

Contaminación de las aguas con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia

Jaime Fernando González Mantilla
EDITOR



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
AQUÁTICA - GRUPO DE INVESTIGACIÓN
EN TOXICOLOGÍA ACUÁTICA Y AMBIENTAL

AQUÁTICA es el Grupo de Investigación en Toxicología Acuática y Ambiental de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. El grupo tiene por objetivos la investigación, el estudio y la divulgación de la problemática generada por la contaminación de las aguas y sus efectos sobre la población humana y las especies animales. En particular, las especies piscícolas ocupan un lugar especial en nuestros trabajos de investigación. Las temáticas de mayor interés para nuestro grupo incluyen la toxicología de plaguicidas, metales e hidrocarburos, así como los efectos sobre las especies animales por alteraciones en la físico-química del agua de ecosistemas y sistemas productivos. Nuestro grupo viene trabajando desde 1997, tiempo en el que ha publicado resultados en varias revistas científicas de circulación internacional y en libros como el que se presenta en esta oportunidad.



**Contaminación de las aguas
con glifosato y sus efectos tóxicos
en ictiofauna nativa de Colombia**

Jaime Fernando González Mantilla

EDITOR

**Contaminación de las aguas
con glifosato y sus efectos tóxicos
en ictiofauna nativa de Colombia**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

Bogotá, D. C., octubre de 2012

- © Universidad Nacional de Colombia
- © Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
AQUÁTICA: Grupo de Investigación en Toxicología Acuática y Ambiental
- © Jaime Fernando González Mantilla (ed.)

FOTOGRAFÍA PÁGINAS INTERIORES

Jaime Fernando González Mantilla

Primera edición, 2012

ISBN 978-958-761-280-6

EDICIÓN

Editorial Universidad Nacional de Colombia

direditorial@unal.edu.co

www.editorial.unal.edu.co

Bogotá, D. C., Colombia, 2012

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Impreso y hecho en Bogotá, D. C., Colombia

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Contaminación de las aguas con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia / ed. Jaime Fernando González Mantilla. – Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2012
74 p., il.

Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-280-6

Peces - Efectos de los plaguicidas – Colombia 2. Peces - Efectos de la contaminación del agua - Colombia 3. Contaminación por plaguicidas - Efectos fisiológicos 4. Glifosato - Efecto sobre los animales 5. Glifosato - Aspectos ambientales I. González Mantilla, Jaime Fernando, 1963-

CDD-21 639.969 / 2012

Lista de investigadores - coautores

Jaime Fernando González Mantilla
Médico Veterinario, M.Sc., Ph.D., Profesor Titular
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá

Diana Milena Ochoa Cardona
Médica Veterinaria, M.Sc.
Universidad Nacional de Colombia

Carlos Arley González Avella
Médico Veterinario
Universidad Nacional de Colombia

Dora Edith Figueredo Peralta
Médica Veterinaria
Universidad Nacional de Colombia

Carolina Montaña Marín
Zootecnista
Universidad Nacional de Colombia
Especialista en Sanidad Animal, UDCA

Cindy Olmos
Estudiante de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá

Carmen Helena Moreno Durán
Licenciada en Biología, M.Sc.
Profesora Licenciatura en Biología
Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Pilar Cristina Rojas Rodríguez
Licenciada en Biología
Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Alejandra Jiménez Rodríguez
Licenciada en Biología
Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Agradecimientos

AQUÁTICA expresa sus agradecimientos a todas las entidades y personas que facilitaron con su financiación, ayuda logística y buena voluntad la ejecución de todos los trabajos compilados en este volumen, a saber:

- IFS (*International Foundation for Science*), Proyectos A-3517/1 y A-3517/2.
- Vicerrectoría de Investigación y División de Investigación Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia (Programas de apoyo a grupos y semilleros de investigación).
- Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Programas Curriculares en Biología e Ingeniería y Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico.
- Profesor Miguel Ángel Landines, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo en la consecución de animales experimentales.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Prefacio | 15 |
| Antecedentes del uso de glifosato en Colombia, su posible impacto ambiental y efectos tóxicos | 17 |
| Glifosato en el mercado nacional y en la erradicación de cultivos ilícitos | 19 |
| Estudios de impacto ambiental y efectos sobre salud humana y animal en Colombia y zonas aledañas | 20 |
| Otros reportes sobre el efecto tóxico del glifosato | 21 |
| Referencias | 23 |
| Características generales y metodológicas de las investigaciones realizadas | 27 |
| Exposición controlada a glifosato en especies ícticas seleccionadas | 29 |
| Pruebas bioquímicas y otros análisis realizados en los bioensayos con las especies ícticas | 31 |
| Análisis físico-químico y presencia de glifosato en algunos cuerpos de agua de Cundinamarca y Boyacá | 31 |
| Referencias | 33 |
| Resultados | 35 |
| Bioensayos con las especies ícticas | 37 |
| Análisis físico-químico y de niveles de glifosato en aguas | 51 |
| Discusión y conclusiones | 53 |
| Investigaciones con especies piscícolas | 55 |
| Análisis de parámetros físico-químicos y de niveles de glifosato en los cuerpos de agua muestreados | 58 |
| Conclusiones | 61 |
| Referencias | 62 |
| Reflexiones finales sobre las investigaciones realizadas y la problemática del glifosato en Colombia | 65 |

Lista de figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Especies ícticas nativas que se trabajaron en el estudio | 30 |
| Figura 2. | Algunos de los cuerpos de agua analizados para presencia de glifosato | 32 |
| Figura 3. | A. Ejemplar de yamú mostrando dificultad respiratoria (“boqueo”) hacia la superficie del acuario tras la exposición a 30 ppm de Roundup®. B. Ejemplar de yamú expuesto a 30 ppm | 38 |
| Figura 4. | Reacción espectrofotométrica al mezclar glóbulos rojos de yamú con nitrito, Roundup® y controles | 39 |
| Figura 5. | Actividad colinesterasa plasmática (bocachico) y cerebral (yamú) en ejemplares de las dos especies expuestos a 0, 10 y 30 ppm de Roundup® | 40 |
| Figura 6. | Valores de actividad AST y FA plasmáticas en yamú y cachama blanca | 41 |
| Figura 7. | A. Diagrama esquematizado de la disposición de los equipos para registro de la onda eléctrica del pez fantasma. B. Fotografía de la disposición del sistema en el laboratorio | 46 |
| Figura 8. | A. Toma de sangre en ejemplar de <i>Apteronotus albifrons</i> haciendo una aproximación lateral a la vena caudal. B. Muestras de sangre en las que se observa la tonalidad oscura en los peces expuestos a 90 ppm de Roundup Activo® | 47 |
| Figura 9. | Resultados de la línea base de onda eléctrica y sus variaciones en las diferentes exposiciones al herbicida glifosato | 48 |
| Figura 10. | Cortes de cerebelo en peces control y en expuestos a Roundup Activo® | 49 |
| Figura 11. | Cortes histológicos de hígado en A. peces control, B. 10 ppm y C. 90 ppm Roundup Activo® | 50 |
| Figura 12. | Curva de calibración utilizada en el presente estudio para análisis de glifosato a través del método de microelisa en muestras de agua | 51 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 13. | Aspecto de la laguna de Fúquene en donde se aprecia el crecimiento progresivo de especies vegetales tipo algas como consecuencia del fenómeno de eutroficación | 59 |
| Figura 14. | Apariencia de aguas superficiales en el punto de muestreo en el municipio de Tenjo (Cundinamarca) a pesar de la prohibición sobre disposición de desechos y desperdicios en cuerpos de agua | 60 |
| Figura 15. | A. Cultivos de fresa en el sector de Chocontá (Cundinamarca) encontrados durante el muestreo hecho en el presente estudio. B. Recipiente de Roundup® eliminado directamente sobre el río Bogotá | 60 |

Lista de tablas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1. | Puntos de muestreo con coordenadas y fechas de muestreo para análisis de glifosato y de algunas características físico-químicas de las aguas | 33 |
| Tabla 2. | Indicadores de estrés oxidativo en peces expuestos (n=12 / tratamiento) en forma aguda al Roundup® (controles, 5 ppm y 15 ppm) | 43 |
| Tabla 3. | Cambios bioquímicos en juveniles de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) por exposición subcrónica a Roundup® | 44 |
| Tabla 4. | Valores físico-químicos de algunas variables en los 16 cuerpos de agua estudiados en el presente estudio | 52 |

Prefacio

Los plaguicidas representan uno de los mayores riesgos de contaminación para las aguas en Colombia. Históricamente, nuestro país ha utilizado una gran variedad de productos para controlar insectos, malezas y otras plagas que afectan a humanos, animales y vegetales. Por ello, Colombia es en Latinoamérica uno de los mayores consumidores de estos compuestos, y, en consecuencia, ocupa uno de los primeros lugares en ventas y comercialización de estos productos. Unido al uso masivo de plaguicidas, no existe una apropiada aplicación de medidas de protección al ambiente para evitar la contaminación de fuentes hídricas con plaguicidas y sus productos de desecho.

En los últimos años, uno de los compuestos que ha suscitado gran controversia con respecto a su uso indiscriminado es el glifosato. Se trata de un herbicida no selectivo que, además de ser usado en el control de cultivos ilícitos como coca y amapola, se utiliza para controlar malezas de cultivos de otras plantas comestibles.

La mayor inquietud en torno a esta problemática nació con la implementación del denominado Plan Colombia, un acuerdo político entre los Estados Unidos de América y Colombia que incrementó sustancialmente la aplicación aérea de este herbicida en zonas identificadas con cultivos ilícitos.

Las mayores preocupaciones radican en el impacto potencial sobre los ecosistemas que reciben la aspersión del producto, los asentamientos humanos que allí habitan y las poblaciones de animales domésticos y silvestres susceptibles a la acción del plaguicida. El problema ha trascendido las fronteras nacionales, al punto de que el país fue demandado por Ecuador ante la Corte Internacional de Justicia en La Haya, por los efectos que se produjeron en zonas del vecino país. Se trataba, en particular, de la frontera norte ecuatoriana, que limita con áreas extensas del departamento del Putumayo en Colombia, zonas cultivadas con coca y que recibieron las aspersiones del herbicida.

AQUÁTICA, nuestro grupo de investigación, tiene como misión estudiar, investigar y divulgar la problemática ligada a la contaminación del agua y sus efectos sobre la población humana y los animales, en particular sobre las poblaciones ícticas. Estas últimas son especies bioindicadoras del estado de contaminación de los cuerpos de agua, dada su facilidad de estudio y la posibilidad frecuente de extrapolar los efectos vistos en estas a otros animales y a humanos. El tema del impacto potencial del glifosato como contaminante de las aguas llamó poderosamente nuestra atención como grupo de investiga-

ción años atrás, especialmente al notar con preocupación que su uso masivo se definió sin tener un sustento científico y ambiental que respaldara la “inocuidad” de su aplicación. Por ello, planteamos varias propuestas de investigación para generar conocimiento sobre los efectos del herbicida en especies representativas de la valiosa y biodiversa ictiofauna nacional. Los resultados de estas investigaciones son presentados en este documento con el deseo de contribuir en el área de educación ambiental en el país, y de ofrecer a las entidades reguladoras mayores elementos de juicio en la aplicación sensible y responsable de decisiones.

**Antecedentes del uso
de glifosato en Colombia,
su posible impacto ambiental
y efectos tóxicos**



Glifosato en el mercado nacional y en la erradicación de cultivos ilícitos

El glifosato es un herbicida de amplio uso en Colombia desde hace varios años. Se lo describe como un herbicida post-emergente y no selectivo, de acción sistémica sobre malezas anuales y perennes. Su uso no solamente se ha dado en la erradicación de cultivos ilícitos, sino también para control de malezas que afectan los cultivos de café, palma de aceite, arroz, fresa y varios pastos. [1] En Colombia, el glifosato es el herbicida de mayor venta y mayor número de nombres comerciales disponibles en el mercado. El ICA reporta que para el año 2007 se vendieron 10 438 917 litros, lo cual representa el 47 % de los 22 179 437 litros del conjunto total de herbicidas comercializados en el país. [2]

El glifosato usado en la erradicación de cultivos ilícitos ha tenido variaciones en su composición química, particularmente en lo que tiene que ver con los adyuvantes de la mezcla. En la versión más reciente del producto aplicado para la erradicación de los cultivos ilícitos, el principio activo (N- fosfonometilglicina) fue combinado con un adyuvante conocido como Cosmoflux 411F. Este último fue recomendado luego de los estudios de Collins y Helling, [3] quienes argumentaron un incremento en la actividad herbicida de hasta cuatro veces por esta inclusión, en comparación con la obtenida cuando otros adyuvantes fueron utilizados. [4] Según información reportada por la policía antinarcóticos de Colombia, la aplicación del herbicida sobre las zonas identificadas con cultivos ilícitos alcanza una cantidad de 3,69 kg del producto por hectárea. La inclusión del Cosmoflux 411F se hizo teniendo en cuenta que sus componentes tipo polietoxilato y aceites base como las isoparafinas favorecían la superficie de contacto y la penetración del producto en la planta que se deseaba eliminar, además de incrementar la disrupción de la cutícula protectora de la superficie foliar. [4] Estos cambios en los adyuvantes o vehículos utilizados para la fórmula destinada a la erradicación de cultivos ilícitos se dieron al parecer ante la evidencia del bajo poder herbicida que tenía el producto con las fórmulas anteriores al uso del Cosmoflux. Este cambio también determinó la reclasificación de estos preparados comerciales, pasando de la categoría IV (ligeramente tóxico) a la categoría III (medianamente tóxico). [10]

Estudios de impacto ambiental y efectos sobre salud humana y animal en Colombia y zonas aledañas

Los expertos contratados por el gobierno colombiano para evaluar el efecto ambiental del glifosato usado en erradicación de cultivos ilícitos han indicado, a través de sus estudios de valoración de riesgo, que el impacto relativo del glifosato en el ambiente es menor que el causado por la misma actividad de los cultivos ilícitos. [5] Solo se ha reportado por parte de este grupo algunos efectos sobre especies anfibias que habitan cuerpos de agua con una profundidad inferior a los 30 cm y sobre las cuales haya aspersión directa. Estos autores han atribuido estos efectos a los adyuvantes presentes en la mezcla, pero no al principio activo, N-fosfonometilglicina. [6, 7]

Contrario a los reportes del grupo contratado por el gobierno nacional para la evaluación del impacto ambiental del glifosato en el país, otros estudios indican que el glifosato ha causado efectos tóxicos en humanos y animales en el país y en Ecuador. El gobierno ecuatoriano decidió demandar ante la Corte Internacional de La Haya a su contraparte colombiana, acusándola de que, por la denominada “deriva” en las aspersiones sobre los cultivos del departamento del Putumayo, se daba exposición al herbicida y efectos tóxicos subsecuentes en poblaciones humanas y animales de la frontera. [8, 9] Parte de los argumentos presentados por el gobierno ecuatoriano se basaron en estudios de genotoxicidad en donde se encontró un incremento significativo de células de sangre periférica con daño en su núcleo, en personas que estuvieron expuestas a las aspersiones del herbicida.

