



## The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

### EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL RISK OF THE MIX OF ALPHA-CYPERMETHRIN AND IMIDACLOPRID ON THE EARTHWORM (*EISENIA FETIDA*) (SAVIGNY, 1826)

### EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE LA MEZCLA DE ALFA-CIPERMETRINA E IMIDACLOPRID SOBRE LA LOMBRIZ DE TIERRA (*EISENIA FETIDA*) (SAVIGNY, 1826)

Elsa María Arrázola-Vásquez<sup>1</sup> & José Iannacone<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Carrera de Ingeniería Ambiental. Universidad Científica del Sur (UCSUR), Lima, Perú.

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú.

<sup>3</sup>Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

\*Corresponding author: joseiannacone@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-3699-4732>

## ABSTRACT

In the present study, the environmental risk (ERA) of alpha-cypermethrin and imidacloprid, individually and as a mixture, was evaluated on *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). The mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values for alpha-cypermethrin and imidacloprid individually were 341.1 mg·kg<sup>-1</sup> and 2.34 mg·kg<sup>-1</sup> at 14 d of exposure, respectively, being the most toxic imidacloprid. A reduction in dry and wet weight was observed in *E. fetida*, for both pesticides. The mixture did not show a significant dose-response relationship at LC<sub>50</sub>; However, the values of NOEC (concentration at which no effect is observed) and LOEC (lowest concentration at which effect is observed), corresponding to wet and dry weight, presented a significant relationship. The analysis of toxic units (TU) established an antagonistic behavior of both pesticides. The evasion test showed a relationship with the presence of the toxin in the mixture, however the same did not occur in the individual tests. In general, none of the chemical compounds is considered a highly toxic compound and they do not represent a significant risk at an acute level based on mortality for *E. fetida*, but sublethal effects could be presented in organisms due to growth impairment.

**Keywords:** ecotoxicity – *Eisenia fetida* – insecticides – pesticides – Toxic units

doi:10.24039/rtb2021191898

## RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó el riesgo ambiental (ERA) de la alfa-cipermetrina y del imidacloprid, individualmente y en mezcla, sobre *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para la alfa-cipermetrina y el imidacloprid fue de  $341,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $2,34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a los 14 d de exposición, respectivamente, siendo más tóxico el imidacloprid. Se observó una reducción en el peso seco y húmedo en *E. fetida*, para ambos plaguicidas. La mezcla de alfa-cipermetrina e imidacloprid no permitió calcular la  $CL_{50}$  para la mortalidad; sin embargo, los valores subletales de NOEC (concentración a la cual no se observa efecto) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), para el peso húmedo y seco de *E. fetida*, presentaron diferencias significativas con el control. Las unidades tóxicas (UT) mostraron un comportamiento antagónico entre la alfa-cipermetrina y el imidacloprid. La prueba de evasión arrojó un mayor efecto de la mezcla de alfa-cipermetrina e imidacloprid, lo que no ocurrió con los ensayos con los plaguicidas individuales. En general, el alfa-cipermetrina y el imidacloprid son considerados compuestos altamente tóxicos y no representaron un riesgo significativo a nivel agudo en base a la mortalidad de *E. fetida*, pero se observaron efectos subletales por afectación del crecimiento.

**Palabras clave:** ecotoxicidad – *Eisenia fetida* – insecticidas – plaguicidas – Unidades tóxicas

## INTRODUCCIÓN

La evaluación de riesgo ambiental (ERA) para sustancias químicas es una herramienta útil que provee información para el manejo de riesgos, y es usada comúnmente en la toma de decisiones en relación a temas ambientales debido a que proporciona una base para clasificar, comparar y priorizar los riesgos. Estos resultados pueden ser usados en el análisis de costo-beneficio y de costo-efectividad; a través de un proceso iterativo, así nueva información puede ser incorporada dentro de la valoración de riesgo y mejorar la toma de decisiones (EPA, 1998; Cáceres-Del Carpio & Iannacone, 2021).

Esta herramienta es útil para determinar los riesgos que se pueden generar por el uso de agroquímicos. En la actualidad están aumentando las investigaciones ecotoxicológicas enfocadas en realizar un ERA para mezclas de plaguicidas en el ambiente terrestre. Los estudios ecotoxicológicos de mezclas de plaguicidas proporcionan una visión mucho más cercana al campo, dado que la situación real implica la combinación de diferentes plaguicidas para controlar y/o mejorar las condiciones agrícolas. Por lo general, estas investigaciones contemplan todo tipo de plaguicidas desde organofosforados hasta neonicotinoides (Zhou *et al.*, 2011; Escobar-Chávez *et al.*, 2019; Cáceres-Del Carpio & Iannacone, 2021).

Los piretroides son los principales insecticidas neurotóxicos que existen, actúan sobre un amplio rango de plagas y son usados comúnmente en agricultura, salud pública e industria; además son una alternativa a los insecticidas organofosforados debido a su menor toxicidad en mamíferos y costo-efectividad (Davies *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2007; Meeker *et al.*, 2008; Lao *et al.*, 2012). Uno de los piretroides más usado en el sector agrícola es la alfa-cipermetrina, un insecticida y acaricida para el control de plagas en cultivos como cereales, arroz, algodón, maíz, soya, tomates, entre otros (Baronio *et al.*, 2019).

El imidacloprid es un insecticida neonicotinoide de aplicación en el suelo o la planta que es usado en una gran variedad de cultivos y tiene tasas de disipación variables en el suelo que dependen de la degradación de sus metabolitos y de su mineralización (Cox *et al.*, 1998; Anhalt *et al.*, 2007; Farouk *et al.*, 2014; Escobar-Chávez *et al.*, 2019). Este insecticida tiene una gran actividad en pequeñas cantidades, sobre especies de coleópteros, dípteros y lepidópteros; además es efectivo en insectos que son resistentes a carbamatos, organofosforados y piretroides (Oliveira *et al.*, 2000). Algunos estudios han indicado que el imidacloprid puede persistir en el suelo dependiendo de su granulometría, pH, fertilizantes orgánicos y la presencia de cobertura vegetal (Sharma & Singh, 2014; Escobar-Chávez *et al.*, 2019).

