

Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos



ISBN 978-958-97780-1-2



Autores:

Pedro René Eslava Mocha • Wilson Ferney Ramírez Duarte • Iang S. Rondón Barragán
Grupo de Sanidad de Peces Instituto de Acuicultura de los Llanos - IALL- Universidad de los Llanos

Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos

Autores

Pedro René Eslava Mocha

MV; M Sc. Profesor Asociado

Wilson Ferney Ramírez Duarte, MVZ

Iang Schroniltgen Rondón Barragán, MVZ

Instituto de Acuicultura de los Llanos -IALL-

Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana -IIOC-

Universidad de los Llanos

2007

Eslava-Mocha Pedro René; Ramírez-Duarte Wilson Ferney;
Rondón-Barragán lang Schroniltgen
Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto sobre peces nativos
Universidad de los Llanos, 2007

150 Pág.

ISBN: 978-958-97780-1-2

© Pedro René Eslava M; Wilson Ramírez D; lang Rondón B.
© Unillanos - (IIOC-IALL)
© 2007

Primera Edición.

Autores: Pedro René Eslava M; Wilson Ramírez D; lang Rondón B.

Este es un libro producto de investigación apoyada por el Sistema de Investigaciones
de la Universidad de los Llanos y el IALL.

Fotografías portada: Archivo IALL; foto Opistogramma macmasteri, profesor Miguel Angel Landinez U.N.

Diagramación e impresión: Editorial Juan XXIII Villavicencio.

Calle 39C N° 24ª-17 Emporio Av. del Llano – Villavicencio, Meta - Colombia

ISBN: 978-958-97780-1-2

Derechos Reservados.

Esta obra es propiedad intelectual de los autores. Los derechos de publicación de la 1ª edición corresponden a la Universidad de los Llanos. Prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio sin permiso escrito de los propietarios de los derechos del copyright.

.....



RESENTACIÓN

.....

Amable lector:

Esta es una obra derivada de los resultados del proyecto de investigación titulado: **Estudios sobre efectos de los componentes de la mezcla de aspersión de cultivos de coca y amapola en Colombia sobre especies nativas: modelo cachama blanca** (*Piaractus brachypomus*) financiado por el Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana (IIOC). También ha sido el producto de rigurosas lecturas, experimentos y discusiones del Grupo de Estudio Sanidad de Peces de la Universidad de los Llanos desde hace algunos años, dentro del cual, hemos compartido la preocupación de hacer algo concreto sobre problemáticas de toxicología acuática y ambiental en nuestra región, rica en fuentes de agua y megabiodiversa por excelencia. Acciones y análisis que nos permitan comprender e interpretar de la mano de la ciencia los efectos de algunas prácticas de control, tanto en sistemas de producción tradicionales, o como en este caso, sobre ecosistemas intervenidos por los cultivos prohibidos.

Del citado proyecto, además de la obra que ponemos a disposición del lector, se han elaborado tres publicaciones científicas como reporte original de investigación destinadas a revistas indexadas, las cuales se han sometido a los comités editoriales respectivos. También, se presentaron resultados parciales en dos eventos académicos: el **I Curso-Seminario Internacional de Patología y Sanidad Piscícola**, Universidad Nacional, Bogotá, Septiembre de 2006; y el **III Congreso Colombiano de Acuicultura**, Santa Marta, Universidad del Magdalena, Octubre de 2006; en este último, la presentación denominada: “*Efectos de los componentes de la mezcla de aspersión sobre cultivos ilícitos en el sistema nervioso central de la cachama blanca: resultados preliminares*” recibió el reconocimiento como el

.....

mejor trabajo oral del Congreso; lo cual, además de ser muy satisfactorio para la Universidad de los Llanos, comprometió a las Directivas universitarias y a los autores en particular, a intentar compartir de una manera más asequible, explicativa en el contexto general del país, abierta y de menos tediosa lectura, sobre todo, por el lenguaje especializado, que fuese puesta a disposición del público en general en un medio directo que aún no pasa de moda, el papel. Incluyendo en él los resultados del trabajo científico, técnico, y por supuesto también las reflexiones que el Grupo de Estudio Sanidad de Peces ha venido construyendo en torno a éstos temas de capital importancia para la región amazinoquense, pues sin ninguna duda, tanto los efectos del establecimiento, como de las prácticas de control en cultivos de coca y amapola impactan notoriamente el ambiente y los ecosistemas acuáticos en particular.

El uso de agroquímicos como herramienta en labores agrícolas es una práctica común en el ámbito mundial que ha llevado a la contaminación de los suelos y de los cuerpos de agua. Uno de los agroquímicos de más amplio uso es el glifosato (GP) bajo la formulación comercial Roundup®. En Colombia se usa el GP como componente de la mezcla de aspersión usada en las prácticas de erradicación química de los cultivos de coca y amapola, en la cual, además del Roundup® Ultra, se incluye el surfactante Cosmoflux® 411F. Dicha mezcla se compone en un 44% de Roundup® Ultra, 55% de agua y 1% de Cosmoflux® 411F, en proporción volumen/volumen con una tasa de aspersión de 10,4 l/ha de GP. En contraste los fabricantes en Estados Unidos solo permiten concentraciones del Roundup® Ultra entre 1,6-7,7% y una tasa de aspersión de un cuarto de galón por acre (2,33 l/ha) (BINLFA, 2002; Oldham *et al.*, 2002). En Colombia, específicamente, se estableció el uso del Cosmoflux® 411F como surfactante. Además, no se realizaron los estudios sobre los efectos del Cosmoflux® 411F, solo o en combinación con Roundup® Ultra. De este modo, no existen bases para asumir la seguridad de las aspersiones sobre la población, cultivos de pancoger y fuentes de agua.

El uso de la mezcla Roundup® Ultra-Cosmoflux® 411F en las prácticas de erradicación química de cultivos de coca y amapola es justificado por trabajos que reportan baja toxicidad del GP para animales y el ser humano (Solomon *et al.*, 2005), debe aclararse que es diferente el GP al producto comercial Roundup® y, que adicionalmente, la mezcla de

aspersión aplicada no se ha estudiado rigurosamente, lo cual complica el cuadro, pues las mezclas son mucho más tóxicas que el GP. En conclusión, estos trabajos no han aportado la necesaria seguridad para establecer la inocuidad de su uso o los posibles impactos ambientales, incluyendo el medio acuático. Este último se ve involucrado en tales prácticas por el alcance de los componentes de la mezcla asperjada hasta los cuerpos de agua ya sea por lixiviación y/o escorrentía desde terrenos fumigados o por acción del viento.

Este estudio realizado en Villavicencio, Meta, Colombia, determinó la toxicidad aguda del herbicida Roundup®, del surfactante Cosmoflux® 411F y de la mezcla herbicida-surfactante en ejemplares juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) así como las lesiones en varios órganos ante la exposición a diferentes concentraciones de las sustancias experimentales. Los resultados permiten deducir efectos patológicos y mortalidad causados por la mezcla de tales productos. Sin embargo, el trabajo también aclara que la cachama blanca es una especie relativamente resistente a la toxicidad aguda por Roundup® al comparar la CL₅₀ (concentración letal para el 50% de la población) con lo reportado para otros teleósteos cuando se aplica por separado, pero la CL₅₀ de la mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F evidencia claramente un efecto sinérgico entre los compuestos asperjados. Adicionalmente, y tal vez uno de los hallazgos más relevantes, tiene que ver con la observación de cambios degenerativos en los somas neuronales en el telencefalo lo cual sugiere un importante campo de investigación en el que se hace pertinente dilucidar la(s) vía(s) por la(s) cual(es) los componentes del Roundup® y el Cosmoflux® 411F acceden al sistema nervioso central (SNC) y establecer los mecanismos por los cuales ocurre el daño neuronal. Dado que las lesiones en el SNC se manifestaron incluso en las concentraciones experimentales más bajas es posible que aquellas se desarrollen ante exposiciones crónicas o sub-crónicas, es decir, a las posibles concentraciones que habitualmente se manejan en el medio acuático en las zonas donde se usa la mezcla, lo cual puede afectar la supervivencia de los animales en el medio natural al afectar los procesos de olfacción de los peces -dado que el GP afecta el telencéfalo- así como el comportamiento individual y grupal, incidir en el desempeño reproductivo y tener repercusiones a nivel poblacional.

Los autores desean expresar su agradecimiento por el apoyo recibido

tanto en soporte bibliográfico, discusión y evaluación de los resultados: a entidades y personas, tanto en la Universidad de los Llanos: Institutos de Acuicultura (IALL) e Investigaciones (IIOC), como de Universidades, en Colombia y en otros países tales como: **Michael A. Lewis**, Battelle, Environmental Biology and Assessment, USA; **Pedro M. Anastácio** (Profesor auxiliar), IMAR - Institute of Marine Research, Department of Ecology, University of Evora, Portugal; **Anneclaire J. De Roos** (Profesor asistente), University of Washington, USA; **Julie Marc**, Station Biologique de Roscoff, Cycle Cellulaire et Développement, Unité Mer & Santé, Centre National de la Recherche Scientifique and Université Pierre et Marie Curie, Roscoff, Francia; **Valeria Mezzanotte**, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio Università degli Studi di Milano Bicocca, Italia; **William S. Baldwin**, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, University Avenue, El Paso, USA; **Ryoko Kuruto-Niwa**, Laboratory of Microbiology and Host Defenses, School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Japón; **Rensuke Goto**, Laboratory of Radiation Biology, University of Shizuoka, Japan; **Ilaria Corsi**, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Siena, Via delle Cerchia, Siena, Italia; **Evens Emmanuel**, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, École Nationale des Travaux Publics de l'État, France et Laboratoire d'Analyse Environnementale des Procédés et Systèmes Industriels, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Francia; **Scott Belanger**, Environmental Science Department, The Procter & Gamble Company, Miami Valley Laboratory, Cincinnati, USA; **Liliana Gianfreda**, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente, Sezione Scienze Chimico-Agrarie, Università di Napoli Federico II, Italia; **Dick Vethaak**, Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), The Hague, The Netherlands; **Lee Man Chu** (Profesor asociado), Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, China; **James J. Anderson**, Columbia Basin Research, School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, USA; **Joe Eugene Lepo** (Profesor asociado), Center for Environmental Diagnostics and Bioremediation and, Department of Biology, University of West Florida; **Eliahu Zlotkin**, Department of Animal and Cell Biology, Alexander Silberman Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Israel; **Albertinka J. Murk**, Wageningen University—Toxicology Group, the Netherlands; **Vivian R. Dayeh**, Department of Biology, University of Waterloo, Canada;

Hans Sanderson, Director, Environmental Safety US Soap & Detergent Association, Washington, USA; **Kevin J. Buhl**, USGS, BRD, Columbia Environmental Research Center, Field Research Station, USA; **Matt D. Busse**, Pacific Southwest Research Station, USDA Forest Service, USA; **Dana Kolpin**, Geological Survey, USA; **Shigehiko Urawa**, Genetics Section, National Salmon Resources Center, Japón; **John Mallatt**, School of Biological Sciences, and Basic Medical Sciences, Washington State University, USA; **Juliana Molinari**, Canadian Wildlife Service; al grupo de Pato-biología acuática de la Universidad Nacional de Colombia; al Dr. **Jorge Ossa Londoño** de la Universidad de Antioquía. De igual manera, agradecemos el apoyo de los estudiantes del Grupo de Sanidad de peces de Unillanos y expresamos especial y profundo reconocimiento al Dr. **Jaime Fernando González** del Laboratorio de Toxicología Acuática la Universidad Nacional de Colombia, y a la Dra. **Anne-Lise Haenni** de las Universidades de París, Polonia y Antioquia por la lectura de los manuscritos de resultados y sus acertadas correcciones, recomendaciones y comentarios. Por último, expresamos nuestro agradecimiento al Profesor Dr. **Carlos Iregui Castro** del Grupo de Pato-biología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia y al Profesor **Nayib Camacho** de la Facultad de Ciencias Básicas de Unillanos por sus aportes a la revisión idiomática del texto.

Finalmente, tenemos claro que esta obra es apenas el inicio de un camino, aspiramos seguir contando con la cooperación y el apoyo de personas, instituciones y organizaciones comprometidas con el futuro de la biodiversidad amazinoquense como patrimonio de la humanidad, aspiramos a que los resultados sean tenidos en cuenta por quienes toman decisiones al intervenir sobre los recursos naturales, siendo evidente que la Universidad cumple su misión cuando genera conocimiento, ideas y reflexiones apropiadas a su contexto. Sin embargo, para el beneficio de la sociedad en su conjunto no basta conocer o saber, hay que tener la voluntad de obrar en consecuencia con los nuevos argumentos.

Palabras clave: Toxicología acuática, toxicidad aguda, glifosato, surfactantes, ecosistemas acuáticos, cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

.....

.....

ONTENIDO

.....

Capítulo I

Contexto	17
Retrospectiva de la política de aspersión	17
Condiciones particulares del uso de la mezcla Roundup® Ultra más Cosmoflux® 411F en la erradicación de cultivos ilícitos	20
Comportamiento histórico de los cultivos	21
Impacto ambiental	23
Fumigación y población indígena	25
Soporte científico de las aspersiones	26
Malestar fronterizo	30
GLIFOSATO, ROUNDUP® Y COSMOFLUX® 411F :	34
NATURALEZA Y EFECTOS	34
Estructura y propiedades del glifosato	34
Acción en plantas	34
Composición del Roundup®	36
GLIFOSATO, ROUNDUP®, SUELO Y MICROORGANISMOS	37
Efectos del glifosato y del Roundup® en ecosistemas acuáticos	39
Disrupción endocrina	43
Carcinogénesis	43
SURFACTANTES	44
COSMOFLUX® 411F	48
Modo de acción del Cosmoflux® 411F	49
Toxicidad	49

Capítulo II

Concentraciones de exposición	56
-------------------------------------	----

Capítulo III

Parámetros de calidad del agua	61
Manifestaciones clínicas	62
Concentración Letal 50 (CL50)	63
Hallazgos de necropsia	63
Hallazgos histopatológicos	65

Capítulo IV

EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN A	76
CONCENTRACIONES SUBLETALES	76
Parámetros de calidad del agua	76
Comportamiento	76
Hallazgos Histopatológicos	77
Experimento para la determinación de la CL ₅₀	78
Hallazgos de necropsia	79
Hallazgos histopatológicos de la CL ₅₀	80

Capítulo V

Parámetros de calidad del agua	88
Manifestaciones clínicas	88
Concentración letal 50 (CL ₅₀)	89
Hallazgos de necropsia	90
Hallazgos histopatológicos	91

Capítulo VI

Manifestaciones clínicas	100
CL ₅₀	101
Roundup®	101
Cosmoflux® 411F.	102
Mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F	102
Hallazgos de necropsia e histopatología	103

Capítulo VII

Conclusiones y Recomendaciones	117
--------------------------------------	-----

Bibliografía	123
---------------------------	-----

A propósito de la obra...	141
--	-----

Capítulo I

*M*ARCO CONTEXTUAL

Contexto

En Colombia, el crecimiento paulatino de cultivos de coca y amapola en los últimos años, como sustento evidente de los grupos armados ilegales, ha llevado a que las políticas de control se encaminen a la erradicación de dichos cultivos. La estrategia de erradicación, como se estipula en el Plan Colombia, está basada en la aspersión aérea del glifosato (GP) bajo la presentación comercial Roundup® Ultra, en combinación con sustancias surfactantes, gracias a su efectividad y a la facilidad de su uso. Aun cuando se han propuesto alternativas de erradicación como los métodos manuales estas son limitadas debido a las condiciones de seguridad para el desarrollo de las mismas.

Retrospectiva de la política de aspersión

La política de aspersión de cultivos ilícitos en Colombia inició en la década de 1970, debido a la gran producción nacional de marihuana. Desde ese entonces, las prácticas de cultivo de marihuana, coca y amapola y la distribución de coca y opio/heroína han constituido un objetivo de intervención del gobierno colombiano a través de un programa nacional de control y erradicación de cultivos ilícitos, coordinado por la Dirección Nacional de Estupefacientes (DNE). A lo largo de esa década Estados Unidos presionó para la instauración de la fumigación con el herbicida Paraquat®. A pesar de la no autorización de las fumigaciones, se hicieron algunos experimentos con dicho herbicida

.....

en la sierra Nevada de Santa Marta. En 1984, ante la escalada narcoterrorista en el país, el presidente Belisario Betancourt (1982-1986), reforzó la lucha contra la producción de drogas, permitiendo la aspersión aérea con GP en el mismo lugar. De esa forma se erradicaron 12.000 ha de marihuana con aparentes buenos resultados. No obstante, los cultivos simplemente se trasladaron a otros sectores y para 1988 Colombia volvió a ser nuevamente la primera exportadora. Paralelamente, en 1985, se decidió iniciar la fumigación de los cultivos de coca con el herbicida Garlon® 4 el cual, debido a sus efectos y la negativa de su fabricante para seguir distribuyéndolo, fue discontinuado. Bajo la presidencia de Virgilio Barco (1986-1990), un año después bajo la de su sucesor Cesar Gaviria (1990-1994), las aspersiones aéreas descendieron debido principalmente al enfoque de la lucha contra las drogas sobre los grandes carteles que manejaban el negocio. Esto continuó durante el gobierno de Ernesto Samper (1994-1998), aunque debido al *boom* de la amapola desde 1991 y el continuo crecimiento de los cultivos de coca desde la década de los años ochenta, se hizo más énfasis en la fumigación, se ensayó también el Imazapyr y se proyectó el uso del Tebuthiuron¹.

Pese al incremento en las prácticas de aspersión bajo el gobierno de Samper los cultivos de coca aumentaron sustancialmente (los cultivos de amapola disminuyeron hasta 6.500 ha en 1995, cifra alrededor de la cual han girado en los últimos años). Sin embargo, el uso de estos herbicidas generó una polémica entre las autoridades antinarcóticos, científicas, académicas, ambientalistas, por lo cual el gobierno colombiano decidió dejar tales herbicidas en período de prueba, al igual que el Imazapyr, y empezar la preparación de un Plan de Manejo Ambiental para las aspersiones con GP.

A partir de 1997, el programa de erradicación de cultivos de coca y amapola se apoyó en el proyecto de detección remota para la identificación de cultivos ilícitos el cual inició cubriendo algunas zonas de los departamentos de Guaviare, Vaupés y Vichada. Posteriormente, el proyecto fue ampliado bajo la denominación Sistema Integrado de Monitoreo de Cultivos Ilícitos (SIMCI) el cual logró cubrir la totalidad del territorio nacional en el año 2001, permitiendo la identificación y cuantificación

¹ Gamboa Gutiérrez, L. “Ni una sola mata de coca”: Las políticas de erradicación de cultivos ilícitos en Colombia (1998-2002). Facultad de Ciencias Humanas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

de los cultivos de coca y amapola y el monitoreo de la tendencia de los mismos usando imágenes satelitales y fotografías aéreas².

Desde 1992, se inició la práctica de aspersión con GP bajo la presentación comercial Roundup® Ultra por aplicación aérea previa aprobación por el Consejo Nacional de Estupefacientes (CNE) para el control de los cultivos de amapola. En 1994, su uso se extendió a los cultivos de coca mediante aprobación del Ministerio de Salud. En su comienzo, las prácticas de aspersión estuvieron limitadas a lotes de más de 2 ha bajo la resolución No. 0001 de Febrero de 1994 emitida por el CNE excluyendo de estas prácticas a aquellos cultivos establecidos en áreas de manejo especial y reservas naturales en los cuales se aprobó la erradicación manual o mecánica. Sin embargo, en el año 2000 con la resolución No. 0005 se amplió la cobertura de aspersión a cultivos fraccionados (cultivos divididos con barreras vivas y/o artificiales, plantaciones lícitas, cultivos de pancoger o bosque nativo) y/o mezclados (lícitos e ilícitos) y con la resolución No. 0013 del 27 de junio de 2003 fueron habilitadas las aspersiones aéreas sobre cultivos establecidos en áreas de manejo especial y reservas naturales.

Durante el mandato presidencial de Andrés Pastrana el gobierno buscó por medio de visitas diplomáticas a los Estados Unidos, que junto con otros países, se apoyara económicamente el “Plan Marshall” que enfocaría sus esfuerzos en la sustitución por cultivos lícitos, sin embargo fue infructuosa. A mediados de 2000 se aprobó el Plan Colombia cuyo eje central es la lucha contra el narcotráfico por medio de la erradicación forzosa de los cultivos ilícitos, lo que causó(a) un gran revuelo entre organizaciones no gubernamentales (ONG), académicas y ambientalistas. Las críticas aumentaron cuando se desató la discusión a mediados del 2000, acerca de la posible experimentación y posterior uso del hongo *Fusarium oxysporum* en territorio colombiano lo cual podría resultar peligroso, debido a la imposibilidad de predecir sus efectos, o controlarlos dado el caso. Las fumigaciones continuaron principalmente en el Putumayo, durante la primera fase del Plan Colombia; allí también se desarrollaron los primeros pactos de erradicación manual³.

² UNDCP. Colombia, Annual coca cultivation survey 2001. Illicit crop monitoring system Colombia. March, 2002.

³ *Ibidem* Gamboa Gutiérrez

Los resultados del Plan Colombia a lo largo del 2001 no presentaron un panorama muy alentador. Las cifras fueron claras: a pesar de las fumigaciones y los pocos pactos de erradicación manual, éstos habían aumentado notablemente a lo largo y ancho del país.

Tras la posesión de Álvaro Uribe Vélez, con su política de “mano dura”, como presidente en agosto de 2002, nuevamente se presentaron denuncias por las fumigaciones, el mal manejo de los agroquímicos y el incumplimiento de normas ambientales, unidas a amenazas de marchas y bloqueos por parte de los cultivadores y exigencias de ONG’s y organismos como la Defensoría del Pueblo, de suspender las aspersiones. Estas protestas, al igual que en años anteriores, no tuvieron repercusión alguna.

En el año (2002) se presentó el informe del Departamento de Estado norteamericano⁴, en donde se le asegura al congreso del mismo país, que el herbicida es inofensivo para animales terrestres y humanos exceptuando una pequeña irritación en los ojos. Asevera que la erosión que causa es mínima permitiendo a las plantas crecer nuevamente en poco tiempo puesto que sólo permanece por un período largo en el agua. También afirma que los parámetros de fumigación, desde la preparación del químico hasta la aspersión misma, son seguros y se realizan evitando hacer mayor daño al ambiente. A pesar de las críticas a este informe por diversas organizaciones nacionales e internacionales el congreso norteamericano autoriza la ayuda condicionada al plan Colombia.

La política del nuevo gobierno, cuya bandera es la seguridad del país, consiste en acabar lo más rápido posible con los cultivos, para eliminar la fuente de financiación de la guerrilla y así poder vencerla.

Condiciones particulares del uso de la mezcla Roundup® Ultra más Cosmoflux® 411F en la erradicación de cultivos ilícitos

Inicialmente, el Roundup® Ultra fue asperjado bajo una tasa de 8 L/ha pero a finales del año 2002, el CNE aprobó el incremento de la concentración del herbicida en la mezcla de aspersión hasta 10,4 L/ha

⁴ “Informe sobre el Glifosato”. Notas Actuales. Boletín de la Embajada de Estados Unidos. No. 3. Septiembre de 2002.

sobre cultivos de coca y de 2,5 L/ha para los cultivos de amapola, con el fin de aumentar la eficacia de la mezcla⁵.

La mezcla de aspersión sobre cultivos de coca y amapola se compone de glifosato utilizado bajo la presentación comercial Roundup® Ultra constituyendo el 44% de la mezcla en proporción volumen/volumen lo que determina una concentración de 180 g de glifosato como principio activo por litro de la mezcla. Además se agrega el surfactante no-iónico denominado Cosmoflux® 411F, cuyo uso se realiza únicamente en Colombia, al 1%, y el 55% restante de la mezcla está constituido por agua. La tasa de aspersión de la mezcla sobre los cultivos para el Roundup® Ultra es de 17.6 a 30.8 L/ha. Los parámetros de uso de la mezcla citados anteriormente se contraponen a los establecidos por los fabricantes de estos agroquímicos quienes recomiendan una concentración de 1.6 a 7.7% de Roundup® Ultra en la mezcla y una tasa de aspersión de 2.8 L/ha ^{6,7}.

Comportamiento histórico de los cultivos

En la tabla 1 se describe el comportamiento de los cultivos de coca desde 1994 hasta el año 2004. Es evidente el poco efecto que sobre ellas han tenido las prácticas de aspersión de la mezcla en tanto que no han logrado reducir sustancialmente o frenar el cultivo de la coca. Año tras año han surgido nuevos cultivos, como fue evidenciado en la evaluación de los lotes sembrados con coca en el año 2004 comparado con los lotes asperjados en el 2003, en donde el 62% de ellos constituían nuevas hectáreas sembradas. A pesar de que en el 2002 se comenzó a utilizar una mayor concentración del Roundup® Ultra en la mezcla y que según el Informe de Naciones Unidas-Oficina contra la droga y el delito del 2005 se fumigaron más hectáreas que las censadas por el SIMCI correspondiente a un 48% más de las hectáreas cultivadas con coca, no se logró una reducción significativa. Ello refleja la gran movilidad que tienen estos cultivos y el incentivo económico en que redundan las prácticas de aspersión, comportamiento que ha sido denominado

⁵ UNODC-Gobierno de Colombia. Censo de cultivos de coca 2004. Junio de 2005.

⁶ Oldham J, Massey R, Cryan P. Aerial spraying in Colombia: health and environmental effects. The Institute for Science & Interdisciplinary Studies. Fact Sheet. 2002. 4 p.

⁷ BINLFA. Report on issues related on the aerial eradication of illicit coca in Colombia. Released by the Bureau for International Narcotics and Law Enforcement Affairs. 2002.