Para esta evaluación se utilizó el ensayo del cometa, prueba frecuentemente usada y basada en la disrupción del material nuclear de la célula por efecto del agente genotóxico. [9, 21] En particular, para este estudio se encontró que el daño causado al núcleo de las células de las personas expuestas a las aspersiones (n=24) determinó una longitud promedio de la “cola” del cometa de 35,5 μm , mientras que en la población control (n=21), habitantes de una región ubicada a 80 km de las zonas de aspersión, el promedio de la cola del cometa fue de 25,9 μm . Esta variación en la longitud de las “colas” de los cometas de la población control y la expuesta al glifosato representó una diferencia estadísticamente significativa al aplicar las pruebas respectivas.

En Colombia también se han presentado denuncias por parte de organizaciones –como coaliciones indígenas– en las cuales se reportan casos de enfermedades oculares, dérmicas, respiratorias y digestivas en personas que han recibido directamente las aspersiones del producto aplicado inicialmente a los cultivos ilícitos. [15]

En lo relacionado con los estudios hechos en animales, nuestro grupo ha trabajado el efecto tóxico del glifosato sobre peces de importancia en el país. Un compendio de los resultados presentados en este texto mostrará cómo diferentes especies nativas (ej. yamú, *Brycon amazonicus*; bocachico del

Magdalena, *Prochilodus magdalenae*; pez fantasma, *Apteronotus albifrons*, y cachama blanca, *Piaractus brachypomus*), han presentado diferentes tipos de efectos por las exposiciones agudas y subcrónicas al herbicida. Los efectos tóxicos generales por exposiciones agudas y los cambios en respuesta de tipo estrés oxidativo en branquias e hígado han sido los principales hallazgos de estos estudios. [11, 12, 13] Detalles de estos y otros tipos de efectos en estas especies de la ictiofauna nacional se encontrarán en el presente texto. En los peces, los efectos de tipo estrés oxidativo causados por contaminantes ambientales –dentro de estos, el glifosato– han sido revisados y reportados en la literatura. [24] Otros estudios hechos en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) han mostrado los daños de tipo histológico en tejido branquial y sistema nervioso central, fundamentalmente, tras exposiciones agudas a glifosato, su mezcla comercial y el surfactante Cosmoflux. [14]

Otros reportes sobre el efecto tóxico del glifosato

Estudios varios sobre los efectos tóxicos del glifosato en humanos y animales se encuentran reportados en la literatura científica de circulación internacional.

Un reporte sobre los efectos de varios productos a base de glifosato en la regulación del ciclo celular fue hecho por Marc et ál. en 2004 [16]. En este estudio, todos los productos a base de glifosato que se analizaron llevaron a alteración del ciclo celular cuando se usaron concentraciones del herbicida entre 1 y 10 milimolar (mM). La disfunción consistió en la demora en el desarrollo de embriones que tenían glifosato en su ambiente, en comparación con los controles (libres de glifosato). El sector molecular específicamente afectado fue en el complejo CDK1/ciclina B, regulador universal de la transición G₂/M del ciclo. Aunque no hubo efectos como aberraciones cromosómicas u otros daños genotóxicos, los autores recuerdan en este reporte que ha habido una correlación epidemiológica entre la exposición a glifosato en humanos y el desarrollo de linfomas tipo no-Hodgkin en granjeros que lo utilizan rutinariamente. [17]

También se han evaluado los efectos tóxicos del glifosato en la gestación de animales de laboratorio (ratas). En un estudio utilizando marcadores bioquímicos, Daruich et ál. (2001), [18] encontraron que hubo variaciones en actividades enzimáticas de cerebro, hígado y corazón, tanto en las hembras gestantes como en sus fetos. En particular, las enzimas isocitrato-deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y malato deshidrogenasa se vieron afectadas en los animales que recibieron glifosato en su agua de consumo por 21 días. Los autores destacan que las enzimas afectadas catalizan la producción de NADPH, lo cual podría asociarse con parte de los mecanismos tóxicos ejercidos por el herbicida. Además de los efectos bioquímicos, los animales expuestos al herbicida tuvieron una considerable disminución en

consumo de agua y alimento, llevándolos a una pérdida importante de peso corporal como efecto adicional.

En el cono sur de América, la utilización de glifosato en labores agrícolas es significativa. Particularmente, en países como Argentina y Uruguay se ha presentado un uso progresivamente alto de este producto, especialmente por el desarrollo de la soya genéticamente modificada para hacerse resistente al efecto del glifosato. Así, los trabajadores expuestos al producto están en mayor riesgo de intoxicación. En el estudio de Burger y Fernández (2004), [19] que tomó el período de 1997 a 2002, se reunieron 107 casos clínicos en humanos ingresados a hospitales de Uruguay por exposición a glifosato. En la mayoría de los casos la exposición fue involuntaria (accidental o por razones de trabajo), y, en consecuencia, se hizo evidente la absorción cutáneo-mucosa y los síntomas de tipo neuromuscular en la población afectada (mialgias y calambres musculares).

En el ámbito de los animales domésticos, un estudio retrospectivo hecho por investigadores del Centro Nacional de Información Toxicológica Veterinaria (CNITV), en Francia, demostró que de 482 llamadas registradas a este centro en un período de cuatro años y con sospecha de exposición al glifosato en animales domésticos solo 31 fueron catalogadas como de alta probabilidad de asociación al efecto del herbicida. La especie involucrada en 25 casos fue la canina, ya fuera por ingestión de productos o por exposición vía aerosol. Los síntomas más frecuentes reportados en estos pacientes fueron vómito, hipersalivación y diarrea. Los tratamientos de apoyo sintomático a estos pacientes permitieron su recuperación rápida sin secuelas. [20]

En los últimos años se ha dado especial énfasis a posibles efectos de tipo reproductivo en humanos y animales por causa de la exposición al glifosato. Uno de los estudios más relevantes en este sentido ha sido el reportado por Richard et ál. (2005) al evaluar las acciones del glifosato sobre células de placenta humana y, concretamente, en la actividad de la enzima aromatasas. Esta enzima es la responsable de la conversión irreversible de andrógenos a estrógenos.

El estudio demostró que la mezcla comercial de glifosato con sus adyuvantes disminuyó la actividad de la enzima y los niveles de ARNm, interactuando con los sitios activos de la misma. Esto fue comprobado no solo con las células humanas sino también con células placentarias de equino. Los adyuvantes del producto comercial no solo facilitaron la penetración del producto por daño a las membranas celulares, sino que además afectaron el ciclo celular, como fue previamente señalado en esta revisión. Este estudio permitió afirmar que el glifosato también puede ser catalogado como un disruptor endocrino. [22]

El efecto sobre aspectos reproductivos en peces por acción del glifosato también ha empezado a ser evaluado en estudios recientes. En el caso del

pez *Rhamdia quelen*, investigadores brasileños encontraron que en exposición crónica subletal al herbicida (3,6 mg/l), el 17 β -estradiol disminuyó en hembras expuestas durante 40 días. Además, el herbicida causó una menor viabilidad en el número de larvas nacidas de estas hembras expuestas al producto. [23] Esta alteración sobre hormonas de tipo estrogénico podría estar asociado a la acción previamente descrita del efecto bloqueador sobre la aromatasa. [22]

Como puede verse, los reportes sobre efectos tóxicos del glifosato en humanos y animales son variados. En algunos estudios se habla de un efecto menor y prácticamente inocuo, mientras en otros se ha llegado a asociar inclusive con presentación de algunos tipos de cáncer. El propósito del estudio, que el lector encontrará en el presente volumen, fue determinar los diferentes efectos tóxicos en diferentes especies representativas de la ictiofauna nativa colombiana, por exposiciones controladas bajo condiciones de laboratorio y usando formulaciones comerciales de glifosato.

Referencias

- [1] Diccionario de Especialidades Agroquímicas. 17.^a ed. Bogotá: Thomson-PLM. 2007. p. 816.
- [2] Instituto Colombiano Agropecuario. Comercialización de plaguicidas 2007: producción, ventas, importación y exportación. Boletín Técnico, Código 00.02.52.08. 2008. Bogotá.
- [3] Collins RT, Helling CS. Surfactant-enhanced control of two *Erythroxylum* species by glyphosate. *Weed Technology*. 2002; 16:851-859.
- [4] Marshall EJP, Solomon KR, Carrasquilla G. Coca (*Erythroxylum coca*) control is affected by glyphosate formulations and adjuvants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2009; 72:930-936.
- [5] Solomon KR, Anadon A, Carrasquilla G, Cerdeira A, Marshall EJP, Sanin LH. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*. 2007; 190:43-125.
- [6] Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. Toxicity of glyphosate and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs. Laboratory acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2009; 72:961-965.
- [7] Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. Toxicity of glyphosate and Cosmo-Flux to larval and juvenile Colombian frogs. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2009; 72:966-973.
- [8] Ávila R, Bravo E, Breith J, Campaña A, Paz-y-Miño C, Peñaherrera L, Valencia J. El sistema de aspersiones aéreas del Plan Colombia y sus

- impactos sobre el ecosistema y la salud en la frontera ecuatoriana. Comisión Científica Ecuatoriana. Quito, Ecuador. 2007; p. 150.
- [9] Paz-y-Miño C, Sánchez ME, Arévalo M, Muñoz MJ, Witte T, Oleas de-la-Carrera G, Leone PE. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics Molecular Biology*. 2007; 30:456-460.
- [10] Cox C. Glyphosate, Part 2: human exposure and ecological effects. *Journal of Pesticide Reform* 1995; 15:14-20.
- [11] González JF, Ochoa DM, Figueredo D, González CA. Efectos tóxicos del Roundup® (glifosato) en tilapia roja (*Oreochromis sp.*), yamú (*Brycon amazonicus*) y bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia* 2007; 54:113-119.
- [12] Ochoa DM. Respuestas de estrés oxidativo y cambios en transaminasas plasmáticas por exposición a glifosato (Roundup®) en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y yamú (*Brycon amazonicus*). Tesis de Maestría. Programa de Maestría en Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; 2009.
- [13] Montaña C. Exposición subcrónica a glifosato (Roundup®) en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Bogotá: Trabajo de Investigación, Especialización en Sanidad Animal, UDCA; 2008.
- [14] Eslava P, Ramírez W, Rondón I. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Universidad de los Llanos, Villavicencio; 2007, p. 150.
- [15] Morris K. "Plan Colombia" – parallels drawn with Vietnam war. *The Lancet*. 2007; 357:52.
- [16] Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*. 2004; 96:245-249.
- [17] de Roos AJ, Zahm SH, Cantor KP, Weisenburger DD, Holmes F, Burmeister LF, Blair A. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*. 2003; 60:e11.
- [18] Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environmental Research A*. 2001; 85:226-231.
- [19] Burger M, Fernández S. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica del Uruguay*. 2004; 20:202-207.
- [20] Burgat V, Keck G, Guerre P, Pineau X. Glyphosate toxicosis in domestic animals: a survey from the data of the Centre National

- d'informations Toxicologiques Veterinaires (CNITV). Veterinary and Human Toxicology. 1998; 40:363-367.
- [21] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. Molecular Biotechnology. 2004; 26:249-261.
- [22] Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini G-E. Differential effects of glyphosate and Roundup® on human placental cells and aromatase. Environmental Health Perspectives. 2005; 113:716-720.
- [23] Soso AB, Gil LJ, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo R, Anziliero D, Lima M, Bolognesi da Silva L, Ritter F, Calliari A, Finco JA. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). Environmental Toxicology Pharmacology. 2007; 23:308-313.
- [24] Ochoa DM, González JF. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Revista de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. 2008; 55:115-126.

**Características generales
y metodológicas
de las investigaciones
realizadas**



El trabajo que se presenta se realizó en dos fases: 1) investigación con especies piscícolas nativas seleccionadas, y 2) análisis de la presencia de glifosato en algunos cuerpos de agua de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. En este último también se midieron algunas características físico-químicas de las aguas para complementar el análisis del glifosato en las mismas.

