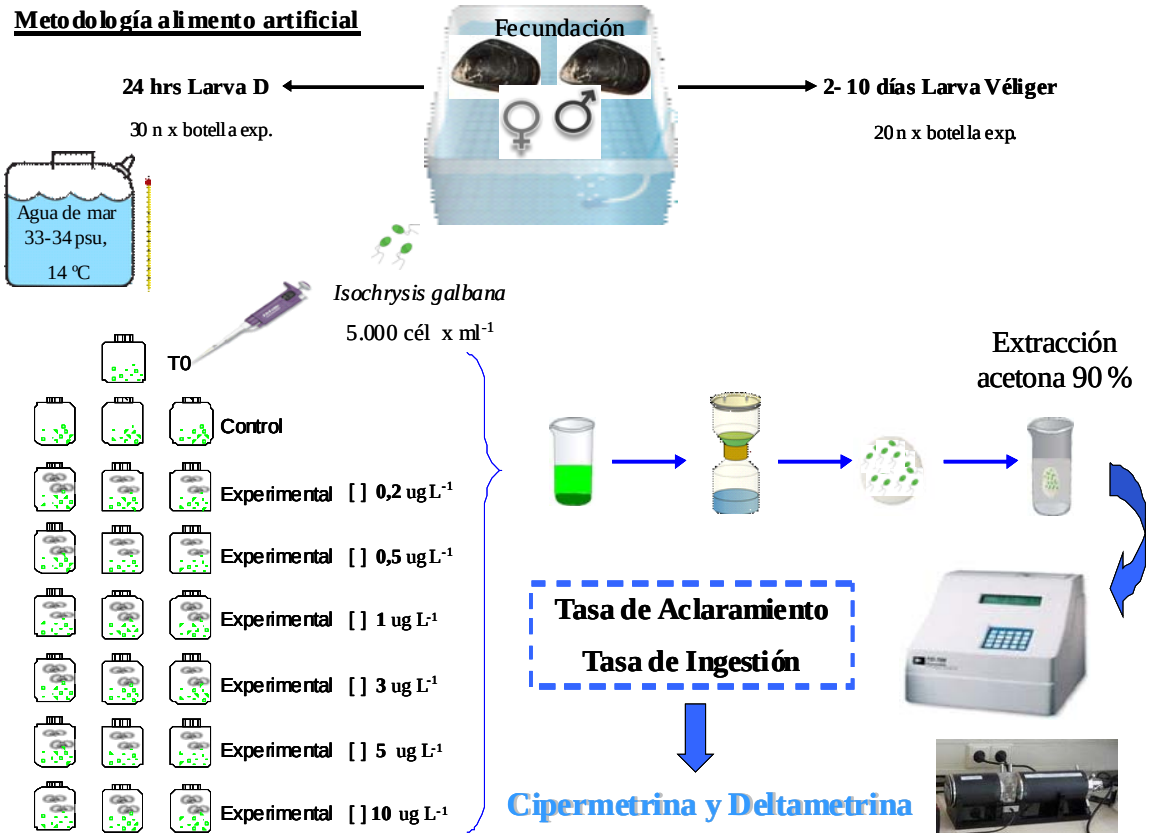


Figura 14. Diseño experimental realizado para larvas en estadios D y véliger con alimento artificial del genero *Isochrysis sp.*

3.2.1.2 Experimento con Alimento Natural (Larva veliger)

De forma similar al experimento descrito en la sección anterior, se estimó las tasas de aclaramiento e ingestión de larvas véliger (8 días de la fecundación) de *M. chilensis* a diferentes concentraciones de cipermetrina y deltametrina en forma separada, pero utilizando una oferta natural de seston o material particulado. El diseño experimental fue similar a los otros experimentos de laboratorio (i.e. botellas 'control' y 'experimental'), pero utilizando una oferta natural de alimento (i.e. fitoplancton). Para la colecta de agua conteniendo fitoplancton natural (e.g. cianobacterias, criptófitas, dinoflagelados, diatomeas, etc.) se utilizaron baldes previamente lavados en HCl (10%). Una vez en el laboratorio, esta agua fue tamizada por 200 µm para eliminar los consumidores meso-zooplanctónicos, cuidando que las cadenas de diatomeas permanezcan y constituyan uno más de los grupos alimenticios disponibles. Esta agua de incubación < 200 µm incorpora la oferta natural de alimento existente en el océano costero, independiente del lugar de colección.

De forma similar al experimento con oferta artificial, se tomaron sub-muestras de cada botella al tiempo T_0, y T_{final} de las botellas 'control' y 'experimental', pero en esta oportunidad, se tomaron alícuotas de 20 mL de cada una de las botellas control y experimental, para estimar la concentración de clorofila, utilizando un perfilador espectrofotométrico, *bbe Fluoroprobe*, el cual es un instrumento altamente sensible para la determinación de diferentes tipos de algas (e.g. cianobacterias, algas verdes, criptófitas y, diatomeas/dinoflagelados) (Figura 15). Utilizando este equipo, la fluorescencia de las algas producida por excitación con luz visible, depende principalmente de la presencia de clorofila *a*. La presencia de otros pigmentos accesorios es típica en las diferentes especies de algas. Las interacciones entre estos diferentes sistemas de pigmentos con la clorofila-a dan como resultado un espectro de excitación especial para las clases taxonómicas de algas. Lo anterior, permitió poder determinar los grupos algales que han sido removidos por las larvas veliger de *M. chilensis* a las diferentes concentraciones de cipermetrina y deltametrina.

Las tasa ingestión y aclaramiento se determinó basándose en las mediciones de clorofila *a*, calculadas de acuerdo a Frost (1972), modificado por Marín et al. (1986). Además se tomaron submuestras de 150 mL desde cada botella, las cuales fueron preservadas con lugol ácido 5% para su posterior conteo bajo microscopia y obtención de abundancia y biomasa fitoplanctónica.

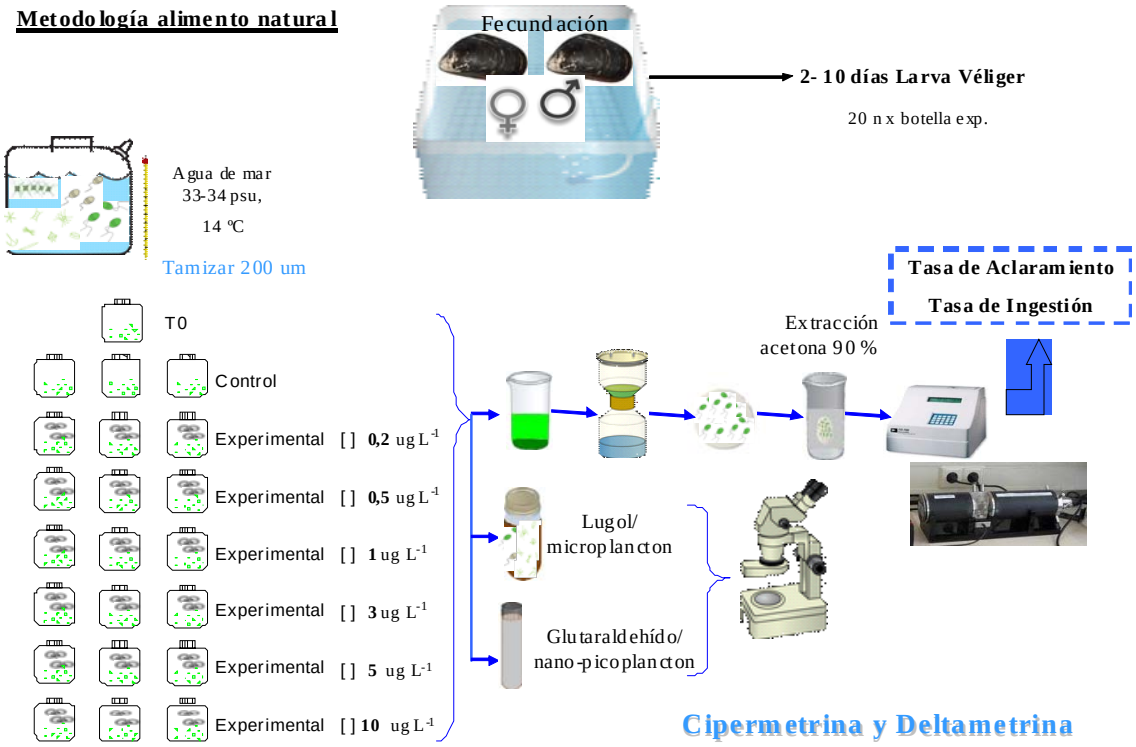


Figura 15. Diseño experimental realizado con larva véliger, luego de la incubación se tomaron submuestras que serán analizadas bajo microscopia.

3.2.2 Resultados del Estudio

Durante el desarrollo del estudio se realizaron dos fecundaciones de *M. chilensis*, la primera fecundación de los gametos fue realizada de forma artificial mediante la disección de gónadas de la hembra, obteniendo gametos con la futura fecundación utilizando espérmios de machos. Esta primera fecundación permitió la obtención de larvas hasta el estadio D, pero se mantuvieron con vida solo hasta el décimo día, lo cual no permitió poder realizar los experimentos con larvas *veliger*, como planificado (Tabla 11).

La segunda fecundación fue de forma natural, con la liberación espontánea de los gametos femeninos, una vez que se desarrollo la larva D se realizaron los experimentos que se detallan a continuación:

Tabla 11. Experimentos realizados

Dieta	Estadio larval	Deltametrina	Cipermetrina
Alimento artificial	Larva D	x	x
	Larva Veliger		
Alimento natural	Larva Veliger		

Una vez alcanzado el desarrollo de la larva D, se realizaron cuatro experimentos de laboratorio:

Experimento con cipermetrina en presentación “comercial” ver Figura 16 (a)
Experimento con cipermetrina en presentación “pura” ver Figura 16 (b)
Experimento con deltametrina en presentación “comercial” ver Figura 16 (c)
Experimento con deltametrina en presentación “pura” ver Figura 16 (d)

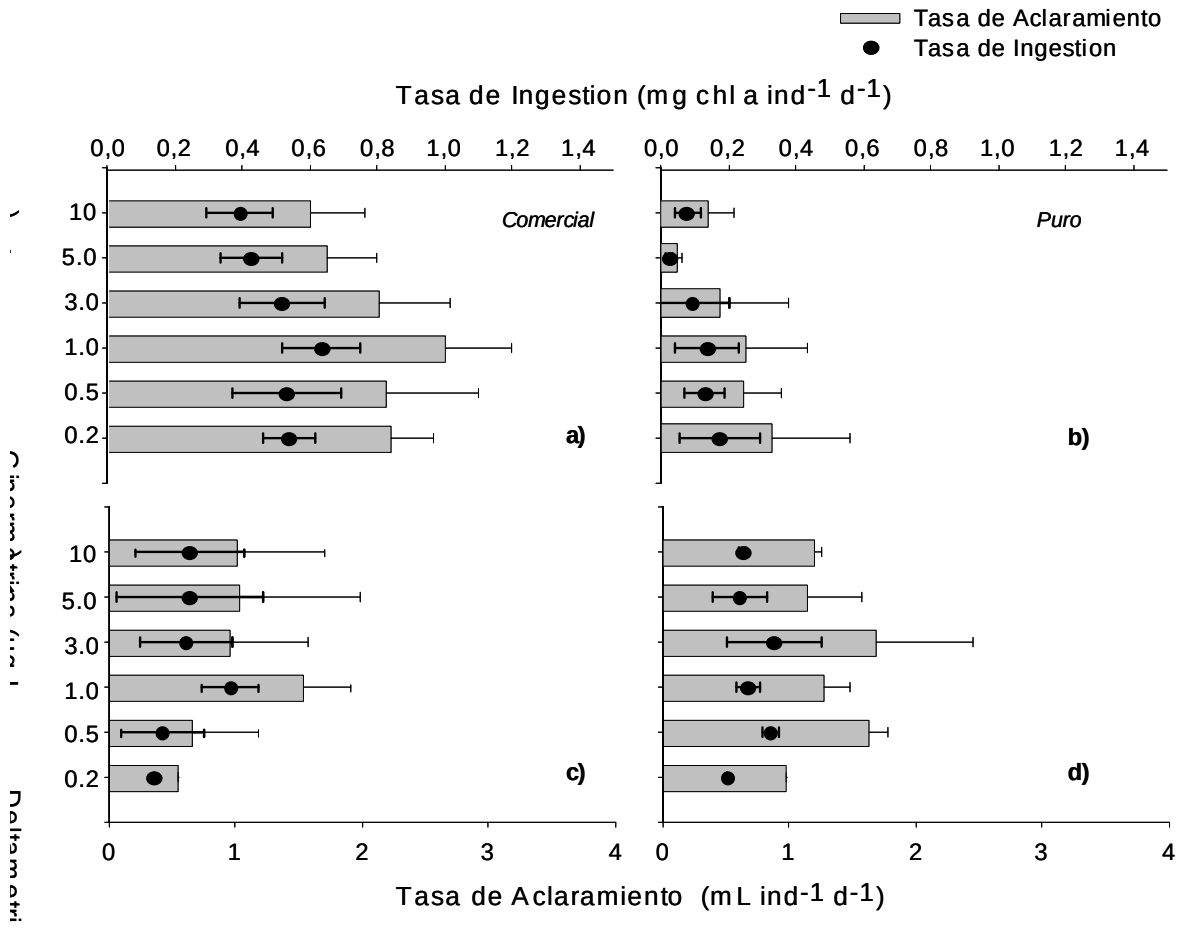
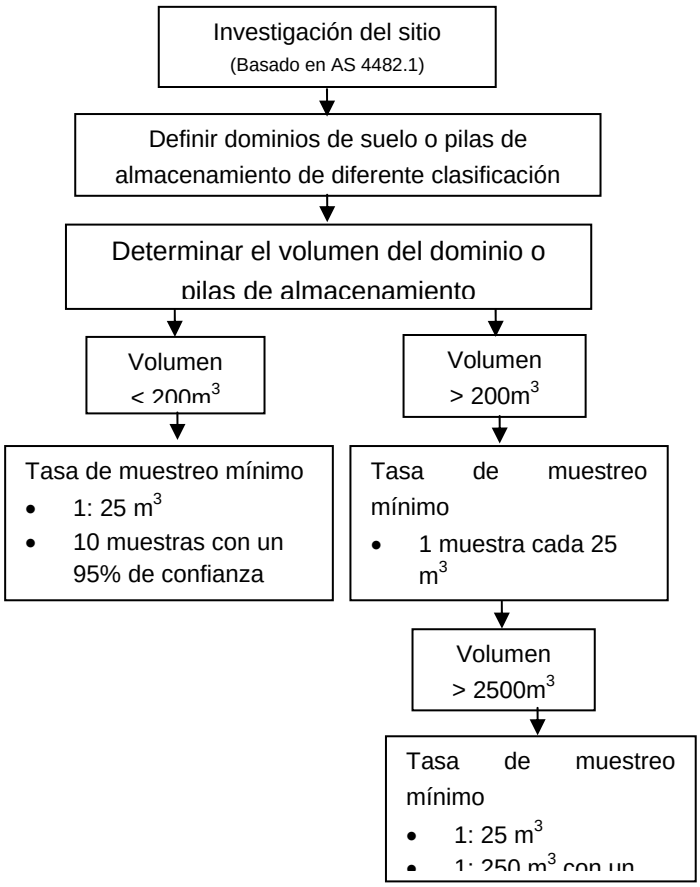