“fenómeno globo”. En la medida que la demanda mundial del consumo de drogas se ha incrementado considerablemente, principalmente en los países con mayor desarrollo industrial como Estados Unidos, país hacia el cual es destinada la mayor parte de la droga producida en Colombia y de quien recibe aproximadamente el 90% de la droga, la reducción de la oferta induce un alza en el precio del kilogramo de pasta de coca y de la cocaína y ello estimula a los pobladores rurales a establecer nuevos cultivos de coca en áreas no intervenidas generando un desplazamiento de los mismos. El impacto ambiental de este desplazamiento de los cultivos es digno de mención y será discutido más adelante.

Además del desplazamiento de los cultivos, se ha demostrado en algunos departamentos como Caquetá, Guaviare y Vichada, el establecimiento de cultivos más pequeños cuya detección satelital a través del SIMCI se dificulta como fue evidenciado en un Proyecto Piloto desarrollado en Guaviare realizado por la UNODC⁸ en Octubre de 2004 en donde a partir de entrevistas a 55 cultivadores de coca se determinó un promedio del tamaño de los lotes de 0.72 ha. Aunque no son suficientemente representativos, los datos que arrojó este proyecto, vislumbran discrepancias con el tamaño promedio de los lotes de 1.2 ha obtenido con las imágenes satelitales del SIMCI. A esta tendencia está aunada el establecimiento de cultivos fraccionados y/o mezclados lo cual tiene consecuencias de consideración sobre la población de animales, plantas y microbiota silvestre, y la calidad de las aguas y el suelo en áreas de importancia para la conservación de la biodiversidad y otras zonas de importancia medio ambiental así como sobre la seguridad alimentaria en zonas rurales alejadas de los cascos urbanos en la medida que se ven afectados también cultivos de pancoger que abastecen las necesidades alimenticias locales.

Frente a esto se debe recalcar que desde la década de 1970, la Sierra de la Macarena y la Sierra Nevada de Santa Marta sirvieron de base para los primeros cultivos ilegales en el país lo que estimuló una fuerte oleada de colonización propia de la bonanza. Desde entonces, se han consolidado extensas áreas de cultivos ilícitos en estos y otros parques nacionales y reservas naturales de modo que para el año 2004, 13

⁸ *Ibidem* UNODC.

parques naturales se vieron afectados por los cultivos de coca según la UNODC⁹, hallándose el nivel más alto en el Parque Nacional de la Sierra de la Macarena.

Tabla 1. Comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde 1994 al 2004, hectáreas asperjadas y cantidad de Roundup® Ultra utilizado en dichas prácticas.

Año	Hectáreas de coca cultivadas	Hectáreas de coca asperjadas	Hectáreas de amapola cultivadas	Hectáreas de amapola asperjadas	Cantidad de Roundup® Ultra utilizado (L)
1994	45.000 ^b	3.871 ^a	14.167 ^b	5.101 ^b	
1995	50.900 ^b	23.915 ^a	20.274 ^b	3.466 ^a	
1996	67.200 ^b	18.519 ^a	6.540 ^b	6.885 ^a	
1997	79.500 ^b	41.861 ^a	6.300 ^b	6.988 ^a	
1998	106.000 ^b	66.029 ^a	6.600 ^b	2.901 ^a	
1999	160.119 ^a	43.111 ^a	6.600 ^b	8.249 ^a	
2000	162.510 ^a	58.073 ^a	6.500 ^b	9.254 ^a	603.970 ^c
2001	144.807 ^a	94.153 ^a	6.200 ^b	2.066 ^a	984.848 ^c
2002	102.071 ^a	130.364 ^a	4.153 ^a	3.371 ^a	1'061.538 ^c
2003	86.340 ^a	132.817 ^a	4.026 ^a	2.995 ^a	1'381.296 ^c
2004	80.350 ^a	136.552 ^a	3.950 ^a	3.061 ^a	1'420.130 ^c

a Datos tomados del Informe de Naciones Unidas-Oficina Contra la Droga y el Delito. Colombia, Censo de Cultivos de Coca 2004. Junio de 2005.

b Datos tomados de UNDCP. COLOMBIA, Annual Coca Cultivation Survey 2001. Illicit Crop Monitoring System Colombia. March 2002.

c Datos tomados del informe de Solomon, K., Anadón, A., Cerdeira, A. L., Marshall, J., Sanín, L. H. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América, 31 de marzo de 2005.

Impacto ambiental

La estrecha relación entre los cultivos de coca y amapola y las áreas de parques naturales y reservas forestales hace necesario analizar los efectos desencadenados en estos ecosistemas.

En general, las áreas de reserva forestal se caracterizan por poseer suelos muy frágiles, pobres en nutrientes, no aptos para la ganadería ni la agricultura. Estos ecosistemas forestales han sido afectados por procesos

⁹ *Ibidem* UNODC.

de deforestación asociados a movimientos de colonización, establecimiento de cultivos ilícitos y construcción de pistas de aterrizaje. Se ha estimado que por cada hectárea de coca se deforestan aproximadamente 4 ha de bosque y 2.5 ha por cada hectárea de amapola¹⁰. Otros procesos asociados al establecimiento de los cultivos ilícitos incluyen quema y erosión de los suelos de bosque; contaminación con sustancias empleadas en la elaboración de la base de coca, en la cual, según la Dirección de Policía Antinarcóticos, se utilizan 440 L de gasolina por hectárea de coca, 4 L/ha de ácido sulfúrico, 2 L/ha de permanganato de potasio y 3 L/ha de amoníaco, entre otros. Los vertimientos a partir del procesamiento de la hoja de coca están constituidos por ácido sulfúrico (1,9 L por Kg de base de coca), amoníaco (1,25 L por Kg de base de coca) y aguas residuales contaminadas (193,75 L por Kg de base de coca). Se ha estimado que entre 1999 y el 2001 se vertieron al medio 152.463 L de ácido sulfúrico y amoníaco, 9.377.694 L de aguas residuales del procesamiento y 30.250.625 Kg de residuos de hoja de coca contaminados¹¹.

Aunque se ha venido justificando la práctica de fumigación bajo los parámetros establecidos en Colombia sobre cultivos de coca y amapola con base en su riesgo relativamente menor, no es posible mirar esta práctica con tolerancia, mas aún cuando no ha sido soportada en estudios científicos que avalen su inocuidad y existe un gran número de artículos científicos que advierten sobre el riesgo de la contaminación con Roundup® sobre poblaciones animales y humanas así como las consecuencias directas e indirectas de esta práctica sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres.

Recientemente, Álvarez (2002)¹² puso en evidencia la amenaza potencial que existe sobre la biodiversidad de aves a partir de los establecimientos de cultivos de coca y amapola en áreas de bosque, los cuales están asentados principalmente en zonas de alta biodiversidad correspondiendo a 101.850 ha abarcando el 62,3% de las 162.510 ha

¹⁰ Correa, H. D., Ruiz, S. L., Arévalo, L. M. (eds.) 2006. Plan de acción en biodiversidad de la cuenca del Orinoco-Colombia/2005-2015-Propuesta técnica. Bogotá. D. C.: Corporinoquia, Cormacarena, IAvH, Unitrópico, Fundación Horizonte Verde, Universidad Javeriana, Unillanos, WWF-Colombia, GTZ-Colombia, Bogotá, D: C., 330 p.

¹¹ Ramos R.E. & Ramos B. Evaluación Ambiental del Impacto de cultivos de Coca y el procesamiento de la hoja de coca. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Disponible en: www.cultivosilicitoscolombia.gov.co/documentos/eval_ambiental.pdf

¹² Álvarez, M.D., 2002. Illicit crops and bird conservation priorities in Colombia. *Conserv. Biol.* 16, 1086-1096.

censadas en el 2000, de las cuales la mayor parte se encuentra en el Amazonas, correspondiendo a 78.800 ha. Las restantes hectáreas se encuentran ubicadas principalmente en áreas forestales del sur y noroccidente de los Andes y tierras bajas adyacentes al Darién, así como en la sierra Nevada de Santa Marta, la serranía del Perijá y la serranía de San Lucas.

Lo anterior contrasta con lo reportado en el informe de Solomon *et al.* (2005) quienes textualmente dicen “Dado que los puntos críticos de la diversidad se asocian principalmente con las tierras altas de los Andes y que la coca se cultiva en su gran mayoría en altitudes más bajas, existe tan sólo algo de superposición entre las áreas de producción de coca y las regiones de gran biodiversidad. La amapola se cultiva a mayores altitudes, que sí se superponen con los puntos críticos de la biodiversidad; no obstante, el total de las áreas cultivadas en la actualidad es pequeño”. Actualmente, el riesgo de expansión de los cultivos de coca y amapola a otras áreas de reserva forestal y de importancia para conservación de la biodiversidad de la fauna y la flora es alto en tanto que las características de altitud (1000 a 2000 msnm) y de precipitación (1000 a 4200 mm) necesarias para los cultivos ilícitos son halladas en los bosques de la sierra Nevada de Santa Marta, la serranía del Perijá, el noroccidente de los Andes, el Darién y la serranía de San Lucas, así como en el Amazonas.

Una aproximación detallada sobre los efectos del glifosato y los surfactantes presentes en la mezcla de aspersión será emprendida más adelante.

Fumigación y población indígena

La población indígena se ha convertido en “blanco” de las fumigaciones aéreas, no solo por el impacto de las mismas sobre su salud sino también por la alteración de sus cultivos de pancoger. Aun cuando ha habido pronunciamientos, la consideración de sus peticiones se subordina a la política de erradicación. “La fumigación mediante el herbicida glifosato no impide el cultivo de la coca” sostuvieron 20 dirigentes indígenas colombianos en una conferencia de prensa en Washington. «La fumigación dañó los cultivos de yuca y caña de azúcar y enfermó a

.....

nuestros hijos», dijo Francisco Tenorio, dirigente de la Organización Indígena Regional de Putumayo.

Hasta el 2006, en la población indígena *Nasa* del Putumayo se reportaron 780 personas afectadas por las fumigaciones aéreas. A esto se le debe sumar que la planta de coca es sagrada para esta etnia, que realiza el curanderismo a través del mambeo¹³. De esta manera, la erradicación manual y controlada de la planta de coca, limitaría los desplazamientos y el desarraigo cultural.

Por otra parte, los indígenas de la etnia *Eperara Siapidaara* en las selvas noroccidentales de Nariño, poblaciones San José de Robles, Tórtola y Casa Grande del resguardo indígena de San José de Bacao, han sido afectados con la fumigación, en la población infantil se han presentado episodios de vómito y diarrea, así como lesiones cutáneas y episodios de fiebre acompañada de dificultad respiratoria. Los individuos fueron conducidos al Centro de Salud de Olaya Herrera, y los más graves fueron remitidos al hospital de Tumaco. Tres niños murieron, 17 más resultaron afectados. Según el censo de Aciesna, la Asociación de Cabildos Indígenas *Eperara Siapidaara* de Nariño, se perdieron 108.337 plantas de plátano, banano, papa china, yuca, caña, chilma, limón, coco, zapote, naranja, chontaduro, cacao y maderables¹⁵.

Soporte científico de las aspersiones

Aunque las aspersiones con Roundup® Ultra se han venido realizando de forma oficial por parte del gobierno sobre los cultivos de coca y amapola desde 1992, no fue sino hasta el 2005 cuando el Gobierno Nacional ordenó adelantar un estudio que evaluara el impacto de las aspersiones con la mezcla Roundup® Ultra más Cosmoflux® 411F sobre la salud humana y ambiental. El informe final de dicho estudio¹⁴ denominado “Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente” (Solomon *et al.*, 2005) preparado por la Comisión Interamericana para el Control

¹³ Muyuy Jacanamejoy, G. Defensor Delegado para Indígenas y Minorías Étnicas. Intervención de la defensoría del pueblo en el día internacional de las poblaciones indígenas. Agosto 8 de 2003

¹⁴ Solomon, K.R., Anadón, A., Cerdeira, A.L., Marshall, J., Sanín, L.H., 2005. Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América. 143 p.

.....

del Abuso de Drogas (CICAD), asegura que tales aspersiones son inocuas para la población humana y el medio ambiente, sin embargo, dicho estudio ha sido cuestionado con argumentos metodológicos, técnicos y científicos por diferentes grupos de investigación en Colombia y en otros países¹⁵.

De modo general, el informe de Solomon *et al.* (2005) constituye una revisión y análisis de literatura sesgados al tomar en consideración sólo aquellos estudios que reportan una baja toxicidad del glifosato sobre la salud animal, humana y ambiental sin tener en cuenta las condiciones particulares de uso en las aspersiones y la co-exposición a los surfactantes POEA (Polioxietilamina) y Cosmoflux® 411F.

El análisis de este informe visto con mayor profundidad permite establecer una duda razonable sobre sus conclusiones basado en los siguientes aspectos:

Dice el informe “...los riesgos para las personas y para la salud humana del uso de glifosato y Cosmoflux® 411F en la erradicación de coca y amapola en Colombia eran mínimos”. Esto es concluido con base en supuestos elaborados a partir de información sobre toxicidad del Roundup® a concentraciones y tasas de aspersión utilizadas normalmente en prácticas agrícolas, condiciones en las que no son utilizadas las mismas proporciones del producto con aditivos como el Cosmoflux® 411F, como lo dice el mismo informe: “Se estimaron las exposiciones de personas al glifosato de los estudios extensos y bien documentados en otros territorios y se cree que son precisos con respecto a los circunstantes que recibieron directamente la aspersión”. Adicionalmente, el análisis de riesgos es fundamentado solamente en los efectos que ocasiona el glifosato, cuya toxicidad *per se* ha demostrado ser muy baja, sin realizar un análisis del riesgo de co-exposición al surfactante POEA, presente en el herbicida Roundup® Ultra, y al surfactante Cosmoflux® 411F, sustancias que modifican la toxicidad del glifosato. Del mismo modo, el análisis está soportado en periodos cortos de exposición dejando a un lado el riesgo, reportado en algunos estudios (Marc *et al.*, 2002, 2003, 2004a, 2004b; De Roos *et al.*, 2005), de

¹⁵ León Sicard, T., Burgos Salcedo, J., Toro Pérez, C., Luengas Baquero, C., Ruiz Rojas, C. N., Romero Hernández, C. P. Observaciones al “Estudio de los efectos del programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente”. Instituto de Estudios Ambientales (IDEA), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, mayo 11 de 2005.

desarrollo de procesos neoplásicos, mutaciones y alteraciones del desarrollo ante exposiciones crónicas y subcrónicas a bajas concentraciones.

Luego concluyen que “los riesgos para el ambiente del uso del glifosato y el Cosmoflux® 411F en la erradicación de la coca y la amapola en Colombia eran pequeños en la mayoría de las circunstancias” establecido a partir de la ausencia de contaminación con glifosato en los cuerpos de agua muestreados respecto a lo cual en el mismo trabajo dicen “El muestreo de las aguas superficiales solamente se llevó a cabo durante un periodo de 24 semanas y únicamente en 5 localidades se tomaron muestras de esta forma. Aunque dos de ellas estaban programadas para ser asperjadas, sólo un sitio fue tratado durante el periodo de muestreo. Por razones de logística, no fue tampoco posible obtener muestras de sitios cercanos a los de aplicación”. De los 5 sitios muestreados en solo dos de ellos había plantaciones cercanas de coca y en uno de ellos se realizaron prácticas de aspersión. No obstante, no se describe la relación del río muestreado (si el río irriga o recibe afluentes de terrenos asperjados) con los campos asperjados ni la diferencia en tiempo entre el evento de aspersión y el muestreo del agua. Adicionalmente, la descripción del otro sitio donde se hallaban cultivos de coca, el que corresponde al río Mansoya en Putumayo (N 26° 43,259', O 80° 5,634', según el mismo informe) no se encuentra dentro de las coordenadas geográficas del territorio colombiano (N 12°26'46", S 4°12'30", E 60°50'54", O 79°2'33"). Aún más, sólo determinan la concentración del glifosato y su metabolito AMPA (ácido aminometilfosfónico), dejando a un lado la determinación de los surfactantes POEA y Cosmoflux® 411F, y el muestreo se realiza solamente en agua superficial, mas no en el sedimento. Sin embargo, con base en la propiedad del glifosato de unirse a arcillas y materia orgánica es previsible que en un ecosistema acuático se encuentren concentraciones más altas en el sedimento, lo cual es relevante para organismos acuáticos. Se omite la determinación de concentraciones de glifosato en el suelo arguyendo una baja actividad biológica con base en la rápida recolonización de los terrenos asperjados con plantas invasoras y replantaciones de coca. Se debe resaltar que la presencia de glifosato en el suelo no afecta directamente a las plantas dado que este no se absorbe por la raíz y su efecto del etéreo se da sobre poblaciones microbianas principalmente (Nosorchut, *et al.*, 2001).

Finalmente, concluye el estudio que la adición de Cosmoflux® 411F a la mezcla de aspersión no influye en la toxicidad del glifosato y que el uso de esta mezcla no representa riesgos para la salud humana. Sobre esta afirmación varios aspectos merecen ser considerados basados en los trabajos de toxicidad de la mezcla glifosato más Cosmoflux® 411F reportados:

1. Los autores no establecen la formulación comercial de glifosato utilizada lo cual influye en el resultado final de acuerdo con diferencias en las concentraciones del glifosato y los adyuvantes presentes en las formulaciones.
2. Los estudios efectuados con ratas Sprague Dawley expuestas por inhalación de una concentración de 2.6 mg.l⁻¹ de glifosato no representan las condiciones de exposición de animales pobladores de los campos asperjados en tanto que la concentración evaluada es considerablemente inferior a la hallada en la microgota asperjada (180 g.l⁻¹ de glifosato). No se menciona el Cosmoflux® 411F en ese ensayo.
3. Los estudios de exposición a la mezcla glifosato más Cosmoflux® 411F no se acompañan de exposiciones separadas a los dos agroquímicos, para determinar la influencia del Cosmoflux® 411F sobre la toxicidad del glifosato.

Por otra parte, Sanho Tree (2006), investigador del Instituto de Estudios de Política, de Washington, criticó las políticas concentradas en erradicar y prohibir las drogas. Tree mencionó un estudio del centro de investigación estadounidense Corporación RAND según el cual, en términos financieros, el tratamiento para ayudar a los cocainómanos a abandonar la adicción es diez veces más efectivo que la prohibición de la droga y 23 veces más que intentar erradicar la coca en su fuente. “Si nuestro objetivo final es la reducción del uso de la droga, entonces deberíamos designar más recursos a los programas nacionales para el tratamiento de la adicción, donde cada dólar gastado será 23 veces más eficaz”, propuso Tree.

A parte del estudio preparado por la CICAD (liderado por Solomon en 2005) y del que se presenta más adelante en los capítulos III, IV y V no existen trabajos que evalúen los efectos de la mezcla de aspersión bajo las condiciones particulares de uso practicadas en Colombia. De este

.....

modo, los escasos estudios realizados con tecnologías cuestionables no brindan bases sólidas para aseverar que las prácticas de aspersión no implican riesgo sobre la salud humana, animal y ambiental, y sí mucho que indagar y evaluar sobre los riesgos que implican dichas prácticas.

Malestar fronterizo

Aunque el gobierno colombiano continúa sustentando la decisión del uso de las aspersiones en la supuesta inocuidad del glifosato sobre la salud humana, animal y ambiental, son frecuentes las quejas por parte de pobladores rurales colombianos y residentes ecuatorianos de la frontera con Colombia quienes manifiestan el daño a cultivos lícitos (lo que atenta contra la seguridad alimentaria de estas zonas) afectación de animales domésticos y problemas sobre la salud humana. Un ejemplo de ello lo constituye las denuncias provenientes de valle del Guamuez, en el departamento de Putumayo, asentamiento cercano a la frontera donde se reportó el daño a 3.174 ha de cultivos lícitos, afectación de alrededor de 55.045 entre animales de cultivos y de compañía, así como 1551 casos de personas enfermas que han sido expuestas a las fumigaciones. Del mismo modo, del lado ecuatoriano de la frontera para el mismo año se reportó la pérdida de 2.560 ha de cultivos lícitos y la afectación de 11.828 animales y 44 personas en varias poblaciones ecuatorianas asociado a las aspersiones desarrolladas en el departamento de Nariño. En el año 2002, se reportaron numerosas quejas sobre daños a los cultivos lícitos, animales y humanos. Las manifestaciones en las personas que denuncian haber sido afectadas por las aspersiones suelen ser fiebre, diarrea, dolor abdominal, infección respiratoria aguda e infecciones en la piel¹⁶.

Finalizando el año 2006, las aspersiones han continuado. Aunque la Cancillería Ecuatoriana y el Embajador de Ecuador en Colombia, solicitaron el 2 de julio de 2001 se respetara una franja de 8 a 10 Km del lado colombiano en la frontera con Ecuador, en el 2003 una misión de verificación¹⁷ llevada a cabo por integrantes de varias instituciones ha

¹⁶ Maldonado, A., Gallardo, L., Álvarez, T., Pazmiño, J. L., Reyes, D., Chiriboga, G., Moscoso, R., Monge, E., Rodríguez, F., Benalcazar, P., Jiménez, J., Barragán, J. P., Cahuasquí, L., (2002). Informe Misión de Verificación. "Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia".

¹⁷ *Ibidem* Maldonado et al., 2006.

manifestado que las aspersiones se realizan no solo dentro de la franja de 10 Km sino que se asperja directamente en las riberas del río San Miguel, límite norte de la frontera con Colombia e incluso sobre las casas y demuestra una relación temporal directa entre las fumigaciones y la aparición de enfermedades en los pobladores consistentes principalmente en trastornos digestivos, respiratorios y dérmicos, así como una relación directa entre la distancia donde se fumigó y la sintomatología, la cual es menos frecuente hacia zonas más distantes de la frontera. A esto se le suma la reciente decisión de permitir una franja de solo cien metros, declarada por el general Jorge Barón, director de la Policía Antinarcóticos¹⁸. Las aspersiones en la frontera, además de constituir una amenaza para el ambiente y la salud humana como se manifiesta en la Resolución No. DAP-001-2004¹⁹ de la Defensoría del Pueblo de Ecuador donde se declara que las consecuencias de las prácticas de aspersión en la frontera con Ecuador “generan lo que en la doctrina del derecho Ambiental se denomina como daño transfronterizo, que es la lesión, daño o pérdida ambiental ocasionado a las personas o a los bienes que se encuentran en el territorio o jurisdicción de un Estado, por causa atribuible a cualquier actividad humana desarrollada total o parcialmente, en el territorio o jurisdicción de otro Estado”; sino que abordado desde otras perspectivas comprende también una violación a los derechos de las poblaciones indígenas amazónicas dada la estrecha relación existente entre la conservación territorial y la supervivencia de sus costumbres culturales así como un grave atentado a la conservación del medio ambiente, la fauna y la flora silvestre en tanto que los 586 Km de frontera colombo-ecuatoriana abarcan áreas de las selvas amazónica, chocoana y andina. Sin embargo, la seguridad de estas prácticas continúa siendo defendida por el gobierno nacional como lo ha manifestado recientemente el general Jorge Barón, Jefe de la Dirección Antinarcóticos de la Policía Nacional con relación a la protesta del gobierno ecuatoriano en diciembre del presente año por la declaración oficial de fumigar a 100 m de la frontera: “la preparación de las operaciones de aspersión es minuciosa y contamos con los recursos humanos y tecnológicos para garantizarle al país la reducción efectiva

¹⁸ El Tiempo, Diciembre 12 de 2006. “Colombia reanudó la fumigación de cultivos ilícitos en área fronteriza con Ecuador”.

¹⁹ Resolución de la Defensoría del Pueblo. Resolución No. DAP-001-2004. Chávez del Pozo, R., Defensor Adjunto Primero.

de las áreas cultivadas y la protección de las comunidades y la biodiversidad de las zonas afectadas por el narcotráfico”²⁰

En el informe presentado por el médico tropicalista Adolfo Maldonado “Daños genéticos en la frontera de Ecuador por las fumigaciones del plan Colombia”²¹ realizado sobre la población femenina de provincias afectadas por las prácticas de aspersión en la frontera colombo-ecuatoriana se estableció una correlación entre la exposición a la mezcla de aspersión y la presencia de anomalías cromosómicas por medio de la prueba cometa realizada sobre muestras de sangre tomadas entre 15 días y 2 meses después de las aspersiones. Ello demuestra efectos a largo plazo desencadenados a partir de la exposición a la mezcla de aspersión, los cuales son de mayor significancia en la medida que las alteraciones citogenéticas reportadas pueden ser transferidas a la descendencia, desembocar en el desarrollo de procesos neoplásicos, mutaciones y anomalías del desarrollo. Estos hallazgos son respaldados por estudios realizados en Francia por un equipo del Centre National de la Recherche Scientifique y de la Université Pierre et Marie Curie en cabeza de Julie Marc (Marc *et al.*, 2002, 2003, 2004a, 2004b) quienes reportaron el desarrollo de alteraciones en los puntos de control del ciclo celular en células *in vitro* expuestas a glifosato al 0.1% (bajo la presentación Roundup®), lo cual implica que existe un mayor riesgo de que errores que se presenten en la replicación del ADN no sean corregidos y se transfieran a la progenie celular. Lo anterior contrasta con la concentración de glifosato en microgotas de 23.4%. A partir de estos resultados no es apresurado especular sobre efectos semejantes en la población animal terrestre, acuática y aérea. Sin embargo, el gobierno colombiano ha atendido otra clase de estudios que con dudas razonables sobre su rigor científico suponen la inocuidad de la mezcla herbicida-surfactantes.