Exposición controlada a glifosato en especies ícticas seleccionadas

Las cuatro especies de peces que se utilizaron como biomodelos en el presente trabajo se aprecian en la figura 1. Se incluyeron especies nativas importantes, por ser representativas de la ictiofauna nacional, y además por sus beneficios nutricionales para la población colombiana o por su carácter ornamental. Las especies que se trabajaron fueron: cachama blanca (*Piaractus brachipomus*), yamú (*Brycon amazonicus*), bocachico del Magdalena (*Prochilodus magdalenae*) y pez fantasma o cuchillo (*Apteronotus albifrons*).

La cachama blanca y el yamú son especies nativas de interés por su utilización como parte de la dieta de los colombianos. La primera ocupa el segundo lugar en cuanto a las especies producidas en sistemas acuícolas en el país. La segunda tiene un mercado más local en la región de los Llanos Orientales de Colombia, pero los estudios iniciales sugieren beneficios nutricionales para la población humana, en particular por sus perfiles de ácidos grasos. [1]

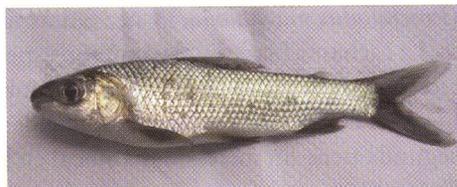
El bocachico del Magdalena está clasificado como especie amenazada (peligro crítico) en el *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia*. [2] Varias razones de índole ambiental y antrópico han llevado a que sea catalogada como una de las especies de mayor vulnerabilidad del país, por efecto de la pesca indiscriminada, la contaminación y la desecación de ciénagas, entre otros perjuicios. Aunque se dan algunos pequeños esfuerzos para producir y cultivar la especie en cautiverio, la gran fuente de esa especie para consumo es la captura en los ríos, diezmada en los últimos tiempos por las razones antes mencionadas.

Por su parte, el pez fantasma o cuchillo es un pez de gran aceptación como ornamental. Tiene la particularidad de emitir ondas eléctricas, lo cual lo hace muy atractivo desde varios puntos de vista. Esta especie tiene una gran presión de captura, y además alto riesgo de recibir contaminantes tipo plaguicida en las cuencas hidrográficas donde habita. Como representante del orden de los Gymnotiformes, su capacidad para emitir una onda eléctrica se constituye en un aspecto de interés científico, con aplicaciones como biomodelo de investigación. [3]

Los bioensayos que se presentan en este trabajo consistieron en exposiciones controladas a una presentación comercial del herbicida glifosato bajo condiciones de laboratorio (Laboratorio de Toxicología Acuática, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá). Los objetivos de estos experimentos fueron investigar los grados de susceptibilidad de las especies a este herbicida, para evaluar sus respuestas (síntomas, cambios en variables bioquímicas y otros hallazgos), con el propósito de generar conocimiento y aplicarlo, dado el incipiente desarrollo que aún tiene esta área de investigación en el país. Los ejemplares fueron expuestos en forma aguda o subcrónica al glifosato (Roundup® y Roundup Activo®) disponible comercialmente. Los animales fueron monitoreados por el tiempo estipulado en el diseño experimental y luego muestreados para los análisis correspondientes. Los ejemplares de cada especie fueron climatiza-



A.



B.



C.



D.

Figura 1. Especies ícticas nativas que se trabajaron en el estudio: A. cachama blanca, B. bocachico del Magdalena, C. yamú, D. pez fantasma o cuchillo.

dos a las condiciones del laboratorio por un período no inferior a las tres semanas antes de llevar a cabo los experimentos. Todos los ejemplares fueron tratados según los protocolos y regulaciones de manejo ético de animales en experimentación toxicológica fijados por la Sociedad Mundial de Toxicología (www.toxicology.org). [4]

Pruebas bioquímicas y otros análisis realizados en los bioensayos con las especies ícticas

En los diferentes bioensayos realizados, los ejemplares fueron muestreados para diferentes pruebas de tipo bioquímico, fijación de tejidos y posterior tinción con hematoxilina-eosina, además del análisis de la onda eléctrica emitida por el pez fantasma, utilizando el equipo PowerLab®.

Para la prueba de colinesterasas plasmática y cerebral se utilizó la técnica espectrofotométrica de Ellman et ál. [5] Para los ensayos de estrés oxidativo se utilizó la fracción S-9 de tejido hepático y branquial, y se hicieron según las técnicas reportadas para glutatión transferasa y glutatión peroxidasa, [6, 7] catalasa, [7] niveles de glutatión reducido [7] y superóxido dismutasa. [8, 9] Las pruebas de peroxidación lipídica se hicieron a través de la detección de niveles de malondialdehído. [9, 10]

Análisis físico-químico y presencia de glifosato en algunos cuerpos de agua de Cundinamarca y Boyacá

En la segunda parte de este trabajo, se utilizó la técnica de microelisa para medir niveles de glifosato en aguas, tomando como puntos de muestreo algunos cuerpos de agua de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. [11] El análisis químico del glifosato en aguas ha sido un gran inconveniente en el país, ya que ninguna de las entidades estatales involucradas en el control ambiental y la vigilancia de la aplicación del herbicida ha implementado alguna técnica que permita hacer un monitoreo de cuerpos de agua del país. Algunos de los sitios de muestreo se aprecian en la figura 2. Las coordenadas y fechas de muestreo para todos los sitios se ven en la tabla 1. Adicionalmente, a las muestras de agua se les practicó un análisis físico-químico que incluyó la medición de pH, dureza, alcalinidad, cloruro y nitrito. [12] Estos muestreos se llevaron a cabo entre los meses de diciembre de 2010 y enero de 2011. Los análisis de glifosato en aguas se hicieron por duplicado o triplicado para cada uno de los puntos de muestreo.

Contaminación de las aguas con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia



A.



B.



C.



D.



E.



F.

Figura 2. Algunos de los cuerpos de agua analizados para presencia de glifosato. **A.** Desagüe de represa de Tominé, **B.** Río Bogotá (Chocontá), **C.** Laguna de Fúquene (Ubaté), **D.** Río Magdalena (Girardot), **E.** Represa del Sisga, **F.** Río Teatinos (Puente de Boyacá).

Tabla 1. Puntos de muestreo con coordenadas y fechas de muestreo para análisis de glifosato y de algunas características físico-químicas de las aguas

| Punto de muestreo | Coordenadas | Fecha de muestreo |
|--|----------------------|-------------------|
| Desagüe de Embalse de Tominé (Cundinamarca) | N 5° 3,3 W 73° 48,1 | 27/12/2010 |
| Represa del Sigra (Cundinamarca) | N 5° 5,3 W 73° 43,2 | 27/12/2010 |
| Quebrada El Tejar (Chocontá, Cundinamarca) | N 5° 9,1 W 73° 40,1 | 27/12/2010 |
| Río Bogotá (Chocontá-Villapinzón, Cundinamarca) | N 5° 11,5 W 73° 36,9 | 27/12/2010 |
| Riachuelo Iridachín (Ventaquemada, Boyacá) | N 5° 21,9 W 73° 31,2 | 27/12/2010 |
| Río Teatinos (Puente de Boyacá, Boyacá) | N 5° 27,3 W 73° 25,8 | 27/12/2010 |
| Agua superficial trayecto Tenjo-Tabio (Cundinamarca) | N 4° 53,8 W 74° 6,7 | 28/12/2010 |
| Río Chicú (Tabio, Cundinamarca) | N 4° 54,6 W 74° 6,0 | 28/12/2010 |
| Río Frío (Tabio-Cajicá, Cundinamarca) | N 4° 55,6 W 74° 4,1 | 28/12/2010 |
| Laguna de Fúquene (Ubaté, Cundinamarca) | N 5° 27,7 W 73° 46,2 | 28/12/2010 |
| Represa de La Copa (Boyacá) | d. n. d. | 12/12/2010 |
| Agua Acueducto de Bogotá D.C. | N 4° 11,0 W 74° 28,9 | 29/12/2010 |
| Quebrada Tena (vía La Mesa, Cundinamarca) | N 4° 40,8 W 74° 21,6 | 05/01/2011 |
| Río Apulo (Apulo, Cundinamarca) | N 4° 31,3 W 74° 35,5 | 05/01/2011 |
| Río Magdalena (Girardot, Cundinamarca) | N 4° 17,6 W 74° 48,5 | 05/01/2011 |
| Quebrada Grande (Pandi, Cundinamarca) | N 4° 11,0 W 74° 28,9 | 06/01/2011 |

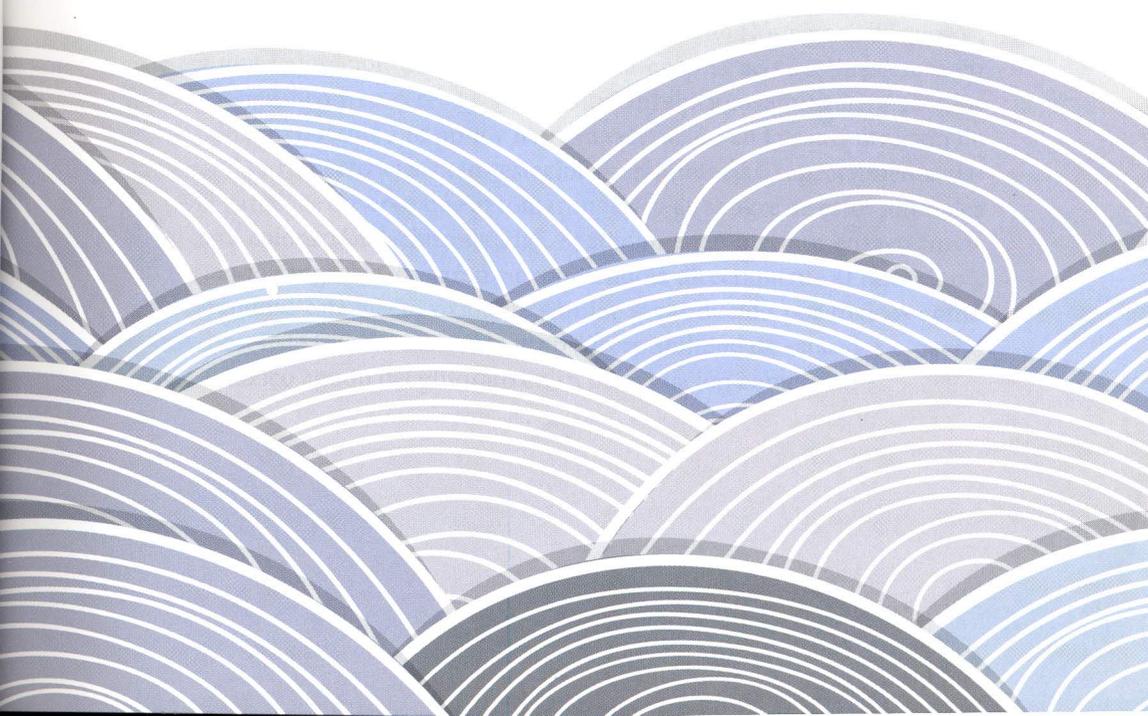
d. n. d.: dato no disponible.

Referencias

- [1] Betancourt L, Cuervo L, Díaz GJ. Perfil de ácidos grasos de diferentes especies piscícolas. Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura. Villavicencio, octubre 27-29. 2004; 71-72.
- [2] Mojica JI, Castellanos C, Usma JS, Álvarez R. (eds). Libro Rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; 2002.
- [3] Jiménez A, Rojas PC. Determinación de los efectos tóxicos del glifosato en el sistema nervioso de *Apteronotus albifrons*. Tesis

- de Grado. Proyecto Curricular Licenciatura en Biología. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2010.
- [4] [http:// www.toxicology.org](http://www.toxicology.org) (consultada 06-16-2011).
- [5] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95.
- [6] Habig WH, Pabst MJ, Jackoby WB. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry.* 1974; 249:7130-7139.
- [7] Dorval J, Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2003; 192:191-200.
- [8] Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica Biophysica Acta;* 2000; 1523:37-48.
- [9] Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez, Haque R, Raisuddin S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003; 56:295-301.
- [10] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolic and Cardiovascular Diseases.* 2005; 15:316-328.
- [11] Byer JD, Struger J, Klawunn P, Todd A, Sverko E. Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: an evaluation. *Environmental Science and Technology.* 2008; 42:6052-6057.
- [12] Colt JE, Tomasso JR. Hatchery water supply and treatment. En: *Fish Hatchery Management*, G. Wedemeyer (ed). 2.^a ed. Bethesda (MD): American Fisheries Society; 2001. p. 91-187.

Resultados



Bioensayos con las especies ícticas

A continuación se presentan los resultados y hallazgos más significativos de los cuatro experimentos que fueron realizados con las especies de peces seleccionadas por nuestro grupo de investigación y en colaboración, en algunos casos, con otras entidades. La discusión general de los hallazgos de todos los experimentos se presenta en el capítulo 4.

Efecto tóxico agudo de la exposición a glifosato (Roundup®) en juveniles de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) y yamú (*Brycon amazonicus*)

Jaime Fernando González M., Diana M. Ochoa, Dora E. Figueredo y Carlos A. González.