Dentro de organismos usados como bioindicadores de contaminación encontramos a las lombrices de tierra, como *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Annelida). Las lombrices de tierra son organismos importantes para la formación de los suelos y para la descomposición de la materia orgánica, y han sido considerados indicadores aptos para evaluar la contaminación debido a su interacción con el suelo; además las lombrices de tierra son expuestas a diversos contaminantes químicos (Capowiez *et al.*, 2003; Lionetto *et al.*, 2012; Pelosi *et al.*, 2014; Ávalos-Ruiz & Iannacone, 2020). La primera es a través de la cutícula, dado que es extremadamente permeable y está en continuo contacto con los poros y el agua que hay en el suelo, por lo que hacen que esta sea la principal ruta de exposición a los contaminantes químicos. Otra vía de exposición a los contaminantes, es a través de su sistema digestivo, los cuales ingresan al interior de la lombriz de tierra al descomponer la materia orgánica y los agregados del suelo (Lionetto *et al.*, 2012; Ávalos-Ruiz & Iannacone, 2020).

Por lo tanto, la presente investigación evaluó el riesgo ambiental (ERA) de los ingredientes activos (ia) alfa-cipermetrina e imidacloprid, individualmente y en mezcla, sobre *E. fetida*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación del sustrato artificial

El suelo artificial se preparó con: 1) 10% de musgo de turba, 2) 20% de humus de lombriz, y 3) 70% de arena industrial fina. La mezcla se pasó por un tamiz de 2 mm, se puso un 1 kg de suelo en macetas. Se realizó una caracterización del suelo y un análisis granulométrico en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Científica del Sur, Lima, Perú. Los resultados obtenidos en la caracterización del suelo, mostraron que es de tipo arenoso y con un pH de 7,33. Es un suelo tipo medio a bajo, en relación al porcentaje de materia orgánica (MO), cuyo valor fue de 2,02. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) presentó un valor de 7,77. Por otro lado, el análisis granulométrico, mostró que la mayoría de las partículas fueron de tipo arena con un 93%, siendo la arena fina (0,25 - 0,10 mm) la de mayor presencia. El limo tuvo un porcentaje de 3% y la arcilla de 4%.

### Selección de lombrices de tierra (*Eisenia fetida*)

Se escogieron individuos adultos de *E. fetida* con clitelo visible y con un peso aproximado entre 200-500 g, las cuales fueron adquiridas de un centro de lombricultura de la ciudad de Lima, Perú. Las lombrices seleccionadas fueron aclimatadas en el suelo artificial previamente preparado. Posteriormente se lavaron con agua y se pesaron (Ávalos-Ruiz & Iannacone, 2020). La especie fue identificada como *E. fetida* en base a las características morfológicas señaladas por Domínguez *et al.* (2005).

### Plaguicidas

Fastac® (ia alfa-cipermetrina) (rac-(R)-ciano(3-phenoxyphenyl)methyl (1S,3S)-3-(2,2-dichloroetenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate), C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, PM=416,30). Se utilizó el concentrado emulsionable (100 g·L<sup>-1</sup> equivalentes de ia). Dentro de sus propiedades físicas y químicas tiene un valor de pH= aprox. 7,2; densidad= aprox. 0,919 g·cm<sup>-3</sup> (20°C); y solubilidad: emulsionable.

Lancer® (ia imidacloprid) (1-(6-cloro-piridilmetil) N-nitroimidazolidin-2- ilideneamina, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, PM= 255,7). Se utilizó la suspensión concentrada (350 g·L<sup>-1</sup> equivalentes de ia). Dentro de sus propiedades físicas y químicas tiene un valor de pH= 6 (al 1%), densidad= 1,54 g·L<sup>-1</sup> (23°C), y solubilidad en agua: 610 g·L<sup>-1</sup> (20°C).

### Bioensayos

Se realizaron tres bioensayos de toxicidad, dos de ellos en forma individual para alfa-cipermetrina y imidacloprid, y un tercero usando la mezcla de ambos plaguicidas. También se realizó la prueba de evasión, la cual se efectuó para cada plaguicida individualmente y para la mezcla.

### Ensayos agudos y subletales

#### Alfa-cipermetrina

Se establecieron seis concentraciones de alfa-cipermetrina (2025, 675, 225, 75, 25 y 8,3 mg·L<sup>-1</sup>) y un control, con cuatro repeticiones cada una. Para la elaboración de las concentraciones, se preparó una solución usando 5,06 mL de plaguicida, obteniendo la máxima concentración (2025 mg·L<sup>-1</sup>). A partir de la concentración 2025 mg·L<sup>-1</sup>, se realizó un proceso de dilución para obtener las demás concentraciones. Para el

bioensayo se usaron contenedores con 1 kg de sustrato artificial, posteriormente se les adicionaron 40 mL de cada sustancia al sustrato de forma homogénea. Luego, se adicionaron 10 lombrices adultas, las cuales fueron previamente climatizadas. La duración del bioensayo fue de 14 d, en donde se regó diariamente para mantener la humedad del suelo. A los siete días de comenzar el bioensayo se extrajeron las lombrices de cada contenedor, se tomaron los puntos finales de mortalidad, y tres efectos subletales (fragmentación: partición de la lombriz y oscurecimiento: cambio en el color de la lombriz) y un peso húmedo (PH). Después de 14 d de exposición, se procedió a la extracción de las lombrices en su totalidad, se tomaron los puntos finales de mortalidad, PH, peso seco (PS), para este último parámetro subletal las lombrices de tierra fueron llevadas al horno a una temperatura de 40°C durante 72 h de exposición. También a los 14 días se evaluaron dos efectos subletales: fragmentación y oscurecimiento.

#### Imidacloprid

Se establecieron seis concentraciones de imidacloprid (128, 32, 8, 2, 0,5 y 0,125 mg·L<sup>-1</sup>) y un control, con cuatro repeticiones cada una. Para la elaboración de las concentraciones, se preparó una solución madre usando 0,5 mL de Lancer®, obteniendo una concentración de 175 mg·L<sup>-1</sup>. Posteriormente, se extrajeron 183 mL de solución madre y se adicionó agua hasta tener un volumen de 250 mL, obteniendo así la máxima concentración de 128 mg·L<sup>-1</sup>. A partir de esta concentración, se realizó un proceso de dilución para obtener las demás concentraciones. El montaje del bioensayo y la toma de puntos finales para el imidacloprid fue el mismo que el usado con la alfa-cipermetrina.

#### Mezclas

Para establecer la proporción de cada plaguicida en la mezcla, se realizó previamente el bioensayo individual para cada uno de los plaguicidas identificando su CL<sub>50</sub> (Concentración letal media). Basado en estos datos, se establecieron cinco concentraciones de las mezclas equitoxicas. Los valores de CL<sub>50</sub> de cada plaguicida se usaron en la concentración penúltima más alta, la máxima concentración de cada plaguicida fue dos veces la CL<sub>50</sub> y las tres concentraciones menores restantes, fueron la mitad de la concentración anterior

sucesivamente (Chen *et al.*, 2014; Schung *et al.*, 2015). Al igual que en los bioensayos individuales, se realizó el mismo procedimiento en el montaje y la toma de los diversos parámetros como puntos finales.