Figura 16. Tasa de aclaramiento (ml ind^{-1} d^{-1}) e ingestión (mg chl a ind^{-1} d^{-1}) de larvas de *M. chilensis* en estadio D expuestos a dos diferentes fármacos en su presentación "comercial" y "pura".



Se observa en los cuatro experimentos realizados con piretroides en sus dos presentaciones, una leve disminución en la tasa de aclaramiento e ingestión a medida que la concentración del fármaco se incrementa (Figura 16). En el caso de cipermetrina los resultados evidenciaron diferencias significativas en las tasas de aclaramiento e ingestión, dependiendo del grado de pureza u origen del fármaco (*comercial* o *puro*) (Tabla 12 y 13), e independiente de la concentración, siendo mayores en el experimento desarrollado con insecticida *comercial*. La concentración de cipermetrina tuvo además un efecto altamente significativo en ambas tasas, reflejando una tendencia a la disminución de éstas, a medida que aumenta la concentración del piretroide por sobre 1 µg L^{-1} (Figura 16 a, b; Tabla 12a y 13a). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la combinación de ambos factores (*origen* × *concentración*), evidenciando que no se observa un efecto significativo mayor a medida que aumenta la concentración del piretroide, entre ambas fuentes, *comercial* o *pura.*

Tabla 12. ANOVA 2-vías para evaluar el efecto del origen del piretroide ('comercial' o 'pura') y concentración de éste, tanto para (A) cipermetrina y (B) deltametrina, sobre la tasa de aclaramiento de larvas D de *Mytilus chilensis*.

	Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P-value
(A)	*Origen*	1	22.28	22.28	119.93	**< 0.001**
	Concentración	5	2.72	0.54	2.93	**0.033**
	Origen × Concentración	5	0.53	0.11	0.58	0.718
(B)	*Origen*	1	2.07	2.07	31.16	**< 0.001**
	Concentración	5	1.67	0.33	5.02	**< 0.001**
	Origen × Concentración	5	0.61	0.12	1.84	0.14

Tabla 13. ANOVA 2-vías para evaluar el efecto del origen del piretroide ('comercial' o 'pura') y concentración de éste, tanto para (A) cipermetrina y (B) deltametrina, sobre la tasa de ingestión de larvas D de *Mytilus chilensis*.

	Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P-value
(A)	*Origen*	1	1.44	1.44	169.84	**< 0.001**
	Concentración	5	0.13	0.03	2.98	**0.031**
	Origen × Concentración	5	0.03	0.005	0.65	0.663
(B)	*Origen*	1	0.07	0.07	27.31	**< 0.001**
	Concentración	5	0.06	0.01	5.15	**0.002**
	Origen × Concentración	5	0.02	0.004	1.89	0.132

Los resultados de estos experimentos no muestran un efecto claro del fármaco sobre las tasas de aclaramiento e ingestión (Figuras 16c, d). En el caso de la deltametrina pura, se observa una leve disminución en las tasas de aclaramiento e ingestión, sobre concentraciones de 3.0 µg L^{-1}.

3.2.3 Discusión y Conclusiones

Bioensayos de toxicidad aguda y crónica en *Mytilus chilensis*

Los bioensayos aplicados a gametos y al desarrollo del embrión hasta larva D indican que *Mytilus chilensis* no es sensible a los caligucidas evaluados a las concentraciones que estos se aplican en el tratamiento de control del *Caligus*. Incluso a concentraciones

considerablemente más altas que las recomendadas no hay efectos o estos se manifiestan en una baja proporción del grupo experimental.

Intentos infructuosos de criar larvas de chorito hasta el asentamiento de la larva no ha permitido poner a prueba la sensibilidad a piretroides de la etapa metamórfica que transforma la larva en juvenil. Sin embargo, las evaluaciones de sensibilidad de las etapas anteriores en el desarrollo sugieren como muy probable la ausencia de efectos inhibitorios del asentamiento larval.

Bioensayos de toxicidad crónica de piretroides sobre el metabolismo de larvas véliger en *Mytilus chilensis.*

Aunque se cree que los piretroides son relativamente no tóxicos para aves y mamíferos, se ha probado que son extremadamente tóxicos para los organismos acuáticos (Smith & Stratton, 1986). En particular, los peces y moluscos son altamente sensibles (Eshleman & Murria, 1991; Little et al., 1993; Karaslu Benli 2009, Köprükü & Seker 2008). Por ejemplo, para el caso de la deltametrina se ha observado en pruebas de toxicidad aguda, que LC_{50} en larvas de peces (e.g. Tilapia) se puede alcanzar a concentraciones entre 1.2 a 1.7 µg L^{-1}.

A nuestro conocimiento no se encuentran reportados estudios respecto del efecto de los piretroides cipermetrina y deltametrina sobre la fisiología y metabolismo de estados larvales de mitílidos, más específicamente la especie de importancia económica en Chile, *Mytilus chilensis.* Las tasas de aclaramiento e ingestión de larvas D de *M. chilensis* medidas en nuestro estudio, evidencian que estas fueron para ambos piretroides significativamente diferentes, dependiendo si se utilizaba el fármaco en su forma *pura* o *comercial*, siendo estas tasas mucho menores en experimentos utilizando el fármaco en su forma *pura.* En nuestro estudio, hemos observado además que las tasas de aclaramiento e ingestión en larvas D de *Mytilus chilensis* disminuyen en forma significativa por sobre concentraciones de 1 y 3 µg L^{-1}, para cipermetrina y deltametrina, respectivamente. Sin embargo este efecto de la concentración del piretroide, no es significativamente diferente si se utiliza el fármaco en su forma *pura* o *comercial* (i.e. ANOVA interacción *origen × concentración*).

Gowland et al. (2002) ha demostrado en áreas de uso de cipermetrina, que a concentraciones tan altas como 1000 µg L^{-1}, se observa que el mitílido *Mytilus edulis* cierra sus valvas y deja de alimentarse, sin embargo su sobrevivencia no se ve afectada. Ait Ayad et al. (2011) ha observado también que la actividad valvar del mitílido *Mytilus galloprovincialis* se ve afectada también a concentraciones desde los 100 µg L^{-1}. Para el caso de la deltametrina, se han reportado que concentraciones más bajas, cercanas a los 10 a 50 µg L^{-1}, podrían causar una depresión en el tiempo de apertura y flujo de agua por el sifón del mitílido de agua dulce *Anadonta cygnea* L. En consecuencia, resta por evaluar si concentraciones de deltametrina y cipermetrina por sobre los 10 y 100 µg L^{-1}, podrían llegar a ser observadas en terreno en áreas cercanas a centros de salmonicultura, considerando la alta capacidad de disolución que tienen los cuerpos de agua.

4 OBJETIVO 3: "EVALUACIÓN DE EXPOSICIÓN, DETERMINACIÓN DE DISPERSIÓN Y DILUCIÓN DE PIRETROIDES"

4.1 MODELACION DE PIRETROIDES

4.1.1 Modelo de Fugacidad

El modelo de fugacidad (tendencia al escape sustancia química que se expresa en unidades de presión) es un modelo multicompartimental que se basa en la distribución o flujo de sustancias químicas a través de diferentes compartimentos o matrices de interés, basado en principios de reparto o partición de la sustancia química bajo condiciones de equilibrio. Este modelo se encuentra representado en diferentes niveles de complejidad (I, II y III), los cuales entregan información de acuerdo a los datos requeridos para un escenario ambiental fijado por el usuario.

4.1.2 Metodología

En base a la disponibilidad de información sobre propiedades físico-químicas de compuestos piretroides (Tabla 14) y escenario ambiental (Tabla 15) se procedió a trabajar con el modelo de fugacidad Nivel III, siendo una primera aproximación predictiva de concentraciones en el ambiente marino (agua y sedimento) frente a una situación de tratamientos con piretroides: cipermetrina y deltametrina. Para dicha experiencia fue considerado el peor escenario de aplicación.

Tabla 14. Propiedades físico-químicas críticas de piretroides.

Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad agua (g/m^3)	Presión de Vapor (Pa)	Log Kow	Vida media (días)	
					Agua	Sedimento
Cipermetrina	416.29	0.004	2.3×10^{-7}	6.6	5	30
Deltametrina	505.19	0.002	2.0×10^{-6}	6.2	4	23

Ex. Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals.

Tabla 15. Datos ambientales que representan el escenario de tratamientos con piretroides. (*) Variables ambientales modificadas para el modelo de fugacidad.

Parámetro	***unidades***	***Valor***
Densidad salmones (D)*	Kg/m^3	25 (20-30)
Volumen agua	m^3	$2x10^5$
Volumen sedimento	m^3	20
Concentración material particulado	mg/L	10
Peso salmón	Kg	2.3
Área jaula	m^2	400 (20x20m)
Profundidad zona	m	50
Fracción carbono orgánica (fco)*	%	2 (1-3)
Fracción lípidos	%	10
Velocidad de Corriente (V)*	cm/s	6 (4-8)
Tasa depositación sedimento[a]	m^3/m^2h	$4.6x10^{-8}$
Tasa resuspensión sedimento[a]	m^3/m^2h	$1.1x10^{-8}$
Difusión en agua[a]	m^2/h	$4.0x10^{-6}$

[a]Datos ambientales obtenidos de Mackay et al., 2001.

La emisión de piretroides utilizada para el modelo fueron las dosis aplicadas en tratamientos de caligus por centro de cultivo, siendo estas 5 µg/L para cipermetrina y 3 µg/L sobre una jaula de dimensiones 20m x 20m y velocidad de corriente promedio de 6 cm/s.

Con el propósito de entregar variabilidad en la predicción de concentraciones ambientales fue utilizado la simulación de Monte Carlo a través del software estadístico riesgo-análisis *Oracle Crystal ball* a través de la realización de 1000 simulaciones del modelo desplegado en una planilla Excel (Tabla 16) (Anexo Objetivo 3). Datos como velocidad de corriente (V), fracción de carbono orgánico (fco) y densidad de peces (D) por jaula fueron utilizados como variables de acuerdo a información disponible (Sernapesca, 2012). La contribución a la varianza de los resultados en cada matriz es mostrada en la Tabla 17.

Tabla 16. Predicción de concentraciones en sedimento y agua para compuestos piretroides. Variabilidad de la modelación se obtuvo mediante el software análisis-riesgo *Crystal ball*.

Compuesto	**Matriz**	**Unidad**	**Promedio**	**Mínimo**	**Máximo**
Cipermetrina	Agua	$ng\ L^{-1}$	6.03	4.54	8.81
	Sedimento	$\mu g\ kg^{-1}$	2574	713	7313
Deltametrina	Agua	$ng\ L^{-1}$	3.64	2.47	5.96
	Sedimento	$\mu g\ kg^{-1}$	222	62.9	628.3

Tabla 17. Contribución a la varianza de concentraciones modeladas por el modelo de fugacidad. Las variables consideradas fueron fracción de carbono orgánico (fco), Velocidad de corriente (V) y densidad de salmones por jaula (D).