Resumen

En este trabajo, juveniles de bocachico (n=12) y yamú (n=18) fueron expuestos a concentraciones de 10 y 30 partes por millón (ppm, vol/vol) de Roundup® (glifosato 48 %, C.E.), usando acuarios de 10 galones y con previa aclimatación de los ejemplares experimentales. Los efectos tóxicos en las dos especies se manifestaron en forma rápida, siendo necesario suspender el experimento hacia las tres horas y media de exposición. Los ejemplares de las dos especies mostraron signos nerviosos como hiperexcitabilidad (10 ppm) y dificultad respiratoria (30 ppm) antes de morir. Dados los signos nerviosos, se hizo una valoración de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en plasma sanguíneo y en cerebro; se encontró inhibición significativa para las dos especies expuestas a 10 ppm y marcada elevación en la concentración de 30 ppm. Con respecto a las manifestaciones respiratorias, especialmente vistas en el yamú, se observó que al tomar muestra de sangre de estos animales había una coloración “achocolatada”. Seguidamente, hizo un ensayo in vitro tomando sangre de los yamú y exponiéndola directamente al Roundup®, confirmándose este efecto oxidante similar al producido por tóxicos como los nitritos. Este trabajo mostró la gran susceptibilidad de estas dos especies al efecto tóxico agudo del glifosato en su presentación comercial.

Resultados

Lo más significativo de la exposición al herbicida en este experimento fue el rápido efecto tóxico que presentaron los ejemplares, ya que ellos manifestaron la sintomatología a los pocos minutos de iniciada la exposición. Dependiendo de la concentración utilizada del herbicida, se observaron signos nerviosos (10 ppm) o de tipo respiratorio (30 ppm). Los signos nerviosos se manifestaron como cambios en el patrón de nado de los ejemplares (nado frenético y sin un rumbo definido) hasta cuando fue suspendida la exposición al tóxico. Contrario a la concentración de 10 ppm, en 30 ppm los peces se mostraron más pasivos en sus movimientos al inicio, pero conforme transcurrieron las primeras tres horas de exposición, se ubicaron hacia la superficie de los acuarios y mostraron movimientos bucales continuos (“boqueo”), compatibles con lo que manifiestan los peces que tienen dificultad en la captura de oxígeno (figura 3A).

Estos animales, al ser evaluados en las necropsias, mostraron un color más oscuro de branquias y de sangre (figura 3B). Dado que este último hallazgo se presenta cuando los peces están expuestos a tóxicos de tipo oxidante (ej. nitritos), se hizo una prueba adicional en la cual al mezclar sangre con fracciones muy pequeñas del herbicida se reprodujo este efecto. En esta última se utilizó nitrito como control positivo y sangre de ejemplares control para hacer la comparación respectiva. Esta prueba mostró que el Roundup® causó un efecto oxidante sobre los glóbulos rojos, aunque en menor cuantía que en el caso del nitrito (figura 4).

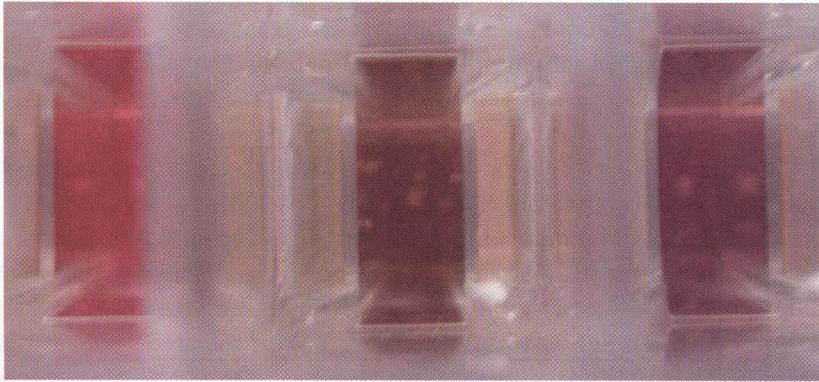


A.



B.

Figura 3. A. Ejemplar de yamú mostrando dificultad respiratoria (“boqueo”) hacia la superficie del acuario tras la exposición a 30 ppm de Roundup®. B. Ejemplar de yamú expuesto a 30 ppm. En la necropsia refleja el color oscuro de sus branquias (el opérculo ha sido cortado para mostrar la apariencia del tejido branquial).



Control

Nitrito

Roundup®

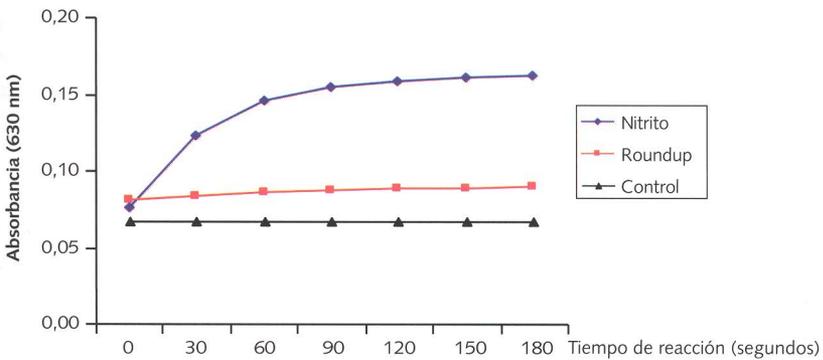


Figura 4. Reacción espectrofotométrica al mezclar glóbulos rojos de yamú con nitrito, Roundup® y controles. Se observa incremento en absorbancia con nitrito y glifosato en comparación a los controles. Fotografía: el color de la muestra mezclada con Roundup® no es tan oscuro como la nitrito, pero más que en control.

Con respecto a los signos nerviosos de nado frenético e hiperexcitabilidad, la prueba de actividad colinesterasa, tanto en plasma (bocachico) como en cerebro (yamú), reveló que la concentración baja del herbicida (10 ppm) causó una inhibición enzimática significativa, mientras que la concentración alta (30 ppm) provocó una elevación significativa en el bocachico, sin cambios en el yamú (figura 5).

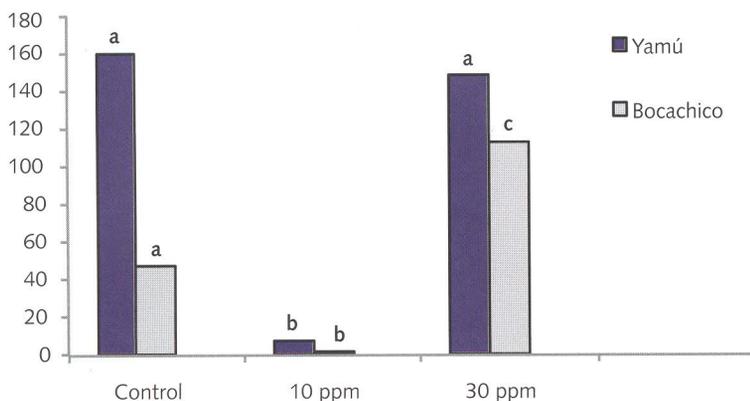


Figura 5. Actividad colinesterasa plasmática (bocachico) y cerebral (yamú) en ejemplares de las dos especies expuestas a 0, 10 y 30 ppm de Roundup®. Se observó una inhibición significativa en la actividad de la enzima en las dos especies expuestas a 10 ppm del herbicida. Para el caso de 30 ppm, se dio una elevación significativa con respecto al control y a 10 ppm en bocachico, mas no en yamú (letras diferentes en las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos, dentro de la misma especie).

Respuestas de estrés oxidativo y cambios en transaminasas plasmáticas en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y yamú (*Brycon amazonicus*) expuestos en forma aguda a glifosato (Roundup®)

Diana M. Ochoa y Jaime Fernando González M.

Resumen

Juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) ($n=36$, $22,7 \pm 2,9$ g) y yamú (*Brycon amazonicus*) ($n=36$, $11,7 \pm 1,1$ g) fueron expuestos a 3 concentraciones de Roundup® (0, 5 y 15 ppm) por un período de 96 horas. Se evaluaron las respuestas enzimáticas de tipo estrés oxidativo en branquias e hígado, así como la actividad plasmática de las transaminasas aspartato amino-transferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA). Ninguno de los ejemplares de las dos especies mostró síntomas de intoxicación. Tampoco se presentó mortalidad durante la fase experimental. Sin embargo, la disminución de actividades enzimáticas, como glutatión transferasa (GST), niveles de glutatión reducido (GSH) y catalasa (CAT), junto con elevación de los niveles de peroxidación lipídica (niveles de malondialdehído, MDA), indican que el herbicida causó daños en membranas celulares de los dos órganos a través del mecanismo de oxidación de macromoléculas (lípidos). Este efecto se correlacionó con la elevación de AST, lo cual fue indicador del daño tisular ocasionado por la oxidación de los lípidos de membrana. Este experimento demostró que, si bien no hubo efecto letal en ninguna de las especies, las

concentraciones utilizadas del herbicida y el tiempo de exposición al mismo indujeron el inicio del daño tisular en branquias e hígado como órganos blanco del efecto tóxico.

Resultados

Los resultados encontrados en este trabajo indicaron que el glifosato en su presentación comercial Roundup® desencadenó una respuesta de tipo estrés oxidativo tanto en hígado como en branquias de los peces en las dos especies. Aunque no se presentó sintomatología de intoxicación aguda ni mortalidad en ninguna de las dos concentraciones usadas, los valores de la mayoría de enzimas e indicadores de estrés oxidativo se alteraron al final de las 96 horas de exposición al herbicida. La tabla 2 resume los principales hallazgos de estas variables. Adicionalmente, se midió la actividad de AST y FA. Estas dos enzimas también se vieron alteradas ante la exposición al Roundup®, ya que tendieron a su elevación por la exposición al producto comercial usado en esta investigación (figura 6).

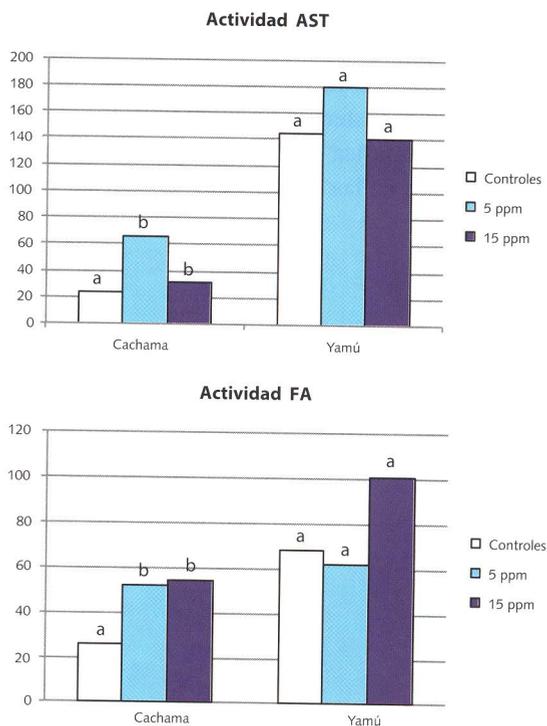


Figura 6. Valores de actividad AST y FA plasmáticas en yamú y cachama blanca. Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos de la misma especie ($p < 0,05$, ANOVA). Actividades enzimáticas expresadas en unidades/l.

En 10 de las 24 pruebas hechas para los 6 indicadores de estrés oxidativo, y para las 2 especies y los 2 órganos, se dieron resultados en los que por lo menos una de las concentraciones del herbicida examinadas tuvo una diferencia significativa con respecto a las otras utilizadas.

La tendencia de estas respuestas fue la disminución de la actividad enzimática correspondiente con respecto a la del grupo control (libre de glifosato en el agua). La especie que más presentó alteraciones en estas actividades fue la cachama blanca (7 de las 10 señaladas), mientras que en el yamú se dio el menor número (3 de las 10).

Los dos indicadores que más efectos mostraron por la exposición al glifosato fueron la concentración de GSH y la peroxidación lipídica de los tejidos (LPO). Mientras que en el caso del GSH hubo una reducción significativa de su concentración en los dos tejidos y las dos especies, por exposición al glifosato, la peroxidación lipídica presentó una elevación considerable, mostrando que el Roundup® causó daño peroxidativo en los lípidos de membrana de estos dos tejidos. Los órganos más afectados por el estrés oxidativo causado por el Roundup® fueron las branquias de la cachama blanca, las cuales presentaron variaciones en los parámetros glutatión transferasa, catalasa, glutatión reducido y peroxidación lipídica; contrario a las del yamú, que presentaron variación por acción del herbicida solo en la actividad glutatión transferasa. Las actividades glutatión transferasa (cachama), y el nivel de glutatión reducido y la peroxidación lipídica (cachama y yamú) fueron los parámetros más afectados en el hígado de las dos especies por efecto de la exposición al herbicida.