Respecto al malestar expresado por Ecuador, la Asamblea Permanente de Derechos Humanos (APDH) instó al gobierno ecuatoriano²² a condenar la unilateral decisión colombiana de reiniciar las fumigaciones

²⁰ SNE - Presidencia de la Republica de Colombia. Policía comienza aspersión de cultivos ilícitos en Nariño y Putumayo. 11 de Diciembre de 2006.

²¹ Maldonado, A., (2003). Informe de investigación. Daños genéticos en la frontera de Ecuador por las fumigaciones del plan Colombia.

²² El presidente ecuatoriano, Alfredo Palacio, pidió a la ONU en septiembre del 2005, visitar la zona y realizar un estudio sobre el impacto del glifosato.

aéreas con glifosato en la zona fronteriza colombo-ecuatoriana²³. Ante el silencio de la cancillería quiteña, la APDH reclama²⁴, en un comunicado, rechazar la «criminal política ambiental del vecino país» en la zona limítrofe ecuatoriana. Se ha considerado además que se debe presentar una demanda ante la Corte Internacional de La Haya contra Bogotá por las afectaciones ambientales que ese tóxico ha producido entre los pobladores nacionales. El directivo de la Asociación Latinoamericana de Derechos Humanos (ALDH), Juan de Dios Parra, resaltó que es hora de acudir a las instancias internacionales, pues el país es víctima de una mala vecindad. Lo anterior contrasta con la pasividad de amplios sectores nacionales en Colombia, pues mientras el vecino país hace respetar su soberanía al exigirle al gobierno que se respete la franja de 10 km del lado del territorio colombiano, nuestro gobierno en ejercicio del Plan Colombia continúa asperjando sobre miles de hectáreas de bosque sin revisar los nuevos resultados que contradicen los argumentos usados para autorizar la fumigación. Mientras la aplicación de glifosato en Colombia no está soportada por trabajos rigurosos realizados en nuestro país, otras alternativas a la erradicación, como el uso del hongo *Fusarium oxysporum*, han sido rechazadas pues los riesgos son más grandes que los beneficios que promete. Con base en ello, surge la pregunta ¿cuánto tiempo y recursos se han dedicado a dilucidar científica y técnicamente los posibles efectos del glifosato y sus mezclas?.

Frente a esta problemática el gobierno ecuatoriano ha decidido instaurar un proceso ante la Corte internacional de la Haya, con el fin de solucionar el conflicto fronterizo entre los países; sin embargo, Colombia busca una salida concertada del mismo.

²³ "Teniendo en cuenta que esta suspensión temporal cumple un año y que ha resultado en un sustancial incremento en dicha franja de cultivos ilícitos (...) el Gobierno de Colombia ha tomado la decisión de reiniciar las labores de aspersión...", señala un comunicado de la Cancillería de Colombia.

²⁴ Centro de Medios Independientes de Ecuador. 13 de diciembre de 2006. "Reinician fumigaciones en frontera".

GLIFOSATO, ROUNDUP® Y COSMOFLUX® 411F : NATURALEZA Y EFECTOS

Estructura y propiedades del glifosato

El glifosato, N-fosfonometil glicina (Figura 1) es un herbicida no selectivo de amplio espectro (Alibhai & Stallings, 2001) de carácter ácido con clase II de toxicidad (moderadamente tóxico), según la categorización de la U.S. EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) (WHO, 1994).

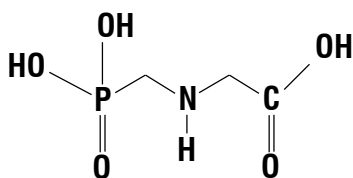


Figura 1. Estructura molecular del glifosato (N-fosfonometil-glicina).

Fuente: Kegley *et al.* (1999).

Es altamente soluble en agua, con un coeficiente de partición octanol/agua de -3.2 a 25°C (Cox, 1998), presente en estado iónico en solución y no se volatiliza del suelo ni del agua (WHO, 1994).

Es utilizado en la práctica agrícola como herbicida de uso general para el control de plantas anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas (WHO, 1994).

Acción en plantas

El glifosato ingresa a la planta a través de las hojas y es translocado a otras partes donde es poco metabolizado (Monheit, 2003). Ha sido encontrado en fresas (Cessna & Cain, 1992), arándano, frambuesas, (WHO, 1994), lechuga, zanahorias y cebada después de la aplicación (Cox, 1998).

El glifosato ejerce su acción herbicida mediante la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esenciales - triptófano, fenilalanina y tirosina - en las plantas a través de la inhibición de una

enzima de la vía del chikimato (Figura 2) denominada 5-enolpiruvilchikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), lo cual reduce la producción de proteína e inhibe el crecimiento de la misma (Williams *et al.*, 2000; Haney *et al.*, 2002).

La reacción catalizada por la EPSPS es el penúltimo paso en la vía del chikimato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios incluyendo tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (Alibhai & Stallings, 2001).

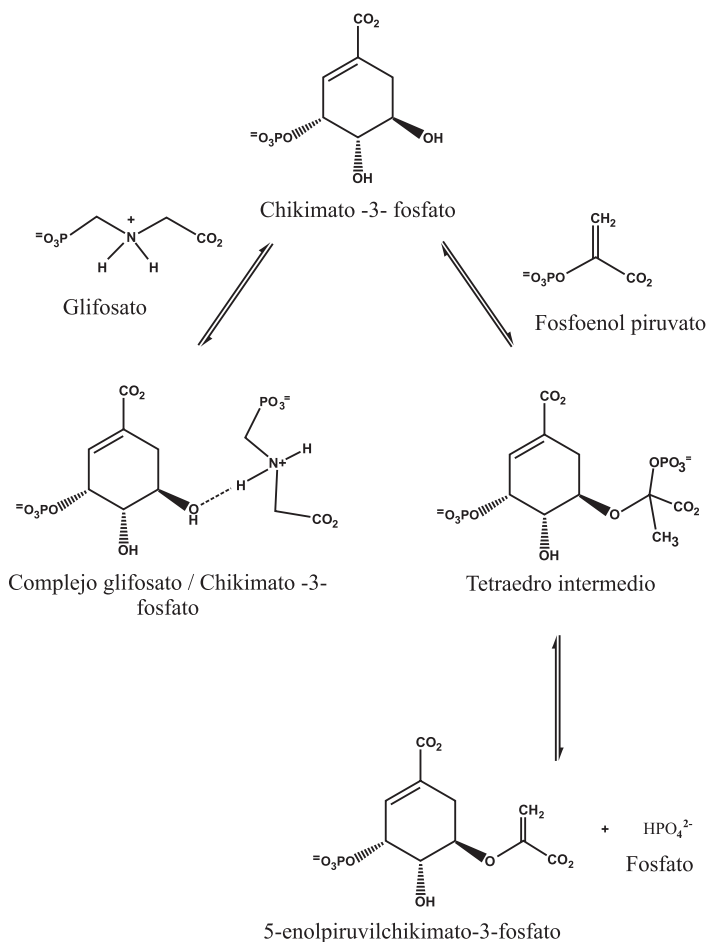


Figura 2. Mecanismo de inhibición de la vía del chikimato por el glifosato.
Fuente: Alibhai & Stallings, 2001.

La vía del ácido chikímico, presente en plantas y microorganismos, no se encuentra en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos (Alibhai & Stallings, 2001). El glifosato puede afectar otras dos enzimas relacionadas con la vía del chikimato: la clorismato mutasa y prefrenato hidratasa. Además, puede afectar otras enzimas no relacionadas con la vía del chikimato; por ejemplo, en la caña de azúcar reduce la actividad de una de las enzimas involucradas en el metabolismo del azúcar, la ácido invertasa (Cox, 1998).

Composición del Roundup®

El glifosato es el principio activo del producto comercial Roundup® (48% de sal ácida isopropilamina de glifosato, 15% de surfactante polioxietilamina (POEA) y 37% de agua (Oldham *et al.*, 2002).

En Colombia, en las prácticas de erradicación química de cultivos de coca y amapola se ha venido utilizando una presentación comercial glifosato denominada Roundup® Ultra la cual difiere en la concentración de sus componentes, presentando 41,5% de glifosato y 16% de POEA (MONSANTO, 2005).

En cuanto al surfactante POEA se compone de múltiples unidades etoxi ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) y un grupo funcional amina (Nivia, 2001a). Es adicionado a la formulación herbicida para facilitar la acción del glifosato dado que le permite adherirse y atravesar la superficie cuticular de las hojas. Aunque es descrito como un ingrediente inerte, el POEA es más tóxico que el glifosato y le confiere al Roundup® características toxicológicas diferentes a las del glifosato (Folmar *et al.*, 1979; Servizi *et al.*, 1987).

La utilización del Roundup® Ultra mediante aspersión aérea de cultivos ilícitos dificulta su aplicación en áreas específicas, posibilitando su llegada hasta cultivos lícitos, fauna silvestre y cuerpos de agua por acción del viento, siendo dependiente de las condiciones meteorológicas, la altura de aspersión y dispersión de la solución (WHO, 1994).

GLIFOSATO, ROUNDUP®, SUELO Y MICROORGANISMOS

La estabilidad del glifosato en el suelo está relacionada con el flujo de biomasa y la tasa metabólica microbiana o con cambios fisicoquímicos generados a partir de la actividad microbiana. La presencia de la vía del chikimato en los microorganismos (Alibhai & Stallings, 2001) teóricamente los hace susceptibles a la acción del glifosato, respecto a lo cual hay resultados contradictorios. En estudios adelantados por Covetto (1988, citado por Villegas *et al.*, 1998) se reportó al glifosato como inocuo para la población de hongos y como un fuerte promotor del crecimiento para bacterias y actinomicetos fomentando la microbiota del suelo. Forlanni *et al.* (1999 citado, por Haney *et al.*, 2002) mostraron evidencia de microorganismos incultivables cuando están expuestos a glifosato. En trabajos adelantados por Haney *et al.* (2002) se concluyó que el Roundup® incrementa la actividad microbiana debido al surfactante contrastando con el glifosato como molécula individual el cual presentó efectos contrarios. Del mismo modo ha sido reportado que el Roundup® reduce el contenido de nitrógeno microbiano en mayor extensión que el del carbono, aumentando la proporción carbono:nitrógeno en la biomasa microbiana, lo cual es reflejo de una reducción en la liberación y fijación de nitrógeno al suelo (Haney *et al.*, 2002).

Igualmente, diversos autores han reportado que el glifosato tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de algunos parásitos (Roberts *et al.*, 1998 citado por Nosanchuk *et al.*, 2001), como nemátodos (Dewar *et al.*, 2000), diversas especies microbianas y hongos como el *Cryptococcus neoformans* (Nosanchuk *et al.*, 2001). Algunos investigadores han determinado que el glifosato puede promover el crecimiento de hongos patógenos como el *Fusarium sp.* (Descalzo *et al.*, 1996). Parte de los efectos inhibidores del glifosato han sido atribuidos, específicamente en el caso del Roundup®, al componente surfactante (Haney *et al.*, 2002). Igualmente, el glifosato interfiere con la relación micorrizal entre hongos, nutrientes y plantas mediante la inhibición de hongos benéficos que ayudan a las plantas a absorber nutrientes y agua (WHO, 1994).

De acuerdo con lo descrito en la etiqueta del Roundup®, el glifosato es inactivado inmediatamente en el suelo mediante una reacción química

que ocurre con las arcillas; presenta un bajo potencial de lixiviación ya que es fuertemente adsorbido a arcillas, óxido hidroso (Haney *et al.*, 2002), material orgánico y mineral suspendido en el agua. De este modo, su movilidad en el suelo está determinada por la composición del mismo presentando una alta movilidad en suelos con bajo contenido de materia orgánica y arcillas (Piccolo *et al.*, 1994).

Aunque el glifosato no es aplicado directamente al suelo, una cantidad significativa puede alcanzar la superficie del mismo (Haney *et al.*, 2002). La cantidad de glifosato disponible en el suelo depende de varios factores:

- Composición y pH: El glifosato se une a partículas del suelo a través del grupo fosfónico y, de este modo, compite con el fósforo por los sitios de adsorción. A mayor concentración de fósforo (P) en el suelo se reduce la capacidad de adsorción del glifosato a partículas del mismo y sus reacciones de adsorción son más débiles, lo que promueve una mayor movilidad del glifosato. Los principales cationes que quelan el glifosato en el suelo son el Al^{+3} y el Fe^{+2} y en menor relevancia $\text{Mn}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+}$. La disponibilidad de Al^{+3} y el Fe^{+2} , y de P para la adsorción del glifosato y competencia con el mismo, respectivamente, es influida por el pH del suelo. El aumento del pH del suelo incrementa la estabilidad del Al^{+3} y el Fe^{+2} y, de este modo, promueve el mantenimiento de concentraciones más altas de estos cationes. Ello conlleva a una mayor adsorción del glifosato a partículas del suelo. El aumento del pH también genera una reducción en la concentración edáfica del P, por lo que en condiciones de pH bajo se reduce la movilidad del glifosato al haber menos competencia por los sitios de adsorción (Jonge *et al.*, 2001).
- Actividad microbiana del suelo y temperatura: La tasa de degradación del glifosato ha sido correlacionada con la actividad microbiana de los suelos y esta a su vez está relacionada con la temperatura (WHO, 1994).

El glifosato es descompuesto por microorganismos en el suelo, agua y sedimento a través de dos vías: en una de ellas se presenta el clivaje del enlace C-N, lo cual lleva a la formación de ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual es posteriormente transformado en metilamina

.....

(Gardner & Grue, 1996); y una segunda vía en la cual ocurre el clivaje del enlace C-P formando sarcosina (N-metil-glicina), el cual es biodegradado a glicina, formando CO₂ a través de la vía del formaldehído (WHO, 1994).

Aunque la vida media del glifosato es relativamente corta (<50 días) (Torstensson *et al.*, 1989) hay que tener en cuenta que la disipación del mismo se realiza en dos fases: una primera fase rápida y una segunda fase lenta, la cual puede ser muy prolongada. De este modo, se han reportado valores de DT₉₀ (tiempo necesario para que desaparezca el 90% de una sustancia) de 30-720 días (WHO, 1994). En trabajos realizados por Torstensson *et al.* (1989) se logró recuperar 1-2% de la dosis aplicada a los 1080 días después de la aplicación del Roundup®. La disipación del Roundup® es más rápida en el agua que en el suelo teniendo valores de DT₅₀ de unos pocos días a dos semanas en el agua. Sin embargo, se presenta una mayor persistencia del glifosato en el sedimento en donde se ha hallado una concentración de 0,6 mg/Kg 14 días después de la aplicación del Roundup® a una tasa de 3,3 Kg de principio activo/ha y hasta 400 días en un cuerpo de agua léntico a una concentración de 1,0 mg/Kg de sedimento (WHO, 1994). El metabolito principal del glifosato, el AMPA, posee una tasa de degradación más baja, posiblemente como consecuencia de su estrecha unión al suelo (GEIR, 1985).

Efectos del glifosato y del Roundup® en ecosistemas acuáticos

El glifosato puede entrar en ecosistemas acuáticos por lixiviación, escorrentía, aspersión accidental y con la deriva por el viento (Water, Sanitation and Health Team, 2003). En un estudio realizado en Canadá, fue encontrado el glifosato hasta 800 m de distancia del sitio asperjado (Cox, 1998). Payne (1992 citado por WHO, 1994) en otro estudio, en Canadá, determinó que se debe establecer una zona buffer de 75 a 1200 metros, ello con el fin de prevenir el daño a la vegetación que debe ser protegida y cuerpos de agua.

El glifosato, de acuerdo con su carácter hidrosoluble, no se bioacumula en los animales (Giesy *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). En

ecosistemas acuáticos, el glifosato es menos tóxico que el Roundup®. Acorde con esto, han sido reportados valores de concentración letal 50 (CL₅₀) del glifosato de 140 mg·l⁻¹ en el “bluegill sunfish” (*Lepomis microchirus*) y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*); de 97 mg·l⁻¹ en “fathead minnows” (*Pimephales promelas*); 130 mg·l⁻¹ en “channel catfish” (*Ictalurus punctatus*) a 96 h (Folmar *et al.*, 1979); de 645 mg·l⁻¹ a las 48 h y de 620 mg·l⁻¹ a las 96 h en carpa común (*Cyprinus carpio*) (Neškovic *et al.*, 1996). La CL₅₀ a las 48 h en la Daphnia (*Daphnia magna*) (pulga de agua), una importante fuente de alimento para peces de agua dulce, es de 780 mg·l⁻¹ (Neškovic *et al.*, 1996). Mientras que el Roundup® presenta mayor toxicidad con valores de CL₅₀ entre 2.3 y 97.4 mg·l⁻¹ en teleósteos (Folmar *et al.*, 1979; Hildebrand *et al.*, 1982; Servizi *et al.*, 1987; Mitchell *et al.*, 1987; Neškovic *et al.*, 1996; Abdelghani *et al.* 1997; Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Ramírez-Duarte, 2006).

La toxicidad aguda del Roundup® sobre peces es atribuida al componente surfactante, POEA, para el cual Folmar *et al.* (1979) determinaron un valor de CL₅₀ en trucha arcoiris tres órdenes de magnitud inferior a la del glifosato y semejante a la del Roundup®, y en “bluegill sunfish” un valor de CL₅₀ dos órdenes de magnitud inferior a la del glifosato y con toxicidad sin variaciones significativas a la del Roundup®.

Efectos subletales del glifosato ocurren a bajas concentraciones. En trucha arco iris y tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), concentraciones de cerca de la mitad o tercera parte de la CL₅₀ (respectivamente) causan nado errático y dificultad respiratoria. Estos efectos pueden incrementar el riesgo de que el pez sea predado y a su vez alterar los patrones de alimentación, migración, y reproducción (Morgan, *et al.*, 1991).

Adicionalmente, en carpa ha sido descrito un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina hepática y cardíaca, así como un ligero incremento en la actividad de las transaminasas glutámico-oxaloacética y glutámico-pirúvica al ser expuestas a concentraciones de 10 mg·l⁻¹ por un periodo de 14 días, con efectos similares, pero más leves a concentraciones de 2.5 a 5 mg·l⁻¹ (Neškovic *et al.*, 1996). Ensayos realizados por Jiraungkoorskul *et al.* (2003) demuestran que la exposición a concentraciones subletales de 5 y 15 mg·l⁻¹ de Roundup®

durante periodos prolongados causa una reducción en la tasa de crecimiento de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Nešcovik *et al.* (1996) han reportado desarrollo de hiperplasia epitelial y edema subepitelial branquial en carpas expuestas a glifosato (5 mg.l^{-1}); cambios similares, pero más pronunciados, seguidos de infiltración linfocitaria, hipertrofia leve de las células de cloro, separación y ruptura del epitelio respiratorio (Gomez *et al.*, 1998) al igual que denudación y fusión de lamelas secundarias han sido reportados por otros autores (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003).

En el hígado, se han descrito congestión sinusoidal leve y signos de fibrosis incipiente, a concentraciones de 10 mg.l^{-1} (Nešcovik *et al.*, 1996). Otros hallazgos consistentes en incremento en el tamaño de los hepatocitos con núcleos picnóticos y la presencia de vacuolas han sido reportados por Jiraungkoorskul *et al.* (2003) en tilapias expuestas a concentraciones de 5 y 15 mg.l^{-1} . En otro estudio, realizado por Szarek *et al.* (2000) se encontró que el Roundup® a concentraciones de 205 y 410 mg.l^{-1} genera lesiones agudas en hepatocitos de carpa descritas como estructuras semejantes a mielina, tumefacción mitocondrial y desaparición de la membrana mitocondrial interna, que conllevaron a la muerte del animal.

Algunas formulaciones del glifosato pueden ser más tóxicas para peces y otros organismos acuáticos (Tabla 2) debido a diferencias en la toxicidad de sus componentes.

La toxicidad del Roundup® es variable entre peces. Parte de esta variabilidad es debida a:

- **Especie:** Rango amplio de CL_{50} en teleósteos (2.3 a 97.4 mg.l^{-1}) (Folmar *et al.*, 1979; Hildebrand *et al.*, 1982; Servizi *et al.*, 1987; Mitchell *et al.*, 1987; Neškovic *et al.*, 1996; Abdelghani *et al.* 1997; Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Ramírez-Duarte, 2006) (Tabla 2).
- **Edad:** Peces jóvenes son más sensibles al Roundup® que los adultos, hallándose que la CL_{50} del Roundup® en adultos de tilapia del Nilo es el doble de la hallada en juveniles (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Toxicidad del glifosato, polioxietilamina (POEA) y Roundup® para peces.

Compuesto	Nombre común	CL ₅₀ (mg·l ⁻¹)	Referencia
Roundup®	Trucha arcoiris	7.4 y 12	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
	Salmón chinook	9.6	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
	Salmón coho	11.0	Mitchell <i>et al.</i> (1987)
	Tilapia del Nilo (juveniles)	16.8	Jiraungkoorskul <i>et al.</i> (2002)
	Tilapia del Nilo (adultos)	36.8	Jiraungkoorskul <i>et al.</i> (2002)
	Trucha arcoiris	8.3	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Fathead minnows	2.3	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Channel catfish	13.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Bluegill sunfish	5.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Channel catfish	14.5	Abdelghani <i>et al.</i> (1997)
	Bluegill sunfish	13.0	Abdelghani <i>et al.</i> (1997)
	Trucha arcoiris en laboratorio	54.8	Hildebrand <i>et al.</i> (1982)
	Trucha arcoiris en campo	52.0	Hildebrand <i>et al.</i> (1982)
	Cachama blanca	97.4	Ramírez-Duarte (2006)
POEA	Trucha arcoiris	2.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Fathead minnows	1.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Channel catfish	13.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Bluegill sunfish	3.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
Glifosato	Trucha arcoiris	140.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Fathead minnows	97.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Channel catfish	130.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)
	Bluegill sunfish	140.0	Folmar <i>et al.</i> (1979)

- **Dureza del agua:** El Roundup® es más tóxico en aguas duras. Característica conferida por el surfactante POEA, dado que el glifosato presenta un comportamiento contrario (Folmar *et al.* 1979).
- **Temperatura del agua:** La toxicidad del Roundup® se incrementa con el aumento en la temperatura reportándose mayor toxicidad en trucha arco iris a 17°C que a 7°C, y en “bluegill sunfish” a 27°C que a 17°C (Folmar *et al.* 1979).
- **pH del agua:** El Roundup® es más tóxico para peces a mayor pH del agua, reportándose mayor toxicidad en trucha arco iris y “bluegill sunfish” a pH de 7.5 que a pH de 6.5. Esta característica es conferida

por el surfactante POEA, el cual es más tóxico a mayor pH, mientras el glifosato presenta un comportamiento contrario (Folmar *et al.*, 1979).

Disrupción endocrina

El hecho de que el sistema endocrino es altamente regulado durante ciertas fases del desarrollo, como durante la diferenciación del sistema nervioso central y el sistema reproductivo, implica que alteraciones leves en el balance hormonal pueden tener efectos deletéreos irreversibles en los individuos expuestos.

El efecto disruptor endocrino reportado para el Roundup® está dado por la alteración en la expresión de la proteína aguda reguladora esteroidogénica, la cual se encarga de mediar el paso del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hasta la interna donde la citocromo P-450 escinde el colesterol iniciando la síntesis de todas las hormonas esteróideas (Walsh *et al.*, 2000). De este modo, el glifosato puede reducir o inhibir la síntesis de hormonas esteroideas.

Adicionalmente, ha sido demostrado que el glifosato puede acumularse, aunque a bajas concentraciones, en los huevos de los peces (Folmar *et al.*, 1979), lo cual tiene implicaciones importantes en el estado larvario, con el potencial de alterar el desarrollo sexual, el comportamiento y la fertilidad.

Carcinogénesis

El desarrollo de neoplasias está asociado con defectos en el control del ciclo celular. Fallos en los puntos de control del ciclo celular permiten que las células se dividan cuando han ocurrido errores en la replicación del ADN o cuando los cromosomas son incorrectamente segregados generando cambios en el material genético que persisten en la progenie celular.

Se ha determinado que el glifosato *per se* ocasiona un retraso en la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular por un fallo en la

.....

activación del complejo CDK1/ciclina B en trabajos realizados con embriones de erizos de mar en fase temprana de desarrollo (Marc *et al.*, 2002; 2003). Adicionalmente, para que el glifosato actúe se requiere la presencia conjunta de compuestos surfactantes que permitan el paso del glifosato a través de la membrana celular (Marc *et al.*, 2004b). Marc *et al.* (2004b) determinaron que el glifosato, en diferentes productos comerciales conteniendo agentes surfactantes, a una concentración de 0.01 a 0.12 mM (variable dependiendo del producto comercial y por ende de los compuestos surfactantes presentes en el producto) en una microgota asperjada es suficiente para ocasionar una disregulación en la transición del ciclo celular, la cual es inferior a la concentración recomendada para aspersión de 40 mM, siendo incluso más baja a la concentración de glifosato en la aspersión de cultivos de coca y amapola realizada en Colombia que es de 234 mM.

Conjuntamente con el retraso en la progresión del ciclo celular, Marc *et al.* (2004a) han descrito que los herbicidas a base de glifosato inhiben la síntesis del ADN durante la fase S. De este modo, el fallo en la progresión de la fase G2 a la fase M no solo puede ser ocasionada por la no activación del complejo CDK1/ciclina B, sino también por falencias en la replicación del ADN o debido a la ausencia de replicación del ADN, sin descartar alteraciones en otras vías que afecten de forma indirecta la progresión del ciclo celular.

Acorde con los hallazgos de Marc *et al.*, un estudio retrospectivo de 57.311 fumigadores de pesticidas realizado por De Roos *et al.* (2005) permitió dilucidar una asociación entre la exposición al glifosato y el desarrollo de mieloma múltiple.

