

ARTÍCULO ORIGINAL

TOXICIDAD AGUDA DE METOMILO EN
POECILIA LATIPINNA (LESUEUR 1821) (POECILIDAE)ACUTE TOXICITY OF METHOMYL ON
POECILIA LATIPINNA (LESUEUR 1821) (POECILIDAE)Kandy Napán¹, Carlos Llanos² & Christian Paredes³

Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

Universidad Nacional Federico Villarreal-Lima Perú.

Calle Río Chepén s/n Cuadra Nº 1, El Agustino, Perú.

Correo electrónico: ¹kanliznapmol@hotmail.com, ²catomax1987@hotmail.com, ³chepeeco@hotmail.com

The Biologist (Lima) 8:21-28.

ABSTRACT

Methomyl is a chemical compound acetylcholinesterase inhibitor that acts by contact system and is one of the most widely used chemicals such as insecticide-acaricide for control of a wide range of agricultural pests. The following study aims to assess the acute toxicity of methomyl on introduced fish *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821) (Poeciliidae) at 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 and 96 h of exposure. Bioassays were carried out with 5 levels and 4 treatments, temperature was $21.8^{\circ} \text{C} \pm 1$, pH 7.34 ± 0.31 , conductivity $0.54 \text{ mS} \pm 0.03$, and average dissolved solutes in the middle $267.39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The data obtained during tests were evaluated using the statistical method analytic Probit ver. 1.5. The results of the median Lethal Concentration (LC_{50}) of methomyl on *P. latipinna* were: 2 h = $13.95 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h = $10.39 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 h = $8.12 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 8 h = $5.81 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h = $3.99 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h = $2.61 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 72 h = $2.24 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$ and finally 96 h = $2.08 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$. At the highest concentration was observed a change of skin color intensity of silver to black.

Key words: LC_{50} , methomyl, acute toxicity, *Poecilia latipinna*.

RESUMEN

El metomilo es un compuesto químico inhibidor de la acetilcolinesterasa que actúa por contacto sistémico y es uno de los agroquímicos de mayor uso como insecticida-acaricida para el control de un amplio rango de plagas agrícolas. El siguiente trabajo tiene como objetivo evaluar la toxicidad aguda del metomilo sobre el pez introducido *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821) (Poeciliidae) a 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 y 96 h de exposición. Los bioensayos se realizaron con cinco concentraciones y cuatro repeticiones. La temperatura fue de $21,8^{\circ} \text{C} \pm 1$, pH $7,34 \pm 0,31$, conductividad eléctrica $0,54 \text{ mS} \pm 0,03$; y un promedio de solutos disueltos en el medio de $267,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los datos obtenidos durante las pruebas se evaluaron utilizando el método estadístico analítico Probit ver. 1,5. Los resultados obtenidos de la Concentración Letal media (CL_{50}) del metomilo sobre *P. latipinna* fueron: 2 h = $13,95 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h = $10,39 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 h = $8,12 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 8 h = $5,81 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h = $3,99 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, a 48 h = $2,61 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$, a 72 h = $2,24 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$ y finalmente a 96 h = $2,08 \text{ mg IA}\cdot\text{L}^{-1}$. A la concentración más alta se observó un cambio de intensidad de color de la piel de plateado a negro.

Palabras clave: CL_{50} , metomilo, *Poecilia latipinna*, toxicidad aguda.

INTRODUCCIÓN

En el Perú la demanda de pesticidas por la industria agrícola ha aumentado en los últimos años como resultado de grandes transformaciones económicas y la competencia en cantidad y calidad de productos. Uno de los objetivos para lograr una buena cosecha es que los sembríos estén libres de plagas y/o parásitos llevando a los agricultores a tomar medidas de eliminación de los insectos, hongos, bacterias, etc. Sin embargo, existen entes no destinatarios (Iannacone *et al.* 2007a,b) en el ecosistema acuático en donde las aguas de los campos de cultivos son escurridas superficialmente y/o filtradas y junto con ellas residuos químicos (Ismail & Kalithasan 1997, Laabs *et al.* 2002) con distintos tiempos de vida media, los cuales causan reducción en el estado de salud o la muerte de los individuos acuáticos y por tanto consecuencias e interferencias ecológicas en la cadena trófica.