#### Ensayos de evasión

Para el análisis de comportamiento de evasión de *E. fetida*, se usó el método de la doble cámara (OECD, 1984; Schaefer, 2003; Zhou *et al.*, 2011), se usaron recipientes plásticos cuadrangulares de 1 kg que contenían suelo contaminado y no contaminado, se pusieron 10 lombrices y se tapó el recipiente para dejarlas pasar libremente. Después de 48 h, se separaron ambos suelos usando una barrera, y se procedió a contabilizar el número de individuos en cada lado. Esta prueba se realizó para el imidacloprid, la alfa-cipermetrina y la mezcla, y contó con siete repeticiones para cada una.

Se usó una sola concentración subletal para cada plaguicida, con un valor de 68,22 mg·L<sup>-1</sup> para alfa-cipermetrina y para imidacloprid un valor de 0,468 mg·L<sup>-1</sup>, obtenidas en los ensayos individuales. En el caso de la mezcla, se realizó una combinación con los valores anteriores. La prueba de evasión de las lombrices de tierra a concentraciones subletales, fue realizada de acuerdo a De Silva & van Gestel (2009) y empleó la siguiente fórmula:

$$NR(E) = \frac{C - T}{N} \times 100$$

Donde NR es el porcentaje de evasión, C es el número de lombrices en el suelo control, T es el número de lombrices en el suelo contaminado, y N es el número total de lombrices al comenzar la prueba. Un porcentaje positivo indica evasión del suelo contaminado, un cero significa no evasión, y un porcentaje negativo indica atracción por el plaguicida tratado (Alves *et al.*, 2013).

#### Análisis de datos

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones para los bioensayos ecotoxicológicos de mortalidad y subletales se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y con una prueba *a posteriori* de Tukey para la determinación del NOEC y LOEC. Previamente para emplear estas pruebas paramétricas, la data estadística fue verificada para el cumplimiento de la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianzas con la prueba de

Levene. Los datos porcentuales de mortalidad fueron previamente normalizados (transformación a raíz cuadrada del arcoseno), y los datos de PH y PS fueron transformados a  $\sqrt{(X+1)}$ . Las  $CL_{50}$  fueron determinadas usando el programa Probit versión 1,5. El modelo de regresión lineal simple fue verificado con el estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Posteriormente para el ensayo de evasión se realizó una prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para verificar si existe una dependencia entre la evasión y la presencia de plaguicidas para los ensayos individuales y para el de mezcla. Se usó el paquete estadístico SPSS versión 25,00, para calcular los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de 0,05 (Iannacone *et al.*, 2011b; Stockemer, 2019).

Por otro lado, para determinar el posible impacto ambiental de los plaguicidas en el estudio se usó el criterio basado en los valores de toxicidad por exposición (TER). Según el Anexo 6 de la Directiva 91/414/EEC de la Comisión Europea (CE), citada por Hartnik *et al.* (2008), si el valor del TER agudo es menor a 10 y/o el TER crónico es menor a cinco, por lo tanto en condiciones de campo, no se debe dar una autorización para el empleo del plaguicida evaluado porque ocasiona efectos negativos en las lombrices de tierra. Se calculó el valor del TER agudo y crónico, para el primero se usaron los valores de  $CL_{50}$  y para el

segundo de los valores NOEC (concentración a la cual no se observa efecto) o LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto), con la siguiente ecuación:

$$TER = \frac{CL_{50} \text{ o } NOEC \text{ o } LOEC}{PEC}$$

Siendo PEC, la concentración ambiental prevista para cada plaguicida que se determinó de la literatura científica, y se usaron los valores de  $CL_{50}$ , NOEC y LOEC obtenidos en esta investigación.

Asimismo, la toxicidad de la mezcla se determinó de acuerdo a Iannacone *et al.* (2011a) empleando la siguiente ecuación:

$$UT_{mezcla} = \left[ \frac{NOEC \text{ o } LOEC \text{ o } CL_{50} \text{ alfa - cipermetrina (en mezcla)}}{NOEC \text{ o } LOEC \text{ o } CL_{50} \text{ alfa - cipermetrina (individual)}} \right] + \left[ \frac{NOEC \text{ o } LOEC \text{ o } CL_{50} \text{ imidacloprid (en mezcla)}}{NOEC \text{ o } LOEC \text{ o } CL_{50} \text{ imidacloprid (individual)}} \right]$$

**Aspectos éticos:** Los autores señalan que se cumplieron todos los componentes éticos nacionales e internacionales.

## RESULTADOS

### Pruebas de toxicidad aguda

En general, el imidacloprid presentó una mayor toxicidad, en términos de mortalidad en *E. fetida*, en comparación a la alfa-cipermetrina (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de los plaguicidas alfa-cipermetrina e imidacloprid sobre el porcentaje de mortalidad de *Eisenia fetida* a 14 días de exposición.

Ingredientes activos	Parámetros	
	Concentración (mg·kg <sup>-1</sup> )	Mortalidad (%)
Alfa-cipermetrina	Control	0a
	8,3	12,5a
	25	16,67ab
	75	25b
	225	50c
	675	54,17c
	2025	75d
Imidacloprid	Control	0a
	0,125	20,69b
	0,5	27,59b
	2	44,83c
	8	48,28c
	32	86,21d
	128	100e

En los ensayos individuales se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  para imidacloprid y alfa-cipermetrina a 14 d de exposición (Tabla 2). Por otro lado, con respecto a la  $CL_{50}$  de la mezcla para imidacloprid y alfa-cipermetrina, al realizar el ANOVA, no se encontró diferencias significativas entre las

concentraciones de la mezcla y la mortalidad, por lo que no fue posible obtener este valor. Sin embargo, se halló el NOEC y LOEC para la mezcla en base a alfa-cipermetrina o a imidacloprid a 14 d de exposición.

**Tabla 2.** Parámetros ecotoxicológicos ( $CL_{50}$ , límites superiores e inferiores, NOEC, LOEC) para los ensayos individuales con los plaguicidas alfa-cipermetrina e imidacloprid sobre *Eisenia fetida*.