Compuesto	Matriz	Variable	Varianza (%)	Correlación
Cipermetrina	Agua	V	99.97	-0.980
		D	0.03	0.016
		fco	0	-0.003
	Sedimento	fco	95.3	0.972
		V	4.6	-0.213
		D	0.1	-0.026
Deltametrina	Agua	V	99.1	-0.980
		D	0.7	0.086
		fco	0.1	-0.034
	Sedimento	fco	96.6	0.970
		V	3.3	-0.179
		D	0.1	0.023

4.1.3 Resultados

Los resultados obtenidos sugieren concentraciones en el rango de 4.54-8.81 ng/L de cipermetrina en agua, contribuyendo mayormente a la varianza la *velocidad de corriente* (*V*) en la zona (99%), lo que podría indicar la probabilidad de transporte advectivo según las corrientes predominantes. De igual manera, la predicción en agua para deltametrina sugiere concentraciones en el rango de 2.47-5.96 ng/L, siendo de igual manera la *velocidad de corriente* la variable que mayormente contribuye a la varianza (99%) (Tabla 16 y Tabla 17).

Para el caso de concentraciones predichas en sedimento de los compuestos cipermetrina y deltametrina obtenidos por el modelo se encontraron en el rango de 713-7313 y 62.9-628.3 µg/Kg, respectivamente (Tabla 16). La mayor contribución a la varianza de los datos fue aportada por la variable *Fracción de carbono orgánico* (*fco*) en sedimento con un 95 y 97% en la aplicación de cipermetrina y deltametrina, respectivamente. La variable *Velocidad de corriente* contribuyó de manera inversa en la varianza de compuestos piretroides en sedimento.

4.2 MONITOREO AMBIENTAL DE PIRETROIDES EN CENTROS DE CULTIVOS

4.2.1 Área de Estudio

Periodos de estudio

Se llevo a cabo un estudio en dos áreas ubicadas en la Isla de Chiloé, Región de los Lagos. Cada área estudiada fue diferenciada de acuerdo a los tratamientos realizados por los centros de cultivos de salmón en evaluación (piretroides). Durante el 16-23 de Diciembre del 2012 se efectúo la toma de muestras en el área con uso de cipermetrina (Pulelo) por parte de la industria salmonera ubicada a 41°51’23.14’’S, 73°29’09.45’’O (Figura 17, izquierda). Por otro lado, durante el 1-5 de Febrero del 2013 se efectúo la toma de muestras contemplada para la concesión salmonícola con aplicación de deltametrina (Quinchao), ubicada a 42°25’53.98’’S, 73°37’19.07’’O (Figura 17, derecha).

Coordenadas de sitios de muestreo

La selección de sitios para cada una de las regiones en estudio (Figura 18 a y b) fue de acuerdo a información hidrodinámica entregada por los centros de cultivos en evaluación. Las coordenadas de la toma de muestra en los distintos sitio se muestran en la en la Tabla 18. La toma de muestra para cada uno de los sitios fue realizada antes, durante y después de los tratamientos con piretroides.

Tabla 18. Coordenadas de sitios muestreados para cada área estudiada con tratamientos de piretroides.

Compuesto	Sitio	Latitud	Longitud
Cipermetrina	S1	41°51'30.07"S	73°29'02.80"O
	S2	41°51'21.52"S	73°29'21.97"O
	S3	41°51'21.01"S	73°29'43.22"O
	S4	41°51'24.16"S	73°29'53.21"O
Deltametrina	S1	42°25'53.25"S	73°37'18.66"O
	S2	42°25'46.56"S	73°37'20.24"O
	S3	42°25'43.74"S	73°37'22.34"O

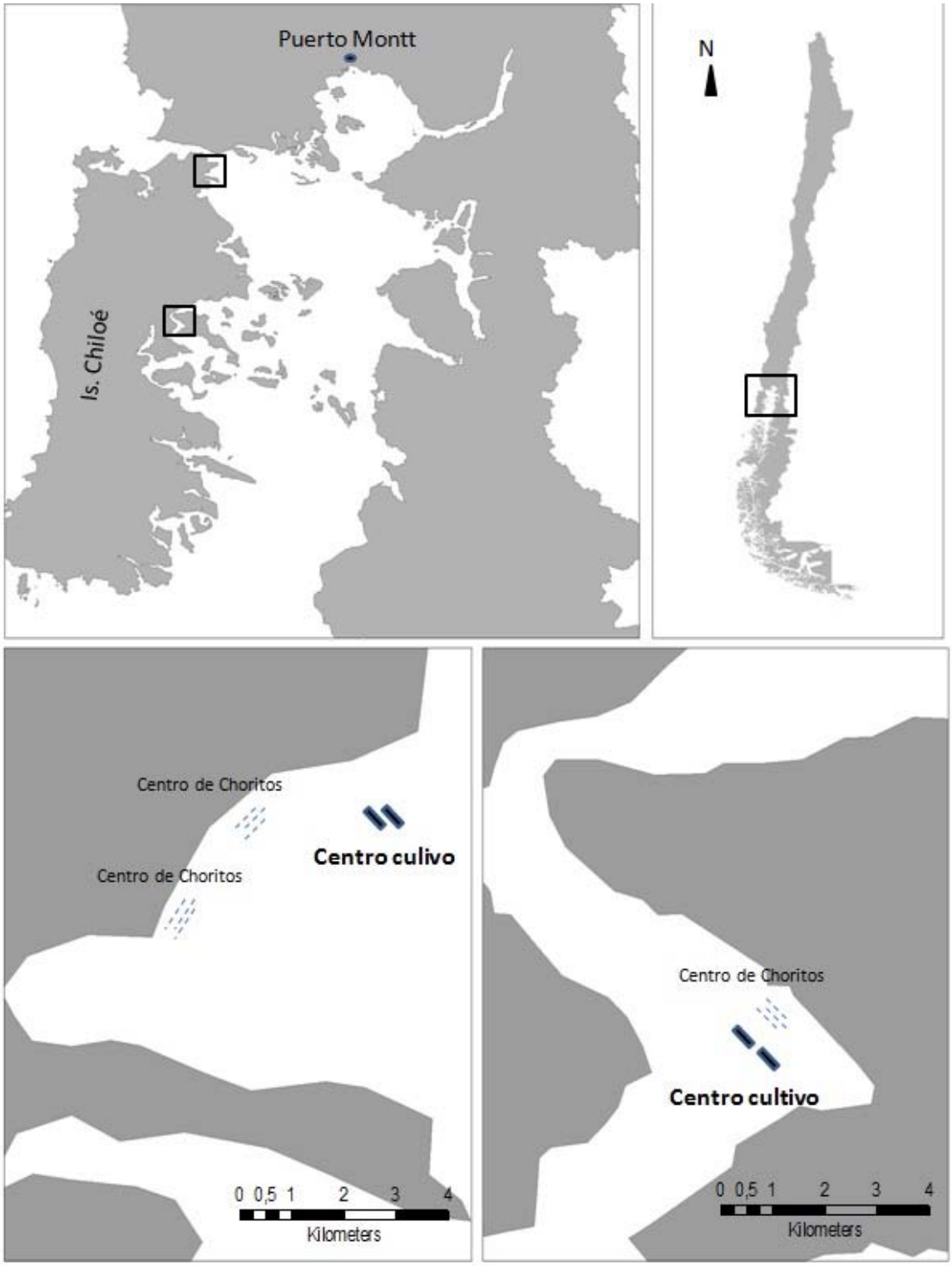
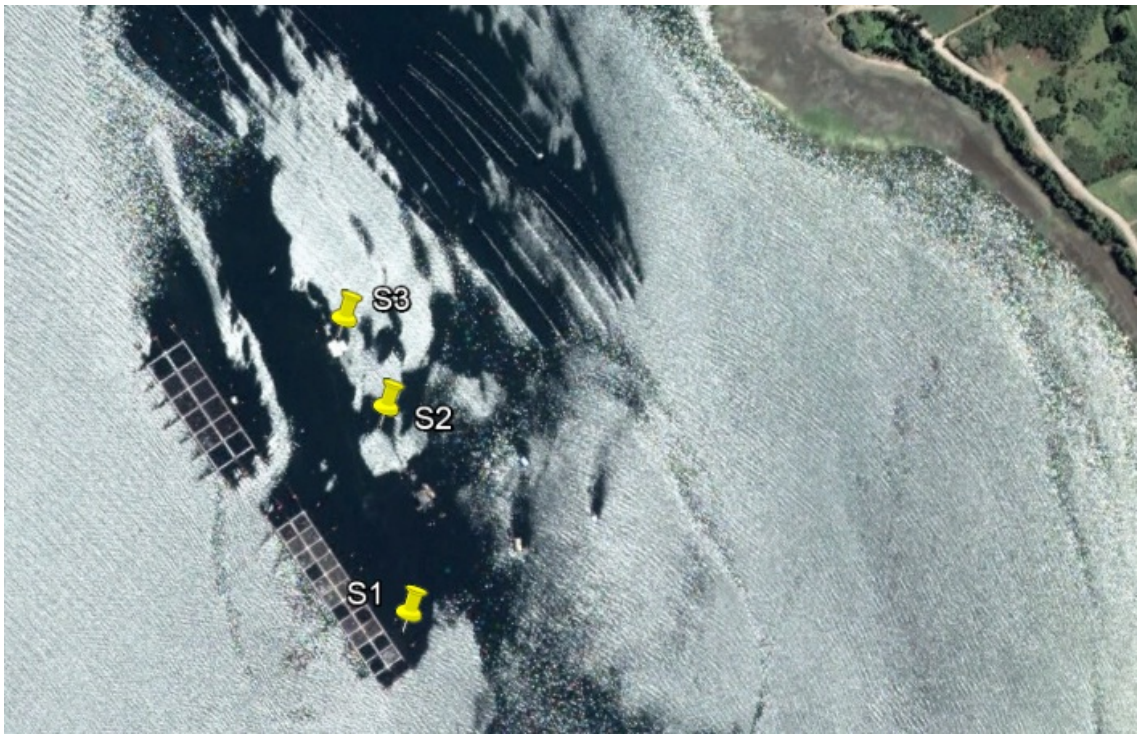


Figura 17. Ubicación de cultivos de salmón y choritos (*Mytilus chilensis*) en la Isla de Chiloé, Región de Los Lagos. Derecha: Centro con aplicación de Cipermetrina (Pulelo); Izquierda: centro con aplicación de Deltametrina (Quinchao).

(a)



(b)

Figura 18. Sitios de muestreo para cada centro con uso de cipermetrina (a) y deltametrina (b).

Dirección de corrientes

De acuerdo a información entregada por el centro de cultivos de salmón con aplicación de cipermetrina la dirección predominante en la zona es NORESTE. La tendencia de las masas de agua en la concesión estudiada predomina la orientación SURWESTE-NORESTE (Figura 19).

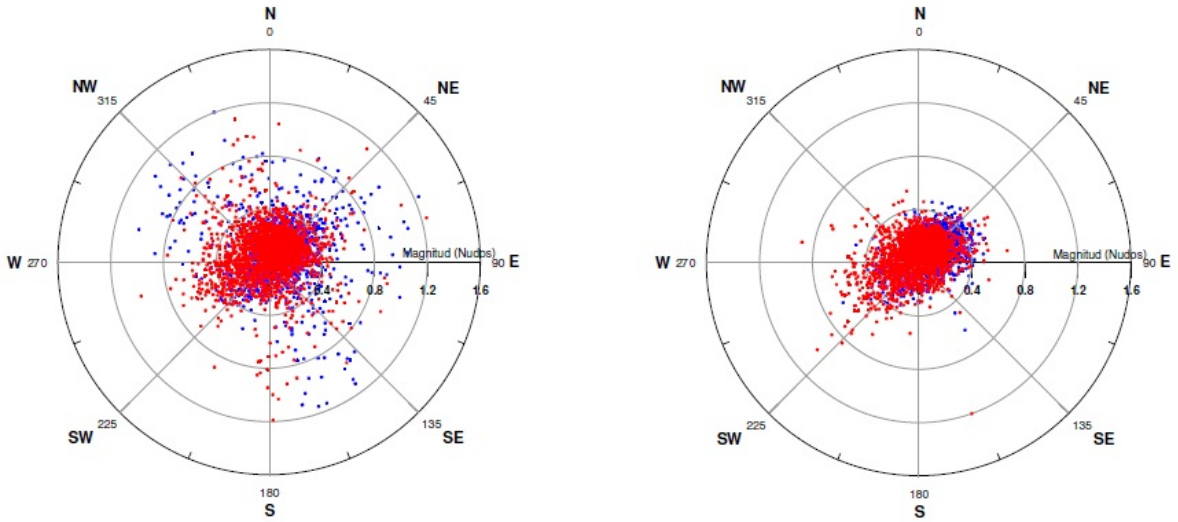


Figura 19. Ploteo de dirección de corrientes en capas superficiales (2.5m, izquirda.; 5m, derecha) de la zona con aplicación de cipermetrina. Fase de marea vaciante (color rojo), fase llenante (color azul).

Por otro lado, con respecto al centro con aplicación de deltametrina la dirección de corrientes predominantes es principalmente NORESTE-SUR, en fase llenante y vaciante, respectivamente (Figura 20).