Tabla 2. Indicadores de estrés oxidativo en peces expuestos (n=12 / tratamiento) en forma aguda al Roundup® (controles, 5 ppm y 15 ppm). Los valores son promedios ± error estándar de las medias. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada especie. Los números en negrilla resaltan la actividad para cada órgano y especie en la que se dio diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$, ANOVA).

| Indicador de estrés oxidativo | Cachama blanca | | | Yamú | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Tratamientos | Branquias | Hígado | Branquias | Hígado | Hígado |
| Glutación transferasa (GST) | Control | 154,2 ± 12,4 a | 200,1 ± 11,8 a | 274,9 ± 27,6 a | 191,1 ± 16,5 a | 191,1 ± 16,5 a |
| | 5 ppm | 119,4 ± 15,6 a,b | 211,3 ± 15,6 a | 313,6 ± 21,3 a | 193,1 ± 21,5 a | 193,1 ± 21,5 a |
| | 15 ppm | 88,7 ± 5,2 b | 208,6 ± 25,7 a | 196,0 ± 10,4 b | 209,1 ± 22,8 a | 209,1 ± 22,8 a |
| Superóxido dismutasa (SOD) | Control | 4,2 ± 0,5 a | 1,3 ± 0,2 a | 9,7 ± 1,0 a | 7,5 ± 0,7 a | 7,5 ± 0,7 a |
| | 5 ppm | 3,9 ± 0,4 a | 1,2 ± 0,1 a | 7,9 ± 0,7 a | 8,9 ± 0,9 a | 8,9 ± 0,9 a |
| | 15 ppm | 2,8 ± 0,3 a | 0,8 ± 0,1 a | 9,0 ± 0,9 a | 6,4 ± 1,0 a | 6,4 ± 1,0 a |
| Catalasa (CAT) | Control | 6,2 ± 1,3 a | 90,7 ± 6,8 a | 26,9 ± 2,2 a | 124,3 ± 11,1 a | 124,3 ± 11,1 a |
| | 5 ppm | 3,2 ± 0,4 a,b | 69,1 ± 5,2 b | 27,0 ± 1,5 a | 142,1 ± 15,7 a | 142,1 ± 15,7 a |
| | 15 ppm | 3,5 ± 0,5 b | 30,2 ± 2,9 c | 26,7 ± 1,7 a | 140,1 ± 15,5 a | 140,1 ± 15,5 a |
| Glutación peroxidasa (GPx) | Control | 50,3 ± 7,3 a | 37,8 ± 5,1 a | 25,3 ± 4,4 a | 21,9 ± 3,5 a | 21,9 ± 3,5 a |
| | 5 ppm | 46,0 ± 6,7 a | 40,3 ± 4,5 a | 25,3 ± 3,0 a | 33,6 ± 5,5 a | 33,6 ± 5,5 a |
| | 15 ppm | 34,5 ± 5,8 a | 31,2 ± 8,2 a | 34,9 ± 3,2 a | 21,8 ± 4,5 a | 21,8 ± 4,5 a |
| Glutación reducido (GSH) | Control | 29,6 ± 2,8 a | 8,7 ± 1,0 a | 7,5 ± 0,7 a | 2,7 ± 0,4 a | 2,7 ± 0,4 a |
| | 5 ppm | 19,8 ± 1,6 a | 12,8 ± 1,0 a,b | 3,7 ± 0,7 a | 2,4 ± 0,4 a | 2,4 ± 0,4 a |
| | 15 ppm | 5,3 ± 0,9 b | 14,0 ± 1,7 b | 5,4 ± 0,6 a | 1,1 ± 0,3 b | 1,1 ± 0,3 b |
| Peroxidación lipídica (LPO) | Control | 0,6 ± 0,04 a | 0,3 ± 0,02 a | 1,5 ± 0,2 a | 5,5 ± 0,4 a | 5,5 ± 0,4 a |
| | 5 ppm | 0,4 ± 0,03 a | 0,3 ± 0,03 a | 1,3 ± 0,1 a | 11,1 ± 0,8 b | 11,1 ± 0,8 b |
| | 15 ppm | 1,1 ± 0,12 b | 0,5 ± 0,06 b | 1,3 ± 0,2 a | 12,4 ± 1,4 b | 12,4 ± 1,4 b |

Actividad GST expresada como nmoles CDNB conjugadas/minuto/mg proteína, actividad SOD expresada como unidades/minuto/mg proteína, actividades CAT y GPx expresadas como nmoles/minuto/mg proteína, concentración de GSH expresada como nmoles/mg proteína y LPO expresada como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmoles de malondialdehído/hora/mg proteína)

Cambios en algunas variables bioquímicas por exposición subcrónica a glifosato (Roundup®) en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*)

Carolina Montaña, Diana M. Ochoa y Jaime Fernando González M.

Resumen

Para evaluar los efectos tóxicos del glifosato (Roundup®) en una exposición subcrónica (17 días), juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) (n=14) (41,3 ± 3,5 g) fueron expuestos a cero (controles) y 5 ppm de la presentación comercial del herbicida. Se midieron las actividades enzimáticas colinesterasa plasmática y cerebral (ChE), glutatión transferasa (GST) y catalasa (CAT) hepáticas, así como los niveles de aspartato amino-transferasa (AST) plasmática. Durante la fase experimental no hubo sintomatología ni mortalidad en ninguno de los ejemplares controles o expuestos. El principal cambio se dio en una disminución en las actividades tipo ChE plasmática y cerebral en las cachamas expuestas a Roundup® (5 ppm) con respecto a los controles, aunque estadísticamente estas diferencias no fueron significativas. De igual forma, se observó una menor actividad tipo GST hepática en los expuestos con respecto a los controles. Este estudio mostró que algunos de los efectos en cambios de actividad enzimática que se observaron en experimentos de exposición corta (96 horas), se dieron también cuando la exposición al herbicida fue de varios días.

Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Cambios bioquímicos en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) por exposición subcrónica a Roundup® (letras iguales entre tratamientos para cada variable indican no diferencia estadísticamente significativa, p > 0,05, test t-student) (media ± s.e.; n=5-7 individuos por prueba evaluada).

| Parámetro evaluado | Control | Expuestos 5 ppm Roundup® |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Colinesterasa plasmática | 24,0 ± 9,4 ^a | 10,5 ± 4,3 ^a |
| Colinesterasa cerebral | 162,4 ± 12,7 ^a | 125,6 ± 29,23 ^a |
| GST branquial | 215,8 ± 22,1 ^a | 208,8 ± 13,8 ^a |
| GST hepática | 643,1 ± 65,3 ^a | 459,4 ± 5,4 ^a |
| Catalasa branquial | 5,9 ± 0,7 ^a | 6,3 ± 0,6 ^a |
| Catalasa hepática | 166,6 ± 42,7 ^a | 149,9 ± 10,5 ^a |
| AST plasmática | 19,9 ± 5,3 ^a | 18,8 ± 4,8 ^a |

Actividad colinesterasa plasmática expresada como nmoles/ml/min y cerebral como nmoles/min/mg de proteína, actividad GST expresada como nmoles CDNB conjugadas/minuto/mg proteína, actividad CAT expresada como nmoles/minuto/mg proteína, actividad AST expresada como unidales/litro.

En estos resultados se aprecia cómo los cambios en los parámetros bioquímicos evaluados luego de la exposición subcrónica al glifosato en juveniles de cachama blanca fueron menores. No se presentó diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados, si bien hubo una tendencia importante a la disminución de la actividad colinesterasa cerebral y plasmática, y GST hepática; en los expuestos a Roundup®. Tampoco se presentó mortalidad en el período de exposición durante 17 días al herbicida.

Efectos tóxicos del glifosato (Roundup®) en el pez fantasma (*Apteronotus albifrons*)

Alejandra Jiménez R., Pilar C. Rojas, Carmen H. Moreno y Jaime Fernando González M.

Resumen

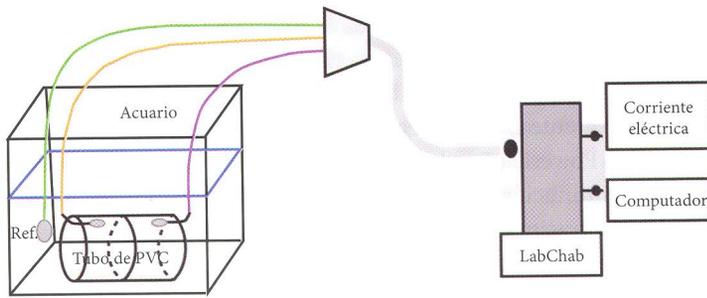
Treinta y siete juveniles de la especie *Apteronotus albifrons* (pez fantasma) fueron expuestos en forma aguda a 0, 10 y 90 ppm de Roundup Activo® (glifosato, 44,6 %). En peces se evaluó la actividad colinesterasa plasmática luego de la exposición. Se encontró una elevación de la misma en los expuestos a 90 ppm con respecto a los otros dos tratamientos. La sangre de los animales expuestos a 10 y 90 ppm se mostró de un color oscuro (achocolatado) con respecto al control, siendo más evidente en la concentración mayor. Se registró la onda eléctrica usando un equipo PowerLab® y el software LabChar-7®. Con base en ese registro, se estableció la disminución en la frecuencia de la señal cuando los peces fueron sometidos a concentraciones de 90 ppm luego de una elevación inicial, mientras que a 10 ppm las frecuencias variaron inicialmente al añadir el tóxico, para luego estabilizarse y decaer finalmente. Al analizar los cortes histológicos del encéfalo y médula de los peces expuestos a 10 ppm y 90 ppm comparados con los peces control, se pudo evidenciar cambios en cerebelo, bulbo raquídeo y sustancia blanca, relacionados con el tiempo de exposición y la concentración del herbicida aplicado. También se observó una gran cantidad de espacios entre fibras y una severa interrupción entre la capa molecular, de Purkinje y granular en el cerebelo.

Estos cambios histológicos se acompañaron de lo visto durante la exposición al herbicida: pérdida del eje de nado, con mayor efecto nocivo en individuos expuestos a 10 ppm, en los cuales el tiempo de exposición fue superior. Se presentó interrupción entre las fibras nerviosas, pérdida de neuronas y daño neuronal en regiones como el lóbulo electrosensorial de la línea lateral (ELL) y núcleo de marcapaso. Estos cambios histológicos se relacionaron con el cambio detectado en la descarga del órgano eléctrico (DOE) de los peces sometidos al herbicida, con respecto al registro de la onda en los individuos control. Asimismo, se presentaron alteraciones en bulbo raquídeo, relacionados con pérdida del equilibrio y aumento de la frecuencia respiratoria. En el hígado se observaron procesos degenerativos de los hepatocitos y vacuolas lipídicas; se encontró una relación con el tiempo de exposición en el caso de 10 ppm.

Resultados

Los experimentos llevados a cabo en esta parte del trabajo mostraron el efecto del glifosato sobre los sistemas respiratorio, nervioso y hepático de los peces. La figura 7 muestra el esquema y la disposición final de los equipos y los acuarios que se utilizaron para detectar y evaluar los cambios en la onda eléctrica de los peces por la exposición al herbicida.

El efecto sobre sistema respiratorio se evidenció por la relativa dificultad para respirar que presentaron los peces expuestos a la mayor concentración del herbicida (90 ppm). Cuando se tomaron las muestras de sangre (figura 8A) para hacer el análisis de la actividad colinesterasa, se observó una coloración oscura (“achocolatada”) en la sangre de los ejemplares expuestos a la concentración más alta del herbicida (90 ppm) (figura 8B). Fue interesante además reconocer la disposición del sistema branquial de esta especie piscícola, ya que la apertura opercular que permite exponer este tejido es bastante estrecha en la especie.



A.



B.

Figura 7. A. Diagrama esquematizado de la disposición de los equipos para registro de la onda eléctrica del pez fantasma y B. fotografía de la disposición del sistema en el laboratorio. PVC=tubo de PVC para ubicación del pez, PC=computador, PL=equipo PowerLab®

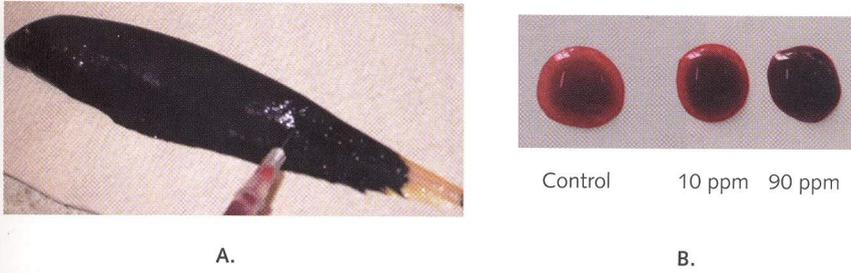


Figura 8. **A.** Toma de sangre en ejemplar de *Aptereronotus albifrons* haciendo una aproximación lateral a la vena caudal. **B.** Muestras de sangre en las que se observa la tonalidad oscura en los peces expuestos a 90 ppm de Roundup Activo®.

La evaluación del sistema nervioso se hizo analizando la sintomatología de intoxicación, los cambios en actividad colinesterasa plasmática, las modificaciones en la onda eléctrica generada por los peces y los cambios histológicos en órganos del sistema nervioso.

Los peces expuestos a la mayor concentración del herbicida presentaron signos de hiperexcitabilidad y pérdida de equilibrio, con alteración de su eje normal de nado. Una vez se dieron estos síntomas extremos, la exposición al herbicida fue suspendida, para obedecer a los protocolos de manejo ético de animales en fase experimental.

Los valores de actividad acetilcolinesterasa plasmática (nmoles/ml/min, media \pm SD) fueron en su orden **control** (n=5) = $65,0 \pm 25,6$ ^a, **10 ppm** (n=11) = $67,4 \pm 26,4$ ^a y **90 ppm** (n=11) = $112,8 \pm 46$ ^b. Como se observa, fue estadísticamente significativo el incremento de la actividad en los peces expuestos a la mayor concentración del herbicida.

La evaluación de la onda eléctrica antes de la exposición al herbicida y luego de esta, mostró los cambios en la misma en particular para la concentración de 90 ppm (figura 9). En esta concentración, se dio una elevación inicial y luego un descenso en la misma conforme transcurrió la exposición al herbicida. No se dieron cambios notables cuando los peces fueron expuestos a 10 ppm del preparado comercial a base de glifosato. No se presentaron cambios en los peces que sirvieron como control durante el período de evaluación de la onda eléctrica.

Los resultados de la evaluación histológica de los tejidos de los peces indican que el cerebelo fue el órgano más alterado en su morfología por la exposición al glifosato (figura 10). Estos cambios, junto con los signos de hiperexcitabilidad, pérdida del eje de nado, elevación de actividad colinesterasa y modificaciones a la onda eléctrica emitida, muestran que el sistema nervioso central fue afectado por la acción de este plaguicida. El hígado también mostró lipidosis y degeneración de hepatocitos por la exposición al herbicida, inclusive en la menor concentración (10 ppm) (figura 11).

