ISBN: 978-628-96613-1-6. ISSN: 2414-6390. Digital Object Identifier: https://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2025.1.1.2012

COVER PAGE IN ENGLISH
(solo para artículos en español, portugués o francés)

Assessment of the aquatic environmental risk of the mixture of two commercial herbicides in the bioindicator *Daphnia magna*

Maximiliano Susanivar-Agustin[1]; Lorena Alvariño[2]; José Iannacone[1],[2]*
[1] Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú,
[2] Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Grupo de Investigación de Sostenibilidad Ambiental "GISA". Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.

Abstract*– The bioassay with the bioindicator Daphnia magna, facilitates obtaining the individual and mixed acute ecotoxicological effect of various toxic chemicals through the mean lethal concentration (LC_{50}). The objective of the present investigation was to evaluate the aquatic environmental risk of the mixture of herbicides, glyphosate (GLY) and paraquat (PQ) in D. magna. For the 24 and 48 h exposure tests, standardized cultures of D. magna were used. The herbicides GLY and PQ, and the mixture of both, were evaluated. The results obtained for D. magna showed that the acute toxicity was the following: mixture of GLY + PQ > PQ > GLY. The Aquatic Environmental Risk Assessment (ERA) without the use of the safety factor (FS) showed that GLY does not represent an individual risk in avocado cultivation. At the same time, it presents an aquatic risk in the other two scenarios (coffee and sugar cane). On the other hand, the PQ presents an environmental risk for all three scenarios. The ERA using FS showed the risk for both herbicides in the three scenarios. It is concluded that GLY and PQ cause a risk to the aquatic environment.

***Keywords*-- Bioassay; expected environmental concentration; mean lethal concentration; pesticide mixture; aquatic environment.**

Evaluación del riesgo ambiental acuático de la mezcla de dos herbicidas comerciales en el bioindicador *Daphnia magna*

Maximiliano Susanivar-Agustin[1]; Lorena Alvariño[2]; José Iannacone[1,2]*
[1] Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú,
[2] Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Grupo de Investigación de Sostenibilidad Ambiental "GISA". Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.

Resumen– ***El bioensayo con el bioindicador Daphnia magna, facilita obtener el efecto ecotoxicológico agudo individual y en mezcla de diversos químicos tóxicos mediante la concentración letal media (CL_{50}). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el riesgo ambiental acuático de la mezcla de los herbicidas, glifosato (GLY) y paraquat (PQ) en D. magna. Para los ensayos de 24 y 48h de exposición, se utilizaron cultivos estandarizados de D. magna. Se evaluaron los herbicidas GLY y PQ, y la mezcla de ambos. Los resultados obtenidos para D. magna demostraron que la toxicidad aguda fue la siguiente: mezcla de GLY + PQ > PQ > GLY. La Evaluación del Riesgo Ambiental acuático (ERA) sin uso del factor de seguridad (FS) mostró que el GLY no representa un riesgo individual en el cultivo de palta, mientras que presenta riesgo acuático en los otros dos escenarios (café y caña de azúcar). En cambio, el PQ presenta riesgo ambiental para los tres escenarios. La ERA con uso del FS mostró riesgo para ambos herbicidas en los tres escenarios. Se concluye que GLY y PQ ocasionan un riesgo para el ambiente acuático.***

Palabras clave-- ***Bioensayo; concentración ambiental esperada; concentración letal media; mezcla de los plaguicidas; toxicidad; ambiente acuático.***

Abreviaciones:
CL_{50} = Concentración letal media.
GLY = Glifosato.
PQ = Paraquat.
ERA = Evaluación del Riesgo Ambiental acuático.
FS = Factor de seguridad.
CAE = Concentración ambiental esperada.
RQ = Cocientes de riesgo.
CSEP = Concentración sin efectos previstos.
LOC = Nivel crítico.
UT = Unidades tóxicas.
Koc = Coeficiente de partición del equilibrio.
Kow = Coeficiente de reparto n-octanol-agua.

I. INTRODUCCIÓN

Los herbicidas a nivel mundial cumplen un rol importante en la agricultura moderna, para el control de malezas [1], facilitando la producción a gran escala; sin embargo, son perjudiciales cuando los compuestos químicos llegan al ambiente acuático, a causa de acciones antropogénicas, como el enjuague de envases, bidones, mochilas fumigadoras en ríos, arroyos o cerca de ellos. Del mismo modo, fenómenos naturales como la escorrentía y/o la lixiviación facilitan el traslado de los residuos de herbicidas hacia los cuerpos de agua superficiales y subterráneas, la cual se manifiesta con efectos toxicológicos en animales y plantas, el grado de toxicidad varia acorde a como se halla el herbicida en el ambiente acuático sea de forma individual o combinados [2-4].

A raíz de ello, la existencia de herramientas para determinar los riesgos que se generan por el uso de agroquímicos, como las investigaciones ecotoxicológicas encaminadas en realizar una evaluación de riesgo ambiental (ERA) para mezclas de plaguicidas, las cuales suministran una visión más acorde a la realidad [5]. La ERA en el ambiente acuático facilita la clasificación, comparación y prioriza los riesgos en temas ambientales, realizando análisis de costo-beneficio y de costo-efectividad; a través de un proceso iterativo, consiguiendo nueva información la cual se incorpora en la valoración de riesgo y mejora la toma de decisiones sobre un compuesto químico [3,5,6].

El glifosato (GLY) es una sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, con peso molecular 228,22 g/mol, que se utiliza como herbicida no selectivo, de acción sistémica, y que actúa a través del follaje [7,8]. En el ambiente acuático el glifosato perjudica la síntesis de aminoácidos aromáticos, la producción de clorofila, la fotosíntesis y la respiración [9].

El paraquat (PQ) conocido como 1,1′ -Dimetil-4,4′ -bipiridilo con peso molecular 186 g/mol, es un herbicida desecante de control no selectivo de malezas [10]. Si los factores ambientales son favorables, sumado a su adsorción a sedimentos el paraquat alcanza una vida media de entre 2 y 820 años aproximadamente, a altas profundidades la inexistente degradación química o microbiológica influye en su gran persistencia en el agua [11, 12], disminuyendo la abundancia y biomasa de los organismos de mayor tamaño alterando el sistema acuático [13].

Los herbicidas representan un gran problema debido a la contaminación al momento de su aplicación y almacenamiento por parte de los agricultores, por ser productos de alto grado de toxicidad [14]. Sin embargo, a nivel mundial, y en especial en el Perú, se hace uso de los herbicidas como el glifosato (GLY) de manera intensiva y el Paraquat (PQ), a pesar de su prohibición desde 2020, lo cual provoca un incremento de residuos de estos compuestos en el ambiente acuático [9,15].

Los bioensayos de toxicidad para ambientes acuáticos con la pulga del agua *Daphnia magna* son altamente sensibles y de bajo coste en su aplicación [16], por otro lado, su amplia distribución geográfica, el significativo papel que desempeñan al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo, la reproducción partenogénica, y el corto ciclo de vida logrando un alto número de crías, lo convierten en un grupo ideal para la evaluación de toxicidad, a nivel universal [3, 6, 16, 17, 18].

A la fecha se han realizado investigaciones científicas de los efectos de la toxicidad individual de los herbicidas comerciales GLY y PQ sobre la biota acuática zooplanctónica como *D. magna*. Sin embargo, no se tiene información publicada sobre la toxicidad de la mezcla de estos dos herbicidas. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el riesgo ambiental acuático de la mezcla de dos herbicidas comerciales (GLY y PQ) sobre el indicador *D. magna*.

II. Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ecología y Biodiversidad animal (LEBA) de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), El Agustino, Lima, Perú.

Se utilizó el cladócero *D. magna*, acondicionados en el laboratorio LEBA, las cuales se cultivaron en peceras de vidrio (15 x 30 x 10 cm), como medio de cultivo se utilizó agua mineral embotellada de manantial San Mateo® (pH neutro cercano a 7, dureza cálcica = 34 mg/L, Calcio = 90 mg/L, Magnesio = 11 mg/L, Sodio = 32 mg/L y Potasio = 6 mg/L), y alimentado con 50mL *Arthrospira platensis* por cada litro de agua, cada dos días.

La alimentación se realizó con capsulas de *A. platensis* de la marca Bionaturista®. Se utilizó dos capsulas en 10 L de agua San Mateo®, la cual se colocó en aireación y luminosidad constante, por tres días antes de alimentar a los cultivos parciales de D. magna. El fotoperiodo de los cultivos fue aproximadamente de 12:12 con temperatura ambiente (27 ±1 °C) y aireación adecuada para la proliferación de los dafnidos. Los parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y conductividad eléctrica (CE) se determinaron haciendo uso del multiparámetro HandyLab 680.

Se empleó el GLY de la marca Fuego® a una concentración de 480 g/L, a partir de la cual se establecieron ocho concentraciones (mg/L) para el bioensayo 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125. Para el PQ se utilizó la marca Quemax® a una concentración de 276 g/L estableciendo seis concentraciones (mg/L) para bioensayo 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1,25.

Se realizaron bioensayos individuales de cada herbicida GLY y PQ, para determinar la concentración letal media (CL_{50}), y luego en base a las CL_{50} de los herbicidas se determinó las concentraciones de las mezclas.

Un día antes de realizar las pruebas de toxicidad individuales y de mezcla, se seleccionaron grupos de madres partenogenéticas de *D. magna*, con el fin garantizar el uso neonatos (< 24h de nacidos) en los bioensayos [3,6,17,19].

Las diluciones para el bioensayo se realizaron con agua embotellada San Mateo®, con factor de dilución de 0,5. y se evaluó los parámetros físicos y químicos: temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y conductividad eléctrica (CE) [3,18]. Luego se colocaron 20 mL de cada dilución en envases de 60 mL de capacidad a los cuales se trasladaron 10 neonatos de *D. magna*, para iniciar el ensayo de toxicidad aguda, donde se evaluaron la mortalidad en 24 y 48h de iniciado la exposición. Se utilizó como criterio de mortalidad la falta de ritmo cardiaco o carencia de movilidad, con la ayuda de un microscopio 40 X y estereoscopio de 10 X [3,6,17,19]. Durante el tiempo de exposición a los dos herbicidas, los neonatos no fueron alimentados.

Para realizar la mezcla equitóxica se utilizaron concentraciones individuales que presentaran una tasa de mortalidad igual o menor al 5%, es decir se realizó la mezcla teniendo como referencia el CL5 del GLY y PQ estimadas en los bioensayos individuales. Establecidos las concentraciones de las mezclas binarias equitóxicas del PQ y GLY sobre *D. magna*, se realizaron las pruebas de toxicidad del mismo modo que los bioensayos individuales.

Para las pruebas de toxicidad aguda de los herbicidas del GLY y PQ de manera individual y en mezcla sobre el bioindicador *D. magna* se utilizaron concentraciones con su respectivo control, cada uno con cuatro repeticiones, para cada herbicida, en un estudio con diseño en bloques completos distribuidos al azar (DBCA) 9x4 para el GLY (un control y ocho concentraciones ($mg \cdot L^{-1}$) 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125), 7x4 para el PQ (un control y seis concentraciones (mg/L) 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25) y 7x4 para la mezcla GLY y PQ [3,6,17,19], todos los DBCA sin interacción factorial.

Las CL_{50}s se calculó mediante el análisis Probit al 95%. Con el análisis de varianza (ANOVA) se evaluó la eficacia entre los tratamientos y las repeticiones, y con una prueba a posteriori de Tukey se determinaron los valores de concentración a la cual no se observa efecto (NOEC) y la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC) (OECD, 2012). La data estadística fue verificada para el cumplimiento de la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianza [20,21,22].

Para determinar la toxicidad de la mezcla se empleó la siguiente ecuación:

$$UT_{mezcla} = \left[\frac{CL_{50}\ glifosato\ (en\ la\ mezcla)}{CL_{50}\ glifosato\ (individual)}\right] + \left[\frac{CL_{50}\ paraquat\ (en\ mezcla)}{CL_{50}\ paraquat\ (individual)}\right]$$

Donde: UTmezcla = Unidades tóxicas totales o suma de la actividad biológica.

El valor UT se utilizó para verificar si existen efectos antagónicos (UT > 1), aditivos = 1 o sinérgicos (UT < 1) de la mezcla. Considerando 1 UTmezcla equivalente a la CL50 (en mg/L) de un herbicida individual [5].

Se usó el programa EXPRESS (EXAMS-PRZM Exposure Simulation Shell) versión 1.03.02 para calcular el CAE (Concentración ambiental esperada). El modelo está diseñado para facilitar una evaluación rápida y consistente de la exposición a pesticidas acuáticos en una variedad de cultivo. Para lo cual incorpora propiedades físico químicas de los herbicidas y estima el CAE al instante y días (4, 21, 60 y 90) en mg/L de exposición. Los parámetros para el modelo EPA para cada herbicida son los siguientes (Tabla 1): La tasa de aplicación (kg/ha), Nº máximo de aplicaciones de manera anual, método de aplicación, intervalo entre aplicaciones (días), peso molecular del ingrediente (ia), presión de Vapor a 25 °C (m Pa) donde el herbicida se encuentre fase partícula en la atmosfera, el coeficiente de partición del equilibrio (Koc) (mg/L), vida media en el suelo en condiciones aerobias (días), solubilidad (mg/L), coeficiente de reparto n-octanol-agua (Kow), Agua-sedimento DT_{50} (días), Solo fase de agua DT_{50} (días), Hidrolisis pH (5, 7 y 9) (días) y Fotolisis (días).

TABLA I
VALORES DE ENTRADA PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN AMBIENTAL ESPERADA (CAE) CON EXPRESS 1.03.02. PARA GLIFOSATO (GLY) Y PARAQUAT (PQ) EN LOS CULTIVOS DE CAFÉ, PALTO Y CAÑA DE AZÚCAR.