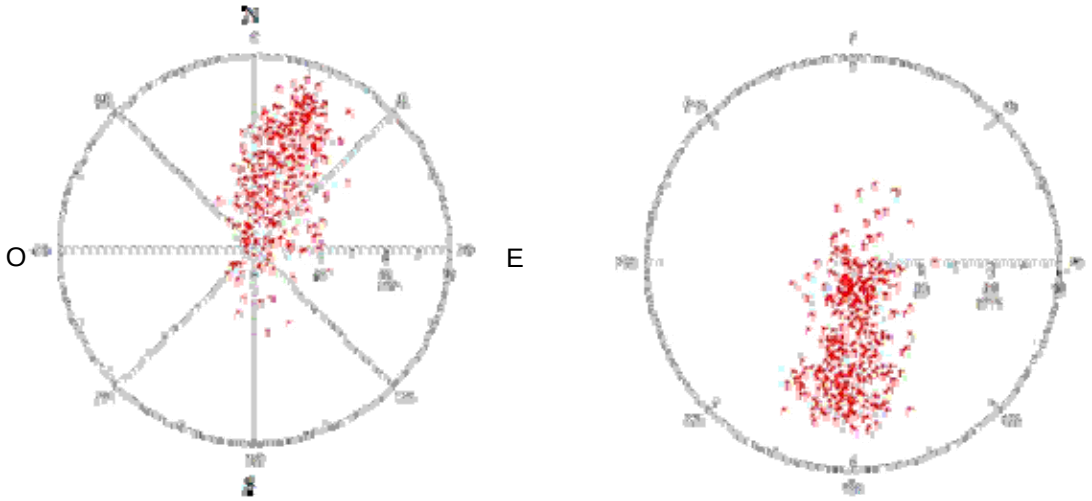


Figura 20. Ploteo de dirección de corrientes en capas superficiales (0-6m) de la zona con aplicación de deltametrina. Fase de marea vaciante (izquierda), fase llenante (derecha).

Toma de muestras de Agua

Para la toma de muestras de agua fue utilizada una botella Niskin (5L) de la cual el agua extraída fue incorporada en botellas ámbar (1L, por triplicado) y guardadas en cooler con hielo (4°C) (Anexo Objetivo 3). Posteriormente las muestras fueron enviadas al laboratorio para sus análisis por cromatografía. En el centro de cultivo de Pulelo, ubicado en la bahía de manao, se trabajó en tres tiempos distintos, pre-aplicación (T1), aplicación (T2) y post-aplicación (T3) de Cipermetrina, y para cada uno de estos tiempos, en diferentes radios de impacto a distintas distancias 0 metros, 10 metros, 100 metros y 400 metros, tomando muestras por triplicado para cada unos de estos puntos, tomando en cuenta las corrientes anti-horario con las cuales cuenta la bahía de manao.

A través de la colaboración de buzos, en cada centro de salmón estudiado, se obtuvo ejemplares de mitilidos en áreas cercanas al pontón, boyas y/o estructuras de la jaula de cultivo (Anexo Objetivo 3). Además, fueron solicitados en centros de mitilidos, cercanos a centro con aplicación de piretroides, ejemplares de *Mytilus chilensis*. Dicho ejemplares fueron procesados a bordo de la embarcación y puestos en formalina tamponada (10%) para su posterior estudio histológico en laboratorio.

4.2.2 Metodología de Análisis

4.2.2.1 Cipermetrina

La determinación de Cipermetrina, se realiza tomando 30 mL de muestra y se mezcla con solvente n-hexano, mediante agitación manual durante un minuto. Posterior a esto se generan dos fases, una orgánica y otra acuosa, en la fase orgánica, se encuentra nuestro analito, por lo cual esta fase es trasvasijada a balones de 100mL de fondo plano. Esta parte de la metodología se realiza 3 veces, para lograr un volumen aproximado de 90 mL de extracto. Este extracto es concentrado en rotavapor y trasvasijado a viales de vidrio de color ámbar para luego ser reconstituidos a su volumen final en tolueno, después de esto, el extracto queda listo para ser inyectado en el cromatografo de gas con detector de captura de electrones (GC-ECD) (Ver Figura 21)

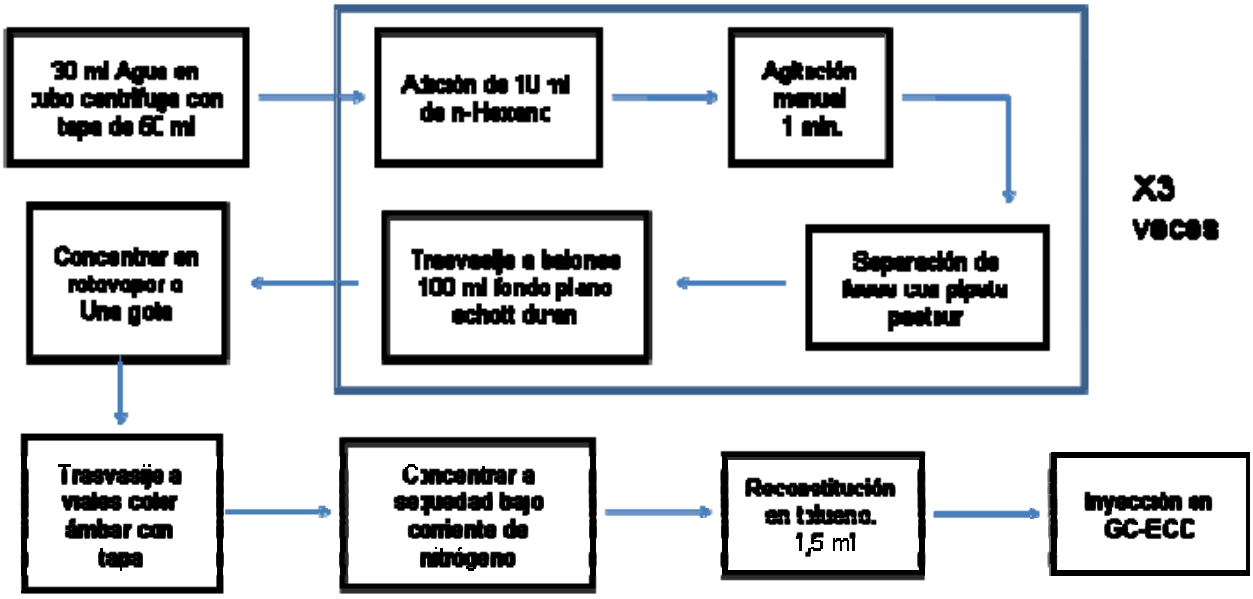


Figura 21. Esquema de la metodología de Análisis de Cipermetrina en la Matriz Agua.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Cipermetrina

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de agua, del centro Pulelo en la bahía de Manao, no se logran detectar concentraciones de Cipermetrina en el medio acuático (< 12 ug/L), en ninguno de los tiempos realizados previas a la aplicación, durante la aplicación o bien después de la aplicación (T1, T2 y T3). Así también a las diferentes distancias a las cual se efectuaron las tomas de muestras, tampoco se logra detectar concentraciones de Cipermetrina.

Las corrientes existentes en la zona de la bahía de Manao, sumado a los vientos predominantes del sector, generan buenas condiciones que mejoran la dilución del contaminante en el medio acuático.

5 OBJETIVO 4: “ESTUDIO GONADAL EN MYTILUS CHILENSIS”

5.1 METODOLOGÍA

La adecuada manipulación del tejido problema, ya sea este una porción del animal o el animal completo, implica la utilización del menor tiempo posible desde su obtención o extracción hasta su disposición en una solución fijadora. La fijación es crítica en el tratamiento tisular para lograr una expresión morfológica representativa de la condición presente en el animal *in vivo*, pues detiene los procesos autolíticos celulares, evitando además la putrefacción (Luna 1968).

A través de la colaboración de buzos, en cada centro de salmón estudiado, se obtuvo ejemplares de mitilidos en áreas cercanas al pontón, boyas y/o estructuras de la jaula de cultivo (Anexo Objetivo 3). Además, fueron solicitados en centros de mitilidos, cercanos a centro con aplicación de piretroides, ejemplares de *Mytilus chilensis*. Se trabajo según los procedimientos establecidos por Kamstock et al (2011), los especímenes extraidos desde los centros Pulelo y Quinchao, fueron dispuestos en formalina tamponada al 10% (FT), utilizando para la disolución agua de mar filtrada. Se considero una relación de al menos 1 parte de tejido problema en 5 partes de solución fijadora. Se utilizo contenedores individuales de plástico, boca ancha, debidamente rotulados. Se considero como antecedentes de rotulación la especie animal, tejido u órgano, fecha de toma de muestra y codificación que identifique al individuo o lote. El tiempo desde el momento de la obtención de la muestra a su inmersión en FT no supero los 10 minutos.

Los frascos fueron remitidos al Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática de la Universidad de Concepción para su procesamiento histológico.

5.1.1 Procesamiento tisular y tinción

Las muestras en cuestión fueron fijadas en formalina al 10%, en agua de mar filtrada y tamponadas con Carbonato de Calcio a saturación, deshidratadas, aclaradas e incluidas bajo protocolo de 1 a 1,5 horas por estación. El corte en micrótomo de rotación se hizo considerando un grosor de 5 µm. Con posterioridad fueron teñidas mediante protocolo de tinción Hematoxilina-eosina (base acuosa) y montadas con resina sintética. La escala de evaluación gonadal en *Mytilus chilensis* será comparada con información cualitativa y cuantitativa analizada por Oyarzún et al. (2011).

La lectura de las láminas se realizó mediante microscopio de luz Olympus CX31, obviando objetivo de inmersión (1000X). Se utilizó la técnica de observación en “S” incluyendo toda

la muestra. Se consideró como mecanismo de obtención de resultados el análisis (en segunda instancia) de 10 campos, aumento 100X asignados de forma aleatoria. Se consideró el tamaño y morfología tubular así como la morfología, disposición y tamaños de los gametos, involucrando en el estudio, la dispersión morfométrica. Igualmente fue analizada la conformación del tejido conectivo intertubular.

5.1.2 Cipermetrina

Descripción Histológica

La descripción histológica se encuentra de acuerdo a la zona y fecha en que fueron tomadas las muestras de choritos. Para el caso en la evaluación del compuesto cipermetrina el orden es el siguiente:

a. Centro de salmones (Pontón, boyas) _ 16/Diciembre/2012.

b. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _18/Diciembre/2012.

c. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _01/Febrero/2013.

Para el caso de Centro de choritos, durante 01/febrero/ 2013, las muestras fueron solicitadas en el mismo centro de cultivo en el mes de diciembre, siendo este la evaluación post tratamiento, luego de 30 días de la aplicación de cipermetrina.

a. Centro de cultivo de salmones (Pontón, boyas)

Réplica 1
Total de gónadas = 5, Hembras 2; Machos 3

Hembras: Ambas láminas expusieron un desarrollo gonadal que involucró ovocitos de bordes redondeados, claramente maduros pre-desove, no observándose ovocitos vitelogénicos.

Machos: Estructuras tipo “clusters” carentes, en su mayoría de lumen, constituidas por espermatocitos maduros morfológicamente acordes a lo esperado para la especie.

A B

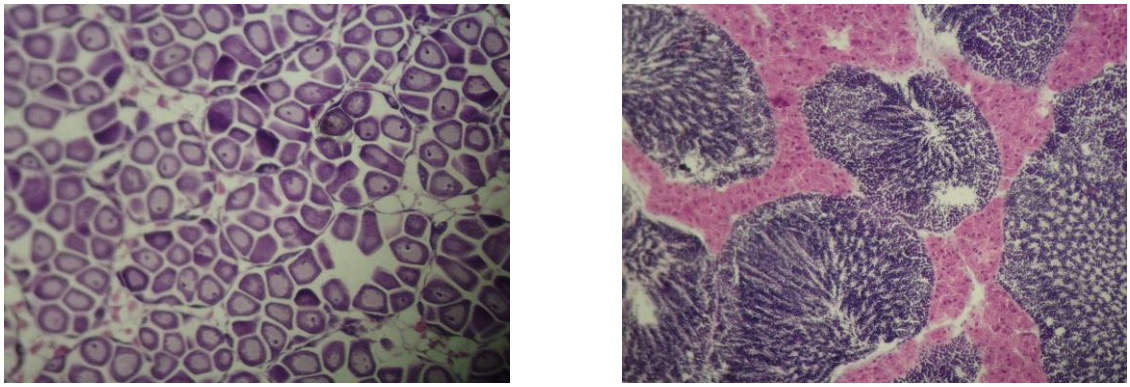


Figura 22. Fotografía corte histológico de Gónada de choritos A) Hembra B) Macho

Réplica 2
Total de gónadas = 5, Hembras 3; Machos 2

Hembras: Gónadas cuyas células en su mayoría poliédricas exponen claramente un cambio gradual hacia un estado de desove, por lo que es preciso sindicarlas como maduras en estado avanzado o pre-ovulatorio.

Machos: Estructuras tipo "clusters" carentes, en su mayoría de lumen, constituidas por espermatocitos maduros morfológicamente acordes a lo esperado para la especie.