El metomilo es un carbamato inhibidor de acetilcolinesterasa que actúa por contacto-sistémico (Iannacone & Alvariano 2008) y es uno de los agroquímicos de mayor uso como insecticida-acaricida en el Perú para el control de un amplio rango de plagas agrícolas de insectos, como son Coleóptera, Lepidóptera, y Díptera. Es usado también como molusquicida, garrapaticida y contra arañas; así como en cebos para el control de la mosca doméstica. Los ésteres de carbamato de N - metilo causan carbamitación reversible de la enzima acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de acetilcolina, la sustancia neuromediadora en las uniones neuroefectoras parasimpáticas (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del músculo esquelético y en los ganglios autónomos (efectos nicotínicos), así como en el cerebro (efectos en el SNC). La

combinación carbamilo-acetilcolinesterasa se disocia más rápidamente que el complejo fosforilo-acetilcolinesterasa producido por los compuesto organofosfatados. Esta alteración tiene varias consecuencias importantes: (1) tiende a limitar la duración del envenenamiento con el insecticida carbamato N-metilo; (2) es responsable de que el intervalo que existe entre la dosis que genera los síntomas y la dosis letal sea mayor que el que existe en el caso de la mayoría de los compuestos organofosfatados; y, (3) con frecuencia invalida la medición de la actividad de la colinesterasa en la sangre como indicador de diagnóstico de envenenamiento, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 1997). Los carbamatos N-metilo son hidrolizados enzimáticamente por el hígado y los productos de degradación se excretan por los riñones y el hígado, aunque también pueden ser bioacumulados en el hígado (Li *et al.* 2008).

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) es la entidad encargada de la verificación y fiscalización de los plaguicidas usados en la agroindustria del Perú, regulada a través de la Decisión 436 de la Comunidad Andina, "Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola" (SENASA 1998). Además difunde e implementa periódicamente la lista de plaguicidas autorizados para su adquisición y de aquellos considerados de uso restringido y prohibido, tomando en cuenta los posibles daños medio ambientales y el correcto uso de estos, así como las sanciones respectivas (Ministerio de Agricultura 2008).

Los ensayos biológicos de toxicidad son eficaces para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas manipulables y controladas

(Fanta *et al.* 2003). Las consecuencias se evalúan por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo 2004).

Poecilia latipinna (Lesueur 1821), “Molly” (Poeciliidae), es una especie dimórfica que se distribuye desde El Cabo del Miedo (Norte Carolina en el Atlántico) en EEUU, hasta Veracruz (Golfo de México) en México (Page & Burr 1991, Felley & Daniels 1992, Nelson 1994, Smith 1987, Allen *et al.* 2002). Pueden ser abundantes en hábitats especializados como piscinas salobres, zanjas y estanques. Debido a su tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno disuelto permite su uso como un bioindicador de impactos por la contaminación a plaguicidas y a otros productos químicos.

El objetivo de esta investigación fue determinar la toxicidad aguda del metomilo de 2 hasta 96 h de exposición en *P. latipinna* (Poeciliidae) e indicar algunos efectos en el comportamiento por este plaguicida a las concentraciones ensayadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metomilo

Es un insecticida que pertenece a la familia de los carbamatos, usado en la agricultura para controlar un amplio rango de insectos. Es clasificado como producto químico muy peligroso categoría Ib (Resolución SAG 2195/00) según la USEPA (1997), con CAS RN 16752-77-5, código químico de la USEPA 090301, nombre IUPAC S-methyl (EZ)-N-methylcarbamoyloxythioacetimidate, fórmula química $C_5H_{10}N_2O_2S$, masa

molecular 162,21 $g \cdot mol^{-1}$, Nombre CAS methyl N-[[[(methylamino) carbonyl] oxy] ethanimidothioate.