Parámetros	Ingredientes activos (mg·kg <sup>-1</sup> )		
	alfa-cipermetrina	imidacloprid	Mezcla
$CL_{50}$	341,1	2,34	-
$CL_{50}$ Límite inferior (95%)	26,8	1,66	-
$CL_{50}$ Límite superior (95%)	1200,5	11,7	-
NOEC	25	>0,125	341,1* o 2,34**
LOEC	75	0,125	682,2* o 4,68**

$CL_{50}$  = concentración letal media. NOEC = concentración a la cual no se observa efecto.  
LOEC = concentración más baja a la cual se observa efecto. \* en base a alfa-cipermetrina. \*\* en base a imidacloprid.

### Prueba de evasión de lombrices

Los resultados obtenidos nos indican que el porcentaje de evasión (NR) de *E. fetida* al imidacloprid, la alfa-cipermetrina y la mezcla de ambos, tienen valores de 2,85%, 7,14% y 22,85%, respectivamente. Todos los porcentajes son positivos, lo cual es un indicador del comportamiento de evasión, por parte de las lombrices de tierra, en sentido opuesto al suelo contaminado (Tabla 3). El análisis de  $\chi^2$ , nos arrojó

un valor p de 0,77 y 0,40, para imidacloprid y alfa-cipermetrina, respectivamente; dado que el  $p > 0,05$ , estos resultados nos indican que no hay una relación entre la evasión de *E. fetida* y la presencia de imidacloprid y alfa-cipermetrina, para las pruebas individuales. Por otro lado, el p para la mezcla tuvo un valor de 0,02, mostrando una relación entre la evasión de *E. fetida* y la presencia de la mezcla de imidacloprid y alfa-cipermetrina.

**Tabla 3.** Resultados de la prueba de evasión de *Eisenia fetida* para imidacloprid y alfa-cipermetrina, y para la mezcla de ambos plaguicidas en relación al número de individuos y porcentajes.

Parámetros	Ingredientes activos		
	Alfa-cipermetrina	Imidacloprid	Mezcla
Con tóxico	32 (45,8%)	34 (48,6%)	27 (38,6%)
Sin tóxico	38 (54,2%)	36 (51,4%)	43 (61,4%)

### Otros puntos finales

Además de la mortalidad de *E. fetida*, se usaron otros puntos finales subletales como: fragmentación, oscurecimiento, PH y PS. Para los dos primeros parámetros subletales no se evidenció un efecto en *E. fetida* relacionado al aumento de

concentraciones, y fue más bien aleatorio. En primer lugar, respecto al PH de *E. fetida*, el cual fue medido a los 7 d y 14 d, para el imidacloprid hubo una disminución en el PH de las lombrices. Los resultados para el PH a los 7 y 14 d de exposición, presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

entre 128 mg·kg<sup>-1</sup> de imidacloprid y el control. De igual modo, para la alfa-cipermetrina para el PH no se presentaron diferencias significativas en todas las concentraciones con relación al control, a excepción de 225 y 2025 mg·kg<sup>-1</sup>, a los siete y 14 d. En general, para ambos ia, se presentó un efecto que señala que a una mayor concentración hay un aumento en la disminución de biomasa de *E. fetida*.

Por su parte, para las mezclas de ambos plaguicidas se observó una mayor disminución de PH a 14 d en *E. fetida* en la máxima concentración, con una reducción de la masa de *E. fetida*, seguida de la segunda concentración más alta en comparación al control. En base a los resultados estadísticos, la mezcla de ambos plaguicidas tiene un efecto en la disminución del PH de las lombrices de tierra (Tabla 4). En segundo lugar, el PS de *E. fetida* en el

imidacloprid presentó diferencias significativas entre la concentración de 32 mg·kg<sup>-1</sup> y el control; esto mismo se evidenció en la alfa-cipermetrina, siendo la máxima concentración la única que no presentó esta diferencia con el control (Tabla 4).

Por otro lado, la mezcla de ambos plaguicidas al igual que en los ensayos individuales, presentó una disminución en el PS promedio de las lombrices de tierra. Todas las concentraciones de la mezcla, presentaron diferencias significativas con el control, excepto la máxima concentración. En general, resultado del PS de *E. fetida*, es una corroboración de lo obtenido con el PH mencionado anteriormente. Por lo cual, sí existe una reducción en el PS de *E. fetida* a una mayor concentración del plaguicida (Tabla 4).

**Tabla 4.** Pesos húmedos y secos de *Eisenia fetida* en ensayos individuales con alfa-cipermetrina e imidacloprid y con la mezcla de ambos plaguicidas a 7 y 14 d de exposición. ia= ingredientes activos; PS= peso seco; PH= peso húmedo.

ingredientes activos	(mg·kg <sup>-1</sup> )	Parámetros		
		PS 14 d (mg)	PH 7d (mg)	PH 14d (mg)
alfa-cipermetrina	Control	0,070a	0,338a	0,416a
	8,3	0,057ab	0,279ab	0,283ab
	25	0,052ab	0,280ab	0,294ab
	75	0,049ab	0,247ab	0,285ab
	225	0,039ab	0,128b	0,180b
	675	0,048ab	0,270ab	0,251ab
	2025	0,020b	0,138b	0,120b
imidacloprid	Control	0,051a	0,291a	0,207a
	0,125	0,059a	0,316a	0,264a
	0,5	0,054a	0,286a	0,247a
	2	0,048a	0,290a	0,266a
	8	0,045a	0,285a	0,243a
	32	0,033b	0,284a	0,185b
	128	0c	0b	0c
mezcla	Control	0,056a	0,312a	0,267a
	42,67*/0,29**	0,051a	0,252a	0,262a
	85,27*/0,68**	0,047a	0,248a	0,227a
	170,55*/1,17**	0,053a	0,270a	0,240a
	341,1*/2,34**	0,043a	0,251a	0,187b
	682,2*/4,68**	0,031b	0,219b	0,128c

\* en base a alfa-cipermetrina. \*\* en base a imidacloprid.

### Evaluación del riesgo y toxicidad

Al realizar el ANOVA de la mezcla, arrojó ausencia de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), por lo cual no se presentó una relación entre la concentración del plaguicida ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y la mortalidad de *E. fetida*, por lo cual un valor  $\text{CL}_{50}$  no fue posible determinar. Por la razón anterior, se usó la máxima concentración para cada plaguicida como la  $\text{CL}_{50}$

de cada compuesto en la mezcla. Asimismo, se analizaron los efectos subletales del PS y PH, los cuales presentaron una relación con la concentración, por lo cual se usaron los valores de NOEC y LOEC, para realizar una evaluación de riesgo. Los valores de TER hallados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de PEC y TER para la alfa-cipermetrina y el imidacloprid.