A B

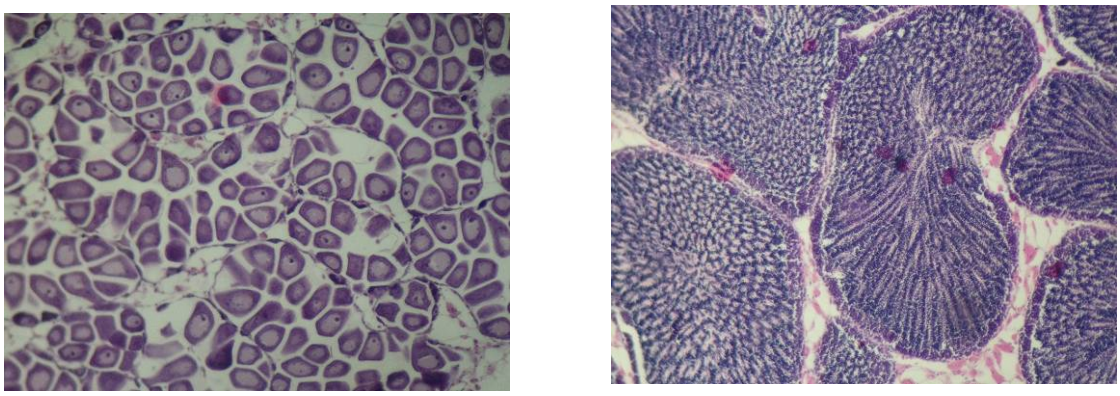


Figura 23. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito A) Hembra B) Macho

a. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _18/Diciembre/2012.

Total de gónadas = 5, Hembras 5; Machos 0

Hembras: Es posible advertir una población casi exclusivamente constituida por ovocitos maduros siendo muy baja la cuantía de ovocitos vitelogénicos y en desove.

Machos: No hubo observaciones.

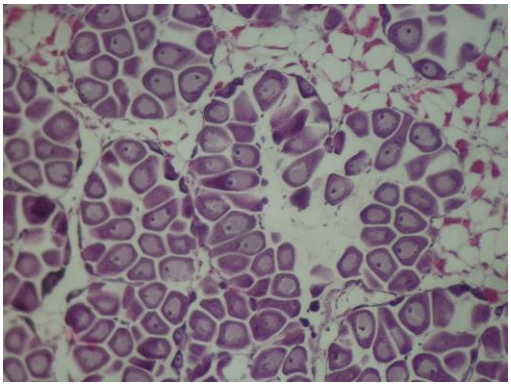


Figura 24. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito en Hembras

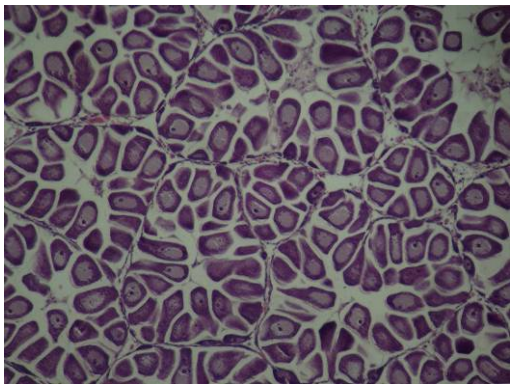
b. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _01/Febrero/2013.

Total de gónadas = 20, Hembra 12; Machos 8

Hembras: Desarrollo gonadal que involucró ovocitos de bordes redondeados, claramente maduros pre-desove, no observándose ovocitos vitelogénicos. 4 individuos evidenciaron franco desove.

Machos: Estructuras tipo "clusters" carentes, en su mayoría de lumen, constituidas por espermatocitos maduros morfológicamente acordes a lo esperado para la especie. La cantidad de individuos que presentaron presencia de lumen en más de un 30% de la muestra fue 1.

A B



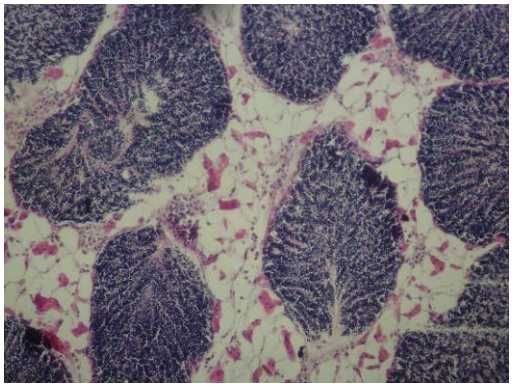


Figura 25. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito A) Hembra B) Macho.

5.1.3 Deltametrina

Descripción Histológica

La descripción histológica se encuentra de acuerdo a la zona y fecha en que fueron tomadas las muestras de choritos. Para el caso en la evaluación del compuesto deltametrina el orden es el siguiente:

a. Centro de salmones (Pontón) _ 31/Enero/2013.

b. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _31/Enero/2013.

Por motivos de entrega de información final a Subpesca no se llevó a cabo la toma de muestra en centro choritos (*Mytilus chilensis*) correspondiente a 30 días después del tratamiento con deltametrina.

a. Centro de salmones (Pontón) _ 31/Enero/2013.

Réplica 1
Total de gónadas = 5, Hembra 5; Machos 0

Hembras: Es posible advertir una población casi exclusivamente constituida por ovocitos maduros siendo muy baja la cuantía de ovocitos vitelogénicos.

Machos: No hubo observaciones.

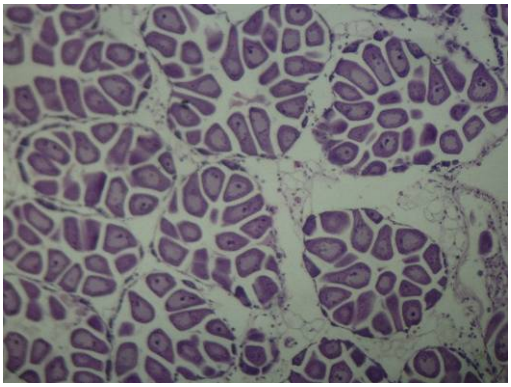


Figura 26. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito Hembra

Réplica 2
Total de gónadas = 5, Hembra 3; Machos 2

Hembras: Es posible advertir una población casi exclusivamente constituida por ovocitos maduros siendo muy baja la cuantía de ovocitos vitelogénicos.

Machos: En todos los casos se distinguen claramente los "clusters" compactos carentes de lumen constituidos por espermatozoides concordante con gónadas maduras.

A B

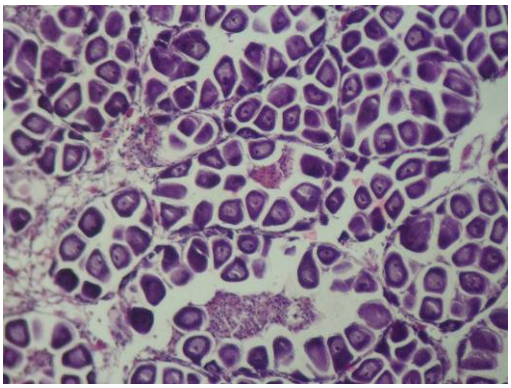


Figura 27. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito A) Hembra B) Macho.

Réplica 3
Total de gónadas = 5, Hembra 4; Machos 1

Hembras: Aspecto morfológico de gónadas idéntico a Réplica1 y Réplica 2.

Machos: Aspecto morfológico de gónadas idéntico a Réplica1 y Réplica 2.

Réplica 4
Total de gónadas = 5, Hembra 5; Machos 0

Hembras: Aspecto morfológico de gónadas idéntico a idéntico a Réplica1 y Réplica 2.

Machos: No hubo observaciones.

b. Centro choritos (*Mytilus chilensis*) _31/Enero/2013.

Réplica 1
Total de gónadas = 5
Hembras 5
Machos 0

Hembras: Es posible advertir una población casi exclusivamente constituida por ovocitos maduros siendo muy baja la cuantía de ovocitos vitelogénicos.

Machos: No hubo observaciones.

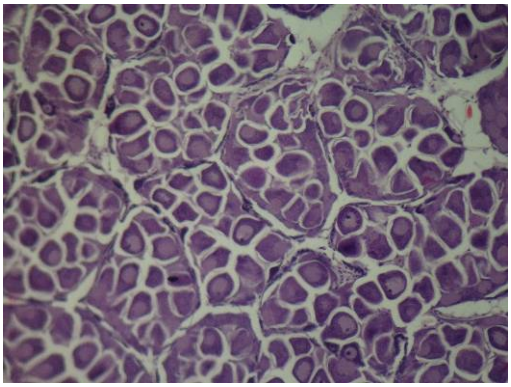


Figura 28. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito Hembra.

Réplica 2
Total de gónadas = 5, Hembras 5; Machos 0

Hembras: Es posible advertir una población casi exclusivamente constituida por ovocitos maduros siendo muy baja la cuantía de ovocitos vitelogénicos.

Machos: No hubo observaciones.

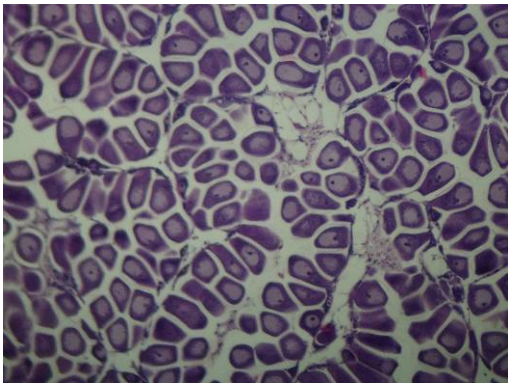


Figura 29. Fotografía corte histológico de Gónada de chorito Hembra

6 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

De la revisión bibliográfica ecotoxicológica realizada sobre los efectos en organismos marinos, se desprende que los mitílidos no corresponden a las especies más sensibles a los piretroides estudiados, las concentraciones de no efecto (NOEC) descritas en la literatura para ensayos de toxicidad crónica corresponden a valores sobre los 10 µg L^{-1} para cipermetrina y sobre 1 µg L^{-1} para deltametrina.

Los bioensayos realizados con gametos y al desarrollo del embrión hasta larva D, indican que *Mytilus chilensis* no es sensible a los caligicidas evaluados a las concentraciones que estos se aplican en el tratamiento de control del *Caligus (*2-5 µg L^{-1}*)*. Incluso a concentraciones considerablemente más altas que las recomendadas no hay efectos o estos se manifiestan en una baja proporción del grupo experimental. Los efectos observados a concentraciones elevadas de exposición 100 µg L^{-1}, indican probablemente un efecto asociado a la presencia de acetona utilizada para disolver estas sustancias debido a su baja solubilidad en agua.

Intentos infructuosos de criar larvas de chorito hasta el asentamiento de la larva no ha permitido poner a prueba la sensibilidad a piretroides de la etapa metamórfica que transforma la larva en juvenil. Sin embargo, las evaluaciones de sensibilidad de las etapas anteriores en el desarrollo sugieren como muy probable la ausencia de efectos inhibitorios del asentamiento larval.

Experimentos verificando los efectos de ambos piretroides sobre las tasas de aclaramiento y de ingestión de las larvas de *Mytilus chilensis*, indican una respuesta de efecto significativamente diferente de los controles en un rango de 1- 3 µg L^{-1} de ambos piretroides. Un aspecto interesante es que este experimento también probó el efecto de los productos comerciales, siendo estos en general menos efectivos en reducir las tasa de aclaramiento e ingestión sobre las larvas de *Mytilus chilensis*

Utilizando un modelo predictivo en un escenario de peor caso, las concentraciones esperadas de ambos piretroides en el agua son del orden de 0,003 y 0,006 µg L^{-1} para deltametrina y cipermetrina, respectivamente.

Las concentraciones experimentales medidas de Cipermetrina en el agua, se encuentran bajo los límites de detección, que para este estudio fueron de 12 µg L^{-1}, para cipermetrina mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones.

En el análisis histológico de gónadas de muestras tomadas en condiciones de campo antes y después de un tratamiento con ambos caligicidas no se observaron alteraciones

histológicas en muestras de gónadas de *Mytilus chilensis* eventualmente expuestas a piretroides en condiciones de campo. Se sugiere sin embargo, un tiempo más largo de observación.

7 REFERENCIAS

Ait, A. M., Ait, F.M., Mouabad, A. (2011) Effects of Cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel Mytilus galloprovincialis. *Arch Environ Contam Toxicol.*Vol. 60(3):462-70. DOI 10.1007/s00244-010-9549-7.

Aufderheide J. (1999) Acute toxicity of BETAMAX® (Cypermethrin) to the Mysid, *Mysidopsis bahia.* ABC Laboratories Study Nº: 70172. (after McHerery, 2000).

Barata C, Baird DJ (2000) Determining the ecotoxicological mode of action of toxicants from measurements on individuals: results from short duration chronic tests with Daphnia magna Straus. *Aquat Toxicol* 48:195–209.

Barata C., Baird D. J., Medina M., Albalat A., and Soares A.M.V.M. (2002a) Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai. Mar Ecol Prog Ser*. Vol. 230: 183–194.

Barata, C., M. Medina, T. Telfer, D. J. Baird (2002b) Determining Demographic Effects of Cypermethrin in the Marine Copepod *Acartia tonsa*: Stage-Specific Short Tests Versus Life-Table Tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 373–378.

Boyle, J. & McHenery, J.G. (1995) Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to brown shrimp (96 hour, Semi-static). Inveresk Research International, Report 12175. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; Knight, B. & McHenery, J.G. (1995c) Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Corophium volutator* (10 day, Static). Inveresk Research International, Report 10645. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; Knight, B. & McHenery, J.G. (1995d): Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Corophium volutator* (10 day, Static). Inveresk Research International, Report 10569. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; Knight, B. & McHenery, J.G., (1995a): Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Mysidopsis bahia* (96 hour, Semi-static). Inveresk Research International, Report 10535. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; Knight, B. & McHenery, J.G., (1995b): Cypermethrin as GPRD01: Marine algae growth inhibition test (72 hour, Limit test). Inveresk Research International, Report 10487. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; McHenery, J.G. & Knight, B. (1995a): Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to Turbot larvae (48 hour, Static). Inveresk Research International, Report 10902. (after McHenery, 2000).