SURFACTANTES

Los surfactantes son un tipo de adyuvantes; sustancias adicionadas a una formulación herbicida para facilitar y/o mejorar la mezcla, aplicación o efectividad biológica de los mismos, por interacciones básicas químicas o físicas con el herbicida y el blanco al que va dirigido (Witt, 1998; Ducar *et al.*, 2003).

Debido a las porciones hidrofóbicas e hidrofílicas los surfactantes se

pueden adsorber al mismo tiempo a materiales polares y no polares (Madsen *et al.*, 2001). Pueden ser removidos del ambiente por mecanismos tales como la volatilización, degradación abiótica, adsorción a partículas, degradación microbiana o acumulación en organismos. La volatilización no es un factor significativo debido a la solubilidad acuosa relativamente alta y la baja presión de vapor de la mayoría de los surfactantes. En los sistemas acuáticos, los surfactantes son fácilmente adsorbidos al sedimento (McWilliams & Payne, 2001).

La concentración de un surfactante en la interfase depende de su estructura y también de la naturaleza de las dos fases que se encuentran en la interfase. Existe, naturalmente, un límite para el efecto mínimo en la tensión superficial e interfacial para un surfactante. En un caso normal, tal limite es alcanzado cuando las miscelas comienzan a formarse en la solución (Madsen *et al.*, 2001; Bakke, 2003).

Es considerado que los más importantes tópicos con respecto al daño ambiental del uso/descarga de surfactantes son: si los surfactantes poseen un riesgo como resultado directo de la toxicidad en el ambiente acuático, o si la biodegradación, bioacumulación y biomagnificación de los surfactantes posee un riesgo mayor (McWilliams & Payne, 2001). De la misma manera, ha sido revisado extensamente que en la determinación de riesgo del uso de surfactantes aparte de la toxicidad intrínseca del surfactante, se debe evaluar el efecto sinérgico sobre la biodisponibilidad y toxicidad de otros compuestos químicos (McWilliams & Payne, 2001).

Los surfactantes son de naturaleza anfífilica por lo cual son llamados a menudo anfífilos (palabra derivada del griego que significa ambos) y su estructura molecular posee partes con diferente polaridad, una porción hidrofóbica (no polar) y una porción hidrofílica (polar) (figura 3). La porción hidrofóbica a menudo se refiere a la cola de hidrocarburos y la porción polar es referida a la cabeza. (Madsen *et al.*, 2001; Bakke, 2003).

De acuerdo con Curran (1999) las moléculas de los surfactantes pueden alterar la permeabilidad de las membranas cuticulares formando un puente entre químicos no similares tales como agua-aceite o agua y la superficie serosa de las hojas, abriendo canales que permiten la entrada del herbicida.

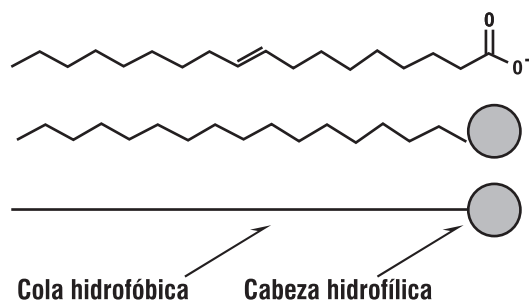


Fig. 3. Ilustración esquemática de los surfactantes (Modificado de Key Center for Polymer Colloids, 2005).

Clasificación. En la actualidad algunos autores agrupan los surfactantes de acuerdo con sus propiedades iónicas en agua dadas por la carga de la cabeza – conservando la clase anfotérica- (Madsen *et al.*, 2001):

- Surfactantes aniónicos tienen una carga negativa
- Los surfactantes no-iónicos no tienen carga
- Los surfactantes catiónicos tienen una carga positiva.
- Los surfactantes anfotéricos tienen carga positiva o negativa dependiendo del pH.

Los surfactantes no iónicos, como el Cosmoflux® 411F, son incapaces de ionizarse en solución acuosa, son compatibles con todos los otros tipos de surfactantes, no son sensibles a aguas duras y son considerados agentes espumantes de potencia media-baja (Madsen *et al.*, 2001; Bakke, 2003). De acuerdo con Bakke (2003), sus propiedades fisicoquímicas no son afectadas significativamente por electrolitos y exhiben una dependencia por la temperatura, es decir, su solubilidad en agua incrementa con la temperatura (Fig. 4). Los surfactantes no iónicos son los más ampliamente usados, de los cuales los alquilfenoles etoxilados son los que presentan el mayor potencial de bioacumulación y sobre los cuales hay evidencia de acción como disruptores endocrinos. En términos ambientales los surfactantes poseen propiedades que determinan que su destino y comportamiento en el ambiente acuático difiera de lo predicho para químicos no activos de superficie (McWilliams & Payne, 2001).

Las moléculas surfactantes evidencian una tendencia a acumularse sobre la superficie de las membranas epiteliales, más que a atravesar las mismas y, de esta forma, bioacumularse, lo cual explica en gran medida la proporción inversa existente entre la longitud de la cadena y su grado de toxicidad. De acuerdo con McWilliams & Payne (2001), el número de sitios de unión sobre la membrana es usualmente limitado por lo cual se evidencia una saturación cinética en los mecanismos de transporte a nivel de membranas. Estos autores además demostraron que el lauril sulfato de sodio y los alquilfenoles en concentraciones de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ alteran severamente la integridad de los estratos superiores del epitelio branquial de los peces; dicha alteración permite el establecimiento de un imbalance hidroelectrolítico (McWilliams & Payne, 2001). Existen algunos reportes en los cuales se describe que la exposición a nonilfenoles (10-40 días a 1 y $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) puede tener un efecto menor sobre la química del moco de la piel de la trucha (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que los efectos subletales de los surfactantes fenólicos etoxilados son resultado de alteraciones de la actividad motora y la frecuencia respiratoria, y aparentemente el surfactante se adsorbe en la superficie del epitelio branquial interfiriendo con la difusión del gas (Swedmark *et al.*, 1971). Los efectos sobre el nado y la respiración a concentraciones $>1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) sugieren un efecto narcótico, que permanece por un periodo prolongado (Tabla 3).

Los alcoholes etoxilados son surfactantes no-iónicos compuestos de una cadena alquil hidrofóbica (alcohol graso) la cual está combinada con grupos de óxido de etileno a través de un enlace éter. Los alcoholes alkoxilados normalmente contienen tanto óxidos de etileno como de propileno en su extremo hidrofílico, mientras el óxido de butileno es menos usado (Madsen *et al.*, 2001). La toxicidad aguda de los alcoholes etoxilados para peces fluctúa con valores de CL_{50} desde $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a más de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para los tipos lineales y de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para los alcoholes etoxilados ramificados (Tabla 4) (Madsen *et al.*, 2001).

Tabla 3. Concentración letal 50 (CL₅₀) y efecto de algunos surfactantes nonilfenoles en especies acuáticas.

Especie	Respuesta	Referencia
Pez lenguado (<i>Pleuronectes americanus</i>)	CL ₅₀ a 96 horas= 17 µg.l ⁻¹	Lussier <i>et al.</i> (2000)
Pececillo cabeza de oveja (<i>Cyprinodon variegatus</i>)	CL ₅₀ a 96 horas= 142 µg.l ⁻¹	Lussier <i>et al.</i> (2000)
Trucha arco iris (<i>Onchorrhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀ 96 horas= 221-270 µg.l ⁻¹	Servos (1999)
Pez sol de branquias azules (<i>Lepomis macrochirus</i>)	CL ₅₀ 96 horas= 209 µg.l ⁻¹	Brooke (1993)

Tabla 4. Concentración letal 50 a 96horas de los alcoholes etoxilados en peces.

Especie	Alcohol etoxilado	CL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Referencia
Fathead minnows (<i>Pimephales promelas</i>)	C ₁₄₋₁₅ EO ₁₃	1.0 (0.62-1.9)	Wong <i>et al.</i> (1997)
Trucha arco iris	C ₁₄₋₁₅ EO ₁₈	5.0-6.3	Talmage (1994)
Fathead minnows (<i>Pimephales promelas</i>)	C ₁₁₋₁₅ EO ₇	6.1	Dorn <i>et al.</i> (1993)
Pez sol de branquias azules (<i>Lepomis macrochirus</i>)	C ₁₁₋₁₅ EO ₉ (alcohol secundario)	4.6	Macek & Krzeminski (1975)

COSMOFLUX® 411F

Es un surfactante no iónico, mezcla de ésteres de hexitan: Alcoholes lineales + aryl etoxilado. Mezclas de tensoactivos estereoespecíficos no iónicos basados en alcoholes lineales etoxilados propoxilados con pequeñas cantidades de compuesto aryl etoxilado. Como lo reporta Nivia (2001b), en la hoja técnica 313.03 de Mayo 30/94 de Cosmoagro, el aditivo se describe químicamente como una mezcla de aceite mineral y surfactantes especializados no-iónicos con agentes de acoplamiento.

Posee además, aceite isoparafínico de alta pureza, baja fitotoxicidad, bajo contenido de compuestos aromáticos y baja tensión superficial que mejora la humectabilidad, promoviendo de esta manera la eficacia de

los ingredientes activos. De acuerdo con la hoja técnica, estas dos clases de ingredientes están exentos de una tolerancia bajo la Regulación 40 CFR 180.1001 (c), (e), de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos. De la misma forma, el aceite parafrínico no fitotóxico que es la base del Cosmoflux® 411F, cumple con las regulaciones de la administración de drogas y alimentos (F.D.A.) (Nivia, 2001b).

Modo de acción del Cosmoflux® 411F

El Cosmoflux® 411F mejora la adherencia y uniformidad de las preparaciones de agroquímicos, controlando la evaporación e hidrólisis del producto activo con cubrimiento total, garantizando concentración homogénea del activo por unidad de área y extendiendo el espectro de actividad biológica de los agroquímicos. Las dosis recomendadas oscilan entre 0.1 - 1% del volumen total de mezcla a asperjar, de acuerdo con el producto a aplicar, aunque la dosis recomendada por el fabricante y tenida en cuenta por la Dirección Nacional de Estupefacientes (DNE) es de un rango de 0.5 – 1.5%. Su efectividad se considera cuatro (4) veces mayor que los aceites de aspersión convencionales, por el sinergismo entre el aceite parafrínico y el tensoactivo especializado. Así mismo, el incremento del efecto tóxico de los plaguicidas con el uso del Cosmoflux® 411F indica que es posible reducir las dosis de los productos utilizados por los agricultores, sin afectar la eficiencia en el control de plagas o malezas. Los profesionales de Cosmoagro aclaran que el incremento de la acción tóxica de los agrotóxicos no obedece a reacciones químicas con el coadyuvante sino a acciones físicas que hacen más eficiente el contacto plaguicida-objetivo (herbicida-planta o insecticida-insecto plaga) (Nivia, 2001b). El Cosmoflux® 411F incrementa sustancialmente la acción biológica de los agroquímicos, permitiendo mayor acción con menores dosis.

Toxicidad

La formulación como concentrado emulsionable conteniendo 17% de alcoholes lineales etoxilados + aryl eto, posee licencia de venta del Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Nº 05.4-2186). No se considera irritante ni sensibilizante de la piel humana, pero se

.....

recomienda el uso de guantes, respiradores y la protección de los ojos durante su manejo y de acuerdo con el concepto toxicológico LP-0593-93 del Ministerio de Salud de Colombia es un producto de categoría toxicológica IV (ligeramente tóxico).

Sin embargo, el uso del Cosmoflux® 411F en las prácticas de erradicación de cultivos de coca y amapola se ha realizado en ausencia de trabajos que determinen sus características toxicológicas y la relevancia de su interacción con otros contaminantes sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los mismos. Lo cual se discutirá en los capítulos IV y VI.

Capítulo II

*U*NA APROXIMACIÓN METODOLÓGICA

Los trabajos experimentales llevados a cabo con el glifosato (N-fosfonometil glicina) estuvieron basados en un modelo de cachama blanca (Figura 4). Esta especie nativa se seleccionó no solo por su carácter endémico en las regiones sometidas a las fumigaciones mediante aspersión aérea sino además por el conocimiento de aspectos anatomopatológicos de la especie, que permiten una mayor confianza en el análisis de los hallazgos. Se escogió un organismo acuático como especie modelo debido a la predisposición de los cuerpos de agua a ser contaminados a partir de suelos asperjados y a través de aspersiones directas e indirectas. Para el establecimiento de los protocolos de manipulación de los animales y de las prácticas de laboratorio se consideró la normatividad FAO descrita por Ward (1982).



NOMBRE COMÚN: Cachama blanca
SUBFAMILIA: *Serrasalminae*
ESPECIE: *brachipomus*

FAMILIA: *Characidae*
GÉNERO: *Piaractus*
ORIGEN: Nativa

Figura 4. Ejemplar de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*).

.....

Se efectuaron experimentos de toxicidad aguda (Concentración Letal 50 – CL₅₀) con el fin de buscar efectos y lesiones que permitieran comparar nuestros datos con reportes en otras latitudes y especies.

Los compuestos utilizados fueron: el herbicida no selectivo, de amplio espectro Roundup® (presentación comercial de distribución mundial, cuyo principio activo es el Glifosato, administrado en forma de sal de isopropilamina; 170 mg.l⁻¹) y el surfactante no iónico Cosmoflux® 411F del cual no existen reportes de toxicidad en animales ni humanos y se desconoce, hasta ahora, su composición química exacta, sin embargo el fabricante reporta según registro ICA N° 054-2186 que contiene como ingredientes activos una mezcla de sustancias tensoactivas estereoespecíficas no-iónicas basada en alcoholes lineales etoxilados propoxilados con pequeñas cantidades de un compuesto aril etoxilado y se le adiciona aceite isoparafínico.



Figura 5. Presentación comercial del glifosato (Roundup®) y del Cosmoflux® 411F

Para un análisis más detallado de la dinámica de los componentes de la mezcla de aspersión se planteó examinar los efectos individuales de cada sustancia así como los efectos de la acción conjunta (mezcla) con el

propósito de argumentar sobre el tipo de interacción. El diseño experimental estuvo basado en unidades experimentales (acuarios) ubicadas en el laboratorio de Bioensayos del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL) en la Universidad de los Llanos. Cada unidad constó de 7 animales con un peso individual de 40 ± 1.7 g, juveniles provenientes de un mismo desove, de estanques de tierra y cultivados en el mismo Instituto. Todos los experimentos se basaron en un grupo control (To) y 5 grupos experimentales (T1-T5) distribuidos al azar en las unidades experimentales. Dichos animales fueron aclimatados por un periodo no menor de 15 días, tiempo en el cual fueron alimentados al 2% de la biomasa total por unidad experimental. La alimentación fue suspendida 24 horas antes del inicio del periodo experimental de 96 horas. Previo al periodo de aclimatación, los peces fueron sometidos a un baño con cloruro de sodio (NaCl) no yodado al 1 % durante 20 minutos con el objetivo de eliminar ectoparásitos de acuerdo con lo descrito por Francis-Floyd (1995).

El tiempo 0 (cero) fue considerado como el momento en el cual fueron adicionadas las sustancias en estudio al agua según las concentraciones descritas en cada caso. Durante la etapa experimental, mediante un sistema semiestático, con recambio diario del 50% del agua de los acuarios (agua + sustancia experimental) se observaron tanto el comportamiento de los animales como su mortalidad, los animales muertos se sometieron a muestreo para su posterior análisis histopatológico. Se evaluaron aspectos de comportamiento en los diferentes ensayos, excepto en el experimento de Cosmoflux® 411F debido a la apariencia lechosa que toma el agua, lo que limitó la visibilidad. Además, fueron medidos parámetros de calidad de agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH) a intervalos de 1 hora durante las primeras 12 horas, de 2 horas durante las siguientes 12 horas, de 3 horas hasta las 36 horas de iniciada la fase experimental y de 4 horas hasta la finalización del experimento. Dichos parámetros de calidad de agua correspondientes a pH (medido con un Pinpoint pH Monitor®, American Marine Inc. USA), temperatura y oxígeno disuelto (medidos con un oxímetro Hach Portable LDO™ HQ10 Dissolved Oxygen Meter®).

En los experimentos de exposición al Roundup® y a la mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F se midieron además los niveles de magnesio y calcio al inicio y al final de la etapa experimental por espectrometría con un

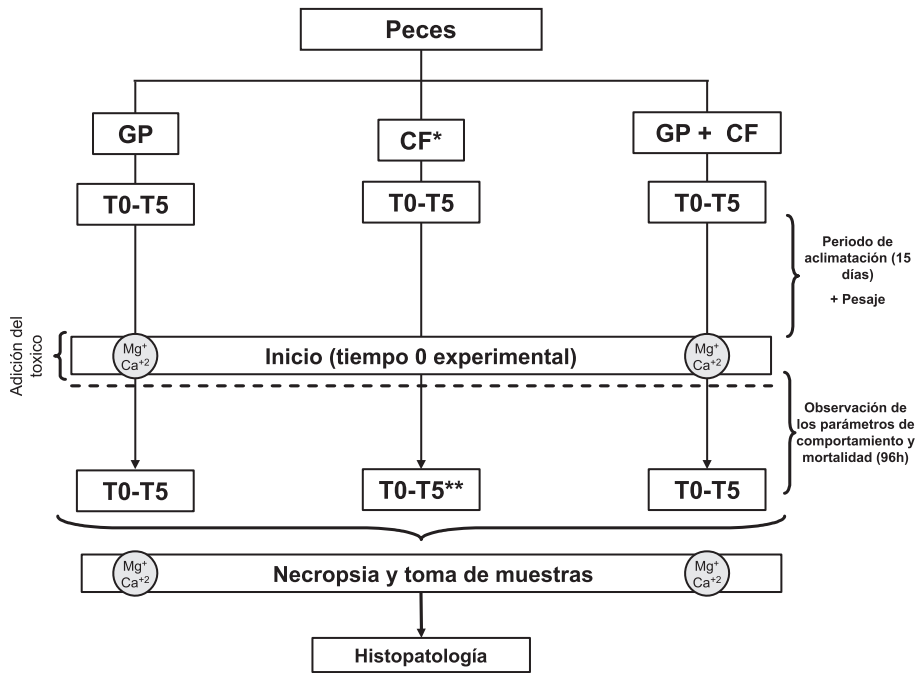
equipo de absorción atómica de llama AAnalyst 100 Atomic Absorption Spectrometer (Perkin Elmer Instrument).

Una vez finalizadas las 96 horas del periodo experimental, 2 animales de cada grupo incluyendo el control fueron sometidos a necropsia y muestreos para análisis histopatológico (Figura 6). Para esto los animales fueron tranquilizados mediante inmersión en agua fría (aproximadamente 5°C) y posteriormente fueron demedulados con un corte dorsal y caudal al opérculo. El protocolo de necropsia se basó en los lineamientos descritos por Reimschuessel (1988). Las muestras de tejidos fueron fijadas en formalina buferada al 3.7%, posteriormente embebidas en parafina y se realizaron cortes de 3 a 5 µm los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. El análisis de los tejidos se llevó a cabo con un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i y los registros fotográficos se hicieron con una cámara Nikon Digital SIGHT DS-5M (DS Camera Head + DS Camera Control Unit DS-L1, Nikon Corporation, Japan).

Concentraciones de exposición

Las concentraciones de las sustancias tóxicas se basaron en resultados de ensayos piloto hechos en el laboratorio contando con comparaciones de trabajos efectuados con otras especies (Figura 7), excepto para el Cosmoflux® 411F sobre el cual no hay reportes de toxicidad en otros animales.

Los ensayos preliminares arrojaron una CL_{50} para el Roundup® de 69.61 mg·l⁻¹ y de 4583 mg·l⁻¹ para el Cosmoflux® 411F. Partiendo de esto, para la determinación de la CL_{50} del Roundup® se tomaron los valores de 0, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0 y 120.0 mg·l⁻¹, correspondientes al grupo control (To), T1, T2, T3, T4 y T5, y para el Cosmoflux® 411F los valores fueron: 0, 3000, 3450, 3900, 4350 y 4800 mg·l⁻¹ (el intervalo entre concentraciones fue considerado con base en bioensayos previos) correspondientes a los tratamientos To, T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente.



GP=glifosato, CF= Cosmoflux® 411F

* En el ensayo del Cosmoflux® 411F se realizó además una prueba de toxicidad subletal, bajo los mismos lineamientos experimentales.

** La observación de los parámetros de comportamiento no fue posible debido a la coloración blanquecina de la solución experimental.

Figura 6. Diagrama experimental general



Figura 7. Unidad experimental

Para la determinación de la toxicidad subletal del Cosmoflux® 411F se establecieron las concentraciones: 0.17, 0.34, 0.68, 1.36, 2.72 mg·l⁻¹; correspondientes al grupo To, T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente.

Las concentraciones de la mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F se establecieron tomando como premisa la proporción 44:1 v/v de Roundup® + Cosmoflux® 411F en la mezcla de aspersión aérea. Las concentraciones fueron de 0 (sin exposición a las sustancias experimentales), 7.5 y 0.06 mg·l⁻¹, 15.0 y 0.12 mg·l⁻¹, 30.0 y 0.24 mg·l⁻¹, 60.0 y 0.48 mg·l⁻¹ y 120.0 y 0.96 mg·l⁻¹ de Roundup® y Cosmoflux® 411F, respectivamente, correspondientes a los tratamientos To-T5.

Para cada uno de los tratamientos se realizaron tres réplicas, cada una de ellas con 7 animales de modo que cada tratamiento se compone de 21 animales.

El valor de CL₅₀ se determinó mediante el análisis de la mortalidad registrada para cada tratamiento a las 96 horas por medio del programa TRIMMED SPEARMAN–KARBER, TSK versión 1.0 (Hamilton *et al.*, 1977), se aceptó valores de $p < 0.05$ como significativos. Posterior a la determinación de la CL₅₀ de las sustancias individualmente y de la mezcla, se determinó el tipo de interacción entre las dos sustancias mediante la aplicación de la fórmula de Timbrell (1999).

Capítulo III

 VALUACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE
LOS EFECTOS TÓXICOS AGUDOS DEL
ROUNDUP® EN JUVENILES DE CACHAMA
BLANCA (*Piaractus brachypomus*)

Los resultados aquí consignados se basan en trabajos de Ramírez-Duarte (2006) como parte del proyecto marco, en el cual se evaluaron efectos tóxicos agudos de la formulación comercial de GP, denominada Roundup®, en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en un periodo de exposición de 96 horas, determinando la CL₅₀, manifestaciones clínicas y alteraciones anatomopatológicas en branquias, hígado, riñones, estómago, intestino, piel y cerebro.

Los ensayos se efectuaron en el Laboratorio de Bioensayos del IALL (Villavicencio, Meta), a una altitud de 422 msnm, con temperatura promedio de 25 °C, pluviosidad anual de 4.050 mm y humedad relativa del 75 %. Los animales experimentales fueron alojados en acuarios de vidrio, con capacidad para 64 L de agua y aireación constante. El Roundup® fue adquirido de una fuente comercial.

Parámetros de calidad del agua

Los parámetros de calidad del agua se mantuvieron constantes durante la fase experimental (Tabla 5). Sin embargo, el pH mostró una reducción gradual en los T's expuestos al Roundup®, con diferencias significativas entre el T₀ y los T's 3-5 ($p < 0.05$).

Tabla 5. Parámetros de calidad del agua durante la fase experimental (Roundup®).

	Oxígeno (mg.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Ca (mg.l ⁻¹)	Mg (mg.l ⁻¹)
To	7.2 ± 0.2	24.8 ± 0.8	6.83 ± 0.13 ^a	0.55 ± 0.50	0.18 ± 0.09
T1	7.2 ± 0.1	24.7 ± 0.7	6.77 ± 0.11 ^a	0.68 ± 0.32	0.13 ± 0.05
T2	7.2 ± 0.2	24.8 ± 0.7	6.75 ± 0.15 ^a	0.70 ± 0.46	0.15 ± 0.05
T3	7.2 ± 0.1	24.9 ± 0.7	6.56 ± 0.28 ^b	0.85 ± 0.72	0.15 ± 0.05
T4	7.2 ± 0.1	25.1 ± 0.6	6.02 ± 0.27 ^{b,c}	0.85 ± 0.57	0.15 ± 0.05
T5	7.4 ± 0.1	25.1 ± 0.6	5.65 ± 0.20 ^{b,c,d}	0.88 ± 0.46	0.16 ± 0.05

Los datos de concentración son expresados como media ± desviación estándar.

^{a,b,c,d} Medias con superíndices distintos presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Manifestaciones clínicas

Variaciones en el patrón de nado y en la ubicación en los tercios de la columna de agua sólo se hallaron en el T5, con respecto al To, momentos antes de la muerte de los animales.

Desde la 1^a hora de exposición, los animales del T5 manifestaron una reducción severa de la actividad de nado y asumieron una posición inclinada con la cabeza hacia arriba, lo cual continuó hasta el final del experimento. A la 2^a hora presentaron una respuesta retrasada al estímulo visual (reflejo de huida) y a la 3^a hora ya no hubo respuesta; dos animales perdieron el eje de nado. La pérdida del eje de nado se presentó de forma paulatina en los restantes animales del T5 a lo largo del periodo de exposición.

A partir de la 48^a hora los animales del T4 manifestaron una reducción leve de la actividad de nado y se ubicaron de forma transitoria en posición inclinada con la cabeza hacia arriba y junto con los animales del T5 presentaron periodos prolongados de quietud.

A partir de la 52^a hora los animales de los T's 1, 2 y 3 también manifestaron una reducción leve de la actividad de nado, la cual se tornó moderada en el T4 a partir de la 80^a hora.

En los animales de los T's 4 y 5 fue notoria una reducción de la frecuencia de los movimientos operculares una vez se presentó la reducción de la actividad de nado. Los animales que manifestaron reducción de la actividad generalmente se ubicaron en los dos tercios superiores de la columna de agua.