Parámetro	Imidacloprid	Alfa-cipermetrina
PEC ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0,33 (Capoweiz <i>et al.</i> , 2003)	0,0592 (BASF, 2014)
TERa ( $\text{CL}_{50}$ )	7,09	576,18
TERc (NOEC)	24,24	1266,89
TERc (LOEC)	96,96	3800,67

PEC= concentración ambiental prevista; TERa= toxicidad por exposición aguda; TERc= toxicidad por exposición crónica;  $\text{CL}_{50}$ = concentración letal media, NOEC= concentración de efecto no observado, LOEC= concentración más baja donde se observa efecto.

Por otro lado, se halló la relación tóxica entre ambos plaguicidas usando las unidades tóxicas (UT), con la ecuación mencionada en el

procedimiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Valores de unidades tóxicas (UT) para ambos plaguicidas sobre *Eisenia fetida*.

Parámetros	UT
$\text{CL}_{50}$	4
NOEC	4,84
LOEC	3,17

UT= unidades tóxicas,  $\text{CL}_{50}$ = concentración letal media, NOEC= concentración de efecto no observado, LOEC= concentración más baja donde se observa efecto.

Los resultados obtenidos fueron superiores a uno, lo cual representa un carácter antagónico entre ambos plaguicidas, es decir que en conjunto, los efectos que podrían generar ambos plaguicidas en las lombrices, no aumentan sino disminuyen.

tuvieron valores de  $\text{CL}_{50}$  = 1,23  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y 0,77  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , en exposiciones a 24 h y 48 h de exposición. Niveles semejantes se han encontrado en los estudios de Wang *et al.* (2012) y Chen *et al.* (2014) ( $\text{CL}_{50}$  = 2,82  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , para ambos estudios) en donde se evidenció una relación dependiente de la concentración y la mortalidad que aumentan a un mayor tiempo de exposición.

## DISCUSIÓN

En este estudio, *E. fetida* presentó efectos en la mortalidad y reducción de peso para el imidacloprid ( $\text{CL}_{50}$  = 2,34  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Resultados similares se han encontrado en otras investigaciones, Luo *et al.* (1999) obtuvieron un valor de  $\text{CL}_{50}$  = 2,30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Gomez-Eyles *et al.* (2009) presentaron una mortalidad desde 1,91  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\text{CL}_{50}$  = 2,36  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), y Zang *et al.* (2000)

En base a la literatura científica se ha estimado que el valor de  $\text{CL}_{50}$  para las lombrices de tierra expuestas al imidacloprid se encuentra en un rango de 1-10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dependiendo de la especie de lombriz empleada (Capoweiz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2019). El valor obtenido en el presente trabajo fue de 2,34  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , y se encuentra dentro de este rango.

Se han identificado diversos factores como la materia orgánica, pH, temperatura, humedad, tiempo de exposición, textura, entre otros, que influyen la variación del  $CL_{50}$  (Alves *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). En este sentido, se ha establecido que la cantidad de carbono orgánico presente en el suelo tiene una relación directa con la absorción del compuesto, es decir que a mayor cantidad de carbono orgánico, mayor será la absorción de éste. Esta correlación también aplica para la CIC; sin embargo no ocurre lo mismo con el pH y la cantidad de arcilla en el suelo (Cox *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2000; Sharma & Singh, 2014). La cantidad de carbono orgánico y la CIC, en la presente investigación, no son muy altas, por lo cual no habría mucha absorción en las partículas del suelo, y por ende el plaguicida estaría disponible en el agua del suelo y podría ser absorbido a través de la piel de la lombriz de tierra. El imidacloprid, al ser catalogado como ligeramente móvil a inmóvil (Oliveira *et al.*, 2000), se mantendría por largo tiempo en el suelo, por ende estaría en mayor contacto con las lombrices. En lo referido al pH y la textura, de acuerdo a Oliveria *et al.* (2000), no habría una relación entre la toxicidad y estas propiedades del suelo.

El imidacloprid, un compuesto neonicotinoide, es uno de los más usados a nivel mundial debido a su gran efectividad en el control de plagas. Al comparar su toxicidad, usando *E. fetida*, con otros tipos de plaguicidas (piretroides, insecticidas antibióticos, carbamatos, insecticidas que regulan el crecimiento de insectos y organofosforados), éstos han mostrado ser más tóxicos (Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). Su alta toxicidad ha podido ser verificada en el presente estudio, donde a las concentraciones bajas, por ejemplo  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  alcanzaba altos efectos. Esta alta toxicidad, se debe al mecanismo de acción del imidacloprid, el cual bloquea el receptor de la acetilcolina (neurotransmisor), acumulándola en el organismo y por ende afectando el sistema nervioso, esto deriva en parálisis de músculos y órganos, que podría a largo plazo matar al individuo (Capowiez *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019).

La pérdida de biomasa en las lombrices puede ser un indicador de efectos subletales a la exposición de un contaminante. Capowiez & Bérard (2006), intentaron establecer una relación entre la pérdida de peso y la longitud de las cavidades (indicador de

comportamiento) realizadas por las especies *Aporrectodea nocturna* Evans, 1946 y *Alloobophora icterica* (Savigny, 1826); sin embargo, no se identificó una clara relación entre ambas variables, dado que factores como, el poco contenido intestinal por la falta de alimento, o una afectación del esqueleto hidráulico de las lombrices, podrían influenciar su comportamiento. Algunas de estas investigaciones han identificado otros efectos del imidacloprid en las lombrices, que podrían estar relacionadas con una reducción del peso. Al respecto, Luo *et al.* (1999) identificaron una reducción en la actividad de la celulasa en *E. fetida*, al aumentar su tiempo de exposición a bajas concentraciones, puesto que la actividad de la celulasa se relaciona con la eficiencia en la alimentación, una afectación en ésta podría generar una disminución en el peso (Alves *et al.*, 2013).

Con respecto al análisis de evasión, Capowiez & Bérard (2006), señalaron que las lombrices no mostraron una evasión hacia el plaguicida, estos resultados concuerdan con los observado en el presente estudio. En este caso, las lombrices no tienden a evadir el suelo contaminado; pero se debe destacar que las especies empleadas son diferentes, *E. fetida* es una lombriz epigea (vive en la superficie del suelo, tamaño pequeño), mientras que las usadas en las otras investigaciones fueron anécicas (realizan túneles verticales, de gran tamaño) y endogeicas (realizan túneles horizontales, de tamaño variable).