Presenta una alta solubilidad en agua de 55 000 $mg \cdot L^{-1}$ a 20°C, punto de fusión 79,6°C, se descompone antes de la ebullición, según la constante de Henry $2,13 \times 10^{-06} Pa \cdot m^3 \cdot mol^{-1}$ a 25°C se interpreta como no volátil, no es altamente inflamable, degradación en el suelo DT_{50} 7 días y 6,97 días a 20°C en el laboratorio lo que indica que no es persistente. Es estable a fotólisis acuosa DT_{50} (días) en pH 7, estable a hidrólisis acuosa DT_{50} (días) a 20°C y pH 7, estable de pH 5 a pH 7 a 25 °C (PPDB 2009). El rango de dosis empleada como insecticida en el ámbito agrícola es 0,22 - 1,8 $lb \cdot acre^{-1}$. El nombre comercial del producto empleado fue Lannafarm® 90 PS.

Bioensayos toxicológicos

Los especímenes juveniles de *P. latipinna* procedieron del Acuario “La Caleta”, ubicado en la Mz. 6, Lt. 24, Urb. Santo Tomás, Los Cedros de Villa, Chorrillos, Lima, Perú. Se realizó la adquisición de 200 peces, trasladándolos en dos recipientes plásticos de 4 L al Laboratorio de Ecofisiología Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en Calle Río Chepén s/n Cuadra N° 1, El Agustino, Lima, Perú. Los peces fueron aclimatados por un periodo de tres semanas en peceras de 0,55 x 0,30 x 0,18 m. Se usó agua de grifo reposada por 24 h con un acondicionador marca Sera® 0,3 $mL \cdot L^{-1}$. Se instaló un aireado continuo, la temperatura fue de $21,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, pH $7,34 \pm 0,31$, conductividad eléctrica $0,54 \pm 0,03$ mS y promedio de solutos disueltos en el medio de 267,39 $mg \cdot L^{-1}$. Fotoperíodo 12L/12D aproximadamente. Todos los datos fueron medidos diariamente. Los peces fueron

alimentados todos los días con alimento en hojuelas marca Tetramin R.

Se escogieron 120 peces saludables (longitud total $3,42 \pm 0,23$ cm). No se hizo distinción en los peces del sexo para los ensayos. Estos dejaron de ser alimentados 24 h antes y durante el ensayo, para evitar contaminación del medio y alguna interferencia con el tóxico presente.

Cada bioensayo se realizó en envases plásticos de 1 L con 5 peces cada uno. Se preparó una solución madre la cual fue diluida con un factor de 0,6 para obtener 5 concentraciones de ingrediente activo (IA) de metomilo, $2,59 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$, $4,32 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$, $7,2 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$, $12 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$, en 4 repeticiones. La mortalidad fue evaluada en lecturas de 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 y 96 h, después de comenzada la prueba, los peces muertos (sin movimiento de los opérculos ni de las aletas después de un estímulo físico) fueron retirados en cada lectura. En cada una de las concentraciones de metomilo ensayadas se determinaron algunos aspectos en el comportamiento de *P. latipinna*.

Análisis de datos

Las pruebas de toxicidad aguda se evaluaron en cinco concentraciones más el control, con cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA). En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los datos obtenidos durante las pruebas se evaluaron utilizando el método estadístico analítico Probit versión 1,5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toxicidad aguda

El valor de la CL_{50} aguda a 96 h (95% de límites de confianza) del metomilo fue $2,08 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,431 - 2,635 \text{ mg IA} \cdot \text{L}^{-1}$) en *P. latipinna* (Tabla 1). También se observan los efectos de toxicidad aguda de CL_1 a CL_{99} en *P. latipinna* entre las 2 a las 96 h de exposición.

Tabla 1. Toxicidad aguda del metomilo entre las 2 h hasta las 96 h en *Poecilia latipinna* (Poeciliidae).

CL	(mg · L ⁻¹) a diferentes ocho periodos de exposición							
	2 h	4 h	6 h	8 h	24h	48 h	72 h	96 h
1,00	6,11	4,04	2,67	2,18	2,25	1,09	0,9	0,76
5,00	7,78	5,33	3,7	2,9	2,66	1,4	1,18	1,02
10,00	8,85	6,18	4,4	3,38	2,91	1,61	1,36	1,2
15,00	9,66	6,82	4,94	3,75	3,09	1,77	1,5	1,33
50,00	13,95	10,39	8,12	5,81	3,99	2,61	2,24	2,08
85,00	20,14	15,83	13,33	8,99	5,15	3,85	3,35	3,24
90,00	21,96	17,49	14,99	9,97	5,47	4,22	3,69	3,6
95,00	24,98	20,27	17,83	11,62	5,98	4,84	4,25	4,21
99,00	31,81	26,73	24,71	15,49	7,07	6,25	5,55	5,65

Nota: mortalidad en el control = 0,00.