Boyle, J.; McHenery, J.G. & Knight, B. (1995b): Cypermethrin as GPRD01: Oyster embryo bioassay (48 hour, EC50). Inveresk Research International, Report 10930. (after McHenery, 2000)

Bradbury S.P. & Coats J.R. (1989) Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insectides in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 2-21.

Burridge L. E., Haya K., Page F. H., Waddy S.L., Zitko V., Wade J. (2000) The lethality of the cypermethrin formulation Excis® to larval and post-larval stages of the American lobster (Homarus americanus). *Aquaculture* 182, 37–47.

Burridge L.E., K. Haya, S.L. Waddy, J. Wade (2000) The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan Azamethiphos and Excis Cypermethrin to stage IV and adult lobsters *Homarus americanus* during repeated short-term exposures. *Aquaculture* 182 27–35

Calow P, Sibly RM, Forbes V (1997) Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. *Environ Toxicol Chem* 16:1983–1989.

Castro S., J. Espinoza, D. Miguez & F. Matturo (2002) Los Bioensayos como herramientas de la evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo, Canadá. Laboratorio Tecnológico del Uruguay. 51 Pág.

Chapman, R.A., and C.M. Cole (1982) Observations on the influence of water and soil pH on the persistence of pesticides. *J. Environ. Sci. Health B* 17:487-504.

Clark J. R., J. M. Patrick, Jr. J. C. Moore and E.M. Lores (1987) Water-borne and sediment-source toxicities of six organic chemicals to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and amphioxus (*Brachiostoma caribaeu*). *Arc. Environ. Contam. Toxicol.* 16: 401-407.

Clark JR, Goodman LR, Borthwick PW, Patrick JM, Cripe GM, Moody PM, Moore JC, Lores EM (1989) Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates and fish: A literature review and test results with sediment-sorbed chemicals. *Environ Toxicol Chem* 8:393–401

Cragg SM, Eaton RA (1997) Evaluation of creosote fortified with synthetic pyrethroids as wood preservatives for use in the sea. Part 2: effects on wood-degrading microorganisms and fouling invertebrates. *Mat Organ* 31:197–216

Cripe GM (1994) Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis bahia* and postlarval *Penaeus duorarum*. *Environ Toxicol Chem* 13:1867–1872

Davenport, J. (1977) A study of the effects of copper applied continuously and discontinuously to specimens of *Mytilus edulis* (L.) exposed to steady and fluctuating salinity levels. *J. Mar. Biol. Assoc.* U.K. 57, 63–74.

Davies I. M., G. K. Rodger, J. Redshaw, and R. M. Stagg (2001) Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. ICES Journal of Marine Science, 58: 477–485.

Devillers, J., Bintein, S., Domine, D. (1996) Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere* 33(6), 1047–1065.

Elliott, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Needham, P.H., Pulman, D.A. (1974b) Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature* 248, 710–711.

Eshleman, A.J. & Murray, T.F. (1991). Pyrethroid insecticides indirectly inhibit GABA-dependent 36 CL- influx in synaptoneurosomes from the trout brain, en: Neuropharmacology, 12 A: 1333-1341.

Estesen, B., Buch, N., & Ware, G. (1979) Dislodgeable insecticide residue on cotton foliage; permethrin, curacron, fenvalerate, sulprofos, decis and endosulfan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 245-248.

Extoxnet (1999) Movement of pesticides in the environment. Extension Toxicology Network. Web: http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/tibs/movement.htm.

Fairchild, J.F., E.E. Little y J.N. Huckins. (1992) Aquatic hazard assessment of the organophosphate insecticide fonofos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 22: 375-379.

Frost B. W. (1972). Effects of size and concentration of food particles on the feeding behaviour of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. Limnology and Oceanography 17: 805-815.

Forbes VE, Calow P, Sibly RM (2001) Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 20:442–447.

Gowlan, BT, Moffat CF, Stagg RM, Houlihan DF, Davies IM. (2002a) Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res.* Vol. 54(2):169-77.

Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., Stagg, R. (2002b) Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ Pollut.* Vol. 120(3):805-11.

Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms—A review. Chemosphere 37, 1335–1362.

Hartley, D., Kidd, H., Editors (1987) *The Agrochemicals Handbook*. 2nd Edition, The Royal Society of Chemistry, Nottingham, England.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB) (1999). Visto: 20 Octubre 2012, disponible online en la página: http://sis.nlm.nih.gov/enviro/hsdbchemicalslist.html.

Hill I.A. (1985) Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. In J. P. Leahy, ed., The Pyrethroid Insecticides. Taylor and Francis, London, U.K., pp. 151-262.

Karalsu Benli, A.C.; Selvi, M.; Sarikaya, R.; Erkoc, F. & Kocak, O. (2009) Acute toxicity of Deltamethrin on Nile Tilapia (*Oreochronis niloticus* L.1758) larvae and fry. G.U. Journal of Science 22(1): 1-4.

Kidd H, James DR. (1991) The Agrochemicals handbook, Third Edition. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services (as updated).5-14 (Cita en EXTOXNET 1993).

Knight, B.; Boyle, J. & McHenery, J.G. (1995a) Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Acartia tonsa* (48 hour, Static). Inveresk Research International, Report 10527. (after McHenery, 2000).

Knight, B.; Boyle, J. & McHenery, J.G. (1995b) Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Arenicola marina* (10 day, Static). Inveresk Research International, Report 10533. (after McHenery, 2000).

Knight, B.; Boyle, J. & McHenery, J.G. (1995c) Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Asterias rubens* (96 hour, Semi-static, Limit). Inveresk Research International, Report 10531. (after McHenery, 2000).

Kontreczky Cs., Farkas A., Nemcsók J., and Salánki J. (1997) Short- and Long-Term Effects of Deltamethrin on Filtering Activity of Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea* L.) *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol 38, Issue 3, 195–199.

Köprücü K., Yonar E. and Seker E. (2008) Effects of Deltamethrin on Antioxidant Status and Oxidative Stress Biomarkers in Freshwater Mussel, *Unio elongatulus eucirrus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81:253–257. DOI 10.1007/s00128-008-9474-x.

Köprücü K., Yonar S.M., and Seker E. (2010) Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fish Sci* 76:1007–1013. DOI 10.1007/s12562-010-0293-8.

Kumaragura A.K. and Beamish F.W.H. (1981) Lethal toxicity of permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, Salmo gairdneri, in relation to body weight and temperature. Water Res. 15: 503–505.

Laboratorio de Toxicología, Environment Canada. Atlantic Region. (extraido de: Ernst et al., 2001. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. *Marine pollution Buletin* Vol 42 (6): 433-444).

Leahey, J.P. (1985) Metabolism and environmental degradation, in The Pyrethroid Insecticides. Leahey, J.P., Ed., Taylor and Francis, London. 263-342.

Leicht, W.; Fuchs, R.; Londershausen, M., (1996) Stability and biological activity of cyfluthrin isomers. *Pest. Sci.* 48, 325-332.

Little, E.E.; Dwyer, E.J.; Fairchild, J.F.; Delonay, A.J.D. & Zajicek, J. L. (1993). Survival of bluegill and their behavioral responses during continuous and pulsed exposures to esfenvalerate, a pyrethroid insecticide, En: Environ. Toxicol. Chem., 12: 871-878.

Liu, W. ; Gan, J. ; Schlenk, D.; Jury, W. A., (2005) Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. PNAS. 102, 701-706.

Lowe, D.M., Pipe, R.K., (1994) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357–365.

Mackay, D. (2001). Multimedia environmental models. The fugacity approach. Lewis Publishers, Chelsea, USA.

Mackay, D., Shui W., Ma K. and Lee S. (2006). Handbook of Physical- Chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Second edition. Taylor & Francis Group. Vol. IV, Chapter 8: 3715-3992.

Marín V., M. E. Huntley & B. W. Frost (1986). Measuring feeding rates of pelagic herbivores: analysis of experiment design and methods. Marine Biology 93: 49-58.

McLesse, D. W., C.D. Metcalfe and V. Zitko (1980) Lethality of permethrin, cypemetrhin and fenvalerate to almon, lobster and shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 950-955.

Mestres R. and G. Mestres (1992) Deltamethrin: uses and environmental safety, Rev. *Environ. Contam. Toxicol.* 124 1–18.

Milhaud G., Enriquez B. y El Bahri L. (1982) Rev. Intéret des pyréthrines et des pyrethrinoides de synthese en Medicine Veterinare. *Rev. Méd. Vét.* 158(4) 397-405.

Milson T.L. (1999a). The effects of BETAMAX® on the marine copepod, *Acartia tonsa*. Vericore Limited Report Nº:VC99004 (after McHenery, 2000).

Milson T.L. (1999b). The effects of BETAMAX® on the marine amphipod *Corophium volutator*. Vericore Limited Report Nº:VC99029 (after McHenery, 2000).

Milson T.L. (1999c). The effects of BETAMAX® on the marine amphipod *Corophium volutator*, in a 10 day static exposure in seawater. Vericore Limited Report Nº:VC99028 (after McHenery, 2000).

Moore A. and Waring C.P. (2001) The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquatic Toxicol. 52: 1–12.

Muir, D.C.G., Rawn, G.P., Townsend, B.E., Lockhart, W.L. (1985) Bioconcentration of cypermethrein, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environ. Toxicol. Chem*. 4, 51–61.

Pahl, B., Opitz, H. (1999) Acute mortality of soft shell clam Mya arenaria, larvae, green sea urchin Strongylocentrtus droenbachiensis, larvae, and rotifers Brachionus plicatilis, exposed to cypermethrin (excist). *J. Appl. Aquacult.* 9 (1), 73–83.

Smith, T.M. & Stratton, G. W. (1986). Effects of synthetic pyrethroid insecticides on non-target organisms, en: Residue Rev., 97: 93-120.

Strickland JD, and Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. *Bull Fish Res Bd Can* 167.

Siebers, J.; Mattusch, P. (1996) Determination of airborne residues in greenhouses after application of pesticides. *Chemosphere*, 33-8:1597-1607.

Stephenson, R.R. (1982b) WL 85871 and cypermethrin: a comparison of their acute toxicity to *Salmo gairdneri*, *Daphnia magna*, and *Selenastrum capricornutum, Sittingbourne, Shell Research (SBGR.81.277).*

Sujie Q.; Budd R.; Bondarenko S.; Weiping L. & Gan J. (2006). Eantioselectivity degradation and charal stability of pyrethroids in soil and sediment. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 54, 5040-5045.

Tomlin, C. (1994) *The Pesticide Manual (A World Compendium)*. 10th Ed., Incorporating the Agrochemicals Handbook. The British Crop Protection Council, Surrey, UK and The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.

Ural, M. S., Sağlam, N. (2005) A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) *Pest. Biochem. Physiol.*, 83, 124-131.

USEPA (1994) Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh water organisms. EPA/600/4-91/003. Washington, D.C.: USEPA.

WHO Environmental Health Criteria (1989): IPCS International Programme on Chemical Safety. Cypermethrin – Environmental Health Criteria 82. ISBN: 92 4 1542829.

WHO Environmental Health Criteria (1990): IPCS International Programme on Chemical Safety. Deltamethrin – Environmental Health Criteria 97. ISBN 92 4 154297 7.

Willis, K. J., P.A., Gillibrand, C.J., Cromey and K.D., Black. (2005) Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effects on zooplankton communities: a case study. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 50: 806-816.

Willis, K.J. and Ling, N. (2004) Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. *Aquaculture Research* 35: 263-270.

Zitko, V.; McLeese, D.W.; Metcalfe, C.D. & Carson, W.G. (1979): Toxicity of permethrin, decamethrin, and related pyrethroids to salmon and lobster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., 21 338-343.

ANEXO OBJETIVO 1

INFORMACIÓN ECOTOXICOLÓGICA CIPERMETRINA

Tabla 1. Información ecotoxicológica aguda de organismos marinos para el compuesto Cipermetrina.