Por otro lado, los resultados de la  $CL_{50}$  de la alfa-cipermetrina se encuentran dentro del límite establecido en investigaciones anteriores por Inglesfield (1984), citado por Hartnik *et al.* (2008), en donde este valor debe ser superior a  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Wang *et al.* (2012), han encontrado valores para la cipermetrina de  $1272 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Hartnik & Stryrshave (2008) tuvieron datos superiores a  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , dado que recién a esa concentración se observó letalidad. Otras investigaciones han presentado valores inferiores a  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , como Zhou *et al.* (2008) y Zhou *et al.* (2011) donde los valores fueron  $84,14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  y  $86,04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  respectivamente, y se evidenció una relación concentración-respuesta positiva.

Dentro de las variables que influyen la exposición del organismo a la alfa-cipermetrina se tienen: la forma de presentación del químico en el

suelo y la materia orgánica. Se ha demostrado que esta última, tiene una gran absorción de la alfa-cipermetrina y se prevé la presencia de poco compuesto disuelto en los poros de agua. Es necesaria su disponibilidad en fase acuosa para ser tomada por la lombriz de tierra por medio de la cutícula o la ingestión (Hartnik & Styryshave, 2008; Hartnik *et al.*, 2008; Styryshave *et al.*, 2010; Patel & Prajapati, 2020). En este sentido, la cantidad de MO en el suelo de la investigación se encuentra en un rango medio-bajo, por lo cual no habría mucha absorción del contaminante. Con respecto a la forma de presentación, la usada en este estudio se diluía en el agua, por lo cual el compuesto se encontraba más disponible en el agua del suelo y sus partículas, y habría mayor exposición al contaminante por parte de las lombrices.

También se ha establecido que los piretroides como la cipermetrina, son compuestos fotodegradables y al ser expuestos a la luz se degradan rápidamente (Gupta *et al.*, 2011). Otros factores como la forma de alimentación influyen la acumulación de los plaguicidas en el ambiente, y varía de acuerdo a cada especie (Hartnik & Styryshave 2008; Patel & Prajapati, 2020). Wang *et al.* (2012), identificaron que estos compuestos son más fáciles de absorber a través de la cutícula, dado que presentaron mayor toxicidad en la prueba por contacto. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Hartnik *et al.* (2008), en donde se compararon las toxicidades entre lombrices, caracoles y colémbolos, siendo las lombrices las que presentaron mayor toxicidad. Los autores consideran que esto se da porque éstas tienen un mayor contacto con el suelo y el agua que hay en este, y las diferencias en la permeabilidad de la membrana, que se dan entre las especies.

Según Wang *et al.* (2012), se ha demostrado que muchos piretroides, familia de plaguicidas a la cual pertenece la alfa-cipermetrina, no son tóxicos para las lombrices. La baja toxicidad de la alfa-cipermetrina, se puede dar por su rápido metabolismo, el cual puede darse de dos formas: que se metabolice antes de llegar al sistema nervioso central o que se una al receptor y sea redistribuido entre los receptores y el tejido; también se cree que los metabolitos no se unen a las biomoléculas, por lo cual se acumula y presenta muy baja excreción (Hartnik & Styryshave 2008).

Por su parte, Diao *et al.* (2011) encontraron que la alfa-cipermetrina era absorbida por la lombriz rápidamente y de forma enantioselectiva, es decir que tiene preferencia por algunos enantiómeros. Además, se identificó que la degradación de éstos, en los suelos, también presenta enantioselectividad.

En esta investigación, no se identificó una clara evasión por parte de las lombrices hacia el suelo contaminado. Este tipo de comportamiento difiere a lo observado en los estudios de Zhou *et al.* (2008) y Zhou *et al.* (2011), en donde se presentó una evasión a mayores concentraciones de los plaguicidas ensayados. Este comportamiento se justifica por el amplio número de quimiorreceptores que tienen las lombrices en la superficie de su cuerpo (Zhou *et al.*, 2007).

En lo referido a la variación en los pesos, los resultados muestran una reducción a una mayor concentración, esto concuerda con los resultados de Zhou *et al.* (2008), donde el peso muestra efectos adversos de la cipermetrina. Sechi *et al.* (2014) identificaron un efecto adverso en el peso húmedo en *E. fetida*, por parte de la alfa-cipermetrina a las cuatro semanas de exposición; sin embargo, al aumentar su exposición a ocho semanas su peso incrementó.

Para el ingrediente activo del imidacloprid, los resultados obtenidos del TER agudo muestran valores de alta toxicidad, esto se ha corroborado en estudios de Wang *et al.* (2012) y de Chen *et al.* (2014) en donde el imidacloprid siempre ha mostrado altos valores de toxicidad al compararlo con otros plaguicidas. De acuerdo a la normativa de la Unión Europea (UE), este valor de TER agudo, es inferior a 10, por lo cual el plaguicida representaría un riesgo para el ambiente. Sin embargo, sus valores de TER crónico tienen valores superiores a cinco, lo cual no generaría un efecto adverso.

Por otro lado, los valores de CL<sub>50</sub> hallados son de 10 a 100 veces superiores a la concentración ambiental esperada (PEC = 0,33); sin embargo, se le clasificaría como un compuesto no dañino para el ambiente, lo cual no sería concordante con otros autores (Alves *et al.*, 2013). Por ejemplo, al usar la normativa de la República de China, los plaguicidas considerados altamente tóxicos tiene

un  $CL_{50} < 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $1-10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  son plaguicidas medianamente tóxicos y  $> 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  son poco tóxicos (Zhou *et al.*, 2008). El imidacloprid sería un plaguicida con una toxicidad mediana.

Los resultados de toxicidad obtenidos en el ensayo para la alfa-cipermetrina se encuentran por debajo de los establecidos en el reporte de la UE, respecto a este compuesto, en donde el valor del TER agudo es de 1500, según lo citado por Hartnik *et al.* (2008). Por su parte, el TER crónico para la alfa-cipermetrina, no representaría un riesgo al ambiente usando la normativa europea, dado que sus valores no son inferiores a cinco.

En este sentido, los estudios de Hartnik *et al.* (2008) y Hartnik & Styryshave (2010), obtuvieron valores inferiores a los de la UE, por lo cual la alfa-cipermetrina no representaría un riesgo para las lombrices. Por otro lado, de acuerdo a los límites establecidos por la normativa de china, para la evaluación del riesgo ambiental de los plaguicidas, la alfa-cipermetrina sería un compuesto con baja toxicidad para el ambiente.