Comportamiento

El comportamiento en *P. latipinna* durante todo el experimento fue comparado con el control. Esta especie respondía rápidamente a los estímulos físicos. Durante los 10 primeros min a la concentración más alta los peces mostraron un comportamiento que evidenciaba intoxicación del sistema nervioso, en el cual hay carbamización de la acetilcolinesterasa ocasionando una acumulación de la acetilcolina en el cerebro y en las uniones del músculo esquelético con las neuronas motoras (PPDB 2009).

Los efectos muscarínicos que se presentaron en la mayor concentración fueron: 1) contorneo del cuerpo, 2) arqueado de 15 a 30 grados a la altura del final de la aleta dorsal, 3) aletas pectorales que se dirigen hacia adelante

con rápido aleteo, 4) movimiento de los opérculos más rápido que el control y mantenimiento ligeramente abierto, 5) boca que se conserva protuyente abriéndola y cerrándola, y 6) nado volteado y torpe (Fig. 1 a,b). Se los estimuló con un estilete de metal para observar la respuesta física (Fig. 1a), al cual respondieron perdiendo el equilibrio y nadando en círculo. En el resto de las concentraciones se presentaron los mismos comportamientos pero se observaron a mayores periodos de exposición.

En la concentración de $2,59 \text{ mg L}^{-1}$ a las 4 y 48 h, se observó un cambio en la intensidad del color de la piel de plateado a negro, las aletas se tornaron mas amarillas y hubo presencia de huevos fértiles inmaduros y abortados (Fig. 1c).



Figura 1. (a) Prueba de reacción al estímulo físico aplicado para medir comportamiento y letalidad (b). Nado volteado por intoxicación con metomilo (c). Embrión inmaduro abortado durante el ensayo agudo.

Tabla 2. Valores de toxicidad aguda (mortalidad) del metomilo en especies de peces dulceacuícolas a 96 h de exposición (Iannacone & Alvariano 2008, Pesticideinfo 2009).

Nombre científico	CL ₅₀ (ugL ⁻¹)
<i>Anguila japonica</i> Temminck & Schlegel, 1846	1900
<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	1400
<i>Corydoras arcuatus</i> (Elwin 1939)	<2
<i>Cyprinodon variegatus</i> (Lacépède 1803)	1060
<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)	2526
<i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque 1818)	678
<i>Lepomis macrochirus</i> (Rafinesque 1819)	1269
<i>Menidia menidia</i> (Linnaeus, 1766)	340
<i>Micropterus salmoides</i> (Lacépède 1802)	1005
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (Cantor, 1842)	1500
<i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758	750
<i>Oncorhynchus clarki</i> (Richardson 1836)	4817
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum 1792)	2509
<i>Oryzias latipes</i> (Temminck y Schlegel, 1846)	870
<i>Pimephales promelas</i> (Rafinesque 1820)	2401
<i>Poecilia latipinna</i> (Lesueur 1821)	2080
<i>Poecilia reticulata</i> Peters 1859)	40
<i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck & Schlegel 1846)	425
<i>Salmo salar</i> (Linnaeus 1758)	1149
<i>Salvelinus fontinalis</i> (Mitchill 1814)	1784
<i>Tilapia nilotica</i> (Linnaeus, 1758)	1358

La Tabla 2 nos muestra la toxicidad del metomilo en términos de mortalidad a 96 h de exposición a 21 peces. *P. latipinna* en comparación a otras especies de peces resultó ser menos sensible al metomilo. Esto podría deberse a la amplia diversificación y distribución desde el este de los Estados Unidos al noreste de Argentina, y también en África y Madagascar (Nelson, 1994). Esta especie puede vivir en muchos ambientes acuáticos como ríos, lagos e inclusive charcos (Allen et al. 2002). También podría deberse a que esta especie de pez ornamental carece de un adecuado sistema de detoxificación del metomilo, el cual inhibe la actividad de la Acetilcolina-Esterasa (AchE) y de la

Glutathion-S-Transferasa (GTSs) produciendo una alta sensibilidad a este carbamato, como ha sido observado en otras especies de peces (Li et al. 2008).