Concentración Letal 50 (CL₅₀)

Tabla 6. Mortalidad durante las 96 horas (Roundup®).

Hora	To	T1	T2	T3	T4	T5*
6	-	-	-	-	-	7
12	-	-	-	-	-	2
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	1
72	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-
Total	0	0	0	0	0	10

*El T5 constó de 14 animales. Los demás tratamientos tuvieron 21 animales cada uno.

Como se observa en la Tabla 6, luego de 96 horas, habían muerto 10 animales de los 14 pertenecientes al T5.

El análisis de mortalidad con el programa TRIMMED SPEARMAN-KARBER- TSK versión 1.0 arrojó un valor de CL₅₀ de 97.47 mg.l⁻¹ ($p < 0.05$).

Hallazgos de necropsia

Animales muertos en el transcurso del ensayo. Todos los animales presentaron branquias congestionadas, filamentos con los extremos erosionados y material grisáceo en el tercio distal de los mismos (Figura 8) en la piel se evidenció un aumento moderado de la producción de moco. Adicionalmente, en los animales muertos después de 12 horas de exposición el hígado estaba icterico con focos blanquecinos múltiples (Figura 9). El estómago presentó gas en el lumen.

Animales sacrificados al final del ensayo. Los animales del T0 no manifestaron alteración alguna al examen de necropsia. En la Tabla 7 se registran los principales hallazgos de necropsia en los T's 1-5 indicando la frecuencia de las lesiones en cada uno.

Tabla 7. Hallazgos de necropsia en los T's 1-5 al final del periodo de exposición (Roundup®).

Órgano	Lesión	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Branquias	Erosión filamental distal					4.7% (1/21)	100% (4/4)
	Residuo grisáceo en el tercio distal de los filamentos						25% (1/4)
Hígado	Aumento de tamaño con bordes redondeados		47.6% (10/21)	19% (4/21)	7.1% (1/14)	47.6% (10/21)	
	Congestión			42.8% (9/21)	14.2% (2/14)	23.8% (5/21)	
	Focos blanquecinos					9.5% (2/21)	50% (2/4)
	Coloración blanquecina generalizada					23.8% (5/21)	
	Coloración icterica						25% (1/4)
Estómago	Congestión		28.5% (6/21)	23.8% (5/21)	21.4% (3/14)	47.6% (10/21)	25% (1/4)



Figura 8. Material grisáceo en el tercio distal de filamentos branquiales de los peces del T5 (Roundup®) muertos en el transcurso de la fase experimental.

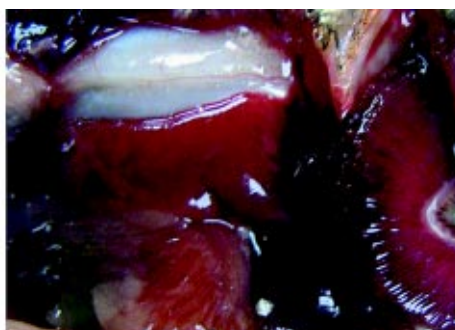


Figura 9. Múltiples focos blanquecinos en el hígado de los animales del T5 (Roundup®) muertos en el transcurso de la fase experimental.

Hallazgos histopatológicos

Branquias. El examen histopatológico de las branquias reveló diferencias morfológicas entre el T0 y los T's expuestos al Roundup®. En el T0 las lamelas se observaron largas y delgadas, con levantamiento leve del epitelio lamelar, conservándose normales las células epiteliales (Figuras 10 y 11). De forma infrecuente se apreciaron procesos multifocales leves de hiperplasia interlamelar e infiltración de células mononucleares en las lamelas.

En todos los T's de exposición al Roundup® se observó branquitis proliferativa generalizada pasando de leve a severa del T1 a T5, (Figuras 12-15) acompañada de levantamiento del epitelio lamelar, hipertrofia de células epiteliales y congestión generalizada. Adicionalmente fue notoria la reducción de la longitud de las lamelas y el plegamiento de las mismas (Figura 12) asumiendo forma de “zig-zag”. En el T2 se acentuaron procesos de necrosis del epitelio lamelar (Figura 12), presentes también en los T's 3, 4 y 5, junto con un patrón de festoneado generalizado del epitelio que progresó a procesos de necrosis lamelar en el T5 (Figura 13). En los T's 2, 3, 4 y 5 (Figura 13-14) se presentó hiperplasia e hipertrofia de células compatibles con células de cloro y de células de moco en espacios interlamelares y en la región faríngea. La branquitis proliferativa en los tres T's con la mayor concentración progresó hasta el desarrollo de fusión y denudación lamelares las cuales cubrieron una mayor extensión en el T5.

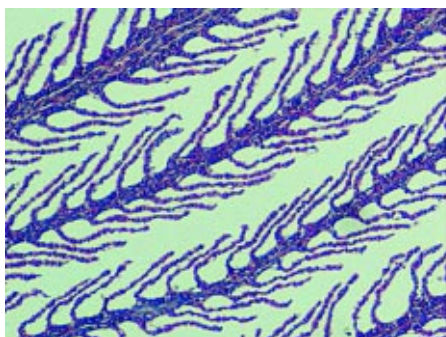


Figura 10. Branquia (T0). Se aprecian las lamelas largas y delgadas, con epitelio lamelar e interlamelar delgado (10x. H-E).

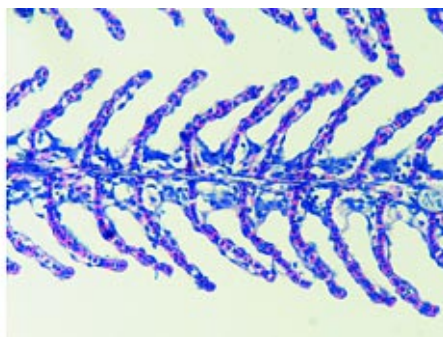


Figura 11. Branquia (T0). Se aprecian las lamelas largas y delgadas, con epitelio lamelar e interlamelar delgado y con leve desprendimiento del epitelio (40x. H-E).

Adicionalmente, en los peces muertos en el T5 antes de las 24 horas se observó fusión lamelar generalizada en la mitad distal de los filamentos y necrosis lamelar severa en la mitad proximal (Figura 16) y en los ejemplares muertos entre las 24 y 48 horas se presentó fusión lamelar generalizada de toda la extensión de los filamentos y en algunos filamentos la mitad proximal se observó denudada o con formación de un pseudoepitelio sobre las lamelas. En las áreas de fusión lamelar fue

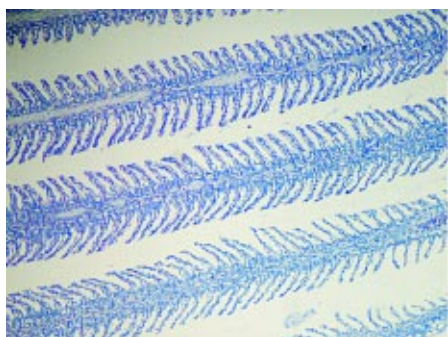


Figura 12. Branquia (T2 - Roundup®). Hiperplasia interlamelar leve generalizada con levantamiento del epitelio y acortamiento de lamelas (10x. H-E).

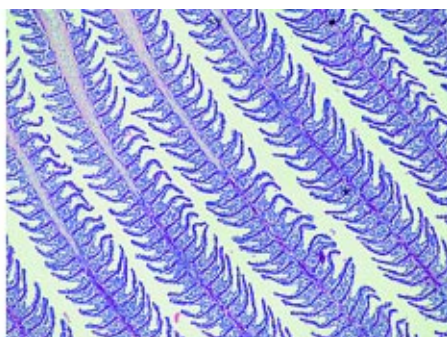


Figura 13. Branquia (T3 - Roundup®). Hiperplasia interlamelar moderada generalizada con plegamiento y acortamiento de lamelas (10x. H-E).

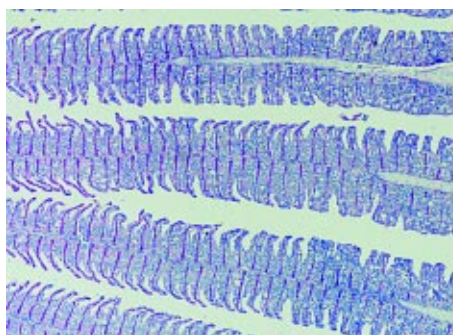


Figura 14. Branquia (T4 - Roundup®). Hiperplasia interlamelar generalizada de moderada a severa con reducción de la longitud lamelar (10x. H-E).

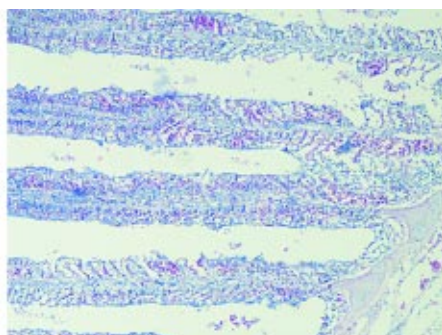


Figura 15. Branquia (T5 - Roundup®). Fusión lamelar hacia la mitad distal de los filamentos y necrosis lamelar en la mitad proximal de los mismos (10x. H-E).

frecuente la presencia de microhemorragias (Figura 17) y algunas de las lamelas que presentaron el extremo distal libre evidenciaron aneurismas siendo más frecuentes en los animales del T5 muertos en el transcurso del ensayo. En los tres T's de concentración más alta se halló infiltrado severo de células mononucleares en los espacios interfilamentales y en la mucosa faríngea (Figura 18), lo cual se evidenció de forma esporádica en el T2.

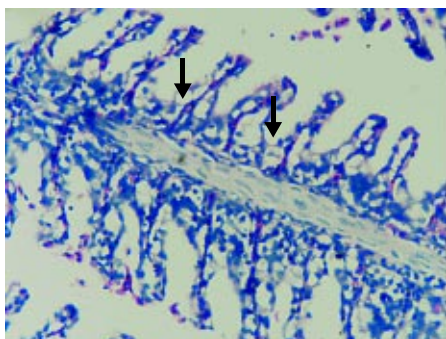


Figura 16. Branquia (T2 - Roundup®). Hipertrofia del epitelio lamelar con necrosis y levantamiento del mismo, así como hiperplasia e hipertrofia de células de moco y de células compatibles con células de cloro ↓ (40x. H-E).

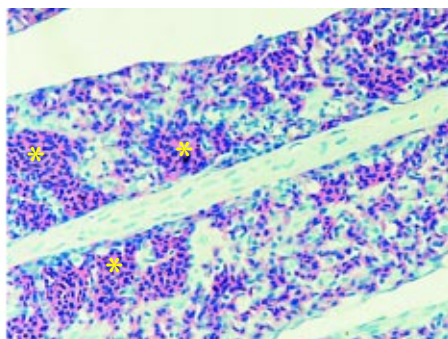


Figura 17. Branquia (T5 - Roundup®) (muerto en el transcurso de la fase experimental). Fusión lamelar y el desarrollo de microhemorragias (*) (40x. H-E).

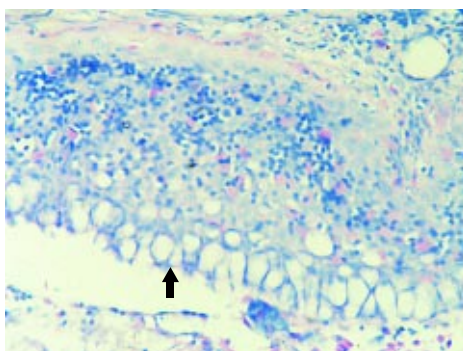


Figura 18. Mucosa faríngea (T5 - Roundup®). Hiperplasia e hipertrofia de células de moco ↑ e infiltrado leucocitario severo (40x. H-E).

Hígado. En el hígado se hallaron diferencias marcadas entre el To y los T's 1-5, con lesiones de mayor severidad en las concentraciones más altas de Roundup®.

En el To se observó congestión y vacuolización lipídica leve de los hepatocitos. Del mismo, se hallaron pequeñas vacuolas lipídicas separadas por material reticular débilmente eosinofílico. Los hepatocitos presentaron homogeneidad en el tamaño y la densidad citoplasmática (Figuras 19 y 20).

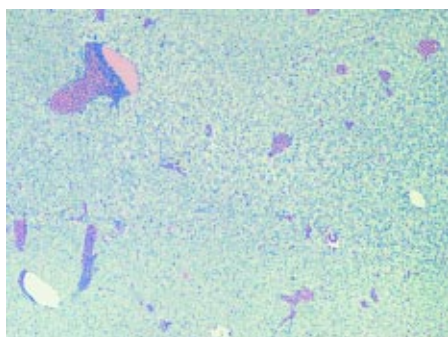


Figura 19. Hígado (To). Vacuolización lipídica leve generalizada de los hepatocitos (10x. H-E).

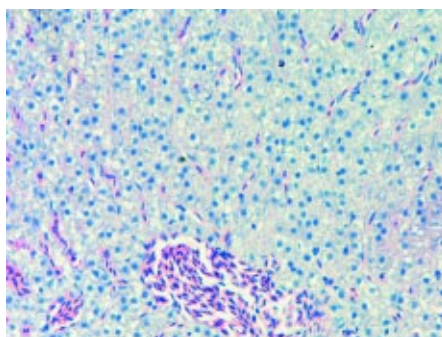


Figura 20. Hígado (To). Vacuolización lipídica leve de los hepatocitos, preservándose la homogeneidad en el tamaño de los mismos (40x. H-E).

La congestión y las vacuolizaciones lipídicas fueron hallazgos comunes al To y a los T's 1-5 (Figuras 21-22). No se observaron diferencias de severidad entre el T1 y el To. En los T's 2, 3, 4 y 5 la congestión y los cambios lipídicos fueron más acentuados, siendo más severos en las concentraciones mayores de Roundup® (Figuras 22 y 23) y se presentaron fuertes contrastes entre áreas de vacuolización lipídica y zonas de mayor densidad citoplasmática en la que el citoplasma se halla ocupado por material reticular denso fuertemente eosinofílico (Figura 24).

Este contraste entre áreas de diferente densidad citoplasmática no se observó en los animales muertos antes de 6 h de exposición del T5. En los T's 2, 3 y 4 y en los animales del T5 muertos después de 6 h las

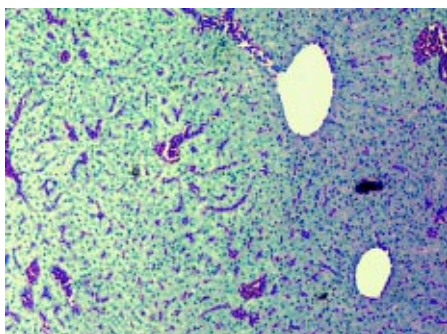


Figura 21. Hígado (T2 - Roundup®). Congestión y un fuerte contraste entre áreas de densidad aparentemente normal (derecha) y de vacuolización lipídica citoplasmática moderada a leve (izquierda) (10x. H-E).

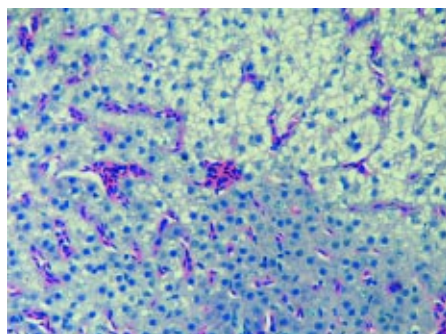


Figura 22. Hígado (T2 - Roundup®). Área de densidad aparentemente normal (parte inferior) y área de vacuolización lipídica moderada de hepatocitos (parte superior derecha). Se evidencian anisocitosis y núcleos picnóticos (40x. H-E).

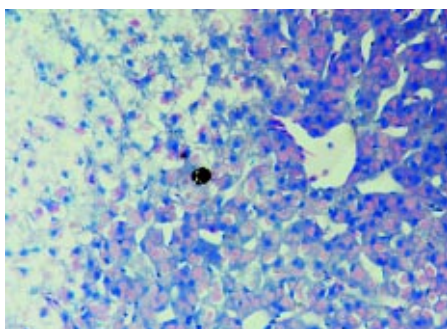


Figura 23. Hígado (T5 - Roundup®). Zona de vacuolización lipídica citoplasmática (esquina superior izquierda) con límites celulares indistinguibles. Son evidentes gotas hialinas en las áreas de vacuolización lipídica y de mayor densidad, siendo más frecuentes en esta última. El CMM constituye un hallazgo eventual (40x. H-E).

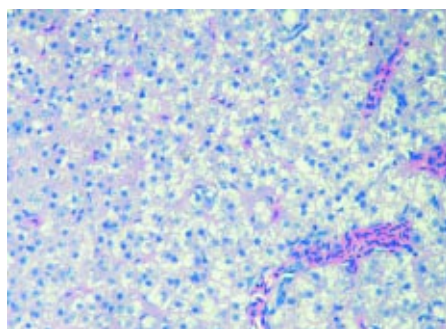


Figura 24. Hígado (T5 - Roundup®). Vacuolización lipídica generalizada y material reticular denso fuertemente eosinofílico en el citoplasma de los hepatocitos (40x. H-E).

vacuolizaciones lipídicas estuvieron separadas por material reticular de mayor densidad y eosinofilia más intensa a la hallada en el To. En los cuatro T's de mayor concentración de Roundup® se presentó anisocitosis y procesos necróticos multifocales.

Piel. En la piel se hallaron diferencias entre el To y los T's 1-5. En el To la piel presentó la morfología normal con epidermis delgada y superficie epidermal regular (Figura 25) hubo acúmulos de pigmento poco extensas a nivel subepidermal.

De modo general, la epidermis en todos los T's de exposición al Roundup® presentó un mayor grosor debido a hiperplasia leve de células epidermales y de moco, pero en los T's 3, 4 y 5, adicionalmente, se halló infiltración leve de células inflamatorias mononucleares y espongiosis junto con un patrón de festoneamiento de la superficie de la epidermis (Figura 26). Aunque acúmulos de pigmento también fueron hallados en el To, en los T's 1-5 se evidenciaron de mayor extensión y con mayor frecuencia (Figura 21). Adicionalmente, en los peces muertos después de 24 horas de exposición se presentó necrosis franca de células de la superficie epidermal.

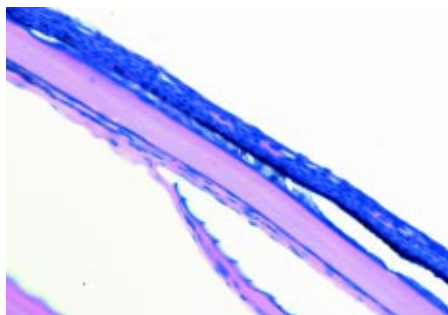


Figura 25. Piel (To). Morfología normal de la epidermis, la cual se presenta delgada y con la superficie regular (40x. H-E).

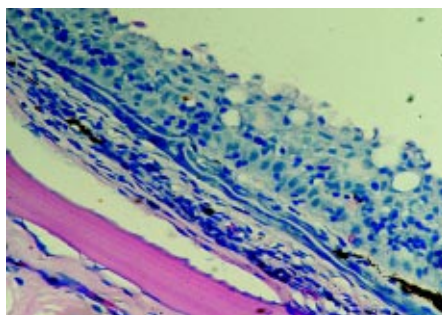


Figura 26. Piel (T5 - Roundup®). Aumento del grosor de la epidermis, festoneamiento de la superficie epidermal, hiperplasia e hipertrofia de células de moco, infiltrado leucocitario en epidermis y subepidermis y acúmulos de pigmento subepidermales (40x. H-E).

Riñón. De modo general en el To y en los demás T's se preservó la arquitectura normal del órgano. Tanto en el To como en los T's de exposición al Roundup® se presentó necrosis multifocal de estructuras tubulares poco frecuentes asociadas a esporas de myxosporidios. Adicionalmente, se hallaron centros melanomacrófagos (CMM) en el To y en los T's 1-5. En todos los T's fueron hallados CMM grandes

asociados a esporas de myxosporidios y en los T's de exposición al Roundup® se presentaron con mayor frecuencia CMM pequeños asociados a estructuras tubulares.

Intestino. En todos los T's se presentó hiperplasia leve de células de moco y congestión e infiltrado leucocitario leve en la lámina propia.

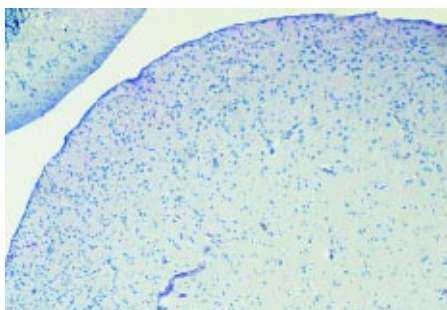


Figura 27. Cerebro (To). Estructura normal del cerebro con meninges delgadas y limpias (10x. H-E).

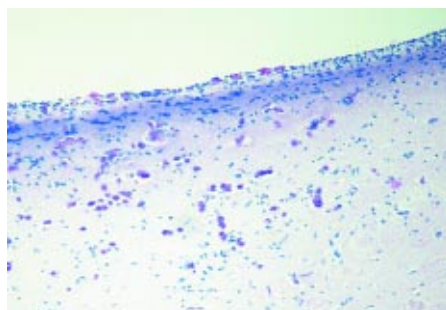


Figura 28. Cerebro (T1 - Roundup®). Infiltración de CGE/CM en las meninges y en la corteza del telencéfalo (10x. H-E).

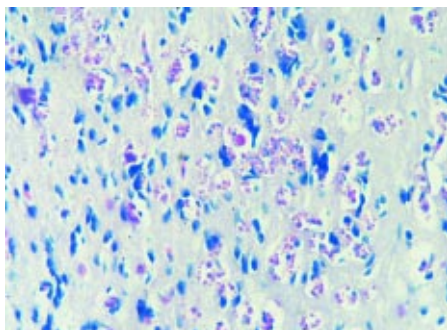


Figura 29. Cerebro (T1 - Roundup®). Infiltración de CGE/CM asociadas a somas neuronales y con gliosis acompañante (40x. H-E).

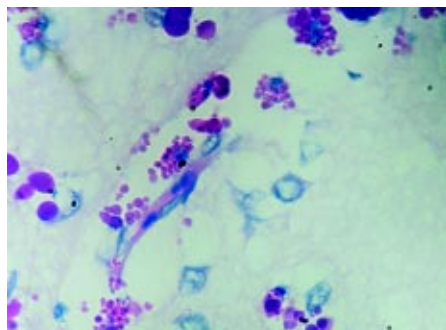


Figura 30. Cerebro (T5 - Roundup®) Neuronas con procesos degenerativos, CGE asociadas a somas neuronales y edema perivascular. Las CGE/CM presentan componentes granulares finos y en forma de gotas hialinas (100x. H-E).

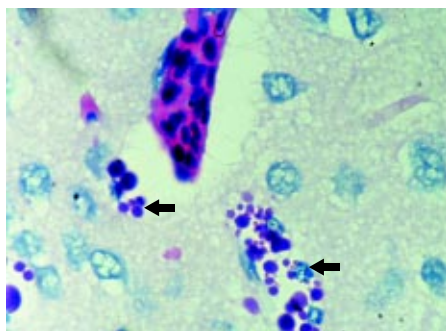


Figura 31. Cerebro (T 5 - Roundup®) Procesos degenerativos de los cuerpos neuronales y cuerpos apoptóticos con CGE/CM asociadas ◀ (100x. H-E).

Estómago. En el To y los T's 1-5 fue común el infiltrado de células mononucleares en la lámina propia y en los T's 3, 4 y 5 se presentó hiperplasia leve de células de moco.

Encéfalo. En el encéfalo se observaron diferencias considerables entre el To (Figura 27) y los T's 1-5 (Figura 28). En los T's 1-5 y en uno de los animales del To se halló infiltración de células granulares eosinofílicas/células mast (CGE/CM) en las meninges y en la corteza cerebral (Figuras 29-31), principalmente en el área del telencéfalo, asociadas a somas neuronales degenerados (algunos en proceso de apoptosis o de necrosis) con gliosis acompañante (Figuras 29). Las CGE/CM estuvieron aumentadas de tamaño y variaron en el tamaño de sus componentes granulares (granulaciones finas y gotas hialinas) (Figura 30). En la corteza cerebral las CGE/CM se observaron en estrecho contacto con somas neuronales. En el To, este hallazgo fue muy localizado, contrastando con la mayor extensión y número de neuronas involucradas en los T's 1-5, en los cuales no hubo diferencias de severidad entre los mismos. Adicionalmente, en los T's 1-5, a diferencia del To, se halló con frecuencia procesos de cromatólisis central de los somas neuronales acompañados de gliosis sin CGE/CM asociadas.

Capítulo IV

 FECTOS DEL COSMOFLUX[®] 411F
EN JUVENILES DE CACHAMA BLANCA
(*Piaractus brachypomus*)

En este capítulo se reportan los efectos tóxicos agudos del surfactante Cosmoflux® 411F en juveniles de cachama blanca expuestas por 96 horas, determinando la CL_{50} , las manifestaciones clínicas y alteraciones anatomopatológicas en branquias, hígado, riñones, estómago, intestino, piel y cerebro con base en trabajos de Rondón-Barragán (2006) como parte del proyecto marco. Del mismo modo se evalúan las manifestaciones clínicas y alteraciones anatomopatológicas en los mismos órganos derivados de la exposición a concentraciones subletales del Cosmoflux® 411F en el mismo periodo de tiempo.