En los ensayos individuales, se ha establecido que ninguno de los ia presenta una alta toxicidad al ambiente. Por otro lado, se ha realizado el ensayo de la mezcla de plaguicidas, dado que en el campo se usan múltiples plaguicidas o una mezcla de éstos, por su rápida acción, efectividad y conveniencia; además se conoce que esta mezcla o mixtura podría tener efectos sinérgicos, en otras palabras podría aumentar la toxicidad (Zhou *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

En la mezcla de imidacloprid y alfa-cipermetrina, no se encontró una relación entre la mortalidad y la concentración de la mezcla. Por otro lado, los valores de NOEC correspondieron al valor de la  $CL_{50}$  de cada plaguicida en los ensayos individuales, mientras que la LOEC correspondió al doble de valor. En este caso en particular, los resultados obtenidos son acordes con el análisis de las UT, en donde se halló que la mezcla tiene un carácter antagónico, por lo cual su efecto en la mortalidad no aumentaría sino disminuiría.

Sin embargo, sí se presentó una relación con los pesos húmedos y secos, en donde se evidenció una leve reducción de éstos, al comparar los valores a los 7 y 14 días. Con esto, se podría decir que la

mezcla tiene un efecto subletal en las lombrices. En estudios realizados en mezcla de imidacloprid con butaclor y clorpirifos, por Chen *et al.* (2014), ambos han presentado una acción combinada antagónica, y además se evidenció valores de  $CL_{50}$  más tóxicos en imidacloprid que en los otros compuestos en la mezcla a los siete días. Mientras que a los 14 d, la acción fue una concentración de adición, es decir que los efectos no presentan ninguna interacción, simplemente son la suma de sus efectos individuales.

Por otro lado, la investigación de la mezcla de cipermetrina y clorpirifos, elaborado por Zhou *et al.* (2011), ha mostrado tener mayor toxicidad en la lombrices que la aplicación individual de los plaguicidas. Además pudieron establecer que esta mezcla, aumentó la toxicidad aguda y crónica, siendo esta última la que mayores efectos tiene en aspectos como la reproducción y el crecimiento, por lo cual a largo plazo podría devenir en afectación a la calidad de los suelos.

En general, según la evaluación del riesgo usando los valores de toxicidad aguda, ambos plaguicidas no representan un riesgo ambiental alto para el ambiente. Basado en la literatura científica, se ha establecido que los estudios de toxicidad aguda en base a la mortalidad no representan los resultados a largo plazo que se pueden presentar en el ambiente. La consideración de puntos finales subletales, dan más respuestas sobre el comportamiento de los compuestos químicos en el ambiente, en el caso de estudio, el uso de la reducción del peso (crecimiento) y la evasión (comportamiento), han arrojado que sí se presenta un efecto subletal en la lombrices, lo cual a largo plazo podría devenir en una afectación en la calidad del suelo por su migración a sitios no contaminados y una posible reducción de su población debido a una afectación en su crecimiento.

Los resultados de la toxicidad aguda en base a la mortalidad para imidacloprid, muestran que este compuesto presenta una toxicidad alta para *E. fetida*. Los efectos del imidacloprid, no solo disminuyen la supervivencia de las lombrices, sino también afectan su peso. La alfa-cipermetrina, ha presentado una toxicidad evidente en *E. fetida*. Los efectos de la alfa-cipermetrina, al igual que del imidacloprid, se dan en la supervivencia de los organismos, como en su peso. La mezcla tiene un

carácter antagónico, no presentó una toxicidad aguda (mortalidad) evidente, pero sí tuvo efectos subletales en *E. fetida*. Con respecto al análisis de evasión, los resultados obtenidos muestran un comportamiento de repelencia por parte de las lombrices en la mezcla; sin embargo no hay una relación significativa entre evasión y presencia de tóxico, a las concentraciones usadas, en los ensayos individuales de alfa-cipermetrina e imidacloprid. La ERA usando la toxicidad aguda, arrojó como resultado de los ensayos individuales, que la alfa-cipermetrina no representa un riesgo para el ambiente, a diferencia del imidacloprid. Por otro lado, al analizarlos usando la toxicidad subletal en *E. fetida*, ninguno de estos compuestos representa un notorio riesgo ambiental.

Se recomienda la elaboración de estudios crónicos en *E. fetida* para establecer mejor cuál es el riesgo real de la mezcla y de los compuestos individuales. Esto daría mayores respuestas sobre el posible comportamiento de las lombrices de tierra y otros organismos del suelo hacia estos ia. Sería importante analizar otros efectos subletales en *E. fetida* como la elaboración de túneles, análisis de ADN, esperma, o lisosomas, debido a que podrían ampliar el conocimiento sobre los efectos de ambos plaguicidas en las lombrices de tierra. Finalmente sería importante evaluar estos plaguicidas sobre otras especies de lombrices de tierra, y así compararlos con resultados obtenidos en esta investigación con *E. fetida*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, P.; Cardoso, E.; Martines, A.; Sousa, J.P. & Pasini, A. 2013. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere*, 90: 2674-2682.
- Anhalt, J.C.; Moorman, T.B. & Koskinen, W.C. 2007. Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42: 509-514.
- Ávalos-Ruiz, S. & Iannacone, J. 2020. Evaluación del riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos en la lombriz de tierra *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Campus*, 25: 189-208.
- Baronio, C.A.; Schutze, I.S.; Nunes, M.Z.; Bernardi, D.; Machota, R.Jr.; Bortoli, L.C.; Arioli, C.J.; Mello-Garcia, F.R. & Botton, M. 2019. Toxicities and residual effect of spinosad and alpha-cypermethrin-based baits to replace malathion for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Control. *Journal of Economic Entomology*, 112: 1798–1804.
- BASF. 2014. *Registration Report: Alpha-cypermethrin*. Central Zone: Germany.
- Cáceres-Del Carpio, F.A. & Iannacone, J. 2021. Evaluación del riesgo ambiental por los insecticidas fipronil e imidacloprid en el camarón de río (*Cryphiops caementarius*). *La Granja*, 33: 1-11.
- Capowiez, Y. & Bérard, A. 2006. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 198–206.
- Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C. & Belzunces, L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker- a case study in imidacloprid. *Pedobiologia*, 47, 542-547.
- Chen, C.; Wang, Y.; Zhao, X.; Wang, Q. & Qian, Y. 2014. Comparative and combined acute toxicity of butachlor, imidacloprid and chlorpyrifos on earthworm, *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 100: 111–115.
- Cox, L.; Koskinen, W.C. & Yen, P.Y. 1998. Influence of soil properties on sorption-desorption of imidacloprid. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 33: 123-134.
- Davies, T.G.E.; Field, L.M.; Usherwood, P.N.R. & Williamson, M.S. 2007. Critical Review: DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *Life*, 59: 151–162.
- De Silva P. & van Gestel, C. 2009. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavates* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere*, 77: 1609-1613.
- Diao, J.; Xu, P.; Liu, D.; Lu, Y. & Zhou, Z. 2011. Enantiomer-specific toxicity and