				LC50	EC50	IC50		
Compuesto	**Especie**	**Tipo**	**Grupo**	**µg/L**			**Tiempo (h)**	**Referencias**
Cipermetrina	*Polydora cornuta* (juvenil)	Poliqueto	Anelido	27,8	-	-	96	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Crassostrea virginica	Ostra	Bivalvo	370	-	-	96	Hill, 1985
	Crassostrea gigas	Ostra	Bivalvo	>2300	-	-	96	Hill, 1985
	Ostra	Ostra	Bivalvo	-	2300	-	48	Haya et al., 2005
	Mya arenaria (larva)	Almeja	Bivalvo	>10000	-	-	12	Pahl and Opitz 1999
	Crassostrea gigas	Ostra	Bivalvo	1400	-	-	48	Gibson, 2000
	Crassostrea gigas	Ostra	Bivalvo	>1001	-	-	48	Boyle et al., 1995b
	Unio elongatulus eucirrus	Almeja	Bivalvo	59,2	-	-	96	Kroprucu et al., 2010
	Acartia tonsa (huevos)	Copépodo	Crustáceo	0,1288	-	-	120 (5días)	Barata et al. 2002
	Acartia tonsa (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	0,0052	-	-	120 (5días)	Barata et al. 2002
	Acartia tonsa (adulto)	Copépodo	Crustáceo	0,1081	-	-	120 (5días)	Barata et al. 2002
	Gammarus spp.	Anfípodo	Crustáceo	0,36	-	-	96	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Artemia salina	Camarón	Crustáceo	>500	-	-	24	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Eohaustorius estuarius	Anfípodo	Crustáceo	>1	-	-	48	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Amphiporeia virginiana	Anfípodo	Crustáceo	7,42	0,03	-	48	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Amphiporeia virginiana	Anfípodo	Crustáceo	6,86	0,0034	-	48	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
	Mysidopsis bahía	Camarón	Crustáceo	0,056	-	-	96	Clark et al., 1989
	Mysidopsis bahía	Camarón	Crustáceo	0,005	-	-	96	Hill, 1985
	Palaemonetes pugio	Camarón	Crustáceo	0,016	-	-	96	Clark et al., 1987
	Penaeus duorarum	Camarón	Crustáceo	0,036	-	-	96	Hill, 1985

Homarus americanus (Larva)	Langosta	Crustáceo	0,04	-	-	48	McLeese et al., 1980
Homarus americanus (adulto)	Langosta	Crustáceo	0,14	-	-	24	McLeese et al., 1980
Homarus americanus(Larva)	Langosta	Crustáceo	0,06	-	-	48	Burridge et al., 1999*
Homarus americanus(Larva)	Langosta	Crustáceo	0,12	-	-	48	Burridge et al., 2000*
Crangon septemspinosa	Camarón	Crustáceo	0,01	-	-	96	McLeese et al., 1980
Uca pugilator	Cangrejo	Crustáceo	0,2	-	-	96	Hill, 1985
Tisbe longicornis	Copépodo	Crustáceo	4,6	-	-	48	En estudio
Homarus americanus (Larva)	Langosta	Crustáceo	0,058	-	-	48	Pahl and Opitz 1999*
Acartia tonsa (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	0,005	-	-	96	Medina et al., 2002
Acartia tonsa (adulto)	Copépodo	Crustáceo	0,142	-	-	96	Medina et al., 2002
Acartia clausi (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	1,1	-	48	Willis and Ling, 2004
Acartia clausi (copepodito)	Copépodo	Crustáceo	-	1,49	-	48	Willis and Ling, 2004
Acartia clausi (adulto)	Copépodo	Crustáceo	-	2,67	-	48	Willis and Ling, 2004
Pseudocalanus elegantus (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	1,37	-	48	Willis and Ling, 2004
Pseudocalanus elegantus (copepodito)	Copépodo	Crustáceo	-	> 5	-	48	Willis and Ling, 2004
Pseudocalanus elegantus (adulto)	Copépodo	Crustáceo	-	> 5	-	48	Willis and Ling, 2004
Temora longicornis (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	0,12	-	48	Willis and Ling, 2004
Temora longicornis (copepodito)	Copépodo	Crustáceo	-	0,73	-	48	Willis and Ling, 2004
Temora longicornis (adulto)	Copépodo	Crustáceo	-	0,74	-	48	Willis and Ling, 2004
Oithona similis (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	0,14	-	48	Willis and Ling, 2004
Oithona similis (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	0,17	-	48	Willis and Ling, 2004
Oithona similis (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	-	0,24	-	48	Willis and Ling, 2004
Balanus albicostatus	Cirripedio	Crustáceo	-	31,6	-	48	Feng et al., 2009
Balanus albicostatus	Cirripedio	Crustáceo	-	110	-	48	Feng et al., 2009
Balanus albicostatus	Cirripedio	Crustáceo	>250000	-	-	48	Feng et al., 2009
Tisbe battagliai (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	0,0373	-	-	96	Barata et al. 2002b
Tisbe battagliai (adulto)	Copépodo	Crustáceo	0,052	-	-	144	Barata et al. 2002b
Tisbe battagliai (huevo)	Copépodo	Crustáceo	0,0671	-	-	144	Barata et al. 2002b
Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0278	-	144	Barata et al. 2002b

Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0232	-	144	Barata et al. 2002b
Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0222	-	144	Barata et al. 2002b
Americamysis bahia	Camarón	Crustáceo	0,005	-	-	96	Office Pestide Program
Mysidopsis bahía	Camarón	Crustáceo	0,00409	-	-	48	Aufderheide, 1999
Mysidopsis bahía	Camarón	Crustáceo	0,00069	-	-	96	Aufderheide, 1999
Acartia tonsa	Copépodo	Crustáceo	0,0013	-	-	48	Milson, 1999a
Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	0,0076	-	-	48	Milson, 1999c
Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	0,0036	-	-	96	Milson, 1999c
Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	0,0024	-	-	240	Milson, 1999c
Acartia tonsa	Copépodo	Crustáceo	1,9	-	-	24	Knigh et al., 1995a
Acartia tonsa	Copépodo	Crustáceo	0,89	-	-	48	Knigh et al., 1995a
Mysidopsis bahia	Camarón	Crustáceo	0,01	-	-	24	Boyle et al., 1995a
Mysidopsis bahia	Camarón	Crustáceo	0,006	-	-	96	Boyle et al., 1995a
Crangon crangon	Camarón	Crustáceo	0,16	-	-	3	Boyle & McHenery, 1995
Crangon crangon	Camarón	Crustáceo	0,034	-	-	96	Boyle & McHenery, 1995
Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	0,213	-	-	96	Boyle et al., 1995c
Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	0,169	-	-	240	Boyle et al., 1995c
Lytechinus pictus	Erizo	Equinodermo	-	-	2560	20 min.	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
Strongylocentrotus droebachiensis	Erizo	Equinodermo	>50	-	-	96	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
Strongylocentrotus droebachiensis (Larva)	Erizo	Equinodermo	>10000	-	-	12	Pahl and Opitz 1999
Asterias rubens	Estrella	Equinodermo	>1000	-	-	96	Knigh et al., 1995b
Brachionus plicatilis	Rotífero	Eumetazoa	>500	-	-	24	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
Rotífero	Rotífero	Eumetazoa	>10000	-	-	12	Pahl and Opitz 1999
Gasterosteus aculeatus	Pez	Pez	8,1	-	-	96	Laboratorio de Toxicología Env Canada.
Cyprinodon variegatus	Pez	Pez	1	-	-	96	Hill, 1985
Salmon salar	Pez	Pez	2	-	-	96	McLeese et al., 1980
Scophtalmus maximus	Pez	Pez	>1000	-	-	24	Boyle et al., 1995a
Scophtalmus maximus	Pez	Pez	15	-	-	48	Boyle et al., 1995a

Tabla 2. Información toxicológica aguda para organismos marinos. Fueron considerados ensayos en sedimento y administración de dosis hacia los organismos en ensayo. (*) en estudio, Laboratorio de bioensayos Universidad de Concepción.

				LC50	EC50	IC50		
Compuesto	**Especie**	**Tipo**	**Grupo**	**µg/Kg**			**Tiempo (h)**	**Referencia**
Cipermetrina	*Arenicola marina*	Poliqueto	Anelido	>1000	-	-	-	Knigh et al., 1995b
	Palaemonetes pugio	Camarón	Crustáceo	10	-	-	240	Clark et al., 1987
	Monocorophium insidiosum	Anfípodo	Crustáceo	57,2	-	-	240	*En estudio
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	42	-	-	-	Milson, 1999b
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	225	-	-	-	Boyle et al., 1995d

Tabla 3. Información ecotoxicológica crónica en organismos marinos con el compuesto Cipermetrina.

Compuesto	Especie	Clase	Grupo	LOEC (µg/L)	NOEC	Tiempo (h)	Referencia
Cipermetrina	*Crassostrea gigas*	Ostra	Bivalvo	-	32	-	Gibson, 2000
	Crassostrea gigas	Ostra	Bivalvo	-	1000	-	Boyle et al., 1995b
	Mytilus galloprovincialis	Mitílido	Bivalvo	100	-	-	Ait Ayad, et al., 2011
	Mytilus edulis	Mitílido	Bivalvo	1000	-	1	Gowland et al., 2002b
	Unio elongatulus eucirrus	Almeja	Bivalvo	160	-	96	Kroprucu et al., 2010
	*Acartia tonsa (*huevos)	Copépodo	Crustáceo	0,089	-	48	Barata et al., 2002
	Acartia tonsa (nauplio)	Copépodo	Crustáceo	0,0042	-	96	Barata et al., 2002
	Acartia tonsa (adulto)	Copépodo	Crustáceo	0,0893	-	120	Barata et al., 2002
	Homarus americanus	Langosta	Crustáceo	-	0,025	1	Burridge et al.,2000
	Carcinus maenas	Cangrejo	Crustáceo	0,05	-	-	Gowland et al., 2002a
	Acartia clausi (adulto)	Copépodo	Crustáceo	1,58	-	96	Willis and Ling, 2004
	Acartia clausi (adulto)	Copépodo	Crustáceo	-	0,5	96	Willis and Ling, 2004
	Mysidopsis bahia	Camarón	Crustáceo	-	0,0008	-	Aufderheide, 1999
	Mysidopsis bahia	Camarón	Crustáceo	-	0,00016	-	Aufderheide, 1999
	Acartia tonsa	Copépodo	Crustáceo	-	0,00016	-	Milson, 1999a
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	0,001	-	Milson, 1999c
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	0,0008	-	Milson, 1999c
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	0,0008	-	Milson, 1999c
	Acartia tonsa	Copépodo	Crustáceo	-	0,2	-	Knigh et al., 1995a
	Mysidopsis bahia	Camarón	Crustáceo	-	0,003	-	Boyle et al., 1995a
	Crangon crangon	Camarón	Crustáceo	-	0,05	-	Boyle & McHenery, 1995
	Crangon crangon	Camarón	Crustáceo	-	0,005	-	Boyle & McHenery, 1995
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	0,11	-	Boyle et al., 1995c
	Asterias rubens	Estrella	Equinodermo	-	1000	-	Knigh et al., 1995b
	Oncorhynchus mykiss	Pez	Pez	-	0,1	28 días	Shelley et al., 2009
	Scophtalmus maximus	Pez	Pez	-	1000	-	Boyle et al., 1995a

Tabla 4. Información ecotoxicológica crónica en organismos marinos con el compuesto Cipermetrina. Ensayos en sedimento.

				LOEC	NOEC		
Compuesto	**Especie**	**Clase**	**Grupo**	(µg/kg)		**Tiempo (h)**	**Referencia**
Cipermetrina	*Arenicola marina*	Poliqueto	Anélido	-	1000	240	SEPA 1998
	Arenicola marina	Poliqueto	Anélido	-	1000	-	Knigh et al., 1995b
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	20	-	Milson, 1999b
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	64	240	SEPA 1998
	Corophium volutator	Anfípodo	Crustáceo	-	64	-	Boyle et al., 1995d

INFORMACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DELTAMETRINA

Tabla 5. Información ecotoxicológica aguada en organismos marinos para el compuesto Deltametrina. (*) Estudio realizado en sedimento marino con el anfípodo marino *M. insidiosum.*

				LC50	**EC50**		
Compuesto	**Especie**	**Clase**	**Grupo**	**(µg/L)**		**Tiempo (h)**	**Referencia**
Deltametrina	*Unio elongatulus eucirrus*	almeja	bivalvo	6600	-	96	Koprucu and Seker, 2008
	Tisbe battagliai (Nauplio)	Copépodo	Crustáceo	0,0151	-	96	Barata et al., 2002b
	Tisbe battagliai (adulto)	Copépodo	Crustáceo	0,0106	-	144	Barata et al., 2002b
	Tisbe battagliai (huevos)	Copépodo	Crustáceo	0,0887	-	144	Barata et al., 2002b
	Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0581	144	Barata et al., 2002b
	Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0138	144	Barata et al., 2002b
	Tisbe battagliai	Copépodo	Crustáceo	-	0,0378	144	Barata et al., 2002b
	Americamysis bahia	Camarón	Crustáceo	0,018	-	96	Office Pestide Program
	Americamysis bahia	Camarón	Crustáceo	0,017	-	96	Office Pestide Program
	Americamysis bahia	Camarón	Crustáceo	0,037	-	96	Office Pestide Program
	Tisbe longicornis	Copépodo	Crustáceo	8,02	-	48	En estudio
	Monocorophium insidiosum	Anfípodo	Crustáceo	7,8	-	240	*En estudio. Sedimento (µg/Kg)
	Oncorhynchus mykiss	Pez	Pez	1,65	-	48	Ural and Saglam, 2005

Tabla 6. Información ecotoxicológica crónica en organismos marinos para el compuesto Deltametrina.