Datos de entrada						
Cultivo	Palto	Palto	Café	Café	Caña de azúcar	Caña de Azúcar
Nombre químico	GLY	PQ	GLY	PQ	GLY	PQ
Tasa de aplicación (kg/ha)	0,96	0,138	1,5	0,552	1,92 y 0,768	0,966
Nº máximo de aplicaciones de manera anual	3	3	3	3	3	1
Método de aplicación	Spray de aire comprimido		Spray de aire comprimido		Spray de aire comprimido	
Intervalo entre aplicaciones (días)	120	120	120	120	50 y 300	0
Peso molecular	169,1	186,3	169,1	186,3	169,1	186,3
Presión de Vapor a 25 °C (m Pa). Fase particula en la atmosférica	0,0131	0,01	0,0131	0,01	0,0131	0,01
Valor K_{oc} (mg/L)	4900	10^6	4900	10^6	4900	10^6
Vida media en el suelo en condiciones aerobias (días)	16,11	5000	16,11	5000	16,11	5000
Solubilidad (mg/L)	1,05*10^4	6,2*10^5	1,05*10^4	6,2*10^5	1,05*10^4	6,2*10^5
coeficiente de reparto n-octanol-agua (K_{ow})	5,25* 10^{-7}	3,16* 10^{-5}	5,25* 10^{-7}	3,16* 10^{-5}	5,25* 10^{-7}	3,16*10^-5
Agua-sedimento DT_{50} (días)	20,8	*E	20,8	*E	20,8	*E
Solo fase de agua DT_{50} (días)	9,9	10	9,9	10	9,9	10
Hidrolisis pH 5 (días)	*E	*E	*E	*E	*E	*E
Hidrolisis pH 7 (días)	*E	*E	*E	*E	*E	*E
Hidrolisis pH 9 (días)	*E	*E	*E	*E	*E	*E
Fotolisis (días)	69	*E	69	*E	69	*E

E= Estable

Empleado para evaluar la naturaleza y magnitud del riesgo ambiental acuático del GLY y PQ de manera individual y en mezcla binaria equitóxica. Para lo cual se consideró los escenarios más críticos y de mayor exposición, teniendo seis escenarios para la ERA. Se evaluó a cada cultivo A, B y C (A = palta B = café y C = caña de azúcar) en dos situaciones: (1) Sin hacer uso de Factor de seguridad (FS) y (2) haciendo uso de factor de seguridad (FS=1000) aplicado al CL_{50}, en un conjunto de datos para una o dos especies acuáticas (OECD, 1992).

Para los escenarios "1A, 1B y 1C", con los de CL_{50} a 48h y CAE, se determinaron los cocientes de riesgo (RQ) del siguiente modo:

$$RQ = CAE/ (CL_{50} \text{ a } 48h)$$

El RQ se comparó con el nivel crítico (LOC = 0,5) planteado por la EPA para ensayos agudos con invertebrados, si el RQ es superior LOC, significa que existe riesgo ambiental [3,6].

Para los escenarios "2A, 2B y 2C", se evaluó el riesgo ambiental mediante el cálculo de los RQ, realizando la comparación del CAE entre la concentración sin efectos previstos (CSEP), determinada a partir de la CL_{50} dividida entre FS igual a 1000. Donde un RQ<1 indica un riesgo aceptable, RQ>1 es una exposición elevada y preocupante.

Los autores señalan que cumplieron toda la normativa nacional e internacional en ensayos eco toxicológicos. Asimismo, se tiene como validación la revisión independiente académica y la aprobación de un Comité de Ética de la Universidad Científica del Sur bajo Resolución Directoral académica de Carrera N° 018-2022-DACIA-DAFCA-U. CIENTIFICA.

III. RESULTADOS

Los valores de pH, CE, OD y T del bioensayo con GLY, PQ, y mezcla GLY-PQ sobre *D. magna* son señalados en la Tablas 2 al 4, donde se observa que el pH, OD y T no

presentan una tendencia marcada de variación entre concentraciones. Mientras que para la CE a medida que se incrementa la concentración del GLY, PQ y mezcla GLY-PQ se incrementa los valores CE, explicando su alta desviación típica.

TABLA II
PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL BIOENSAYO CON GLY SOBRE *DAPHNIA MAGNA*.

Concentración (mg/L GLY)	pH	Conductividad eléctrica (µs/cm)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	Temperatura (C°)
Control	7,87	719	8,82	28,1
3,125	7,98	729	9,18	28,2
6,25	8,00	731	9,18	28,1
12,5	7,98	737	9,31	28
25	7,94	751	9,40	28
50	7,89	775	9,48	28,2
100	7,80	830	9,45	28,1
200	7,66	954	9,55	28,2
400	7,49	1202	9,67	28,3
Desviación típica	0,171	159,60	0,253	0,1

Los resultados de toxicidad aguda en términos de CL_{50} para *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de herbicidas GLY y PQ en periodos de 24h y 48h se muestran en la tabla 5. Donde se evidenciaron que existen diferencias significativas ($p< 0,05$) entre el control y al menos uno de los tratamientos de los herbicidas estudiados.

TABLA III
PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL BIOENSAYO CON PQ SOBRE *DAPHNIA MAGNA*.

Concentración (mg/L PQ)	pH	Conductividad eléctrica (µs/cm)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	Temperatura (C°)
Control	7,95	718	8,73	27,7
1,25	8,02	718	8,42	27,8
2,5	8,03	721	8,41	27,5
5	8,05	723	8,38	27,4
10	8,06	728	8,37	27,3
20	8,06	738	8,35	27,4
40	7,98	759	8,08	27,6
Desviación típica	0,04	14,85	0,18	0,18

TABLA IV
PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL BIOENSAYO CON LA MEZCLA (GLY-PQ) SOBRE *DAPHNIA MAGNA*.

Concentración (mg/L GLY)	Concentración (mg/L PQ)	pH	Conductividad eléctrica (µs/cm)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	T (C°)
0	0	7,89	720	8,73	27,3
0,75	0,43	7,95	737	8,44	27,1
1,5	0,86	7,93	752	8,42	27,3
3	1,72	7,93	754	8,41	27,4
6	3,45	8,03	747	8,38	27,0
12	6,9	7,90	847	8,37	27,2
24	13,8	7,86	865	8,29	27,3
Desviación típica		0,54	57,01	0,14	0,14

A 24h y 48 h de exposición el control se diferencia estadísticamente con los tratamientos 7 y 8 de GLY, con concentraciones de 200 mg/L y 400 mg/L respectivamente. Los valores NOEC y LOEC se mantienen estables a 24h y 48h. Mientras la CL_{50} a 24h excede a la CL_{50} a 48h en 2,6%. A 24h de exposición el control se diferencia estadísticamente con los tratamientos 4,5 y 6 de PQ, con concentraciones de 10, 20 y 40 mg/L, respectivamente. A 48h de exposición se observa que a partir de la concentración 2,5 mg/L de PQ se diferencia estadísticamente del control. Los valores NOEC y LOEC de 24h exceden al de 48h en 75%. La CL_{50} a 24h fue mayor en 82% al de 48h.

Para los bioensayos de toxicidad aguda en términos de CL_{50} para *D. magna* expuesto a diferentes concentraciones de mezclas equitóxicas de los herbicidas GLY y PQ con periodos de exposición de 24h y 48h se muestran en la tabla 6. Donde se evidenciaron que existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre el control y por lo menos uno de los tratamientos.

A 24h de exposición, el control se diferencia estadísticamente con los tratamientos 5 y 6 de la mezcla, con concentraciones de 12GLY; 6.9PQ mg/L y 24GLY;13.8PQ mg/L respectivamente. A 48h de exposición se observa que a partir del T2 con concentraciones 1.5GLY;0.86PQ mg/L de mezcla equitóxica se diferencia estadísticamente del control.

TABLA V
PORCENTAJE DE MORTALIDAD, CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50}), CONCENTRACIÓN A LA CUAL NO SE OBSERVA EFECTO (NOEC) Y CONCENTRACIÓN MÁS BAJA A LA CUAL SE OBSERVA EFECTO (LOEC) AL APLICAR HERBICIDAS GLIFOSATO (GLY) Y PARAQUAT (PQ) SOBRE *DAPHNIA MAGNA* A LAS 24H Y 48H DE EXPOSICIÓN.