El metomilo es un compuesto muy tóxico (Li et al. 2008) de acuerdo a la clasificación de toxicidad de los pesticidas según la USEPA, para *P. latipinna*, pero es más tóxico para otras especies de peces (Tabla 2). Algunos invertebrados adquieren un amplio rango de sensibilidad en dependencia a variaciones de la temperatura, pH, fotoperíodo y componentes químico disueltos en su medio (Iannacone y Alvariano 2008, Li et al. 2008).

Poecilia latipinna puede ser usada como un bioindicador por contaminación por insecticidas como representante de peces dulceacuícolas. Esta especie tiene una amplia distribución en Norteamérica y Sudamérica (Smith 1997), por lo tanto es de fácil acceso para continuar estudios toxicológicos con otros insecticidas. Además de ser de rápida identificación, es una especie con limitada demanda como pez ornamental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, G; Midgley, H. & Allen, M. 2002. *Field guide to the freshwater fishes of Australia*. Australia, CSIRO Publishing. 408 p.
- Castillo, G. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México. Ed. 202 p.
- Fanta, E.; Sant'anna, R. F.; Ríos, A.; Romao, S.; Casagrande, V. A. C. & Freiburger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119-130.
- Felley, J. & Daniels, G. 1992. Life history of the mailfin molly (*Poecilia latipinna*) in two degraded waterways of southwestern Louisiana. *The Southwestern Naturalist*, 37: 16-21.
- Iannacone, J. & Alvariano, L. 2008. Efecto ecotoxicológico del metomilo en *Corydoras Lacépède*, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) y su caracterización leucocitaria. *Ecología aplicada*, 7: 55-61.
- Iannacone, J.; Alvariano F.L.; Miglio, M.C.; Mamani, N.; Olga Huanqui; Onofre, R.; Giraldo A. J.; Huanqui S, O. 2007a. Evaluación del riego ambiental del insecticida metamidofos en bioensayos con cuatro organismos acuáticos no destinatarios. *Agricultura Técnica*, 67: 126-138.
- Iannacone, J.; Onofre, R & Huanqui, O. 2007b. Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre *Poecilia reticulata* "Guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* "Neon Tetra" (Characidae). *Gayana*, 71: 170-177.
- Ismael, B. & Kalithasan, K. 1997. Effects of repeated application on persistence and downward movement of four herbicides in soil. *Australian Journal of Soil Research*, 35: 503-513.
- Laabs, W.; Amelung, W.; Pinto, A. & Zech, W. 2002. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, 31:268-274.
- Li, H.; Jiang, H.; Gao, X.; Wang, X.; Qu, W.; Lin, R. & Chen, J. 2008. Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. *Fish Physiology and Biochemical*, 34: 209-216.
- Ministerio de Agricultura, 2008. *Reglamento de La Ley General de Sanidad Agraria, Normas legales 378995*, Título III De los Insumos Agrarios y Título th IV De las infracciones y sanciones.
- Nelson, J. 1994. *Fishes of the world*. 3 Ed. New York, John Wiley & Sons. 600 p.
- Page, L. & Burr, B. 1991. *A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico*. Houghton Mifflin Company, Boston. 432 p.
- Pesticideinfo.2009.http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=P_C35109&Taxa_Group=Fish leído el 05 de diciembre del 2009.
- PPDB. 2009. *The Pesticide Properties Database (PPDB) developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU)*. University of Hertfordshire,

funded by UK national sources and the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704).

SENASA, 1998. *DECISION 436, Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola*, La Comisión de la Comunidad Andina. Lima-Perú.

Smith, C. 1997. *National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda*. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720 p.

USEPA, 1997. *Reregistration Eligibility Decision (RED) Metomil Dichloride, United States Prevention, Pesticides EPA 738-F-96-018*. Environmental Protection and Toxic Substances August 1997. Agency (7508W).

Fecha de recepción: 04 de diciembre del 2009.
Fecha de aceptación: 19 de mayo del 2010.