El presente ensayo constó de dos experimentos:

1. Exposición a concentraciones subletales.
2. Determinación de la CL_{50} .

Para el experimento de exposición a concentraciones subletales, las concentraciones de Cosmoflux® 411F se establecieron de acuerdo con la proporción 44:1 volumen/volumen de Roundup®/ Cosmoflux® 411F utilizada en la mezcla de aspersión de cultivos ilícitos en Colombia, basándose en las concentraciones de Roundup® utilizadas en el capítulo anterior, y siguiendo una progresión geométrica de 2. Las concentraciones fueron: 0 (T0), 0.17 mg.l⁻¹ (T1), 0.34 mg.l⁻¹ (T2), 0.68 mg.l⁻¹ (T3), 1.36 mg.l⁻¹ (T4) y 2.72 mg.l⁻¹ (T5). Los animales fueron sometidos a dichas condiciones por un periodo de 96 horas y fueron realizadas 3 replicas.

Para el experimento de determinación de la CL_{50} a 96 horas del Cosmoflux® 411F se realizó una prueba piloto con el fin de hacer una aproximación al rango en el cual se encontraba la CL_{50} . Las concentraciones fueron (en orden ascendente del T0 al T5): 0, 3000, 3450, 3900, 4350 y 4800 mg.l⁻¹. Para cada uno de los T's se realizaron dos replicas y se usaron peces diferentes a los usados para el ensayo de exposición a concentraciones bajas, exponiendo 7 peces por acuario.

El muestreo de los peces, la evaluación del patrón de nado y alteraciones en el comportamiento, así como la determinación de la CL_{50} se realizaron de la forma descrita en el capítulo III.

EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES

Parámetros de calidad del agua

Los parámetros de calidad de agua no mostraron diferencias significativas entre T's (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de calidad del agua durante la fase experimental (Cosmoflux® 411F-concentraciones bajas).

	Oxígeno (mg.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH
T0	7.3 ± 0.6	24.5 ± 1.3	7.10 ± 0.21
T1	7.1 ± 0.8	24.4 ± 1.3	7.06 ± 0.24
T2	7.3 ± 0.6	24.6 ± 1.1	7.18 ± 0.14
T3	7.3 ± 0.6	24.6 ± 1.1	7.20 ± 0.12
T4	7.1 ± 0.6	24.6 ± 1.1	7.11 ± 0.13
T5	7.0 ± 0.6	24.5 ± 1.1	7.09 ± 0.11

Los datos son expresados como media ± desviación estándar.

Comportamiento

En todos los T's de exposición al Cosmoflux® 411F se evidenciaron leves alteraciones en el patrón de nado durante las 96 horas del experimento

y fue posible observar movimientos anormales en los tres tercios del acuario. Las alteraciones son descritas a continuación:

A las 2 horas del inicio de la fase experimental, 2 individuos del T2 (0.34 mg.l⁻¹) manifestaron episodios de nado explosivo. Por el contrario, a las 4 horas los individuos del T1 (0.17 mg.l⁻¹) se mostraron pasivos comparados con los demás T's, incluyendo el grupo control. A las 8 horas los animales de los T3 (0.68 mg.l⁻¹), T4 (1.36 mg.l⁻¹) y T5 (2.72 mg.l⁻¹) permanecieron quietos en el tercio inferior del acuario; por otra parte, en el T4 tres individuos mostraron quietud en el tercio medio. En los T's 3 y 5, aunque presentaron movimientos anormales, la velocidad del movimiento se redujo considerablemente. En el T4 a la 8ª hora, los animales permanecieron en el tercio inferior de manera estática; sin embargo, respondieron con prontitud al estímulo de amenaza visual. A las 24 horas los animales del T5 manifestaron hiperactividad comparados con los demás T's.

Hallazgos Histopatológicos

Los hallazgos histopatológicos aumentaron en severidad con el incremento en la concentración del tóxico.

Branquia. El To se conservó la morfología normal excepto por el desarrollo de hiperplasia leve de células de moco. En los T's 2-5 se observó necrosis interlamelar del epitelio. Adicionalmente, en todos los T's se observaron algunas formaciones quísticas de myxosporidios en las lamelas.

Hígado. En el To se halló vacuolización lipídica leve de los hepatocitos, lo cual fue un hallazgo común para los T's expuestos al Cosmoflux® 411F (Figura 32). Adicionalmente, en los T's 1-5 se hallaron cariorrexis, picnosis y anisocitosis multifocales, poco frecuentes, de hepatocitos acompañados de infiltrados leucocitarios. En el T4 se halló congestión severa.

Piel. La piel del To conservó la morfología normal con la epidermis delgada y su superficie regular. En los T's 1-5 se halló infiltración de células mononucleares en la dermis, activación de células de alarma,

hiperplasia de células de moco y edema en la dermis observándose separadas las fibras de colágeno y presencia de pigmentos en la dermis.

Riñón. En el T0 se observaron CMM dispersos en el parénquima, conservándose la estructura normal del órgano. En los T's 1-5 se observaron CMM de distribución multifocal, picrositis tubular así como quistes de esporas de myxosporidios y pérdida de la densidad de las células. En el T4, por otra parte, se observó degeneración leve de células epiteliales tubulares y desprendimiento de las mismas (Figura 33).

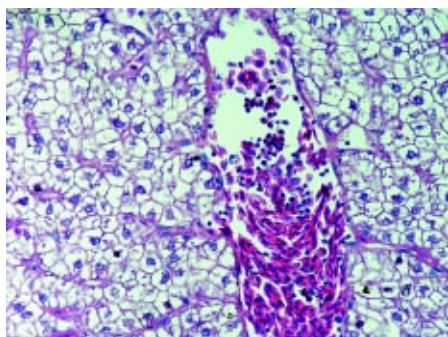


Fig. 32. Hígado (T1 - Cosmoflux® 411F). Vacuolización lipídica leve y anisocitosis de los hepatocitos. (40x. H-E).

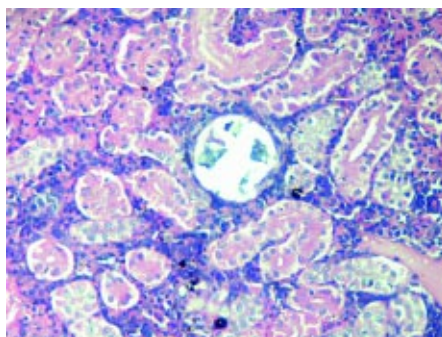


Fig. 33. Riñón (T3 - Cosmoflux® 411F). Desprendimiento leve del epitelio tubular y lesión granulomatosa (40x H-E).

Estómago e Intestino. En el T0 no se hallaron cambios estructurales en estos órganos. En los T's 1-5, tanto en el intestino como en el estómago, se hallaron hiperplasia moderada de células de moco e infiltración linfocitaria y de células mononucleares en la lámina propia. Por otra parte, en los T's 2-5 en el intestino se observó vacuolización moderada de enterocitos (Figura 34).

Experimento para la determinación de la CL_{50}

El valor de CL_{50} es de 4417.99 mg.l⁻¹. La mortalidad de los diferentes T's se registra en la Tabla 9.

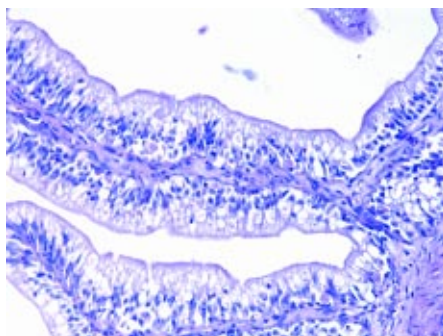


Fig. 34. Intestino medio (T3 - Cosmoflux® 411F). Vacuolización moderada de enterocitos e infiltración de células mononucleares en la lámina propia y la submucosa (40x. H-E).

Tabla 9. Mortalidad a las 96 horas (Cosmoflux® 411F).

Tratamiento	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Número de animales muertos	-	-	7	1	7	8

Hallazgos de necropsia

En el grupo control no fueron hallados signos relevantes. En el T1 se evidenció erosión de la porción distal de las aletas caudal y dorsal (14/14), además de una coloración clara de la piel. En el hígado fue posible observar una coloración roja intensa en algunos animales (2/14) mientras en otros animales (4/14) coloraciones blanquecinas multifocales. Se encontró además el riñón pálido en algunos individuos (2/14).

El T2 mostró un animal con palidez severa del hígado (1/7).

En el T3 fue posible evidenciar en branquias, acumulación de material blanquecino en el tercio distal de los filamentos (13/13) (Figura 35). El hígado, al igual que en el T1, presentó coloraciones blanquecinas más definidas y de mayor extensión acompañada de palidez leve (6/13). En este tratamiento se observó la presencia de contenido gástrico blanquecino (13/13) al igual que en el T5 (6/6). En el T4 se halló palidez en el hígado así como presencia de coloraciones blanquecinas difusas moderadas (1/7) al igual que en el T5 (6/6).

Los animales también presentaban residuos blanquecinos en el tercio distal de los filamentos branquiales (6/7). En el T5 se observaron residuos blanquecinos en el extremo distal de los filamentos branquiales, así como cambios en la coloración de la porción distal de los filamentos branquiales compatibles con hemorragias (6/6).



Fig. 35. Acumulación de material grisáceo en el extremo distal branquial (Cosmoflux® 411F).

Hallazgos histopatológicos de la CL₅₀

La severidad de las lesiones histopatológicas estuvo correlacionada con el incremento en la concentración del Cosmoflux® 411F.

Branquia. En el T₀, las branquias presentaron la morfología normal (Figura 36).

En los T's expuestos a Cosmoflux® 411F se evidenciaron cambios festoneados en el epitelio lamelar, congestión, levantamiento leve del epitelio, infiltrados leucocitarios interlamelares e interfilamentales proximales, hiperplasia interlamelar e interfilamental y activación de células de cloro (Figura 37 y 38).

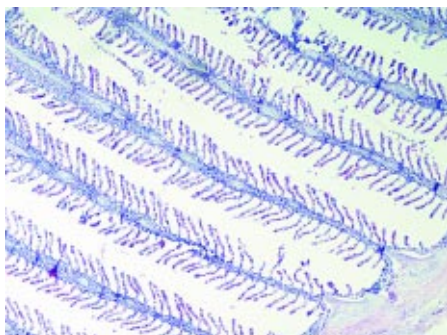


Fig. 36. Branquia (T0). Hiperplasia ligera en la región distal de los filamentos (10x H-E).

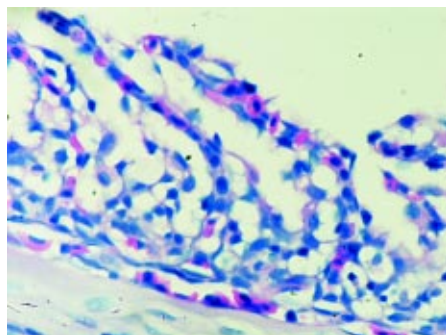


Fig. 37. Branquia (T1 - Cosmoflux® 411F). Hiperplasia leve a moderada en la región interfilamental y cambios festoneados sobre la superficie de las células epiteliales (100x. H-E).

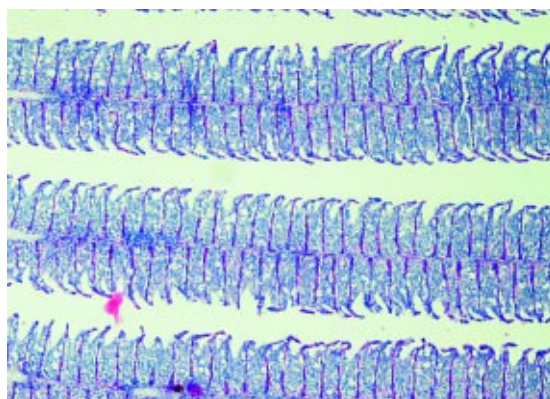


Fig. 38. Branquia (T4 - Cosmoflux® 411F). Hiperplasia interlamelar severa (10x. H-E).

En el T3, las branquias presentaron congestión y hemorragias lamelares multifocales, rompimiento de células pilar acompañado de pequeños aneurismas en las lamelas así como fusión lamelar con reacción inflamatoria. En el T4 y 5 se evidenció hiperplasia de células de moco, fusión lamelar severa y la formación de un pseudoepitelio que une los extremos distales de las lamelas sin hiperplasia interlamelar propiamente dicha (Figuras 39 y 40). La mucosa faríngea se halló engrosada y con infiltración de leucocitos. Del mismo modo, fue frecuente el hallazgo de quistes de myxosporidios de severidad variable, acompañados de focos de hiperplasia leve en algunos ejemplares.

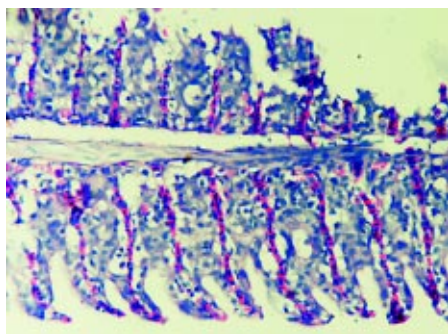


Fig. 39. Branquia (T4 - Cosmoflux® 411F). Hiperplasia interlamelar severa, con hiperplasia de células de moco y dilatación de los mismos, y destrucción de las lamelas (40x. H-E).

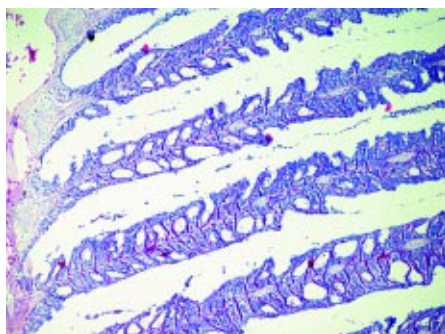


Fig. 40. Branquia (T5 - Cosmoflux® 411F). Hiperplasia interlamelar severa generalizada y formación de pseudomembranas que unen los extremos distales de las lamelas (10x. H-E).

Hígado. En el To el hígado presentó la morfología normal excepto por vacuolización lipídica leve de los hepatocitos, el cual fue un hallazgo común para todos los T's pero de mayor severidad a las concentraciones superiores. Adicionalmente, en los T's expuestos al Cosmoflux® 411F se halló congestión leve. En los T's 3 y 4 se observó anisocitosis de hepatocitos, apoptosis y cariorrexis. En los T's 4 y 5 se halló degeneración parenquimatosa de los hepatocitos así como necrosis de coagulación. De la misma manera, se observaron focos de infiltración por quistes de myxosporidios en algunos ejemplares.

Piel. En el To la piel se observó normal con epidermis delgada y de superficie regular. En los T's 1-5 se observó engrosamiento de la epidermis, mayor a las concentraciones superiores, con hiperplasia leve de células pavimentosas y de moco, infiltración de células mononucleares en la epidermis y espongiosis (Figura 41).

Riñón. En el To el riñón preservó la morfología normal presentándose CMM dispersos en el parénquima. En los T's 1-5 fueron más frecuentes los CMM y de mayor extensión, asociados a lesiones tubulares y a esporas de myxosporidios (Figura 42). También fueron hallados cambios degenerativos leves en algunos túbulos con necrosis, vacuolización leve de células epiteliales tubulares, congestión vascular cortical y daños crónicos, como fibrosis. Adicionalmente, en el T4 se presentó infiltración leve de CGE/CM.

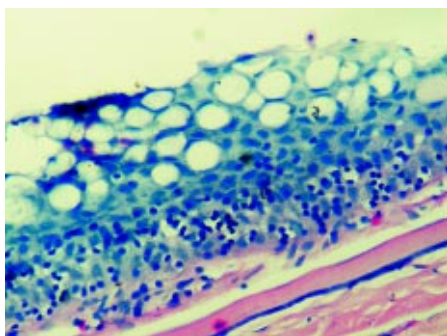


Fig. 41. Piel (T3 - Cosmoflux® 411F). Hiperplasia moderada de células pavimentosas y de moco, acompañada de infiltración de células mononucleares (40x. H-E).

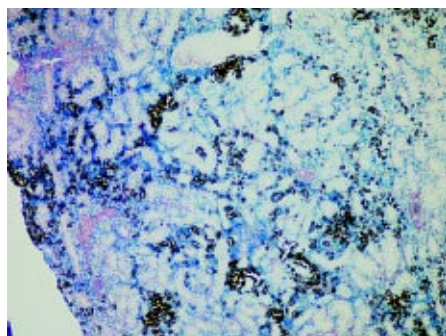


Fig. 42. Riñón (T3 - Cosmoflux® 411F). Aumento de la expresión de centros melanomacrófagos, asociados principalmente a la porción tubular renal (10x. H-E).

Estómago e Intestino. En todos los T's, excepto el T0, se presentó una capa gruesa de moco en el lumen. En los T's 3-5, el estómago evidenció congestión de la lámina propia y submucosa, cambios degenerativos en glándulas gástricas e hiperplasia de células de moco. En los T's 1-5, el intestino medio mostró vacuolizaciones leves no generalizadas de los enterocitos en la región apical, infiltraciones de células mononucleares en la lámina propia y aumento de la presencia de moco en las concentraciones superiores. Adicionalmente, en los T's 4 y 5 se halló necrosis de enterocitos.

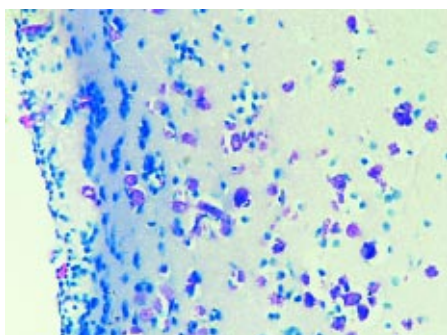


Fig. 43. Encéfalo (T1 - Cosmoflux® 411F). Infiltración de CGE/CM en la corteza del telencéfalo (40x. H-E).

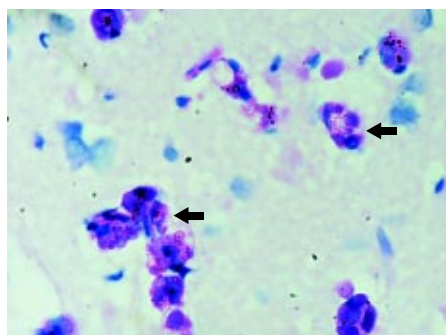


Fig. 44. Encéfalo (T1 - Cosmoflux® 411F). Cuerpos apoptóticos de neuronas con CGE/CM asociadas ◀ (100x. H-E).

Cerebro. El To conservó la morfología normal. En la región anterior del encéfalo, correspondiente al telencéfalo, de los T's 1-5 se halló infiltración perivascular de CGE/CM en la corteza, así como congestión en meninges y la corteza. Igualmente, se detectaron cuerpos de neuronas apoptóticas e infiltración perivascular de células gliales y CGE/CM (Figuras 43-44).

Capítulo V

 FECTOS DE LA MEZCLA ROUNDUP® MÁS
COSMOFLUX® 411F EN JUVENILES DE
CACHAMA BLANCA (*Piaractus brachypomus*)

Los resultados sobre determinación de la toxicidad aguda de la mezcla Roundup® más Cosmoflux® 411F en juveniles de cachama blanca por un periodo de exposición de 96 horas, determinando la CL_{50} , las manifestaciones clínicas y alteraciones anatomopatológicas en branquias, hígado, riñones, estómago, intestino, piel y cerebro se basan en lo reportado por Vidal-Barrios (2006) como parte del proyecto marco. Igualmente, se determinó el tipo de interacción o efecto del Cosmoflux® 411F sobre la toxicidad del Roundup®. Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas para el experimento de exposición al Roundup® (capítulo I). Para este experimento fueron usados el herbicida Roundup® y el surfactante Cosmoflux® 411F, anteriormente descritos (capítulos III y IV). Las concentraciones de las dos sustancias en la mezcla fueron establecidas manteniendo la proporción 44:1 volumen / volumen de Roundup®- Cosmoflux® 411F utilizada en la mezcla de aspersión y tomando como referencia el valor de CL_{50} de 69.61 $mg \cdot l^{-1}$ a 96 horas en juveniles de cachama blanca, obtenido por Ramírez-Duarte *et al.* (2004) en ensayos preliminares.

De este modo, se utilizaron los siguientes T's de exposición a Roundup® y Cosmoflux® 411F: T0 (libre de sustancias experimentales), T1 (7.5 y 0.06 $mg \cdot l^{-1}$), T2 (15.0 y 0.12 $mg \cdot l^{-1}$), T3 (30.0 y 0.24 $mg \cdot l^{-1}$), T4 (60.0 y 0.48 $mg \cdot l^{-1}$) y T5 (120.0 y 0.96 $mg \cdot l^{-1}$) del herbicida y el surfactante, respectivamente.

Parámetros de calidad del agua

Los parámetros de pH y oxígeno disuelto mostraron diferencias significativas entre T's (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de calidad del agua durante la fase experimental (mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F).

	Oxígeno (mg.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Ca (mg.l ⁻¹)	Mg (mg.l ⁻¹)
To	7.4 ± 0.08 ^a	24.8 ± 0.65	6.53 ± 0.17 ^a	1.70 ± 0.18	0.58 ± 0.18
T1	7.4 ± 0.14 ^a	24.8 ± 0.65	6.47 ± 0.14 ^a	1.91 ± 0.43	0.64 ± 0.14
T2	7.3 ± 0.18 ^b	24.9 ± 0.64	6.65 ± 0.24 ^{a,b}	2.16 ± 0.40	0.64 ± 0.14
T3	7.4 ± 0.13 ^c	24.9 ± 0.63	6.42 ± 0.22 ^{a,c}	2.29 ± 0.96	0.70 ± 0.00
T4	7.5 ± 0.18 ^c	24.8 ± 0.65	5.98 ± 0.18 ^d	2.20 ± 0.57	0.70 ± 0.00
T5	7.7 ± 0.06 ^{c,d}	24.8 ± 0.62	5.73 ± 0.04 ^e	2.33 ± 0.20	0.70 ± 0.00

Los datos son expresados como media ± desviación estándar.

^{a,b,c,d} Medias con superíndices distintos presentan diferencias significativas (p<0.05).

Manifestaciones clínicas

Se hallaron alteraciones clínicas en todos los T's en los que las cachamas fueron expuestas a las sustancias experimentales.

A partir de la 1ª hora de exposición se evidenció reducción severa de la actividad de nado y ausencia de respuesta al estímulo visual en los T's 5 y 4 con pérdida completa y transitoria del eje de nado, respectivamente, lo cual persistió a lo largo del experimento. Los peces permanecieron en posición inclinada con la cabeza hacia arriba y se manifestó tos en el T5. A esta misma hora se presentó una reducción leve de la actividad de nado en el T3.

A partir de la 2ª hora se presentó una reducción leve a moderada de la actividad de nado en el T3 y leve en los T's 1 y 2 sin cambios en la respuesta al estímulo visual en comparación al To.

Desde la 24^a hora los peces del T3 manifestaron una reducción severa de la actividad de nado, permanecieron quietos en posición inclinada con la cabeza hacia arriba y a partir de la 28^a hora no hubo respuesta al estímulo visual.

A partir de la 48^a hora los peces del T2 manifestaron reducción moderada de la actividad de nado manteniendo la respuesta al estímulo visual.

Concentración letal 50 (CL₅₀)

En la tabla 14 se observa el comportamiento de la mortalidad en el transcurso de la fase experimental para la determinación de la CL₅₀.

Tabla 14. Mortalidad de la mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F durante las 96h.

Hora	To*	T1	T2	T3	T4*	T5
6	-	-	-	-	7	21
12	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	8	-
48	-	-	-	5	5	-
72	-	-	-	7	-	-
96	-	-	1	5	-	-
Total	0	0	1	17	20	21

*Los T's 0 y 4 se conformaron con 20 animales.

El procesamiento de los datos de mortalidad con el programa TRIMMED SPEARMAN -KARBER- TSK versión 1.0 arrojó un valor de CL₅₀ de 23.42 mg.l⁻¹ para el Roundup® ($p < 0.05$) y de 0.19 mg.l⁻¹ del Cosmoflux® 411F ($p < 0.05$) en la mezcla con una proporción 44:1 herbicida:surfactante.

Teniendo en cuenta la CL₅₀ del Cosmoflux® 411F (capítulo IV) y la CL₅₀ del Roundup® (capítulo III) y la de estos componentes en la mezcla se determinó el tipo de interacción existente entre las dos formulaciones mediante la aplicación de la fórmula de Timbrell (1999):

$$v: \frac{CL_{50} \text{ esperada de (A + B)}}{CL_{50} \text{ observada de (A + B)}} = \frac{97.47 \text{ mg.l}^{-1} + 4417.99 \text{ mg.l}^{-1}}{23.42 \text{ mg.l}^{-1} + 0.19 \text{ mg.l}^{-1}} = \mathbf{191.2}$$

Donde: A: CL₅₀ del Roundup® y B: CL₅₀ del Cosmoflux® 411F

Hallazgos de necropsia

En el T₀ no se observaron alteraciones macroscópicas. Los hallazgos de necropsia en los T's 1-5 son descritos con sus respectivas frecuencias de presentación en la tabla 15.

Tabla 15. Hallazgos de necropsia en los T's 1-5 (mezcla Roundup® + Cosmoflux® 411F).

Órgano	Lesión	T1	T2	T3	T4	T5
Branquias	Residuo mucoso grisáceo en el tercio distal de los filamentos	*10/21; 47.61%	(13/21; 61.90%)	(21/21; 100%)	(20/20; 100%)	(21/21; 100%)
	Congestión		(2/21; 9.52%)	(21/21; 100%)	(20/20; 100%)	(21/21; 100%)
	Hemorragias	10/21; 47.61%	(2/21; 9.52%).	(21/21; 100%)	(20/20; 100%)	(21/21; 100%)
	Hipersecreción mucosa				(21/20; 100%)	(21/21; 100%)
Hígado	Congestión	3/21; 14.28%			(4/20; 19.04%)	
	Focos blanquecinos		(9/21; 42.85%)	(1/20; 5%)	(3/20; 14%)	(2/21; 9.52%)
	Palidez generalizada		(9/21; 42.85%)	(7/20; 35%)	(3/20; 14%)	(21/21; 100%)
Estómago	Congestión			(3/20; 15%)		(8/21; 38.09%)
Piel	Hipersecreción mucosa				(21/20; 100%)	(21/21; 100%)
Intestino	Congestión			(3/20; 15%)		(8/21; 38.09%)
Cerebro	Congestión					(3/21; 14.28%)

*10 animales de 21 presentaron la lesión. El numerador indica la cantidad de animales afectados.