Herbicidas		Glifosato (GLY)					Paraquat (PQ)			
Horas		24h		48h			24h		48h	
[ ]	mg/L	% M		% M		mg/L	% M		% M	
0	0	0	A	0	A	0	0	A	0	A
T1	3,125	0	A	5	A	1,25	0	A	2,5	A
T2	6,25	0	A	17,5	A	2,5	0	A	32,5	B
T3	12,5	0	A	17,5	A	5	0	A	90	C
T4	25	7,5	A	12,5	A	10	12,5	B	100	C
T5	50	10	AB	14	A	20	67,5	C	100	C
T6	100	10	AB	20	AB	40	100	D	100	C
T7	200	30	B	50	B					
T8	400	65	C	77,5	C					
CL_{50} (mg/L)		269,08		262,34			16,17		2,85	
NOEC (mg/L)		100		100			5		1,25	
LOEC (mg/L)		200		200			10		2,50	
Prueba *ANOVA* de un factor	F	31,51		17,78			256,68		2,8	
	p	0,00		0,00			0,00		0,04	

[ ]= concentraciones de herbicidas, CL_{50}= Concentración letal media, NOEC= concentración a la cual no se observa efecto, LOEC= concentración más baja a la cual se observa efecto. F = Estadístico de Fisher según el análisis de Varianza. p = significancia prueba ANOVA de un factor, por ende, las letras mayúsculas iguales en una misma columna señalan que los promedios de mortalidad son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

La Unidad toxica (UT) de la mezcla a 24h y 48h es 0,474 y 0,468 respectivamente, lo cual indica que el tipo de interacción según unidad toxica es sinérgica. Es decir que

ambos herbicidas disminuyen su CL_{50} al interactuar, aumentando su toxicidad. Por ende, la CL_{50} del GLY y PQ en la mezcla para 48h de exposición fueron numéricamente menores respecto a las CL_{50} de las mismas sustancias evaluadas de manera individual. CAE en medio acuático se muestra en la tabla 7, resultados de las CAEs obtenidas en EXPRESS para el GLY y PQ en tres escenarios.

TABLA VI

PORCENTAJE DE MORTALIDAD, CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50}), CONCENTRACIÓN A LA CUAL NO SE OBSERVA EFECTO (NOEC) Y CONCENTRACIÓN MÁS BAJA A LA CUAL SE OBSERVA EFECTO (LOEC) AL APLICAR MEZCLA DE HERBICIDAS GLIFOSATO (GLY) Y PARAQUAT (PQ) SOBRE *D. MAGNA* A LAS 24H Y 48H DE EXPOSICIÓN.

Herbicidas			Glifosato (GLY) + Paraquat (PQ)			
Horas			24h		48h	
[ ]	(mg/L) GLY	(mg/L) PQ	% M		% M	
0	0	0	0	A	0	A
T1	0,75	0,43	0	A	15	AB
T2	1,5	0,86	0	A	20	B
T3	3	1,73	2,5	A	50	C
T4	6	3,45	5	A	95	D
T5	12	6,9	40	B	100	D
T6	24	13,8	100	C	100	D
CL_{50} (mg/L) GLY			12,072		2,320	
NOEC (mg/L) GLY			6		0,75	
LOEC (mg/L) GLY			12		1,5	
CL_{50} (mg/L) PQ			6,941		1,334	
NOEC (mg/L) PQ			3,45		0,43	
LOEC (mg/L) PQ			6,9		0,86	
UT_{Mezcla} [CL_{50} GLY (mezcla)/CL_{50} GLY (individual)] + [CL_{50} PQ (mezcla)/CL50 PQ (individual)]			0,474		0,468	
% contribución de muerte de la toxicidad	GLY		9,46		1,86	
	PQ		90,54		98,14	
Tipo de interacción según UT			Sinérgico		Sinérgico	

CL_{50}= Concentración letal media, NOEC= concentración a la cual no se observa efecto, LOEC= concentración más baja a la cual se observa efecto, UT= Unidad Toxica, Interacciones sinérgicas (UT < 1); interacciones antagónicas (UT > 1). Letras mayúsculas iguales en una misma columna señalan que los promedios de mortalidad son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey (P > 0,05).

TABLA VII

CONCENTRACIONES AMBIENTALES ESPERADA (CAE) DE LOS HERBICIDAS GLIFOSATO (GLY) Y PARAQUAT (PQ) EN LOS CULTIVOS DE PALTA, CAFÉ Y CAÑA DE AZÚCAR CON EXPRESS 1.03.02 (EXAMS-PRZM EXPOSURE SIMULATION SHELL)

Escenario		A		B		C	
Cultivos		Palta		Café		Caña de azúcar	
Herbicidas		GLY	PQ	GLY	PQ	GLY	PQ
CAE(mg/L)	Instante	2,41	2,06	7,93	11,5	14,6	9,91
	4 días	2,22	1,79	6,88	10,2	14	6,45
	21 días	1,6	1,14	4,5	6,75	11,9	4,73
	60 días	0,85	0,71	2,62	4,50	8,90	3,71
	90 días	0,59	0,57	1,80	3,85	8,10	3,26

La evaluación del riesgo ambiental en el escenario 1A, 1B y 1C de GLY y PQ individualmente y en mezcla, en cultivos de Palta, Café y caña de azúcar sin hacer uso del factor de seguridad (FS), se muestran en las figuras 1 al 4 donde se resumen en forma de un gráfico radial. En el ERA del GLY, donde se determinó los cocientes de riesgo (RQ) en base al CL_{50} a 24h y 48h, en los tres cultivos no superan el nivel crítico (LOC = 0,5) planteado por la EPA para ensayos agudos con invertebrados. Lo cual indica que no presenta riesgo ambiental sobre D. magna.

En las Fig. 2, se evalúa el herbicida PQ, los cultivos de café y caña de azúcar presentan riesgo ambiental acuático a 24h y 48h. Mientras que el cultivo de palta no, pues el cociente de riesgo (RQ) en base a CL_{50}PQ a 24h no supera el nivel crítico (LOC=0,5), por ende, no representa riesgo ambiental sobre *D. magna*. A las 48h presenta riesgo ambiental en el instante y cuatro días después de la aplicación del herbicida.

Las Fig. 3 y 4, muestran el resumen de las RQ en base al CL_{50} a 48h del GLY y PQ determinados en el bioensayo de mezcla. El cultivo de palta no supera el nivel crítico (LOC = 0,5) en la mayoría de los gráficos. Mientras los cultivos de café y caña de azúcar si presenta riesgo ambiental sobre *D. magna*.

La evaluación del riesgo ambiental en el Escenario 2A, 2B y 2C. de GLY y PQ individualmente y en mezcla, en cultivos de Palta, Café y caña de azúcar hizo uso del factor de seguridad (FS). En este escenario, al hacer uso del FS se observó que el PQ y GLY de manera individual y en mezcla constituyen un riesgo para el medio acuático, debido a que de manera individual y en mezcla superan el nivel crítico (LOC=1). Cabe resaltar que en los escenarios evaluados a medida que el tiempo de exposición se observó que el CAE disminuye a medida que aumentan los tiempos de exposición.