Contaminación de las aguas con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia

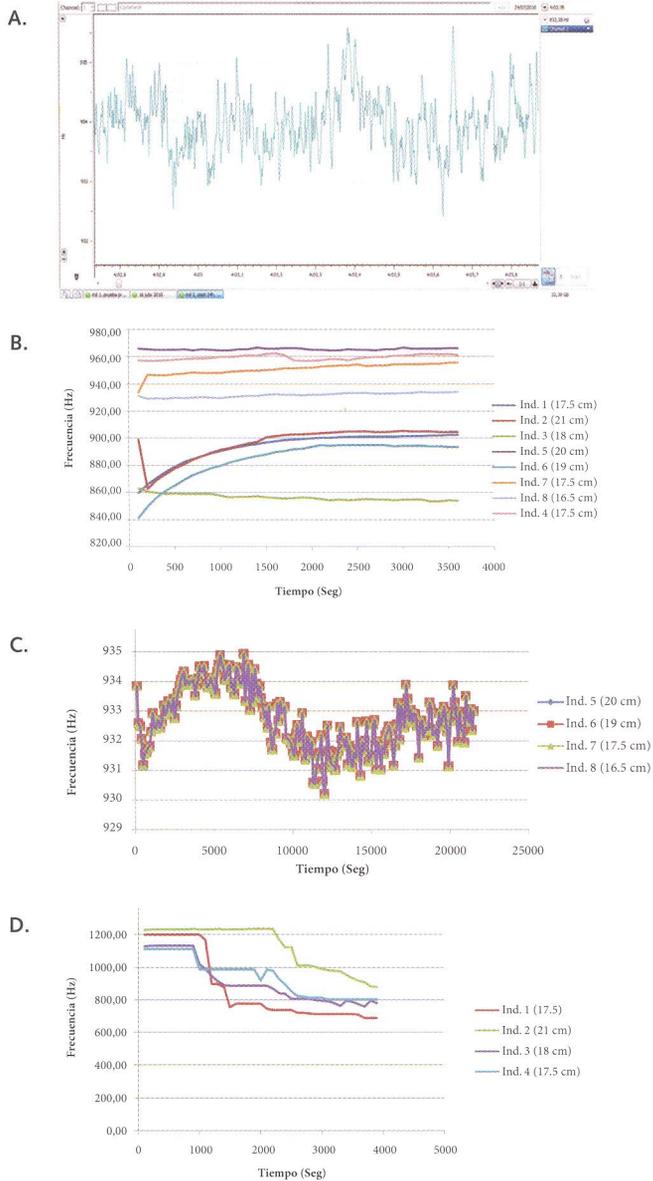
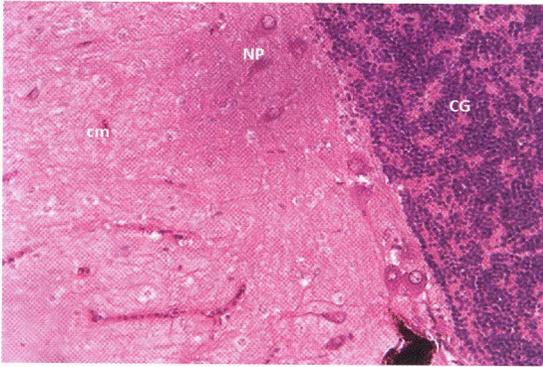
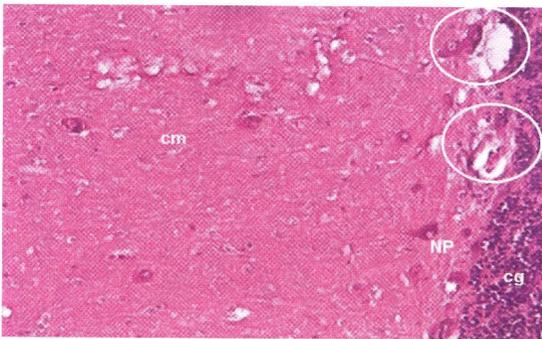


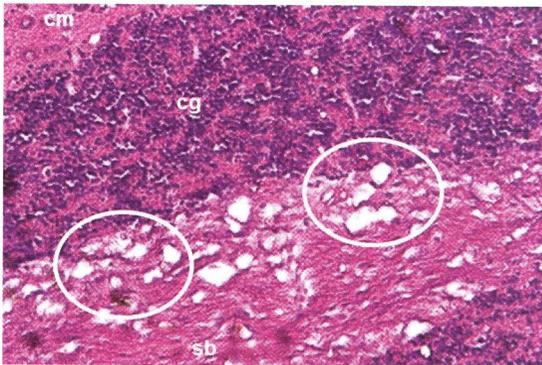
Figura 9. Resultados de la línea base de onda eléctrica y sus variaciones en las diferentes exposiciones al herbicida glifosato. **A.** Ejemplo del registro del programa LabChart-7® de la onda eléctrica en un pez control. Eje x=tiempo, eje y=frecuencia en Hz. **B.** Rangos de registro de onda eléctrica en 8 diferentes peces control (la onda oscila entre 840 y 960 Hz, entre los diferentes ejemplares). **C.** Registro de onda eléctrica en peces expuestos a 10 ppm Roundup Activo® en las que se observa una variación mínima en la frecuencia de la misma. **D.** Variación en la frecuencia de la onda eléctrica en los peces expuestos a 90 ppm Roundup Activo®. Se observa una elevación inicial (1100 – 1200 Hz) en la frecuencia de la misma con respecto a los controles y una disminución significativa (700 Hz) luego de una hora 6 minutos de exposición al herbicida.



A.



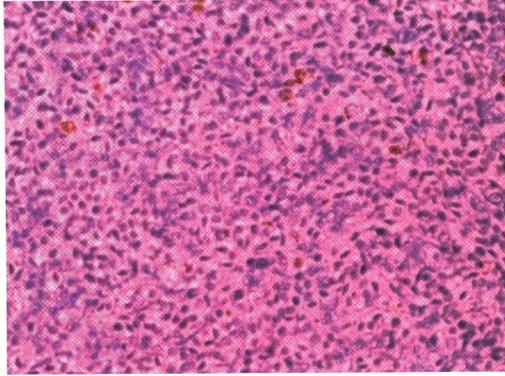
B.



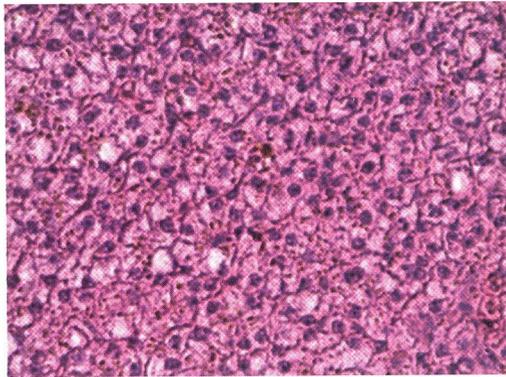
C.

Figura 10. Cortes de cerebelo en peces control y en expuestos a Roundup Activo®. **A.** Control: cm=capa molecular, NP=neuronas de Purkinje y CG=capa granular. Se presentaron cambios en las concentraciones de 10 y 90 ppm del herbicida. **B.** En 10 ppm se ven espacios (círculos blancos) entre las fibras, células de glía y la capa granular. **C.** Son más marcados los espacios entre las células nerviosas y las neuronas de Purkinje en 90 ppm (círculos blancos) (H-E, 40x).

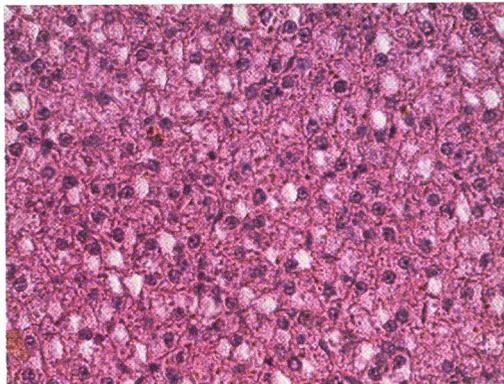
Contaminación de las aguas con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia



A.



B.



C.

Figura 11. Cortes histológicos de hígado en A. peces control, B. 10 ppm y C. 90 ppm Roundup Activo®. Se observan diferentes grados de lipodosis hepática en 10 y 90 ppm con respecto al grupo control (H-E, 40x).

Análisis físico-químico y de niveles de glifosato en aguas

Análisis de algunos parámetros físico-químicos y de niveles de glifosato en 16 cuerpos de agua de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá

Cindy Olmos y Jaime Fernando González M.

Resumen

Se analizaron los parámetros físico-químicos pH, dureza, alcalinidad, nitrato y cloruro, así como los niveles de glifosato presentes en 16 cuerpos de agua de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá: represas de Tominé, Sisga y la Copa, quebradas El Tejar, Tena y Grande, ríos Magdalena, Bogotá, Iridachín, Teatinos, Frío y Chicú, aguas superficiales en trayecto Tenjo-Tabio, laguna de Fúquene y agua de consumo de Bogotá, D.C. Los valores físico-químicos analizados estuvieron dentro de rangos normales para la mayoría de los casos, con excepciones donde se encontraron valores elevados para variables como alcalinidad (río Apulo), dureza (laguna de Fúquene, río Apulo y río Magdalena) y cloruro (río Chicú). No se encontraron valores detectables de glifosato en ninguna de las muestras analizadas.

Resultados

Los cuerpos de agua se muestrearon entre los meses de diciembre de 2010 y enero de 2011. Para el análisis de glifosato se realizó una curva de calibración con los estándares del kit comercial (figura 12).

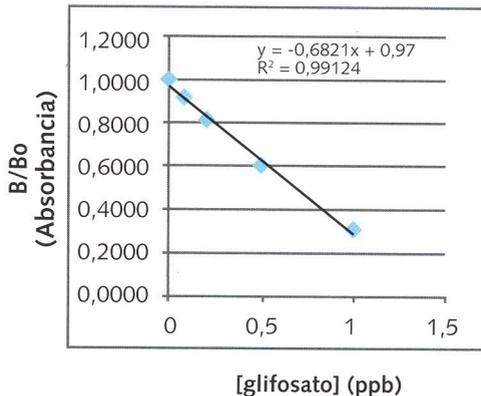


Figura 12. Curva de calibración utilizada en el presente estudio para análisis de glifosato a través del método de microelisa en muestras de agua.

En el análisis de glifosato en los cuerpos de agua no se encontró un nivel detectable en ninguno de estos.

Los valores encontrados para las variables físico-químicas estudiadas en los 16 cuerpos de aguas mencionados se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Valores físico-químicos de algunas variables en los 16 cuerpos de agua estudiados en el presente estudio.

| Punto de muestreo | pH (unidades) | Alcalinidad (ppm CaCO ₃) | Dureza (ppm CaCO ₃) | Cloruro (ppm Cl ⁻) | Nitrato (ppm de N-NO ₂) |
|---|---------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Embalse de Tominé (desagüe) | 6,5 | 34,2 | 34,2 | 60 | n. d. |
| Represa del Sisga | 6,3 | 34,2 | 34,2 | 60 | n. d. |
| Quebrada El Tejar (Chocontá) | 5,8 | 68,4 | 85,5 | 60 | n. d. |
| Río Bogotá (Chocontá-Villapinzón) | 7,1 | 51,3 | 51,3 | 60 | 0,025 |
| Riachuelo Iridachín (Ventaquemada) | 6,4 | 51,3 | 68,4 | 90 | n. d. |
| Río Teatinos (Puente de Boyacá) | 6,6 | 34,2 | 51,3 | 60 | n. d. |
| Agua superficial Trayecto Tenjo-Tabio | 6,0 | 68,4 | 68,4 | 90 | n. d. |
| Río Chicú (Tabio) | 7,0 | 68,4 | 85,5 | 150 | 0,025 |
| Río Frío (Tabio-Cajicá) | 6,4 | 34,2 | 34,2 | 60 | n. d. |
| Laguna de Fúquene (Ubaté-Chiquinquirá) | 6,1 | 51,3 | 171,0 | 90 | n. d. |
| Represa de La Copa (Boyacá) | 6,5 | 51,3 | 51,3 | 60 | n. d. |
| Agua Acueducto de Bogotá | 6,7 | 51,3 | 51,3 | 60 | n. d. |
| Quebrada Tena (vía La Mesa, Cundinamarca) | 7,2 | 34,2 | 34,2 | 60 | n. d. |
| Río Apulo | 7,8 | 102,6 | 376,2 | 60 | n. d. |
| Río Magdalena (Girardot) | 7,2 | 85,5 | 102,6 | 60 | 0,06 |
| Quebrada Grande (Pandi, Cundinamarca) | 7,2 | 34,2 | 34,2 | 60 | n. d. |

n. d.: no detectado.

Discusión y conclusiones



Los resultados obtenidos en los estudios presentados en este trabajo se analizan en dos áreas: impacto sobre especies piscícolas y análisis de parámetros físico-químicos y contaminación de las aguas con glifosato.

Investigaciones con especies piscícolas

Los peces de las diferentes especies estudiadas mostraron efectos en varios sistemas corporales por la exposición al herbicida. Los sistemas más afectados fueron el nervioso, el respiratorio, el hematológico, el antioxidante y el hepático. Cada uno de estos será analizado a continuación.