Compuesto	Especie	Clase	Grupo	LOEC (µg/L)	NOEC (µg/L)	Tiempo (h)	Referencia
Deltametrina	*Anodonta cygnea*	Almeja	Bivalvo	1	-	30 min	Kontreczky et al., 1997
	Anodonta cygnea	Almeja	Bivalvo	10	-	30 min	Kontreczky et al., 1997
	Anodonta cygnea	Almeja	Bivalvo	10	-	7 días	Kontreczky et al., 1997
	Unio elongatulus eucirrus	Almeja	Bivalvo	-	1,6	96	Koprucu et al., 2008
	Balanus amphitrite	Cirripedio	Crustáceo	-	0,01	-	Cragg and Eaton, 1997

ANEXO OBJETIVO 2

ESTADÍSTICA

Cipermetrina

Tratamiento estadístico de los datos del bioensayo de fecundación con gametos de chorito. Se compara el número de óvulos sin fecundar del control agua con cada uno de los otros tratamientos y señala con un asterisco cuando la diferencia es estadísticamente significativa (P ≤ 0,05).

```
Cipermetrina
File: CIPmyt        Transform: NO TRANSFORMATION
                                ANOVA TABLE
-------------------------------------------------------------------
 SOURCE         DF              SS                MS           F
-------------------------------------------------------------------
Between         4             96.933           24.233        3.275

Within (Error) 10             74.000            7.400
-------------------------------------------------------------------
Total          14            170.933
-------------------------------------------------------------------
  Critical F value =   3.48 (0.05,4,10)
  Since F < Critical F  FAIL TO REJECT  Ho: All equal


  DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2          Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                      TRANSFORMED    MEAN CALCULATED IN
GROUP IDENTIFICATION    MEAN          ORIGINAL UNITS    T STAT  SIG
-----  -------------  -----------    ------------------  -----  ---
  1          C agua      22.000           22.000
  2       C acetona      29.333           29.333        -3.302   *
  3           0.001      23.000           23.000        -0.450
  4               1      25.667           25.667        -1.651
  5             100      25.333           25.333        -1.501
-------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.89     (2 Tailed Value, P=0.05, df=10,4)


  DUNNETT'S TEST   -   TABLE 2 OF 2         Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                     NUM OF  Minimum Sig Diff   % of     DIFFERENCE
GROUP IDENTIFICAT.   REPS   (IN ORIG. UNITS)  CONTROL  FROM CONTROL
----- ------------  -------  ---------------  -------  ------------
  1       C agua     3
  2    C acetona     3           6.419         29.2       -7.333
  3        0.001     3           6.419         29.2       -1.000
  4            1     3           6.419         29.2       -3.667
  5          100     3           6.419         29.2       -3.333
-------------------------------------------------------------------
```

Tratamiento estadístico de los datos del bioensayo de desarrollo hasta larva D de chorito. Se compara el número de estados anormales del control agua con cada uno de los otros tratamientos y señala con un asterisco cuando la diferencia es estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

```
Cipermetrina / larva D
File: CipLaD        Transform: NO TRANSFORMATION
                                ANOVA TABLE
-------------------------------------------------------------------
SOURCE            DF             SS                MS          F
-------------------------------------------------------------------
Between            7          2945.958          420.851      32.065

Within (Error)    16           210.000           13.125
-------------------------------------------------------------------
Total             23          3155.958
-------------------------------------------------------------------
   Critical F value =   2.66  (0.05,7,16)
  Since  F > Critical F  REJECT  Ho: All equal

   DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2         Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                       TRANSFORMED   MEAN CALCULATED IN
GROUP IDENTIFICATION     MEAN         ORIGINAL UNITS    T STAT  SIG
----- --------------    ----------  ------------------  ------  ---
  1     Control agua      27.667           27.667
  2  Control acetona      62.000           62.000       -11.607  *
  3            0.001      24.667           24.667         1.014
  4             0.01      31.667           31.667        -1.352
  5              0.1      32.333           32.333        -1.578
  6                1      30.667           30.667        -1.014
  7               10      33.000           33.000        -1.803
  8              100      42.333           42.333        -4.958  *
-------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.92     (2 Tailed Value, P=0.05, df=16,7)


  DUNNETT'S TEST   -   TABLE 2 OF 2       Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                    NUM OF  Minimum Sig Diff    % of     DIFFERENCE
GROUP IDENTIFICAT.  REPS    (IN ORIG. UNITS)  CONTROL  FROM CONTROL
----- ------------ -------  ----------------  -------  ------------
  1    Control agua     3
  2 Control acetona     3           8.637       31.2      -34.333
  3           0.001     3           8.637       31.2        3.000
  4            0.01     3           8.637       31.2       -4.000
  5             0.1     3           8.637       31.2       -4.667
  6               1     3           8.637       31.2       -3.000
  7              10     3           8.637       31.2       -5.333
  8             100     3           8.637       31.2      -14.667   --
-------------------------------------------------------------------
```

Deltametrina

Tratamiento estadístico de los datos del bioensayo de fecundación con gametos de chorito expuestos a deltametrina. Se compara el número de óvulos sin fecundar del control agua con cada uno de los otros tratamientos y señala con un asterisco cuando la diferencia es estadísticamente significativa (P ≤ 0,05).

```
Deltametrina / M. chilensis
File: deltCh        Transform: NO TRANSFORMATION
                                ANOVA TABLE
-------------------------------------------------------------------
SOURCE           DF              SS                 MS         F
-------------------------------------------------------------------
Between          4              94.933           23.733      2.507
Within (Error)  10              94.667            9.467
-------------------------------------------------------------------
Total           14             189.600
-------------------------------------------------------------------
   Critical F value =   3.48  (0.05,4,10)
  Since  F < Critical F  FAIL TO REJECT  Ho: All equal


 Deltametrina / M. chilensis
File: deltCh        Transform: NO TRANSFORMATION

    DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2        Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                       TRANSFORMED  MEAN CALCULATED IN
GROUP IDENTIFICATION      MEAN        ORIGINAL UNITS    T STAT  SIG
----- --------------    ----------  ------------------  ------  ---
  1     Control agua      22.000          22.000
  2  control acetona      29.333          29.333        -2.919   *
  3            0,001      26.667          26.667        -1.858
  4                1      26.667          26.667        -1.858
  5              100      28.333          28.333        -2.521
-------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.89     (2 Tailed Value, P=0.05, df=10,4)


 DUNNETT'S TEST   -   TABLE 2 OF 2          Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                    NUM OF   Minimum Sig Diff    % of     DIFFERENCE
GROUP IDENTIFICAT.  REPS     (IN ORIG. UNITS)  CONTROL  FROM CONTROL
----- -----------  -------  ----------------  -------  ------------
  1    Control agua    3
  2 control acetona    3           7.260       33.0       -7.333
  3           0,001    3           7.260       33.0       -4.667
  4               1    3           7.260       33.0       -4.667
  5             100    3           7.260       33.0       -6.333
-------------------------------------------------------------------
```

Tratamiento estadístico de los datos del bioensayo de desarrollo hasta larva D de chorito. Se compara el número de estados anormales del control agua con cada uno de los otros tratamientos y señala con un asterisco cuando la diferencia es estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

```
Deltametrina standar / Larva D
File: DeStld        Transform: NO TRANSFORMATION

                                ANOVA TABLE
-------------------------------------------------------------------
SOURCE             DF              SS             MS           F
-------------------------------------------------------------------
Between            7            2891.292        413.042    30.131
Within (Error)    16             219.333         13.708
-------------------------------------------------------------------
Total              23            3110.625
-------------------------------------------------------------------
   Critical F value =   2.66 (0.05,7,16)
  Since F > Critical F  REJECT  Ho: All equal

    DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2          Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                      TRANSFORMED   MEAN CALCULATED IN
GROUP IDENTIFICATION    MEAN         ORIGINAL UNITS    T STAT  SIG
----- --------------  -----------    ----------------  ------  ---
  1      Control agua      27.667         27.667
  2   Control acetona      62.000         62.000       -11.357  *
  3             0.001      35.667         35.667        -2.646
  4              0.01      27.333         27.333         0.110
  5               0.1      26.667         26.667         0.331
  6                 1      29.667         29.667        -0.662
  7                10      30.000         30.000        -0.772
  8               100      32.000         32.000        -1.433
-------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.92     (2 Tailed Value, P=0.05, df=16,7)


  DUNNETT'S TEST   -   TABLE 2 OF 2        Ho:Control=Treatment
-------------------------------------------------------------------
                      NUM OF  Minimum Sig Diff  % of    DIFFERENCE
GROUP IDENTIFICATION  REPS   (IN ORIG. UNITS)  CONTROL FROM CONTROL
----- --------------  -----  ----------------  -------  -----------
  1    Control agua     3
  2 Control acetona     3           8.827       31.9      -34.333
  3           0.001     3           8.827       31.9       -8.000
  4            0.01     3           8.827       31.9        0.333
  5             0.1     3           8.827       31.9        1.000
  6               1     3           8.827       31.9       -2.000
  7              10     3           8.827       31.9       -2.333
  8             100     3           8.827       31.9       -4.333
```

ANEXO OBJETIVO 3

Planilla cálculos ejecutada para la predicción de concentraciones en el ambiente marino luego de una aplicación de piretroides

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	**Level III**									ambiente							
2										química							
3	**Propiedades F_Q**			**Escenario ambiental**			**Dosis compuesto**		**Densidad (Kg/m³)**								
4	Compuesto	**químico**		N° salmones	69565,21739		3 µg/L		ρ agua mar	1025							
5	Temperatura (°C)	11		Kg cada salmón	2,3		19200000 µg		ρ Sedimento	1500	conc						
6	PM (g/mol)	505,19		Kg por jaula	160000		19,2 g		ρ Sal. Sup.	1500	10 (ppm)	10 (g/m³)	6,66667E-06				
7	Presión de vapor (Pa)	2,00E-06		Área Jaula (m²)	400	(20x20 m²) jaular	0,038 mol		ρ biota (peces)	1000							
8	Solubilidad (g/m³)	2,00E-03		Profundidad jaula (m)	16	**prof faldón**	0,0016 mol/h			kg/m³							
9	solubilidad (mol/m³)	3,96E-06		Volumen jaula total (m³)	6400				Peces en jaula	25							
10	Cte Ley Henry (Pa m³/mol)	5,1E-01		Volumen jaula total (L)	6400000												
11	Log Kow	6,2															
12	Kow	1584893		ancho (m)	20												
13	Koc	649806		largo (m)	20												
14	Kru	15595,35		Profundidad zona (m)	50												
15	Kbu	158489		Profundidad sedimento (m)	0,05												
16				Área sedimento (m2)	400	40x100 m2								30kg/m3	25kg/m3	20kg/m3	
17				Fracción Carbono Orgánico	0,02		0,2	20 %SS						2003479,3	1669565,2	1335652,2	
18				Fracción de lípidos	0,1	10%			sedimento								
19				Velocidad corriente (cm/s)	6				216 x 100 x 0,05								
20				Velocidad corriente (m³/h)	2,16E+05		216 m/h		216	m3/h							
21	**Fases**								0,05	0,01m/h*100m*0,05m							
22	compartimentos	**Agua mar**	**Sedimento**	**Particula**	**Biota**								**Crystal ball**				
23	Volumen (m³)	20000	20	0,13	160		20580,17645	1,5	30870,3					max	media	min	
24	Densidad (Kg/m³)	1025	1500	1500	25		3,2E+08	1,5	481432551,8				N° Peces total (por jaula)	83478,261	69565,217	55652,174	
25	Fracción CO (fco)	0	0,02	0,02	0												
26	Z (mol/m³ Pa)	1,98	3,1E+04	4,8E+08	3,1E+05									Pram	max	min	DS
27	Flujo advectivo (m³/h)	2,16E+05											Fracción CO	0,0167122	0,0314535	0,010814	0,00382035
28	Tiempo de residencia adv. (h)	0,093															
29	Concentración ingresa (mol/m³)	7,3E-09												Pram	DS		
30	Tasa flujo ingresa (mol/h)	0,0016											Velocidad corriente (cm/s)	6,1992414	0,6454863		
31																	
32																	
33	Emisión (mol/h)	0,0016					***Extender***										
34	vida media (h)	96	552	552			Difusividad molecular en agua (m²/h)		4E-06								
35	k (h⁻¹)	7,2E-03	1,3E-03	1,3E-03	#¡DIV/0!		MTC:		Coef. de transferencia de masa								
36	VZ (mol/Pa)	4,0E+04	6,2E+05	6,4E+07	5,0E+07		MTC del agua sobre el sedimento (m/h)		0,01								
37	Dreac (mol/Pa h)	285,78	775,11	80587,62	#¡DIV/0!		MTC del agua (m/h)		0,03								
38	Dadv (mol/Pa h)	4,3E+05	0	1,0E+14	0		Difusión a la largo de largo sedimento (m)		0,005								
39							Tasa de depositación sedimento (m³/m²h)		4,6E-08								
40			mol/Pa h	mol/h			Tasa de resuspención sedimento (m³/m²h)		1,1E-08								
41	Transformación en sedimento	Dr	775,11	1,10E-05			Area (m²) 20x20		400								
42	Resuspención en sedimento	Dr	0,14	1,92E-09			Area (m²) 20x50		1000								
43	Depositación en sedimento	Dd	8858,36	1,25E-04													
44	Difusión	Dt	1,0E-07	1,43E-15													
45										0,003	rate excresión (d-1)	0,000125	h-1				
46	Transformación en agua	Du	285,8	1,06E-06		1,6E-03	adv agua			0,0025	rate growth (d-1)	0,000104167	h-1				
47	salida en agua	Dj	4,3E+05	1,59E-03		1,5E+06							mol/h				
48	salida partícula en agua	Dy	1,0E+14	3,85E+05	3,85E+05					Da	4,06E+05	Gu Zu 0,95	#¡DIV/0!				
49	entrada en agua	Di	4,3E+05	1,59E-03	3,85E+05					fu-fa							
50	entrada partícula en agua	Dy	1,0E+14	3,85E+05													

Imágenes en la toma de muestras de agua y sedimento en terreno.

Agua

Choritos