Hallazgos histopatológicos

Branquias. En el To las lamelas se hallaron largas y delgadas, con levantamiento leve del epitelio lamelar y de forma infrecuente se observaron procesos multifocales leves de hiperplasia interlamelar (Figura 45), conservándose normales las células epiteliales y la estructura general del órgano (Figura 46).

En los T's expuestos a la mezcla se halló hiperplasia interlamelar (Figuras 47 y 48) e interfilamental proximal de mayor severidad en las

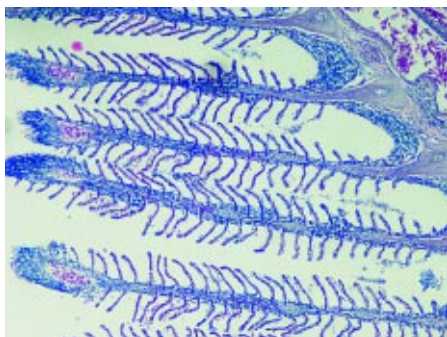


Fig. 45. Branquia (To - mezcla). Lamelas largas y delgadas con hiperplasia interlamelar multifocal leve (10x. H-E).

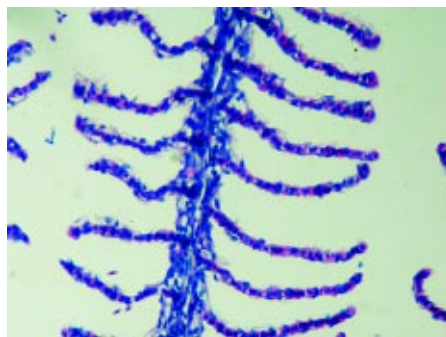


Fig. 46. Branquia (To - mezcla). Lamelas largas y delgadas con desprendimiento leve del epitelio, así mismo el epitelio interlamelar se observa delgado (40x. H-E).

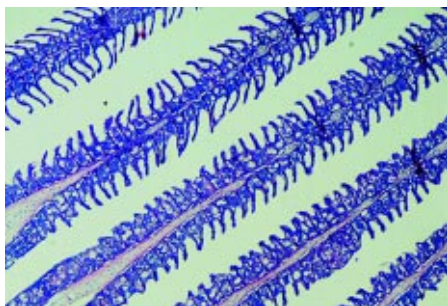


Fig. 47. Branquia (T2 - mezcla). Hiperplasia interlamelar moderada e interfilamental proximal (10x. H-E).

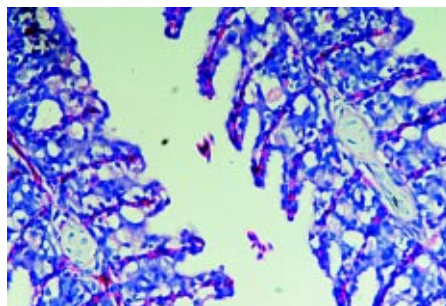


Fig. 48. Branquia (T2 - mezcla). Branquitis proliferativa generalizada, infiltración de células mononucleares en la región interfilamental (40x. H-E).

concentraciones superiores, acompañada de hiperplasia e hipertrofia de células de moco, infiltración leucocitaria (también presentes en la región faríngea) y de CGE/CM, levantamiento, festoneamiento e hipertrofia del epitelio. En los T's 2 y 5 se halló la formación de un pseudoepitelio que une los extremos distales de las lamelas sin el desarrollo de hiperplasia interlamelar propiamente dicha y cambios necróticos leves generalizados del epitelio lamelar, áreas de denudación lamelar, congestión, aneurismas y hemorragias con ruptura de células pilar, más severos y frecuentes en las concentraciones superiores (Figuras 49-51).

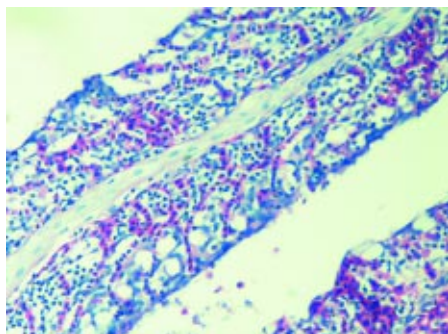


Fig. 49. Branquia (T4 - mezcla). Fusión lamelar, microhemorragias por ruptura de células pilar, pseudoepitelización, e infiltración de células mononucleares (40x. H-E).

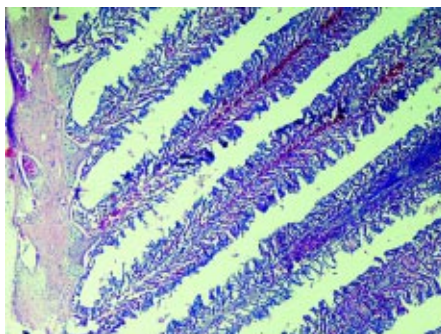


Fig. 50. Branquia (T5 - mezcla). Procesos necróticos hacia la parte proximal de los filamentos y proliferación hacia la parte distal de los mismos progresando hacia fusión total de lamelas con formación de pseudoepitelio, ruptura de células pilar e infiltración severa generalizada de células mononucleares en la región lamelar, interlamelar y faríngea (10x. H-E).

La hiperplasia interlamelar progresó en los T's 3-5 hasta el desarrollo de fusión lamelar presente generalmente en la mitad distal de los filamentos siendo frecuente la presencia de hemorragias multifocales en dichas zonas (Figura 52) y en la mitad proximal de los filamentos se halló necrosis lamelar severa que en algunos casos progresó hasta denudación lamelar. Adicionalmente, de forma infrecuente se hallaron quistes de myxosporidios.

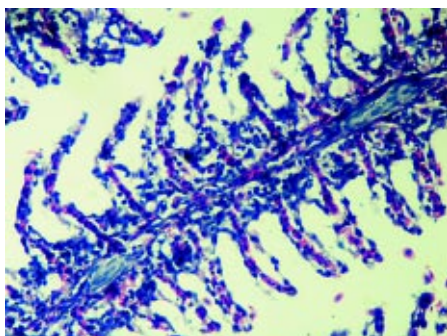


Fig. 51. Branquia (T3 - mezcla). Hiperplasia interlamelar severa y fusión lamelar, desprendimiento del epitelio lamelar e infiltración de células mononucleares (40x H-E).

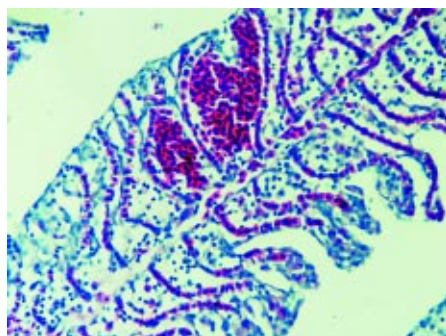


Fig. 52. Branquia (T5 - mezcla). Aneurismas lamelares, branquitis proliferativa (40x. H-E).

Hígado. El To conserva la morfología normal excepto por vacuolización lipídica leve generalizada de los hepatocitos (Figura 53).

En los T's expuestos a la mezcla el hígado se observó congestionado y, al igual que el control, vacuolización lipídica generalizada de los hepatocitos de mayor severidad en las concentraciones superiores. En los T's 3-5 se observó la presencia de material reticular fuertemente eosinofílico con gotas hialinas en el citoplasma de los hepatocitos contrastando con zonas de vacuolización lipídica. Adicionalmente, se halló anisocitosis, necrosis y apoptosis multifocales de hepatocitos, más severas y frecuentes en las concentraciones superiores. Del mismo modo, se presentaron CMM dispersos en el parénquima (Figura 54).

Piel. En el To la piel conserva la morfología normal con epidermis delgada y superficie regular presentando acúmulos de pigmento marrón (melanina) a nivel subepidermal y epidermal (Figura 55).

En los T's expuestos a la mezcla Roundup® + Cosmoflux® se halló engrosamiento de la epidermis con hiperplasia de células pavimentosas y de células de moco, de mayor severidad en las concentraciones superiores, así como acúmulos de melanina a nivel subepidermal. Adicionalmente, en los T's 3-5 se halló infiltración de leucocitos, espongiosis leve y cambios necróticos y festoneamiento generalizado de células pavimentosas (Figura 56).

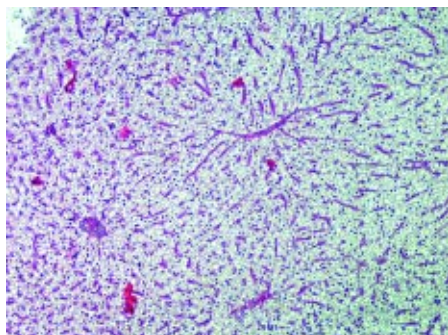


Fig. 53. Hígado (To - mezcla). Vacuolización lipídica leve de los hepatocitos (10x. H-E).

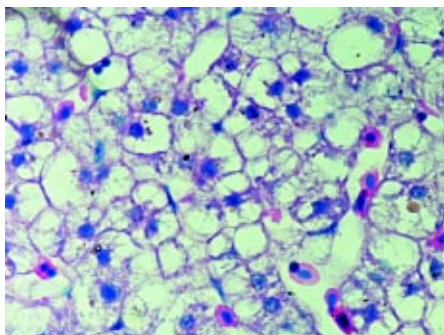


Fig. 54. Hígado (T2 - mezcla). Vacuolización lipídica generalizada moderada, anisocitosis de hepatocitos (40x. H-E).

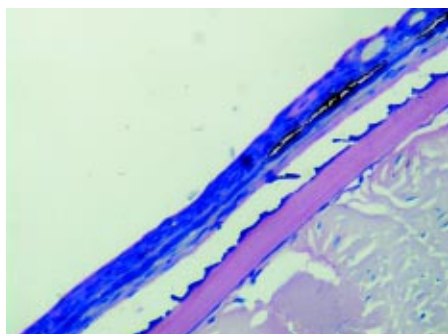


Fig. 55. Piel (To - mezcla). Epidermis delgada conservando su morfología normal con acumulación subepidermal leve de melanina (40x. H-E).

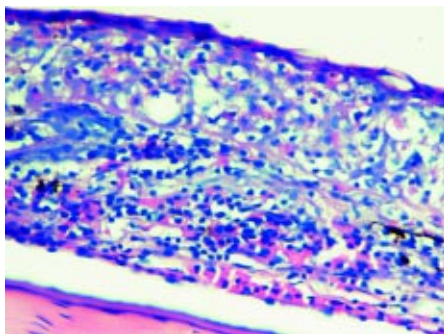


Fig. 56. Piel (T5 - mezcla). Engrosamiento, festoneamiento e hiperplasia severa de células de la epidermis e infiltración de células mononucleares (40x. H-E).

Riñón. En el To el riñón conserva la morfología normal. Adicionalmente, se evidencian CMM pequeños dispersos en el parénquima.

En los T's expuestos a la mezcla Roundup® más Cosmoflux® 411F se halló necrosis multifocal de estructuras tubulares, de mayor frecuencia en las concentraciones superiores. Adicionalmente, se hallaron CMM pequeños dispersos en el parénquima asociados y no asociados a esporas de myxosporidios (Figura 57).

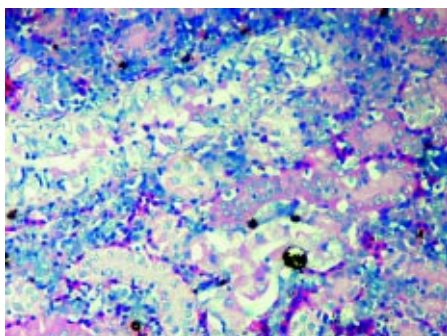


Fig. 57. Riñón (T3 - mezcla). Necrosis multifocal del epitelio tubular (40x. H-E).

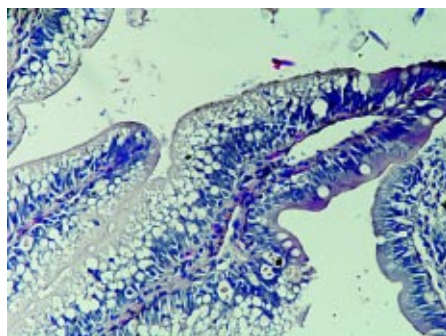


Fig. 58. Intestino (T4 - mezcla). Vacuolización de enterocitos e infiltración leve de leucocitos en la lámina propia, (40x. H-E).

Intestino. En el To el intestino se observó normal excepto por vacuolización leve de los enterocitos, el cual fue un hallazgo común para todos los T's. Adicionalmente, en todos los T's expuestos a la mezcla se halló hiperplasia leve de células de moco, infiltrados leucocitarios en la mucosa así como necrosis y desprendimiento multifocal de enterocitos (Figura 58).

Estómago. En el To se observa la morfología normal del estómago. En los T's 1-5 se hallaron congestión de la lámina propia e hiperplasia leve de células de moco. Adicionalmente, en el T5 se halló infiltración de células mononucleares en la submucosa y la mucosa y procesos necróticos multifocales poco frecuentes en esta última.

Cerebro. En el To no se hallaron alteraciones histopatológicas (Figura 59).

En los T's expuestos a la mezcla de Roundup® + Cosmoflux® 411F se hallaron procesos degenerativos (necrosis y apoptosis) de somas neuronales con gliosis y/o infiltración de CGE/CM asociadas en el telencéfalo, meninges y vasos sanguíneos. Las CGE/CM son observadas aumentadas de tamaño y con contenido eosinofílico citoplasmático de tamaño variable (gotas hialinas y granulaciones finas). Adicionalmente, se observaron edemas perivasculares y perineuronales acompañados de congestión cortical y meníngea (Figura 60-61).

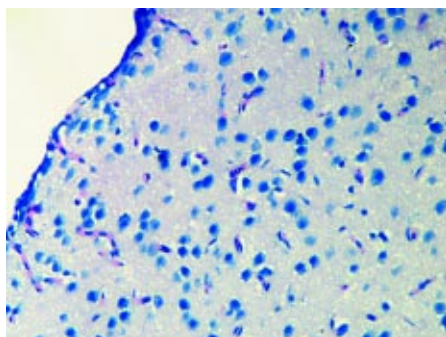


Fig. 59. Cerebro (To - mezcla). Estructura normal del órgano (40x. H-E).

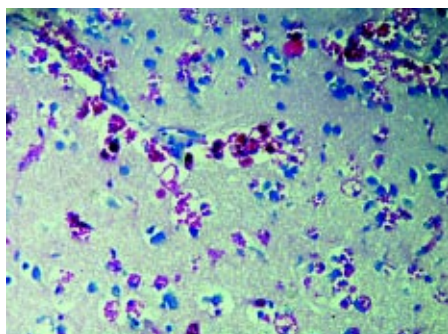


Fig. 60. Cerebro (T4 - mezcla). Infiltración de CGE/CM asociadas a somas neuronales y gliosis en la corteza del telencéfalo (40x. H-E).

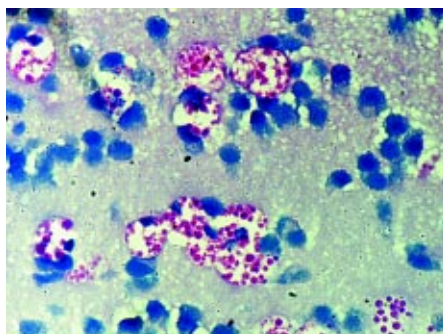


Fig. 61. Cerebro (T5 - mezcla). Cambios degenerativos en somas neuronales asociados a infiltración de CGE/CM (100x. H-E).

Capítulo VI

A NÁLISIS Y DISCUSIÓN SOBRE LOS EFECTOS DEL GLIFOSATO Y SUS MEZCLAS EN LA CACHAMA BLANCA

El Roundup® es un herbicida utilizado ampliamente en prácticas agrícolas. Particularmente en Colombia se viene implementando en las prácticas de fumigación de cultivos de coca y amapola bajo la denominación Roundup® Ultra el cual posee los mismos componentes del Roundup (GP y surfactante POEA) pero con variaciones ligeras en la concentración de los mismos. En las prácticas de fumigación se utiliza, además del GP, el surfactante no iónico denominado Cosmoflux® 411F con el fin de facilitar la actividad herbicida del GP. Por más de 10 años se han venido realizando aspersiones bajo parámetros que exceden los límites de seguridad de uso; de acuerdo a los fabricantes, el Roundup® Ultra se debe utilizar a concentraciones en la mezcla de aspersión de 1.6 a 7.7% peso/volumen con una tasa de aspersión de 2.33 l/ha de Roundup Ultra lo cual contrasta con la concentración en la mezcla de 44% peso/volumen y la tasa de aspersión de 17.6 a 30.8 l/ha usada en Colombia. En cuanto al Cosmoflux® 411F, este se utiliza a una concentración del 1% p/v que se encuentra dentro del rango recomendado por el fabricante y tenido en cuenta por la Dirección Nacional de Estupefacientes de 0.5 a 1.5 % peso/volumen en la mezcla (BINLFA, 2002; Oldham et al., 2002).

La utilización del Cosmoflux® 411F no está fundamentada en estudios toxicológicos previos y, de la misma manera, se desconoce la estructura molecular del compuesto, parámetro bajo el cual se puede evaluar parte de la toxicidad, con base en relaciones cuantitativas estructura/actividad (Morrall et al., 2003; Wind & Belanger, 2006). Los componentes de la mezcla de aspersión pueden contaminar cuerpos de agua a través de procesos de lixiviación y escorrentía desde los campos asperjados y por aspersión directa e indirecta, esta última por acción del viento (WHO, 1994).

Los parámetros de calidad de agua en los experimentos de exposición a Cosmoflux® 411F (tabla 8) no mostraron variaciones significativas entre T's. Sin embargo, en los experimentos de exposición al Roundup® (tabla 5) y a la mezcla herbicida mas surfactante (tabla 13) el pH disminuyó progresivamente con respecto al T₀, a medida que aumentaba la concentración de Roundup®, variando cerca de una unidad de pH en los T's 4 y 5. Esta reducción del pH se debe a la naturaleza ácida del GP (WHO, 1994). Aunque en el experimento de exposición a la mezcla se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de oxígeno disuelto entre los T's 2-5 y los T's 0 y 1, en todos los T's estos se hallaron dentro del rango descrito para la especie (Sastre et al., 2004) por lo que se consideró que esta variable no influyó en los resultados.

Manifestaciones clínicas

Los hallazgos clínicos reportados en el presente trabajo constituyen respuestas inespecíficas a contaminantes. Se observó una reducción de los movimientos operculares en los animales una vez se presentó la reducción de la actividad de nado, basados en las observaciones de Norstrom et al. (1976 citado por Yang et al., 2000), la reducción de la frecuencia opercular puede constituir una respuesta para reducir el flujo de agua, y con ello de xenobióticos presentes en ella, a través de las branquias. Sin embargo, dicha respuesta puede ser el resultado de un déficit energético producto de la baja difusión de oxígeno a través del epitelio branquial. La reducción en la actividad de nado hallada en el experimento de exposición al Cosmoflux® 411F a concentraciones bajas, así como en el de exposición al Roundup® y a la mezcla, puede ser también ocasionada por el letargo producto de la baja difusión de oxígeno a través de las branquias y consecuencia del gasto energético que involucra el metabolismo de los tóxicos y es probable, que la reducción de la frecuencia opercular se sea producto de una disminución de la producción de energía. A su vez, la preferencia por los estratos superiores observada en los peces antes de la muerte puede constituir una estrategia para aumentar el suministro de oxígeno.

Se han descrito alteraciones en el comportamiento de los peces ante la exposición a surfactantes no-iónicos a concentraciones de 0.002 a 40 mg.l⁻¹ (Lewis, 1991). La hiperactividad inicial hallada en el experimento

.....

de exposición a Cosmoflux® 411F puede ser una respuesta evasiva de los peces a medios contaminados, basado en la capacidad de los peces de percibir surfactantes a bajas concentraciones de hasta 0.001 mg.l⁻¹ (Sprague, 1968). La tos en los peces expuestos a la mezcla herbicida-surfactante y cambios en el comportamiento han sido descritos ante la exposición a otros surfactantes no-iónicos (Abel & Skidmore, 1975) peces expuestos a 100 mg.l⁻¹ de laurilsulfato sódico, evidenciaron un incremento inmediato en la actividad de nado y en la frecuencia de tos. Hofer et al. (1995) demostraron disminución en la capacidad de nado de alevinos de trucha arco iris expuestos a surfactantes. Así mismo, algunos autores han demostrado una secuencia de cambios comportamentales asociados a intoxicación con surfactantes: excitación, nado errático con incremento en la frecuencia respiratoria, boqueo, convulsiones y muerte (Jonsson & Toledo, 1993; Ramírez-Duarte et al., 2004). Dichas alteraciones en el comportamiento son de importancia ecológica al afectar el desempeño y la competitividad de los peces en el medio silvestre.

CL₅₀ Roundup

Los valores de CL₅₀ del Roundup para teleósteos varían ampliamente. Mitchell et al. (1987) han reportado valores de CL₅₀ a 96 h para trucha arcoiris entre 7.4 y 12 mg.l⁻¹, de 9.6 mg.l⁻¹ para salmón chinook y 11.0 mg.l⁻¹ para salmón coho. Valores cercanos han sido reportados por Folmar et al. (1979) que varían entre 2.3 y 13.0 mg.l⁻¹ para trucha arcoiris, "fathead minnows" (*Pimephales promelas*), "channel catfish" (*Ictalurus punctatus*) y "bluegill sunfish" (*Lepomis macrochirus*), por Jiraungkoorskul et al. (2002) de 16.8 y 36.8 mg.l⁻¹ en juveniles y adultos de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*), respectivamente, y por Abdelghani et al. (1997) de 14.5 mg.l⁻¹ en "channel catfish" y de 13.0 mg.l⁻¹ en "bluegill sunfish". Los valores de CL₅₀ más altos reportados para el Roundup en teleósteos corresponden a los descritos por Hildebrand et al. (1982) en trucha arcoiris de 54.8 mg.l⁻¹ en laboratorio y de 52.0 mg.l⁻¹ en campo. La toxicidad aguda del Roundup® sobre peces es producto del componente surfactante, POEA, para el cual Folmar et al. (1979) determinaron una CL₅₀ en trucha arcoiris tres órdenes de magnitud inferior a la del GP y semejante a la del Roundup,

y en "bluegill sunfish" una CL_{50} dos órdenes de magnitud inferior a la del GP y con toxicidad sin variación significativa a la del Roundup®. En comparación con la CL_{50} del Roundup® reportada para otras especies de peces, la cachama blanca, para la cual se determinó un valor de de 97.47 mg.l-1 en el presente trabajo, muestra mayor resistencia a la toxicidad aguda inducida por el Roundup®.

Cosmoflux® 411F

El valor de CL_{50} del Cosmoflux® 411F en juveniles de cachama blanca (4417.99 mg.l-1) se encuentra por encima del rango descrito para surfactantes no-iónicos, incluyendo alcoholes etoxilados (AE). Debido al desconocimiento de la estructura molecular del Cosmoflux® 411F, es difícil conjeturar variaciones en la toxicidad con respecto a otros surfactantes no-iónicos, basados en relaciones estructura/actividad.

Mezcla Roundup + Cosmoflux® 411F

El análisis de los valores de CL_{50} de las sustancias experimentales por separado y en la mezcla por medio de la fórmula descrita por Timbrell (1999) arrojó un coeficiente de 191.2. Un coeficiente inferior a 0.7 indica antagonismo; de 0.7 a 1.8 indica un efecto aditivo; y superior a 1.8 sugiere un efecto sinérgico o de potenciación. Dado que las lesiones halladas en branquias fueron comunes para las dos sustancias utilizadas en este estudio y que la mortalidad en los peces se debió a las alteraciones branquiales, en este caso se debería hablar de sinergismo entre el Roundup® y el Cosmoflux® 411F.

Hallazgos de Necropsia e Histopatología

Tegumento

En la piel, los hallazgos histopatológicos muestran diferencias entre los peces expuestos al Roundup®, al Cosmoflux® 411F y a la mezcla, respecto a los controles (Figuras 25, 26, 41, 55 y 56). La piel de los peces al estar en contacto directo con el medio acuático, junto con las branquias, constituyen un blanco primario de contaminantes irritantes.

El "festoneamiento" (Figuras 26 y 56) de las células epidermales superficiales, en los peces expuestos al Roundup® y a la mezcla, constituye un cambio degenerativo ocasionado de forma directa por componentes del Roundup® representando una resistencia relativa de las células epidermales al efecto citotóxico del GP (Monroy et al., 2005). La ausencia de necrosis de células epidermales podría ser debida a la protección conferida por la hipersecreción. Sin embargo, en el T5 de exposición al Roundup® y en los T's 3, 4 y 5 de la exposición a la mezcla, se halló necrosis franca de células pavimentosas. Cambios semejantes han sido reportados por Burkhardt-Holm et al. (1997) en trucha café (*Salmo trutta*) expuestas a aguas contaminadas con efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los procesos necróticos de células epiteliales de las branquias y de la piel han sido descritos como efecto directo de agentes (Mallatt, 1985; Iger et al., 1995).