El sistema nervioso mostró los principales efectos por la exposición al glifosato en todas las especies. El primer parámetro evaluado fue la sintomatología mostrada por los peces en donde el efecto predominante fue la hiperexcitabilidad en exposiciones agudas. Esto sucedió en yamú, bocachico y pez fantasma expuestos durante 96 horas o por un tiempo menor. La cachama blanca expuesta en forma aguda y subcrónica no mostró signos extremos de compromiso nervioso en los ensayos. Los signos que se manifestaron en las especies afectadas fueron cambios en el patrón de nado (ej. nado frenético), pérdida del eje de nado (ubicación en el fondo de los acuarios apoyándose sobre un costado) y depresión en la fase terminal de la exposición. Estos hallazgos se correlacionan con las variaciones que presentó la actividad colinesterasa. En todas las especies en donde se hizo esta evaluación hubo un cambio en la actividad de esta enzima dependiendo de la especie y la concentración del herbicida investigadas.

En el caso del yamú, la cachama blanca y el pez fantasma se dieron elevaciones significativas en la actividad de la enzima. Para el caso del bocachico se presentó un descenso de la actividad en 10 ppm y una elevación en 30 ppm, dependiendo de la concentración usada del herbicida. Otros autores han reportado cambios en actividad colinesterasa de peces por exposición a glifosato. [1, 2] Al buscar una explicación sobre el porqué se da la elevación en la actividad de esta enzima, podría pensarse que debido a la trans-

misión constante del impulso nervioso en los animales (hiperexcitabilidad, nado frenético, etc.), las sinapsis nerviosas incrementan la liberación de la enzima colinesterasa con el propósito de suspender esa sobreestimulación al hidrolizar la acetilcolina, neurotransmisor responsable de la transmisión del impulso nervioso.

De otra parte, para explicar la inhibición de la actividad colinesterasa (bocachico, 10 ppm), podría pensarse en una inhibición de la enzima, por inactivación química, tal y como sucede en intoxicaciones con insecticidas organofosforados o carbamatos, clásicos inhibidores de la misma. Sin embargo, aunque el glifosato tiene fósforo en su molécula (n-fosfono-metil-glicina), no es un insecticida de este tipo sino un herbicida. A este punto, no habría elementos suficientes para pensar que tendría un mecanismo similar a estos insecticidas, y, por ello, cualquier especulación al respecto por el momento carece de sustentación con evidencia científica.

El otro aspecto interesante de la evaluación del sistema nervioso se relaciona con el análisis de la onda eléctrica emitida por el pez fantasma como indicador de efecto neurológico. La línea base de la frecuencia de la onda eléctrica se vio afectada en los peces expuestos a 90 ppm de glifosato, aumentando al comienzo de la exposición y disminuyendo significativamente antes de la muerte de los animales. Esto corrobora la acción del herbicida sobre el sistema nervioso al utilizar esta especie como biomodelo.

Los hallazgos microscópicos en tejido nervioso también fueron muy útiles para entender el cuadro nervioso de intoxicación. Particularmente, la pérdida de equilibrio y la incapacidad para mantener su eje de nado podrían atribuirse en parte a las lesiones encontradas en el cerebelo de los ejemplares (figura 10). Concretamente se presentaron espacios y pérdidas en la celularidad de este órgano, que, como es conocido, tiene entre sus funciones la de mantener equilibrio y posición de eje de nado en los peces. Esto último explicaría parcialmente los signos presentados por los peces en la exposición al herbicida. En la revisión de literatura consultada no se encontró evidencia previa de efectos del glifosato sobre el sistema de generación de onda eléctrica en peces, con el propósito de comparar los hallazgos de este estudio.

Los efectos sobre sistema respiratorio y hematológico causados por el glifosato podrían analizarse conjuntamente dada la naturaleza y características de los hallazgos en este estudio. Las manifestaciones más evidentes de dificultad respiratoria (estrés) las presentaron los ejemplares de yamú, bocachico y fantasma cuando fueron expuestos al herbicida. La tendencia de todos fue buscar y permanecer en la superficie de los tanques, conducta similar a la que presentan los peces cuando tienen problemas de oxigenación en las aguas. Para el caso del yamú y el pez fantasma fueron notorias las coloraciones oscuras de la sangre en los animales que mostraban dificultad respiratoria. En la toxicología general se reportan a los nitritos como los principales

agentes causantes de efecto oxidante sobre el hierro de la hemoglobina, estado conocido como metahemoglobina o ferrihemoglobina. En esta investigación, este efecto causado por el glifosato fue en cierta forma inesperado. Para corroborar que la apariencia oscura de la sangre y tejido branquial en los expuestos al herbicida obedecía a una acción metahemoglobinizante, se planteó el experimento con glóbulos rojos de yamú expuestos *in vitro* al herbicida, haciendo un seguimiento espectrofotométrico durante la exposición. El efecto metahemoglobinizante que causó el glifosato al hacer este ensayo fue menor que el ocasionado por el nitrito como control positivo, pero sí ratificó esta acción tal y como lo sugería la apariencia macroscópica de sangre y branquias.

De las tres especies, el pez fantasma presentó los efectos metahemoglobinizantes a la mayor concentración del glifosato comercial utilizada en los diferentes ensayos (90 ppm). Es interesante ver que anatómicamente, en esta especie, la exposición del tejido branquial al medio no es tan marcada, ya que el opérculo es un pequeño orificio que disminuye la exposición directa de los arcos branquiales al medio acuoso, como sí sucede en otras especies donde el mismo tiene una apertura más amplia. Esto podría explicar tentativamente la mayor resistencia de la especie a la oxidación de la hemoglobina causada por el herbicida.

Al comparar estos hallazgos con la literatura científica se encontró que al trabajar con eritrocitos de humano, Pieniżek et ál. encontraron que el glifosato causaba el mismo efecto metahemoglobinizante en las células humanas que el visto en nuestro estudio con las especies piscícolas. [3] En este estudio también se planteó un protocolo experimental donde muestras de sangre periférica de humanos eran expuestas *in vitro* al herbicida con resultados que confirmaron la acción oxidante de este compuesto.

El estrés oxidativo causado por el glifosato en los tejidos hepático y branquial fue otro de los hallazgos significativos de este estudio. Las especies que se estudiaron con este propósito fueron la cachama blanca y el yamú. En la primera, se analizó si la acción sobre el sistema antioxidante de protección celular se daba tanto en exposiciones cortas (96 horas) como más prolongadas (17 días). En el caso de la exposición corta en la cachama se usaron 5 ppm y 15 ppm de Roundup® para evaluar este efecto. Los cambios fueron evidentes en varias de las enzimas encargadas de proteger la célula de los daños oxidativos, siendo aún mayores a la concentración más alta de glifosato. La suma de los efectos oxidantes causados por el glifosato, como principio activo y los surfactantes que hacen parte de las presentaciones comerciales, se reflejó en la peroxidación de lípidos de membrana (hígado y branquias) que sufrieron los peces expuestos.

De otra parte, cuando la cachama fue expuesta a una baja concentración del herbicida (5 ppm) y por tiempo prolongado (17 días), los efectos fueron

menores, y, aunque hubo algunas alteraciones en parámetros como la actividad glutatión-s-transferasa (GST), las diferencias con respecto a los ejemplares control no fueron significativas al hacer el análisis estadístico.

En el caso del yamú expuesto durante 96 horas fue notorio el efecto de la peroxidación lipídica en el hígado, causado por el glifosato a las concentraciones de 5 y 15 ppm. Estudios preliminares han mostrado que el yamú tiene un buen perfil de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas, lo que los haría más susceptibles a la peroxidación lipídica de las mismas. [4] Los surfactantes (ej. POEA, cosmoflux, etc.) que acompañan al principio activo glifosato en el preparado comercial que se aplica serían por su naturaleza química los mayores responsables de esta peroxidación de membranas celulares. Estos hallazgos de peroxidación lipídica y estrés oxidativo han sido reportados en otras investigaciones hechas en peces y en mamíferos expuestos al glifosato. [2, 5]

Valga destacar que en los experimentos hechos en el presente estudio en ningún caso se dio mortalidad durante los períodos experimentales en los peces expuestos a glifosato, ni en forma aguda ni subcrónica. Esto resalta el hecho de que en algunas ocasiones el parámetro de mortalidad no es suficiente ni único para considerar los efectos tóxicos de los compuestos; por el contrario, todos los cambios bioquímicos subcelulares o de otra naturaleza son importantes para incluir en las evaluaciones correspondientes.

Otro hallazgo importante como efecto tóxico del glifosato sobre los peces fue el daño hepático. Este estaría relacionado también con los daños de estrés oxidativo que fueron analizados previamente, ya que la degeneración de hepatocitos vista en el caso del pez fantasma y los cambios en las enzimas AST y FA en cachama y yamú serían indicadores del mismo efecto. Teniendo en cuenta que el glifosato causó daño a los lípidos de membrana celular, el hallazgo de elevación de las transaminasas (AST y FA) se podría ver como una consecuencia de dicho daño celular, ya que estas enzimas se elevan en el plasma sanguíneo cuando son liberadas desde el citoplasma de las células que han sufrido el daño en sus membranas. Además, los hallazgos histológicos corroboraron para el caso del pez fantasma que el hígado fue un órgano sensible al efecto del herbicida. El efecto sobre el hígado ha sido igualmente reportado por otros autores trabajando con mamíferos y peces, lo cual confirma los hallazgos que se encontraron en nuestro estudio al considerar este órgano. [6, 7, 8, 9]

Análisis de parámetros físico-químicos y de niveles de glifosato en los cuerpos de agua muestreados

Los análisis físico-químicos que se hicieron en forma complementaria a la detección de glifosato arrojaron resultados esperados para los cuerpos de agua en la mayoría de los casos. Las aguas tuvieron valores de pH dentro de

los rangos esperados para aguas dulces y no se vio ningún valor extremo. Las variables que tuvieron resultados por fuera del rango esperado fueron la alcalinidad y la dureza en los cuerpos de agua muestreados en Ventaquemada, laguna de Fúquene, río Apulo y río Magdalena. Varios de estos cuerpos de agua reciben aguas servidas de los municipios vecinos o efluentes contaminantes, como en el caso del río Bogotá en su desembocadura en Girardot sobre el río Magdalena. La elevación de los valores en estas variables indica un incremento en sales tipo carbonato y bicarbonato, así como en los niveles de calcio y magnesio de las aguas.

La problemática de la contaminación de los cuerpos de agua en Colombia por mala disposición de aguas servidas, por efluentes de industria o actividad agropecuaria es de creciente preocupación. Los efectos de este tipo de problemas se pudieron evidenciar en este trabajo, particularmente los niveles de eutroficación crecientes en la laguna de Fúquene, progresivamente afectada por la proliferación de macro y microalgas en detrimento del volumen hídrico (figura 13).

El otro aspecto crítico que se observó en las visitas hechas durante los muestreos fue la turbidez y mal olor de algunos de estos cuerpos de agua que reciben los desechos municipales, basuras y otros desperdicios a pesar de la invitación de autoridades ambientales a no hacerlo. Como una evidencia de esta situación se puede observar la figura 14 en el punto de muestreo del municipio de Tenjo, el cual fue escogido para este estudio.



Figura 13. Aspecto de la laguna de Fúquene en donde se aprecia el crecimiento progresivo de especies vegetales tipo algas como consecuencia del fenómeno de eutroficación.



Figura 14. Apariencia de aguas superficiales en el punto de muestreo en el municipio de Tenjo (Cundinamarca) a pesar de la prohibición sobre disposición de desechos y desperdicios en cuerpos de agua.

El análisis de glifosato en los cuerpos de agua seleccionados en este estudio se planteó para 16 puntos ubicados en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Aunque en estos lugares no se presenta la aspersión de glifosato para control de cultivos ilícitos como coca y amapola, sí se realizan actividades agrícolas como el cultivo de papa, fresa y otras hortalizas en los cuales se usa el herbicida como práctica rutinaria de control de malezas (figura 15A). Desafortunadamente, la disposición de los residuos de plaguicidas y sus recipientes tampoco es la más adecuada en varios lugares de esta región. La figura 15B muestra un recipiente de un producto comercial hecho a base de glifosato que fue encontrado en muestreos previos hechos por nuestro grupo en el río Bogotá, frente a zonas ocupadas por cultivos de fresas.



A.

B.

Figura 15. A. Cultivos de fresa en el sector de Chocontá (Cundinamarca) encontrados durante el muestreo hecho en el presente estudio. B. Recipiente de Roundup® eliminado directamente sobre el río Bogotá.

El análisis de glifosato en los 16 cuerpos de agua que se muestrearon no arrojó la detección del mismo en alguno de estos, resultado que aparece alentador, a pesar de los usos masivos del herbicida para los cultivos antes mencionados.

Un aspecto que debe tenerse en cuenta es que los muestreos hechos en este estudio fueron adelantados durante la cruda fase invernal que se presentó a finales del año 2010 e inicios del 2011 en la región y el país, en general. Este período invernal, que ha sido calificado como el más crítico que ha sufrido el país en los últimos 50 años, ha determinado no solo el desbordamiento de ríos, humedales y lagunas, sino también una dilución significativa de cualquier contaminante que pudiera encontrarse en estos, y sobre el cual se quisiera hacer un análisis para su detección y cuantificación.

Desde ya queda planteada la necesidad de hacer un monitoreo en estos y otros cuerpos de agua hacia el futuro en diferentes épocas del año (fases invernales y de verano), para poder tener un estimativo más completo de los niveles de contaminación con glifosato o cualquier otro contaminante durante los diferentes ciclos hidrológicos anuales.