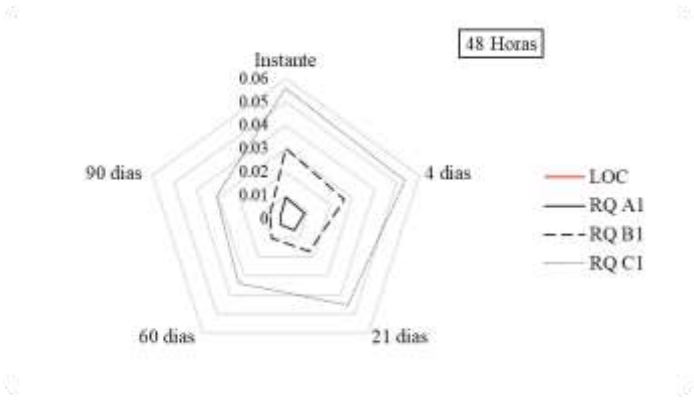

Fig. 1 Evaluación de Riesgo Ambiental del Glifosato (GLY) empleando a *Daphnia magna* en cultivo de palta, café y caña de azúcar sin usar FS (Factor de Seguridad), en base a la Concentración Letal media (CL_{50}) a 48h de exposición y una Concentración ambiental esperada (CAE) de instante a 90 días. LOC = Nivel crítico. RQ = Cocientes de riesgo. A = palta. B = café. C = caña de azúcar). 1 = Sin hacer uso de Factor de seguridad (FS).

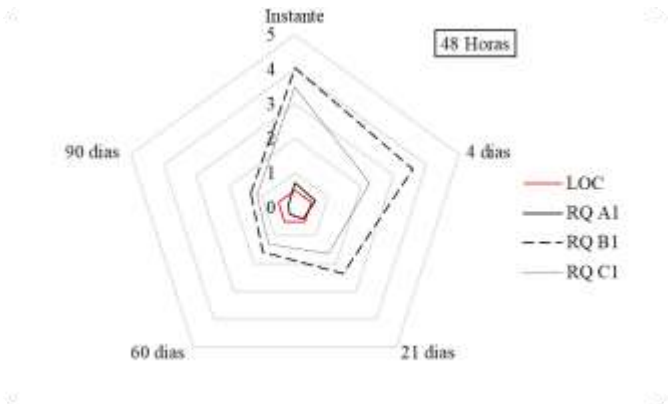

Fig. 2 Evaluación de Riesgo Ambiental del Paraquat (PQ) empleando a *Daphnia magna* en cultivo de palta, café y caña de azúcar sin usar FS (Factor de Seguridad), en base a la Concentración Letal media (CL_{50}) a 48h de exposición y una Concentración ambiental esperada (CAE) de instante a 90 días. LOC = Nivel crítico. RQ = Cocientes de riesgo. A = palta. B = café. C = caña de azúcar). 1 = Sin hacer uso de Factor de seguridad (FS).

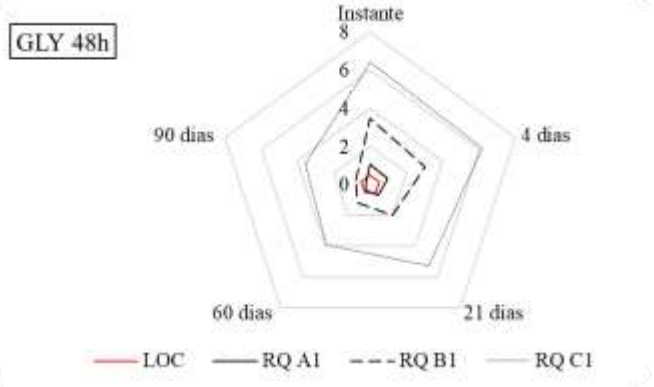

Fig. 3 Evaluación de Riesgo Ambiental del glifosato (GLY) en base a la Concentración Letal media (CL_{50}) a 48h de la mezcla de GLY y paraquat (PQ) empleando a *Daphnia magna* en cultivo de palta, café y caña de azúcar sin usar FS (Factor de Seguridad). LOC = Nivel crítico. RQ = Cocientes de riesgo. A = palta. B = café. C = caña de azúcar). 1 = Sin hacer uso de Factor de seguridad (FS).

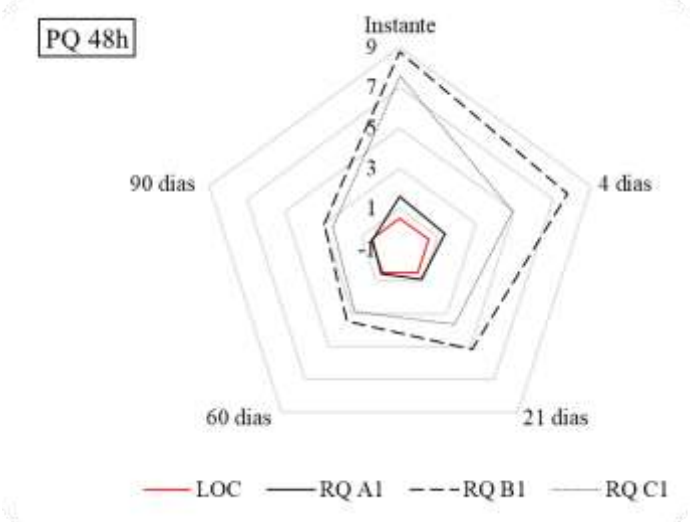

Fig. 4 Evaluación de Riesgo Ambiental del paraquat (PQ) en base al CL_{50} a 48h de la mezcla de glifosato (GLY) y PQ empleando a *Daphnia magna* en cultivo de palta, café y caña de azúcar sin usar FS (Factor de Seguridad). LOC = Nivel crítico. RQ = Cocientes de riesgo. A = palta. B = café. C = caña de azúcar). 1 = Sin hacer uso de Factor de seguridad (FS).

IV. Discusión

Daphnia magna es el micro crustáceo, más usado a nivel mundial en pruebas de toxicidad, por su gran sensibilidad a los agentes tóxicos [16,24], generando información precisa del riesgo ambiental en el ecosistema acuático [25]. Sumado a ello su fácil cultivo y reproducción asexual (partenogénesis) nos facilita el trabajo con poblaciones de características genéticas uniformes [3,16].

El PQ presentó una alta toxicidad sobre *D. magna* con un CL_{50} a 48h de 2,850 mg/L, similar a lo obtenido en la evaluación de toxicidad aguda de PQ con *D. magna* donde determinó un CL_{50} igual a 6,24 mg/L [26]. Estos mismos investigadores al realizar una comparación de la toxicidad aguda de dos herbicidas (PQ y GLY) determinaron un CL_{50} de 4,55 mg/L con *D. magna* y un CL_{50} igual a 2,57 mg/L para la *D. espinulata*.

La variación de CL_{50} entre lo calculado en esta investigación y la literatura, se puede sugerir a causa de la temperatura ambiental de los bioensayos, pues para la investigación fue de 27,5 °C, la cual se observa en varias regiones del Perú, y la de los autores una temperatura constante de 20°C. Della-Penna [27] afirma que a medida que la temperatura se incrementa, la toxicidad del PQ también, lo cual explicaría la variación de la CL_{50}. Los estudios con PQ son escasos y se dificulta obtener data actualizada. Se sugiere realizar bioensayos de las mezclas de PQ y GLY a una temperatura de 20ºC.

El GLY por su parte presentó una baja toxicidad sobre la *D. magna* con un CL_{50} a 48h de 262,12 mg/L, valor cercano a los efectos de la cipermetrina, clorpirifos y GLY como ingrediente activo y formulados sobre *D. magna* obteniendo un CL_{50} de 199 mg/L para GLY [28]. De igual manera Domínguez-Cortinas *et al*. [28] reportan datos de CL_{50} sobre *D. magna* a 48h de una concentración de 146 mg/L. Por otro lado, Huaraca et al. [29], determinaron un CL_{50} igual a 27,4 mg/L al comparar la toxicidad aguda de herbicidas basadas en GLY sobre *D. magna*. y lo obtenido en la evaluación ecotoxicológica de las aguas contaminadas con GLY a partir de *D. magna* donde se reportó un CL_{50} igual a 27,38 mg/L [30]. Estos resultados difieren completamente a lo obtenido en la investigación a pesar de que la pureza de GLY utilizada en la investigación y en la de los autores fueron iguales (48% de GLY). Otros reportes de CL_{50} para GLY, con diferentes porcentajes de pureza, con *D. magna*, registraron una CL_{50} =21,34 mg/L con GLY 36%, obtuvieron una CL_{50} =9,59 mg/L con GLY 43,5%, determinaron una CL_{50} =9,34 mg/L con GLY 74,4% y finalmente calcularon un CL_{50} =10,6 mg/L con GLY 74,4% [31-34].