- bioaccumulation of alpha-cypermethrin to earthworm *Eisenia fetida*. Journal of Hazardous Materials, 192: 1072–1078.
- Domingues, V.F.; Priolo, G.; Alves, A.C.; Cabral, M.F. & Delerue-Matos, C. 2007. Adsorption behavior of  $\alpha$ -cypermethrin on cork and activated carbon. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 42: 649-654.
- Domínguez, J.; Velando, A. & Ferreira, A. 2005. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?. Pedobiología, 49: 81-87.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1998. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. US environmental protection agency. Washington D.C., USA.
- Escobar-Chávez, C.; Alvarino, L. & Iannacone, J. 2019. Evaluation of the aquatic environmental risk of the mixture of the pesticides imidacloprid (insecticide) and propineb (fungicide) in *Daphnia magna* Straus, 1820. Paideia XXI, 9: 301-332.
- Farouk, M.; Hussein, L.A.A. & ElAzab, N.F. 2014. Different techniques for determination of imidacloprid insecticide residues. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94: 194-209.
- Gomez-Eyles, J.L.; Svendsen, C.; Lister, L.; Martin, H.; Hodson, M.E. & Spurgeon, D.J. 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72: 71-79.
- Gupta, R.; Chakravorty, P. & Kaviraj, A. 2011. Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. Chemosphere, 84: 724-726.
- Hartnik, T.; Sverdrup, L.E. & Jensen, J. 2008. Toxicity of the pesticide Alpha-Cypermethrin to four soil nontarget invertebrates and implications for risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, 27: 1408–1415.
- Hartnik, T. & Styrishave, B. 2008. Impact of biotransformation and bioavailability on the toxicity of the insecticides  $\alpha$ -Cypermethrin and Chlorfenvinphos in earthworm. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 11057-11064.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. & Mamani, N. 2011a. Estimación de la toxicidad combinada de mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 6: 23-29.
- Iannacone, J.; Alvarino, L.; Paredes, C., Alayo, M.; Mamani, N.; Bonifacio, J.; Mariano, M. & Miglio, M.C. 2011b. Evaluación de riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta Toxicológica Argentina, 19: 19-31.
- Lao, W.; Tiefenthaler, L.; Greenstein, D.J.; Maruya, K.A.; Bay, S.M.; Ritter, K. & Schiff, K. 2012. Pyrethroids in Southern California coastal sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 31: 1649–1656.
- Lionetto, M. G.; Calisi, A. & Schettino, T. 2012. *Earthworm biomarkers as tools for soil pollution assessment*. pp. 305-332. En: Hernandez-Soriano, M.C. (Ed.). *Soil Health and Land Use Management*, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/soil-health-and-land-usemanagement/earthworm-biomarkers-as-tools-for-soil-pollution-assessment>
- Luo, Y.; Zang, Y.; Zhong, Y. & Kong, Z. 1999. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. Chemosphere, 13: 2347-2356.
- Meeker, J.D.; Barr, D.B. & Hauser, R. 2008. Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. Human Reproduction, 23: 1932–1940.
- OECD. 1984. *OECD Guideline for testing of chemicals No 207. Earthworm, acute toxicity tests*. OECD. Paris. France.
- Oliveira, Jr.R.S.; Koskinen, W.C.; Werdin, N.R. & Yen, P.Y. 2000. Sorption of imidacloprid and its metabolites on tropical soils. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 35: 39-49.
- Patel, P. & Prajapati, R. 2020. Possible toxicological effect of pesticides, cypermethrin on earthworm (*Eisenia fetida*). International Journal of Research in

- Engineering, Science and Management, 3: 138–143.
- Pelosi, C.; Barot, S.; Capowicz, Y.; Hedde, M. & Vandenbulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34: 199–228.
- Schaefer, M. 2003. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology. *The Journal of Soils and Sediments*, 3: 79–84.
- Schung, L.; Ergon, T.; Jakob, L.; Scott-Fordsmand, J.J.; Joner, E. & Leinaas, H.P. 2015. Responses of earthworms to repeated exposure to three biocides applied singly and as a mixture in an agricultural field. *Science of the Total Environment*, 505: 223–235.
- Sechi, V.; D'Annibale, A.; Maraldo, K.; Johansen, A.; Bossi, R.; Jensen, J. & Henning-Krogh, P. 2014. Species composition of soil invertebrate multi-species test system determines the level of ecotoxicity. *Environmental Pollution*, 184: 586–596.
- Sharma, S. & Singh, B. 2014. Metabolism and persistence of imidacloprid in different types of soils under laboratory conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94: 1100–1112.
- Stockemer, D. 2019. *Quantitative Methods for the Social Sciences. A Practical Introduction with Examples in SPSS and Stata*. Springer Nature, Switzerland. 181 p.
- Styrishave, B., Hartnik, T.; Christensen, P.; Andersen, O. & Jensen, J. 2010. Influence of soil type and organic matter content on the bioavailability, accumulation, and toxicity of  $\alpha$ -cypermethrin in the springtail *Folsomia Candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29: 1084–1090.
- Wang, X.; Zhu, X.; Peng, Q.; Wang, Y.; Gea, J.; Yang, G.; Wang, X.; Cai, L. & Shen, W. 2019. Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 219: 923–932.
- Wang, Y.; Cang, T.; Zhao, X.; Yu, R.; Chen, L.; Wu, C. & Wang, Q. 2012. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 122–128.
- Zang, Y.; Zhong, Y.; Luo, Y. & Kong, Z.M. 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108: 271–278.
- Zhou, S.; Duan, C.; Fu, H.; Chen, Y.; Wang, X. & Yu, Z. 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 854–858.
- Zhou, S.; Duan, C.; Wang, X.; Wong, M.; Yu, Z. & Fu, H. 2008. Assessing cypermethrin-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 1381–1385.
- Zhou, S.; Duan, C.; Michelle, W.H.G.; Yang, F. & Wang, X. 2011. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *Journal of Environmental Sciences*, 23: 676–680.

Received October 28, 2020.

Accepted January 5, 2021.