El haber implementado la técnica de microelisa para detectar glifosato en aguas fue un aspecto relevante de este trabajo. Esta siempre ha sido una necesidad para el país dados los usos significativos de este plaguicida y los riesgos de contaminación de las aguas en nuestro medio. Un aspecto limitante para esto son los altos costos de métodos como cromatografía (hasta USD \$300 por muestra) y la complejidad de las técnicas que se requieren. El desarrollo y aplicación de la técnica de microelisa para análisis de plaguicidas ha solucionado en parte esta problemática. Varios países, dentro de los cuales se encuentra Canadá, han implementado estas técnicas para hacer monitoreo de sus aguas teniendo beneficiosos resultados. [9,10] Por esta razón, la técnica podrá, a partir de la fecha, servir para este análisis, con gastos razonables (USD \$10-15 por muestra) y una buena sensibilidad, ya que con el método permite detectar una concentración mínima de 0,05 partes por billón (ppb) de glifosato en aguas.

Conclusiones

Las principales conclusiones derivadas de este estudio son:

- Todas las especies piscícolas nativas usadas en este estudio mostraron algún grado de susceptibilidad a la acción tóxica del herbicida glifosato cuando se hicieron exposiciones agudas letales, agudas subletales o subcrónicas subletales.
- Los sistemas nervioso, respiratorio, hematológico, antioxidante y hepático fueron los que manifestaron los mayores efectos tóxicos en los ejemplares estudiados en esta investigación.

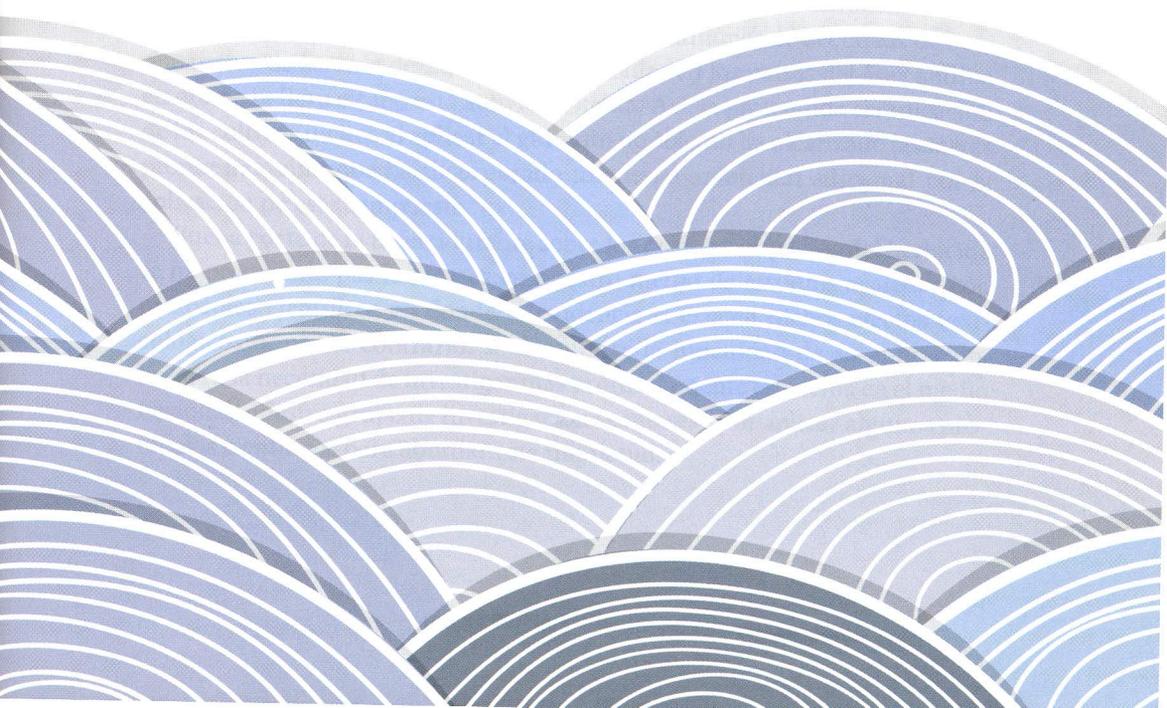
- Ninguno de los cuerpos de agua analizados en el presente estudio mostró algún nivel detectable de glifosato.
- La prueba basada en el análisis de microelisa mostró ser eficiente y sensible en la detección y cuantificación de este herbicida en muestras de agua, y serviría al futuro como técnica analítica dada la necesidad de contar con una prueba de esta naturaleza en el país.
- El presente estudio demostró los efectos tóxicos del herbicida glifosato sobre algunas especies ícticas nativas de Colombia.

Referencias

- [1] Gluszczak L, dos Santos D, Crestani M, Braga da Fonseca M, de Araújo F, Frescura Duarte M, Pimentel VL. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006; 65:237-241.
- [2] Modesto KA, Martínez CBR. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*. 2010; 78:294-299.
- [3] Pieniążek D, Bukowska B, Duda W. Comparison of the effect of Roundup Ultra SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2004; 79:58-63.
- [4] Betancourt L, Cuervo L, Díaz GJ. Perfil de ácidos grasos de diferentes especies piscícolas. *Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, Villavicencio, octubre 27-29, 2004*.
- [5] El-Shenawy N. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup® and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009; 28:379-385.
- [6] Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasrigrams S, Pokethitiyook P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*. 2003; 18:260-267.
- [7] Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiwicz T. Effects of the herbicide Roundup® on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*. 2000; 50:263-266.
- [8] Caglar S, Kolankaya D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup®. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008; 25:57-62.
- [9] Struger J, Thompson D, Staznik B, Martin P, McDaniel T, Marvin C. Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario.

- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2008;
80:378-384.
- [10] Byer JD, Struger J, Klawunn P, Todd A, Sverko E. Low cost
monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method:
an evaluation. Environmental Science and Technology. 2008;
42:6052-6057.

**Reflexiones finales
sobre las investigaciones
realizadas y la problemática
del glifosato en Colombia**



La problemática del glifosato y su aplicación en la erradicación de cultivos ilícitos ha sido un tema controversial que ha generado inconvenientes inclusive de índole internacional para el país. Se han hecho muchos cuestionamientos considerando que el propósito final de esta política no se ha cumplido a plenitud: la erradicación absoluta de los cultivos de coca y amapola. Colombia, a pesar del plan de fumigaciones con glifosato ejecutado durante varios años, se ha mantenido como uno de los mayores productores mundiales de pasta de coca y heroína. El cuestionamiento se hace más fuerte si además existe el riesgo del efecto tóxico en humanos, animales, coberturas vegetales nativas o cultivos lícitos que reciban las aspersiones del herbicida. Estos riesgos y efectos potenciales se unen al serio impacto ambiental que sufren los ecosistemas donde se establecen los laboratorios de producción de narcóticos, los cuales no solo destruyen las coberturas de bosques nativos para iniciar los cultivos ilícitos sino también conducen a una contaminación importante de suelos y aguas con todos los insumos químicos utilizados (ácidos, solventes orgánicos, etc.) en el procesamiento de la pasta de coca y obtención de heroína.

Solo en Colombia se han perdido más de 1,2 millones de hectáreas de bosque nativo de las más de 2,4 millones afectadas en los países del área andina en donde se lleva a cabo esta actividad ilícita. Así, la pretendida erradicación de los cultivos ilícitos al aplicar el glifosato no solo no ha alcanzado las metas propuestas, sino que ha incorporado un riesgo ambiental adicional por la aplicación de este compuesto.

Buena parte de la incertidumbre sobre los posibles impactos del herbicida se ha presentado por la escasez en nuestro medio de estudios avalados con protocolos científicos en donde se evidencie si existen dichos efectos toxicológicos o, por el contrario, se demuestre la inocuidad de su aplicación. Frente a la necesidad de investigar más profundamente este tema en el medio nacional, nuestro grupo de investigación se interesó por aplicar algunos protocolos científicos para abordar esta inquietud.

Teniendo en cuenta la naturaleza de nuestros trabajos y la utilidad de las especies piscícolas como bioindicadoras de contaminación, los resultados presentados mostraron diferentes tipos de efectos sobre algunas especies nativas de la ictiofauna colombiana. Además, se logró implementar una técnica analítica que permite detectar y cuantificar glifosato en aguas contaminadas, una de las necesidades clave para el país, teniendo en cuenta la incertidumbre de contaminación de cuerpos de agua de la geografía nacional.

Los resultados de este trabajo mostraron el riesgo al que pueden estar sometidas algunas especies piscícolas nativas frente a la eventual contaminación de las aguas con el herbicida. Todas las especies escogidas y todos los protocolos de investigación aplicados mostraron efectos en diferentes sistemas corporales de las especies seleccionadas. Los sistemas nervioso, respiratorio, sanguíneo, antioxidante y hepático fueron los más afectados tanto en las exposiciones agudas como en las sub-crónicas. Algunas de las especies (bocachico, yamú) fueron más susceptibles que otras (cachama, pez fantasma) a ciertas concentraciones y durante algunos tiempos de exposición; pero, en general, todas se vieron afectadas en mayor o menor grado por el herbicida. Si bien las exposiciones fueron bajo condiciones controladas, en donde la concentración de glifosato pudo aislarse como variable de estudio, una proyección sobre qué podría suceder en el medio natural cuando se dé contaminación de las aguas con el herbicida es previsible al extrapolar la información obtenida en nuestro estudio.

Con respecto al análisis del herbicida en los cuerpos de agua que fueron muestreados y analizados, es importante destacar que no se encontró un nivel mínimo de contaminación en alguno de los 16 lugares estudiados, a pesar de que su uso para control de malezas es significativo en los puntos de muestreo seleccionados. Aunque no se encontró glifosato en las muestras, algunas de las variables físico-químicas que complementaron el estudio sí mostraron valores que denotan mal manejo de aguas residuales (ej. Ventaquemada), las cuales van a contaminar los cuerpos de agua sin ser tratadas adecuadamente.

Los propósitos del presente estudio fueron no solamente la obtención de información y la generación de conocimiento en el tema del glifosato como contaminante de las aguas y sus efectos en peces, sino que, además, se consideró que los resultados encontrados cobrarían más relevancia si se divulgaban y se hacían conocer al público general y a las entidades reguladoras de impacto ambiental en el país.

Para cumplir con la primera parte, además de los artículos científicos ya publicados y los que están en preparación en el momento, se acudió a medios de comunicación para hacerles saber de estos resultados. De allí surgieron informes en algunos medios como Caracol Noticias (*Informe especial Glifosato bajo la lupa*, <http://www.youtube.com/watch?v=qwmvF2otiSA>), UN Pe-

riódico (*Awarded study about the impact of glyphosate in fish*, agosto de 2010; y *Nuevas secuelas del glifosato*, marzo de 2008), Revista Cambio (*Glifosato afecta a peces nativos*, http://www.cambio.com.co/cienciacambio/866/ARTICULO-WEB-NOTA_INTERIOR_CAMBIO-7716905.html), y BBC Mundo (*Advierten sobre el glifosato*, http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_7315000/7315739.stm), entre otros.

Con respecto al segundo objetivo, nuestro grupo de investigación se reunió con funcionarios de la División de Estupefacientes para entregar copia de los resultados obtenidos y explicar cómo se habían desarrollado las investigaciones. También se entregó informe a la Contraloría Delegada para el Medio Ambiente, con el propósito de dar a conocer estos hallazgos. Confiamos en que los resultados de esta investigación sirvan de información básica para que la toma de decisiones en el futuro sobre temas ligados al impacto ambiental, como la aplicación de este tipo de compuestos, se sustente con evidencias respaldadas en forma científica. Quizás entonces se pueda fortalecer y aplicar plenamente el concepto del *agua como principio de vida* para y por los colombianos.

Declaración de originalidad

Yo, Jaime Fernando González Mantilla, director de AQUÁTICA, Grupo de Investigación en Toxicología Acuática y Ambiental, declaro que los datos e información presentados en este trabajo corresponden a resultados obtenidos en los proyectos que fueron desarrollados en trabajo conjunto con los estudiantes bajo mi dirección y los coinvestigadores participantes en cada caso. Estos resultados son los productos de propuestas originales formuladas por nuestro grupo de investigación entre los años 2004 y 2010, las cuales fueron financiadas por varias instituciones, a saber: *International Foundation for Science* (IFS), División de Investigación Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia; Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia y Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.



Jaime Fernando González Mantilla
Profesor titular – Director AQUÁTICA
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
jfgonzalezma@unal.edu.co; jaimefgonzalez@gmail.com
Tel. (57 - 1) 316 5524

**Contaminación de las aguas con glifosato
y sus efectos tóxicos
en ictiofauna nativa de Colombia**

Esta edición consta de 500 ejemplares; en su composición se utilizaron caracteres Minion Pro 10,5/13 puntos, formato de 16,5 x 24 centímetros, páginas interiores en propalmate de 90 gramos y carátula en propalcote de 240 gramos. Se imprimió en octubre de 2012 en la Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

La aplicación de glifosato sobre cultivos ilícitos en Colombia ha suscitado gran controversia por las posibles implicaciones ambientales, en salud pública y efectos sobre las especies animales. Este libro presenta varios trabajos sobre los efectos tóxicos del herbicida en cuatro especies de peces de Colombia: cachama blanca (*Piaractus brachipomus*), bocachico del Magdalena (*Prochilodus magdalenae*), yamú (*Brycon amazonicus*) y fantasma (*Apteronotus albifrons*). Los temas presentados incluyen evaluación de síntomas post-exposición al herbicida, cambios bioquímicos en varios tipos de enzimas y cambios histopatológicos en los peces tras exposiciones agudas y subagudas bajo condiciones experimentales.



9 789587 612806