Al comparar los resultados de CL_{50} obtenido y de los datos bibliográficos para el GLY se evidencia menor toxicidad aguda del compuesto ensayado Fuego® (262,12 mg/L), en relación a las otras marcas comerciales utilizadas en las investigaciones, lo cual evidencia que existe influencia de sustancias coadyuvantes en las formulaciones comerciales [30], la formulación del herbicida puede ser un factor que afecte la CL_{50} en *D. magna* [3]. Otro factor que influye en los resultados (CL_{50}) es la temperatura ambiente en la cual se desarrolló el bioensayo, siendo cercana a 28 °C para la investigación y un rango de 20 – 22 °C para otros autores. Finalmente, la calidad del agua de dilución usada en los bioensayos con GLY en la presente investigación fue agua de manantial, y otros autores en la literatura emplean agua artificial de laguna, lo cual pudiera tener una influencia en los resultados obtenidos de toxicidad con el GLY sobre *D. magna* [26].

En los bioensayos de las mezclas equitóxicas del PQ y GLY sobre *D. magna*, presentan un efecto sinérgico al interactuar en una solución. Pues la toxicidad de ambos se incrementa con respecto a los bioensayos individuales, lo cual se evidencia en los valores CL_{50} los cuales cambian al estar en mezcla. Resultando el PQ como el componente que contribuye en un 98% a la toxicidad de la mezcla.

El GLY en otras investigaciones ha presentado un efecto sinérgico o antagónico cuando se encuentra en mezcla con otro herbicida. Se ha investigado la toxicidad crónica de mezclas de herbicidas Atrazina y GLY (Roundup®) sobre *D. magna*, obteniendo que al estar juntos disminuyen su toxicidad, es decir presentan efecto antagónico [35,36]. Otros impactos adversos en ambientes acuáticos del GLY en mezcla con insecticidas fueron determinados por Martin-Demetrio [37] quien evaluó efectos de mezclas binarias y ternarias de las formulaciones comerciales de los plaguicidas GLY, cipermetrina y clorpirifos. Los bioensayos utilizados consideraban efectos letales en exposiciones agudas sobre *D. magna*, donde obtuvo que el GLY al estar en mezcla binaria con Cipermetrina presenta efecto sinérgico, y con el clorpirifos presenta efecto antagónico.

Respecto al PQ no se encontraron investigaciones en los últimos 10 años, donde se evalué su toxicidad en mezcla con algún otro plaguicida. En la mezcla de GLY y del PQ se tomó la fracción de su propia toxicidad, con su factor de dilución de 0,5. El efecto sinérgico de estos herbicidas se puede explicar en base a otros estudios, donde el glifosato presenta efecto sinérgico con otros plaguicidas. En el presente estudio el porcentaje de contribución de muerte de la toxicidad del glifosato en mezcla es del 2%, por lo que en futuros estudios se pueden hacer ensayos de los mismos herbicidas donde el glifosato contribuya en mayor porcentaje en la mortandad, e ir evaluando si aún se observa el efecto sinérgico o varia al antagónico a medida que la concentración de glifosato usado en la mezcla se incrementa.

En la evaluación del riesgo ambiental del GLY, sin hacer uso de un factor de seguridad, se evidenció que no existe riesgo afiliado a su uso, en los tres escenarios (palta, café y caña de azúcar) evaluados. Pero al aplicar un factor de seguridad (FS = 1000) se observó que si representa un riesgo ambiental acuático afiliado al uso de GLY en todos los escenarios.

El GLY es altamente soluble en agua y por esto se transporta fácilmente en ecosistemas acuáticos [38]. Una vez aplicado sobre el cultivo, por vía terrestre o aérea, el herbicida puede permanecer en las partículas del suelo hasta ser degradado microbiológicamente o bien, movilizarse en el agroecosistema por influencia del viento, de lluvias o riego, factores que incrementan su infiltración y escorrentía superficial [39,40]. De este modo puede alcanzar ambientes contiguos afectando adversamente la flora y la fauna [11]. EL GLY es un compuesto que presenta alto riesgo para el ecosistema acuático [8], lo cual se corrobora en los resultados de riesgo ambiental del GLY donde se aplicó el factor de seguridad.

Para el PQ, la evaluación del riesgo ambiental sin hacer uso de un factor de seguridad, indica que existe riesgo afiliado a su uso, en los escenarios de café y caña de azúcar, a excepción de la palta que presento riesgo ambiental acuático hasta cuatro días luego de aplicación. Pero al aplicar un factor de seguridad (FS = 1000) se observó que el PQ representa un riesgo ambiental acuático en todos los escenarios.

Onwona-Kwakye [41] afirman que el uso de PQ plantea serios riesgos potenciales agudos y crónicos para el ambiente acuático. Estos riesgos se incrementan si los ecosistemas acuáticos están adyacentes a los campos agrícolas o áreas donde se utiliza este herbicida [39,40,42]. Además, el PQ presenta una vida media en agua de 2 a 820 años dependiendo del factor luz solar y la profundidad el agua [43], mostrando su

gran potencial de causar efectos adversos en el ecosistema acuático.

El PQ presenta mayor toxicidad para cladóceros respecto al GLY, por la cual representa mayor riesgo ambiental para el ecosistema acuática [15,26,44]. Estas afirmaciones se corroboran al evaluar el riesgo ambiental con el uso de factor de seguridad (FS = 1000), indicando que este factor es importante en la extrapolación de los resultados experimentales en pruebas de toxicidad [3].

EL PQ y GLY demostraron tener una relación sinérgica al relacionarse en mezcla. Incrementando su toxicidad entre sí, teniendo como efecto un gran riesgo ambiental acuático evaluados tanto con y sin uso del factor de seguridad (fs=1000), y en los tres escenarios. En las simulaciones de la concentración ambiental esperada (CAE) en los cultivos de palta, café y caña de azúcar se evidenció que a medida que transcurre el tiempo (0, 4, 21, 60, 60 días) esta disminuye. Asimismo, se observa que los CAE para cada cultivo varían lo cual se debe a las tasas de aplicación de los herbicidas ya mencionados en la tabla 1.

Por ende, la mezcla de estos herbicidas presenta riesgo ambiental acuático, debido a sus características fisicoquímicas y las condiciones del ecosistema. Es decir, que para establecer los efectos adversos de los herbicidas PQ y GLY en el ecosistema acuático es necesario considerar la complejidad del sistema, se debe analizar la composición de especies, las interacciones inter e intraespecíficas y factores ambientales tales como los parámetros fisicoquímicos. La interacción de los herbicidas, factores biológicos y ambientales determinan si la contaminación se reduce o incrementa en ecosistemas acuáticos [15,45,46].

La tasa de aplicación recomendada de GLY es de 0,96, 1,5 y 1,92 Kg/Ha para palto, café y caña de azúcar respectivamente, si se considera como valor estándar que por cada ha se utiliza 200L de agua para su aplicación a través de aire comprimido (fumigación), se obtiene que al área agrícola se vierte las siguientes concentraciones de GLY 4800 mg/L, 7500 mg/L y 9600(3840) mg/L cada cierto periodo. Para PQ la tasa de aplicación es de 0,138, 0,552 y 0,966 Kg/Ha para palto, café y caña de azúcar, respectivamente, siendo concentraciones de 690 mg/L, 2760 mg/L y 4830 mg/L los cuáles a través de diversos factores llegan al sistema acuático, en la cual la CL_{50} para el GLY y PQ es de 262,12 mg/L y 2,850 mg/L si se presentan de manera individual, si estos herbicidas interactúan en el agua su CL_{50} disminuye a 2,278 mg/L para el GLY y 1,3340 mg/L para el PQ, evidenciando el gran riesgo de contaminación.

Por ende, la evaluación del riesgo ambiental acuático prevista mediante el método cociente de riesgo (RQ) demostró que sí existe riesgo para GLY y PQ, en mezcla, sobre *D. magna* en el sistema acuático, pues el RQ calculado sobrepasó el nivel crítico LOC. La existencia de riesgo ambiental fue determinada tanto con el uso de FS y sin el uso de esta.

El uso GLY y PQ combinados es un gran riesgo ambiental para el ambiente acuático, por la cual existe probabilidades de que los personas, animales y plantas estén expuestos a una contaminación indirecta, directa o por la magnificación biológica (bioacumulación).

La presente investigación brinda data sobre los efectos toxicológicos en el ambiente acuático, inferida a partir de pruebas toxicológicas en cladóceros, abriendo camino a futuras investigaciones donde existan interacciones entre los herbicidas GLY y PQ en diversos ambientes, puede ser terrestres como zonas agrícolas, zonas urbanas, etc. Además, representa un aporte en conocimiento respecto a la problemática ambiental causada por uso indiscriminado de plaguicidas en general, en la práctica los agrícolas se realizan un sin fin de combinaciones sin conocer las consecuencias y los impactos que generan a nivel ambiental y social.

Según el estudio se evaluó los bioensayos ecotoxicológicos de los herbicidas GLY y PQ de manera individual y en mezcla, obteniendo lo siguiente: El GLY al evaluarse individualmente demostró que presenta un efecto tóxico sobre *D. magna*, siendo el valor de la CL_{50} de 269,08 mg/L a 24h, y 262,12 mg/L a 48h de exposición. El PQ al evaluarse individualmente, demostró que presenta un efecto tóxico letal sobre *D. magna*, siendo el valor de la CL_{50} de 16,170 mg/L a 24h, y 2,850 mg/L a 48h de exposición.

Al contrastar los efectos de los dos herbicidas individualmente sobre *D. magna*, se concluyó que PQ>GLY, debido a que presentó un mayor efecto tóxico (mortalidad e inmovilización) que el producido por el GLY.

Se concluye que el GLY al evaluarse en mezcla demostró que presenta un efecto tóxico sobre *D. magna*, siendo el valor de la CL_{50} de 12,072 mg/L a 24h, y 2,320 mg/L a 48h de exposición. El PQ al evaluarse en mezcla demostró que presenta un efecto tóxico sobre *D. magna*, siendo el valor de la CL_{50} de 6,941 mg/L a 24h, y 1,3340 mg/L a 48h de exposición. Al contrastar los efectos de los dos herbicidas en mezcla sobre *D. magna*, se concluyó que, PQ es más perjudicial que el GLY, debido a que presentó valores de CL_{50} inferiores al del GLY. Del mismo modo, se demostró que existe un efecto sinérgico entre ambos herbicidas, debido a que presentaron mayor toxicidad cuando interactúan en mezcla que cuando se encuentran de manera individual.

Por otro lado, como perspectiva la evaluación del riesgo ambiental acuático prevista mediante el método cociente de riesgo (RQ) demostró que sí existe riesgo para GLY y PQ, en mezcla, sobre *D. magna* en el sistema acuático, pues el RQ calculado sobrepasó el nivel crítico LOC. La existencia de riesgo ambiental fue determinada tanto con el uso de FS y sin el uso de esta.

REFERENCIAS

[1] D.T. Chirinos, R. Castro, J. Cun, J. Castro, S.P. Bravo, L. Solis, et al, "Insecticides and agricultural pest control: the magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador." *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, vol.21, no. 1, e1276, 2020.

[2] M.C. Sasal, M.G. Wilson, S.M. Sione, S.M. Beghetto, E.A. Gabioud, J.D. Oszust et al, "Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje." *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, vol. 43, no. 2, pp. 195–205, 2017.

[3] C. Escobar-Chávez, L. Alvariño, and J. Iannacone, "Evaluation of the aquatic environmental risk of the mixture of the pesticides imidacloprid (insecticide) and propineb (fungicide) in *Daphnia magna* Straus, 1820." *Paidela XXI*, vol. 9, no. 2, pp. 301–332, 2019.

[4] P.E. Gronerth-Acuña, *Determinación de la concentración del contaminante emergente (Glifosato) en la especie ictiológica predominante del tramo bajo del río Shilcayo, provincia y departamento de San Martín 2020* (Tesis Pregrado), Universidad Cesar Vallejo, 2020.

[5] E.M. Arrázola-Vásquez, and J. Iannacone, "Evaluation of the environmental risk of the mix of alpha-cypermethrin and imidacloprid on the earthworm (*Eisenia fetida*) (Savigny, 1826)". *The Biologist (Lima)*, vol. 19, no. 1, pp. 111–124, 2021.

[6] K. Burga, L. Visitación, and T. Chire, "Evaluación ecotoxicológica de pesticidas organofosforados sobre *Daphnia magna*." *Anales científicos UNALM*, vol. 70, no. 2, pp. 11–18, 2009.

[7] N.J. Salazar-Lopez, and M.L. Aldana-Madrid, "Glyphosate herbicide: uses, toxicity and regulation." *Revista de Ciencias Biologicas y de La Salud*, vol. 13, no. 2, pp. 23–28, 2011.

[8] E. Gonzalez-Ortega, and M.H. Fuentes-Ponce, "Dynamics of glyphosate in soil and its effects on microbiota." *Revista internacional de contaminación Ambiental*, vol. 38, Article 54197. 2022

[9] F. Zirena-Vilca, W. Gosgot-Angeles, C.N. Campos-Quiroz, and W.A. Zamalloa-Cuba, "Glyphosate in water bodies: environmental problem." Revista de Investigaciones Altoandinas, vol. 20, no. 3, pp. 325–332, 2018.

[10] G. Viales-López, "Intoxicación por Paraquat." Medicina legal de Costa Rica, vol. 31, no. 2, pp. 1-7, 2014.

[11] L. Neumeister, and R. Isenring, Paraquat. riesgos inaceptables para la salud de los usuarios, 3ra ed, D. de Berna, Ed. PAN Asia y Pacífico (PANAP). Red de Acción en Plaguicidas UK (PAN UK), 2011.

[12] N. Thi-Hue, T.P.M. Nguyen, H. Nam, N. Hoang-Tung, "Paraquat in surface water of some streams in Mai Chau province, the northern Vietnam: concentrations, profiles, and human risk assessments." Journal of Chemistry, vol. 2018, Article 8521012, 2018

[13] A.M. Gagneten, "Efectos del herbicida Paraquat sobre el zooplancton." Iheringia Série Zoologia, vol. 92, no. 3, pp. 47–56, 2002.

[14] F.G. Oyarce, and J. Rodríguez, *Influencia en la contaminación por plaguicidas en la calidad de suelo de cultivo de arroz en el distrito de Cacatachi, Provincia de San Martín.* (Tesis Pregrado). Universidad César Vallejo, 2021.

[15] B. Castillo, J.O. Ruiz, M.A.L. Manrique, and C. Pozo, "Contaminación por plaguicidas agrícolas en los campos de cultivos en Cañete (Perú)." *Revista Espacios*, vol. 41, no. 10, 11, 2020.

[16] A. Albizzi, S. Diodato, and G. Gonzalez Garraza, "El uso de bioensayos crónicos en *Daphnia magna* para la evaluación ambiental de un arroyo urbano en Tierra del Fuego (Argentina)." *Ecología austral*, vol. 31, no. 2, pp. 277-288, 2021.

[17] J. Iannacone, L. Alvariño, and N. Mamani, "Estimación de la toxicidad combinada de mezclas de Furadán 4F ® y Monofos ® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)." *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, vol. 6, no. 1, pp. 23–29, 2011.

[18] E.A. Agudelo, L.F. Gaviria-Restrepo, L.F. Barrios-Ziolo, and S.A. Cardona-Gallo, "Techniques to determine toxicity in industrial wastewater contaminated with dyes and pigments." *Dyna*, vol. 85, no. 207, pp. 316–327, 2018.

[19] J. Iannacone, L. Alvariño, C. Paredes, and H. Ayala, "Acute and chronic toxicity of phenyl quinoline on water flea *Daphnia magna*." *The Biologist (Lima)*, vol. 10, no. 1, pp. 24–33, 2012.

[20] M. Sánchez, *Evaluación de la toxicidad y riesgo ambiental por dos contaminantes emergentes, diclofenaco e ibuprofeno, en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: Daphnia Magna (pulga de agua), Lemna gibba (lenteja de agua) y Paracheirodon Innesi* (pez tetra neón), para la estimación de estándares de calidad ambiental. (tesis pregrado), Universidad Científica del Sur, 2019.

[21] A.V. Caja-Molina, and J. Iannacone, "Evaluación del riesgo ambiental por petróleo crudo en las especies acuáticas *Lemna minor*, *Daphnia magna* y *Danio rerio*." *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol.45, no. 176, pp. 777-794, 2021.

[22] L. Mendoza-Gil, and J. Iannacone, "Ecotoxic assessment of soils contaminated with municipal waste from a dump in *Eisenia fetida*." *Ciencia del suelo*, vol. 39, no. 2, pp. 358-367, 2021.

[23] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), *Test guideline No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, 2012.

[24] L.B. Barrios-Ziolo, L.F. Gaviria Restrepo, E.A. Agudelo, and S.A. Cardona Gallo, "Estudio de la toxicidad asociada al vertimiento de aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos en el área metropolitana del Valle de Aburra." *Revista EIA*, vol. 13, pp. 61-74, 2016.

[25] C.N. Dellafredad-Tesén, J. Iannacone, "Efecto ecotoxicológico de la mezcla de Aroclor 1254 y Plomo en el bioindicador *Daphnia magna*." *Revista lasallista de investigacion*, vol. 18, no. 2, pp. 144-161, 2021.

[26] J.L. Alberdi, M.E. Sáenz, W.D. Di Mazio, M.C. Tortorelli, "Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 57, pp. 229–235, 1996.

[27] A.B. Della-Penna, *Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos*, [Tesis de maestría], Universidad de Buenos Aires, 2004.

[28] G. Domínguez-Cortinas, J. Mejía, G. Santos-Medrano, R. Rico-Martínez, "Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*." *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 90, pp. 377–384, 2007.

[29] L.F. Huaraca, S.A. Chamorro, V. Hernández, E. Bay-Schmith, and C.A. Villamar, "Comparative acute toxicity of glyphosate-based herbicide (GBH) to *Daphnia magna*, *Tisbe longicornis*, and *Emerita analoga*." *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 55, no. 7, pp. 646-654, 2020.

[30] L.F. Huaraca, (2017). *Evaluación ecotoxicologica de aguas contaminadas con glifosato a partir de los bioindicadores Daphnia magna y Artemia salina* [Tesis Pregrado], Escuela Politécnica Nacional, 2017.

[31] K. Gustinasari, L. Slugocki, R. Czerniawski, E.S. Pandebesie, and J. Hermana, "Acute toxicity and morphology alterations of glyphosate-based herbicides to *Daphnia magna* and *Cyclops vicinus*." *Toxicological Research*, vol. 37, pp. 197–207, 2020.

[32] M. Spósito, and J.C. Espínola-Moteldo, "*In vitro* assessment of toxic effects of a commercial formulation ammonium salt of glyphosate over five species representing different trophic levels and hábitats." *Innotec*, vol. 12, pp. 48-53, 2016.

[33] P.M. Demetrio, C. Bonetto, and A.E. Ronco, "The effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus)." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 93, pp. 268–273, 2014.

[34] M. Cuhra, T. Traavik, and T. Bøhn, "Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*." *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 2, pp. 251–262, 2013.

[35] J.A. Stiles, *Toxicity of Herbicide Mixtures: Atrazine and Roundup® Toxicity to Daphnia magna*, [Honors Thesis], Western Washington University, 2013.

[36] W.A. Ramsdorf, E.R. Bordin, R.C. Munhoz, P. Puncholobek, P., and A.M. Freitas, "Transgenerational effects of environmentally relevant concentrations of atrazine and glyphosate herbicides, isolated and in mixture, to freshwater microcrustacean *Daphnia magna*." *Research Square*, pp.1-22, 2021.

[37] P. Martin-Demetrio, *Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana*, (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de La Plata, 2012.

[38] M.C. Bustos, *Destino ambiental del glifosato en una zona arrocera del Tolima, Colombia* (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de Colombia, 2012.

[39]E. Moyano, *Estudio de los efectos del herbicida Triasulfurón sobre la estructura y composición de la microbiota edáfica en suelos enmendados con materia orgánica.* (Tesis Maestría), Salamanca, España: Universidad de Salamanca., 2015.
[40]A. Grandcoin, S. Piel, and E. Baurès, "Amino methyl phosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate." *Water Research*, vol. 117, pp. 187–197, 2017.
[41]M. Onwona-Kwakye, J.N. Hogarh, and P.J. Van den Brink, (2020). Environmental risk assessment of pesticides currently applied in Ghana. *Chemosphere*, vol. 254, Article 126845, 2020.
[42] D. Gil-Diaz, G. Navarrete, M.R. Castañeda, I. Galaviz, and C. Sosa, "Paraquat's herbicide acute toxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) and *Macrobrachium olfersii* (Palaemonidae)." *Acta biológica Colombiana*, vol. 6, pp. 178-185, 2022.
[43]A.M. Stuart, C.N. Merfield, F.G. Horgan, S. Willis, N. Watts, F. Ramírez-Muñoz, et al. "Agriculture without paraquat is feasible without loss of productivity. Lessons learned from phasing out a highly hazardous herbicide." *Research Square*, 2022.
[44]P.K. Wong, "Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Breb." *Chemosphere*, vol. 41, no. 1-2, pp. 177-182, 2000.
[45]M. Badii, R. Garza, V. Garza-Almanza, J. Landeros, "Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados." *CULCyT*, 2, 6, 2005.
[46]S.E. Reyes, and D.M. Cano, (2022). Effects of intensive agriculture and climate change on biodiversity. *Revista investigaciones Altoandinas*, vol. 24, pp. 53-64, 2022.