Los cambios proliferativos, la hipertrofia e hiperreactividad de células de moco, hallados en todos los experimentos (Figuras 26, 41 y 56) indican una fase reactiva. La exposición más prolongada a ambientes contaminados puede inducir reducción del número de células de moco y del grosor de la epidermis acompañado de mayor presentación de eventos de muerte celular por necrosis o apoptosis (Benedetti et al., 1989; Burkhardt-Holm et al, 1997), cambios que indican agotamiento tisular e insuficiente capacidad regenerativa de células de moco y epiteliales. La hiperplasia de células de moco constituye una respuesta general a situaciones de estrés (Wendelaar Bonga et al., 1984).

Los acúmulos de pigmento correspondientes a melanina (Figuras 26), hallados en todos los experimentos, son descritos a nivel ultraestructural como melanosomas contenidos en un tipo específico de cromatóforos,

los melanóforos. Este tipo celular se ubica normalmente en los estratos superior y más profundos de la dermis y bajo las escamas, es infrecuente su presencia en la epidermis (Hawkes, 1974). Aunque los acúmulos de melanina también fueron observados en los T's o de los experimentos de exposición a Roundup® y a la mezcla, en los T's de exposición a las sustancias experimentales se presentan de mayor extensión y con mayor frecuencia. La mayor acumulación de melanina en la piel suele estar asociada a procesos inflamatorios y de reparación (Slominski et al., 2004), lo cual se evidencia en el infiltrado leucocitario en la epidermis y en los procesos degenerativos en células epidérmicas superficiales. La infiltración leucocitaria de la epidermis (Figura 26, 41 y 56) constituye una respuesta inmune estimulada, probablemente, por los procesos degenerativos de las células pavimentosas superficiales. Los leucocitos, además de producir moléculas inmunoreguladoras inducen daño tisular considerable a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas (Jones et al., 1997). De este modo, la mayor acumulación de melanina puede estar dada por su capacidad depuradora de radicales libres, además de su propiedad bactericida que, junto con el infiltrado leucocitario, constituye una barrera de defensa contra microorganismos frente a los cuales la piel se puede encontrar más susceptible debido a las alteraciones estructurales de la misma y a la hipersecreción mucosa que predispone a la proliferación de microorganismos que utilizan el carbono como fuente de energía (Bols et al., 2001; Roberts, 2001). Infiltrados leucocitarios y acúmulos de melanina han sido observados en la epidermis de carpas expuestas a aguas contaminadas de ríos, aguas fertilizadas con residuos orgánicos, contaminadas con metales pesados, con efluentes de aguas de alcantarillado, con petróleo y a temperaturas elevadas (Burton et al., 1984; Iger et al., 1988; Iger et al., 1994a; Iger et al., 1994b; Iger et al., 1994c; Iger et al., 1994d; Bols et al., 2001; Bernet et al., 2004).

Los procesos necróticos de células pavimentosas más severos y manifiestos en el experimento de exposición a la mezcla pueden deberse al sinergismo que se presenta entre componentes del Roundup® y el surfactante Cosmoflux® 411F. Probablemente, la mayor severidad en los procesos de necrosis y su presentación a concentraciones más bajas en la mezcla con respecto al experimento de exposición al Roundup® puede estar dada por la mayor permeabilidad de la membrana celular inducida por el surfactante Cosmoflux® 411F facilitando la pérdida de

electrolitos intracelulares (Stagg & Shuttleworth, 1986) y permitiendo un mayor acceso del GP al interior de la célula donde promueve su efecto citotóxico (Monroy et al., 2005), aunado a la desnaturalización de proteínas presentes en la membrana celular realizada por los surfactantes (Abel, 1976).

Branquias

Como se mencionó la branquia junto con la piel son tal vez los órganos más involucrados en la respuesta de los peces a este tipo de tóxicos ambientales. El aumento en la producción de moco sobre la piel y las branquias, fue una respuesta común en todos los experimentos, tal hipersecreción de moco es observada en casos de polución del medio acuático, ante exposiciones a metales pesados, malatión, 1-naftil-N-metilcarbamato y emisiones de motores fuera de borda (Burton et al., 1984; Benedetti et al., 1989; Iger et al., 1994c; Bols et al., 2001; Roberts, 2001; Altinok et al., 2006; Ní Shúilleabhaín et al., 2006).

La hipersecreción mucosa en las branquias facilita la remoción, dilución y/o neutralización de tóxicos y patógenos (Ferguson et al., 1992) lo cual reduce la difusión de agentes nocivos desde el agua hacia la sangre de acuerdo con Sjim et al. (1993 citado por Yang et al., 2000) quienes sugieren que el limitante para la absorción de contaminantes por las branquias es la difusión desde el agua hacia la sangre más que la ventilación branquial. La hipersecreción de moco sobre las branquias además de dificultar el intercambio gaseoso por el aumento de la distancia de difusión branquial, puede predisponer al desarrollo de infecciones por microorganismos (Bols et al., 2001).

El material grisáceo (Figuras 8 y 35) acumulado en las branquias, se observó en todos los experimentos, se demostró que estaba compuesto por moco, detritos celulares y sangre. Estos exudados son producidos por la acción irritante de los surfactantes Cosmoflux® 411F y el POEA del Roundup® y, para el caso de los experimentos de exposición al Roundup® y a la mezcla, efecto citotóxico del GP. Sumado a lo anterior, una respuesta compensatoria de la vasculatura branquial, pudiera estar contribuyendo a la acumulación de material en la superficie mucosa, tal respuesta consistente en una reducción del riego sanguíneo a los

extremos distales de las branquias con el fin de disminuir la absorción del tóxico procedente del agua (Ferguson, 1989).

La hiperplasia de células de moco (Figuras 16 y 39) además de representar un intento del pez por reducir la posibilidad de difusión de xenobióticos a través del epitelio branquial, constituye una respuesta a un posible imbalance electrolítico ocasionado por la mayor permeabilidad branquial (Lin & Randall, 1995). La proliferación de células de moco es desencadenada bajo condiciones de estrés por niveles altos circulantes de cortisol (Laurent & Perry, 1990). Proliferación de células de moco ha sido determinada en otras especies de teleósteos expuestos a aguas ácidas, metales pesados, contaminantes orgánicos y amoníaco no ionizado (Ferguson et al., 1992; Thiagarajah et al., 1996).

Los ecotóxicos, incluyendo metales pesados, pesticidas, organotinas, solventes orgánicos, surfactantes y xenobióticos orgánicos, pueden ocasionar lesiones tisulares en las branquias incluyendo desprendimiento, necrosis, hiperplasia, hipertrofia, y ruptura del epitelio branquial, no están asociadas exclusivamente a un contaminante en particular (Mallatt, 1985; Randi et al., 1996; Gomez et al., 1998; Bols et al., 2001; Thophon et al., 2003).

La severidad de las lesiones branquiales halladas en los diferentes experimentos aumentó con la concentración del tóxico. En el experimento de exposición a Cosmoflux® 411F y en los T's de concentraciones más bajas de los demás experimentos los hallazgos consistieron principalmente en cambios proliferativos, mientras que a las concentraciones más altas se encontró principalmente necrosis branquial. Las lesiones branquiales observadas incluyeron desprendimiento y ruptura del epitelio, necrosis y acortamiento lamelar, engrosamiento del epitelio lamelar e interlamelar debido a procesos de hiperplasia de células pavimentosas, hiperplasia e hipertrofia de células de moco y de células compatibles con células de cloro, fusión y denudación lamelar, aneurismas, hemorragias y plegamiento lamelar (Figuras 10-17, 36-39, 46-50).

El desarrollo de necrosis epitelial y la ruptura del epitelio branquial han sido descritos como efectos directos de compuestos irritantes en el medio acuático. El desprendimiento del epitelio, edema, fusión y

.....

plegamiento lamelar pueden ser una adaptación fisiológica en la que los peces reducen el área superficial vulnerable con el fin de mantener sus funciones osmorreguladoras (Richmonds & Dutta, 1989; Cengiz & Ünlü, 2002; Bhavan & Geraldine, 2000).

Cengiz y Ünlü (2002) han reportado el desarrollo de necrosis epitelial, ruptura del epitelio branquial, hemorragias en lamelas primarias, desprendimiento del epitelio respiratorio, hipertrofia de células epiteliales, edemas, fusión de lamelas secundarias, plegamiento de lamelas secundarias y aneurismas en "mosquitofish" expuestos a endosulfan por periodos entre 10 y 30 días. Lesiones similares han sido reportadas en otras especies expuestas a xenobióticos (Randi et al., 1996; Bhavan & Geraldine, 2000; Jiraungkoorskul et al., 2002; Thophon et al., 2003; Koca et al., 2005). El festoneamiento de las células epiteliales ha sido descrito por otros autores, tras exposición a contaminantes (Munday et al., 1991). La necrosis del epitelio branquial puede ocurrir por un efecto citotóxico directo del GP (Monroy et al., 2005) o de los surfactantes al desnaturalizar proteínas presentes en la membrana celular, al igual que por alteraciones de la permeabilidad celular desencadenadas por la interacción del surfactante con el componente lipídico de la membrana lo que puede inducir desequilibrios electrolíticos y pérdida de metabolitos que conllevan a muerte celular (Abel 1976; Dayeh et al., 2004).

El desprendimiento del epitelio (Figuras 11, 12, 16 y 51) puede ser producto de la acción directa de componentes del Roundup® y del Cosmoflux® 411F lo que permite el influjo de agua desde el medio hiposmótico. Se descarta que sea ocasionado por una reacción inflamatoria debido a que en general no se asocia con un infiltrado celular en las lamelas. Aunque no ha sido determinado específicamente para surfactantes catiónicos (POEA), se sabe que surfactantes aniónicos y no iónicos (Cosmoflux® 411F) pueden aumentar la superficie branquial efectiva por su efecto vasodilatador a través de la estimulación β -adrenérgica (Stagg & Shuttleworth, 1986) lo que favorece la pérdida de electrolitos a través del epitelio lesionado.

El aumento de tamaño de células compatibles con células de cloro (Figura 16), puede constituir una respuesta compensatoria al estrés osmótico y, para el caso de los experimentos de exposición al Roundup® y a la mezcla, estar implicado en la aclimatación a un posible estrés

ácido (Berrill et al., 1991; Perry, 1997; Haaparanta et al., 1997) por la reducción aguda del pH en aproximadamente una unidad en los T's 4 y 5 de ambos experimentos. En condiciones de pH ambiental bajo se presenta un estado de acidosis en el que se tiende a conservar aniones bicarbonato y por ende se reduce la ingestión activa de sodio y cloro en intercambio con protones y anión bicarbonato, respectivamente, lo cual contribuye al desarrollo de imbalances electrolíticos (Wendelaar Bonga et al., 1984; Goss et al., 1998). Las lesiones branquiales observadas y el efecto permeabilizante sobre la membrana branquial adscrito a los surfactantes pueden predisponer a desequilibrios iónicos y por ende la hipertrofia de células de cloro constituye una respuesta compensatoria tendiente a restablecer la concentraciones séricas de Na^+ , Cl^- y Ca_2^+ (Lin & Randall, 1995; Perry, 1997).

El desarrollo de pseudoepitelios que unen los extremos distales de las lamelas (Figuras 17 y 49), hallado en los experimentos de exposición al Cosmoflux® 411F y a la mezcla herbicida mas surfactante, puede ser una respuesta adaptativa de rápido desarrollo ante la exposición a estímulos irritantes severos en donde el desarrollo de hiperplasia interlamelar no es lo suficientemente rápido para proteger a las lamelas de la exposición a los agentes agresores.

El acortamiento de la longitud de las lamelas en los T's de exposición al Roundup® y a la mezcla de herbicida mas surfactante (Figuras 16, 39 y 46), más notorio en las concentraciones altas, puede ser el resultado de la contracción de células pilar a las cuales se les ha comprobado capacidad contráctil y un papel significativo en la regulación del flujo sanguíneo branquial (Bettex-Galland & Hughes, 1973). La contracción de células pilar, con la reducción concomitante en el flujo sanguíneo hacia las lamelas, aunado a procesos de necrosis lamelar, pueden llevar a denudación de los filamentos branquiales.

Cambios vasculares consistentes en congestión, aneurismas y microhemorragias fueron hallados en todos los T's de exposición a las sustancias experimentales, excepto en el de exposición a concentraciones bajas de Cosmoflux® 411F (Figura 17 y 49). La congestión branquial en los animales expuestos a las diferentes concentraciones de Roundup®, se puede deber a un estado de hipoxia generado por las lesiones branquiales que dificultan el intercambio gaseoso, como lo ha descrito

.....

Ishibashi et al. (2002), bajo condiciones de hipoxia el flujo venoso branquial se incrementa con el fin de facilitar la ingestión de oxígeno. Este aumento en el flujo venoso también puede explicar el desarrollo de hemorragias y aneurismas lamelares asociados al daño a los senos venosos lamelares y a las células pilar tanto por la presión venosa incrementada (Scott & Rogers, 1980) como por la acción irritante del Roundup®.

Los aneurismas han sido reportados por Jiraungkoorskul et al. (2002) en *Tilapia del nilo* expuestas al Roundup® a 36 mg.l⁻¹ de GP. Cambios microvasculares similares han sido descritos en otros peces expuestos a aguas naturales contaminadas (Koca et al., 2005) y por acción de metales pesados (Randi et al., 1996; Thophon et al., 2003). Según Roberts (2001) los aneurismas de las lamelas ocurren por ruptura de células pilar, lo cual permite la dilatación del espacio vascular, predisponiendo al desarrollo de hemorragias cuando los agentes agresores no pueden ser removidos de la superficie branquial (Jiraungkoorskul et al., 2002; Koca et al., 2005). Lesiones hemorrágicas leves asociadas a daños en las células pilar han sido descritas en otros trabajos (Smart, 1976).

Alteraciones eritrocíticas no fueron evidentes en este trabajo, contrario a lo hallado en trabajos de Abel (1976) tras exposición a surfactantes, donde los eritrocitos estuvieron altamente deformados, demostrando hemólisis incipiente.

La mortalidad y el desarrollo de cambios adaptativos a concentraciones bajas de Roundup® en los peces expuestos a la mezcla herbicida-surfactante puede ser el resultado de disregulaciones iónicas severas debido a la característica de los surfactantes no-iónicos, así como de los aniónicos, de formar canales de conducción catiónica en bicapas lipídicas (Stagg & Shuttleworth, 1986). La formación de dichos canales genera desequilibrios iónicos (por flujo de electrolitos a través de los mismos) que afecta el estatus iónico del pez.

Las lesiones branquiales observadas afectan la respiración, osmorregulación, balance ácido-básico, y excreción de desechos nitrogenados. En casos de exposiciones transitorias o prolongadas a concentraciones subletales a los tóxicos, puede no presentarse un evento

.....

tóxico agudo, pero si predisponer al desarrollo de infecciones posteriores al facilitar la entrada de microorganismos al torrente sanguíneo (Bols et al., 2001).

Manteniendo una visión global de los efectos del Roundup y del Cosmoflux® 411F sobre ecosistemas acuáticos la mayor susceptibilidad a eventos de hipoxia inducida por el efecto irritante sobre el epitelio branquial adquiere mayor significancia si se considera la acción herbicida sobre el fitoplancton y las macrófitas (Spradley, 1991 citado por Perschbacher et al., 1997) lo que podría reducir el suplemento de oxígeno y aumentar la demanda bioquímica de oxígeno a partir de la descomposición de la materia vegetal en los cuerpos de agua.

Hígado

Se demuestran diferencias morfológicas entre el To (Figuras 12, 19, 20 y 53) y los T's expuestos al Roundup®, al Cosmoflux® 411F y a la mezcla, notándose que las alteraciones morfológicas del hígado aumentan en severidad en relación con el incremento en la concentración de estas sustancias (Figuras 21-24 y 54). Las vacuolizaciones lipídicas, que consistieron en un hallazgo común para todos los T's, pudieron ser inducidas o favorecidas por el periodo de privación del alimento al que fueron sometidos los animales antes y durante la fase experimental. Sin embargo, los cambios lipídicos incrementaron en severidad con el aumento en la concentración del herbicida y el Cosmoflux® 411F en las exposiciones individuales y a la mezcla. Adicionalmente, en los experimentos de exposición al Roundup® y a la mezcla se observó la aparición de material eosinofílico reticular en el citoplasma de los hepatocitos el cual fue más abundante a concentraciones superiores, conllevando a la presentación de gotas hialinas citoplasmáticas (Figuras 23 y 24). Las gotas hialinas en la exposición al Roundup® se hallaron en el T5, mientras que en la exposición a la mezcla fueron halladas en los T's 4 y 5. Estas gotas hialinas han sido descritas por Jiraungkoorskul et al. (2003) en tilapia del nilo expuestas a 15 mg.l⁻¹ de GP (Roundup®) y por Szarek et al. (2000) en carpas (*Cyprinus carpio*) expuestas a 205 y 410 mg.l⁻¹ de GP (Roundup®). Ultraestructuralmente las gotas hialinas poseen una matriz granular limitada por retículo endoplásmico rugoso, o bien, pueden estar constituidas de lisosomas secundarios

(Papadimitriou et al., 2000). Schlicht (1963) ha demostrado que las gotas hialinas eosinofílicas presentes en hepatocitos consisten esencialmente de albúmina sérica y que el desarrollo de estas inclusiones citoplasmáticas se puede deber a la suficiente disponibilidad de albúmina sérica y a alteraciones en la permeabilidad producida por un incremento en la presión en la circulación portal.

Fallas en el proceso de transcripción, y por ende en la síntesis de proteínas, podrían estar relacionadas con los cambios lipídicos de mayor severidad hallados en los peces expuestos al Roundup® y a la mezcla debido a alteraciones en la síntesis de lipoproteínas necesarias para la liberación y transporte de los lípidos desde los hepatocitos (Jones et al., 1997). Sin embargo, los cambios lipídicos pueden constituir una estrategia de los peces que permite concentrar xenobióticos lipofílicos con el fin de reducir su disponibilidad (Cooley et al., 2000; Sarkar et al., 2005), como el POEA y algunos componentes del Cosmoflux® 411F cuya lipofilicidad está determinada por la longitud de la cadena alquil (Mezzanotte et al., 2003). Estos cambios metabólicos pueden inducir los procesos degenerativos hallados en los hepatocitos, sin descartar que a ello esté contribuyendo también el proceso de hipoxia generado por las alteraciones branquiales.

Aunque las respuestas morfológicas del hígado en los peces expuestos al Roundup® fueron similares a los descritos en los peces expuestos a la mezcla, en estos últimos se presentaron de mayor severidad a concentraciones inferiores de Roundup®. La presencia del surfactante Cosmoflux® 411F, junto con los componentes del Roundup®, promueve una mayor permeabilidad de la membrana celular de los hepatocitos por la formación de canales de conducción catiónica (Stagg & Shuttleworth, 1986) y la desnaturalización proteica (Abel, 1976) lo que facilita la pérdida de electrolitos intracelulares y la entrada del GP, el cual efectúa su acción citotóxica (Monroy et al., 2005) y las alteraciones en los procesos de transcripción (Marc et al., 2005). Esto último explica el desarrollo de gotas hialinas citoplasmáticas en los hepatocitos a concentraciones más bajas en peces expuestos a la mezcla comparado con los expuestos a Roundup®.

Tracto Gastrointestinal

En el estómago los T's de exposición al Roundup® y a la mezcla difirieron del To en el desarrollo de hiperplasia leve de células de moco. La ausencia de cambios considerables como los hallados en la piel o las branquias puede estar relacionado con 1) el pH bajo del contenido gástrico, lo cual reduce la toxicidad del componente surfactante del Roundup® (Folmar et al., 1979), y 2) la mayor secreción de moco que se realiza en la mucosa gástrica lo que tiene un efecto aclarador, diluyente y/o neutralizante de sustancias reduciendo la posibilidad de contacto de las mismas con la mucosa (Ferguson et al., 1992).

En el intestino la vacuolización de los enterocitos observada en la exposición al Cosmoflux® 411F y en la exposición a la mezcla (Figuras 34 y 58) fue mayor conforme aumentaba la concentración del tóxico. Esta vacuolización podría corresponder a surfactante fagocitado (pinocitosis) por los enterocitos.

Riñón

El riñón fue afectado en menor proporción, probablemente por que los procesos de biotransformación y eliminación de estas sustancias se llevan a cabo por el hígado (Tolls et al., 1994). Además, tanto el tejido branquial como el renal no poseen un sistema antioxidante tan eficiente como el hígado, lo cual incrementa su vulnerabilidad frente a especies reactivas generadas en procesos de biotransformación (Fatima et al., 2000). Las lesiones necróticas multifocales en estructuras tubulares (Figura 57), no asociadas a esporas de myxosporidios halladas en las exposiciones al Roundup® y a la mezcla, pueden indicar el efecto citotóxico del GP descrito por Monroy et al. (2005) o del POEA, y del Cosmoflux® 411F en los experimentos de exposición al mismo, o bien de sus metabolitos, los cuales podrían ser absorbidos a través del epitelio tubular y/o sufrir procesos de biotransformación a nivel renal. Cambios degenerativos leves multifocales en el epitelio tubular semejantes a los hallados en el presente trabajo han sido reportados en *Channa punctatus* expuestos a cloruro de mercurio y a amoníaco (Banerjee & Bhattacharya, 1994) y en róbalo marino blanco (*Lates calcarifer*) expuesto a cadmio (Thophon et al., 2003).

La formación leve de vacuolas o gotas proteicas (degeneración hialina) en células epiteliales tubulares renales hallada en los peces expuestos al Cosmoflux® 411F ha sido descrita por otros autores (Reimschuessel et al., 1989; Reimschuessel et al., 1990; Jiraungkoorskul et al., 2002; Jiraungkoorskul et al., 2003; Anderson et al., 2003; Bernet et al., 2004), y podría corresponder a absorción de proteínas del filtrado glomerular (Jiraungkoorskul et al., 2002) o a sobrecarga en los lisosomas tubulares proximales (Read, 1991).

Los CMM asociados a estructuras tubulares renales de mayor presentación en los animales expuestos a las sustancias experimentales (Figuras 42 y 57), con respecto al To, pueden indicar el procesamiento de los componentes del Roundup y del Cosmoflux® 411F y/o de sus metabolitos que son absorbidos o metabolizados a nivel renal, al igual que el procesamiento de sustancias derivadas de los procesos de daño celular. De modo general, los CMM suelen relacionarse con procesos inflamatorios, así como con el almacenamiento, destrucción y detoxificación de sustancias endógenas y exógenas y con el reciclaje del hierro (Mizuno et al., 2002). La presencia de CMM de pequeño tamaño dispersos en el riñón de los peces expuestos a las sustancias experimentales, además de los CMM de mayor extensión y aquellos asociados a esporas de myxosporidios hallados también en peces del To, pueden indicar procesos recientes de daño celular o de procesamiento de sustancias endógenas y/o exógenas. Sin embargo, la frecuencia de asociación de los CMM a esporas de myxosporidios (Figuerola et al., 1999) dificulta separar el efecto de la respuesta a los myxosporidios de la respuesta al tóxico, o una posible interacción del mismo a favor de los parásitos.

Los focos hemorrágicos hallados en el riñón de los animales muertos en el transcurso de la fase experimental de la exposición al Roundup® y a la mezcla pueden ser una consecuencia indirecta de situaciones de hipoxia tisular desarrolladas a partir del daño branquial severo, en donde la vasoconstricción periférica, como parte del proceso de shock, aumenta el flujo vascular hacia las vísceras concomitante con un aumento de la presión sanguínea que induce ruptura de capilares (Scott & Rogers, 1980).

Encéfalo

En el encéfalo se observaron lesiones que indican procesos degenerativos y muerte neuronal, respecto a los cuales no hay reportes de lesiones similares adscritas a componentes del Roundup® y a surfactantes. Los componentes del Roundup® y del Cosmoflux® 411F pueden estar accediendo al sistema nervioso central a través de dos vías. Una puede ser a través del epitelio olfatorio y de allí hasta el área del bulbo olfatorio en el telencéfalo lo cual podría coincidir con la delimitación de los procesos degenerativos neuronales al bulbo olfatorio y/o a través de la barrera hematoencefálica en donde el surfactante por su carácter anfifílico e incorporación dentro de membranas biológicas puede facilitar el acceso del GP y autohabilitar el paso del surfactante (Stock & Holloway, 1993) hacia el sistema nervioso central. Para el caso específico del Cosmoflux® 411F este pudiese estar generando un daño directo sobre las células nerviosas. La predisposición del área del bulbo olfatorio a los procesos degenerativos puede estar dada por la comunicación de esta área con el epitelio olfatorio y/o por la presencia de centros de proliferación y regeneración neural (Lema et al., 2005) en donde componentes del Roundup® pueden inducir alteraciones en los puntos de control del ciclo celular o en los procesos de transcripción, que ocurren durante la neurogénesis, como ha sido determinado por Marc et al. (2002, 2003, 2004a, 2004b, 2005) llevando a la génesis de neuronas no aptas. Las células granulares eosinofílicas - células Mast (CGE/CM) que están presentes en las meninges y en la corteza del telencéfalo siguen un patrón de satelitosis en torno a neuronas con procesos degenerativos (Figuras 29, 30, 60,61), posiblemente desencadenando o acelerando procesos de apoptosis, como se evidencia en algunos cuerpos neuronales (Figura 31 y 44). El patrón observado parece indicar un proceso muy localizado y específico de comunicación y contacto célula-célula con neuronas alteradas por parte de CGE/CM, en donde la degranulación de estas células no induce una reacción generalizada en el parénquima cerebral. Wilhelm et al. (2005) han descrito previamente procesos de comunicación célula-célula entre células mast y neuronas en palomas *Streptopelia rusegrisea*. Estas lesiones en el bulbo olfatorio pueden explicar el bloqueo reversible del proceso de olfacción reportado en salmón del Atlántico ante la exposición a surfactantes catiónicos, como el POEA, y al surfactante aniónico alquilbenceno sulfonado (Lewis, 1991). La reversibilidad del bloqueo del

proceso olfatorio puede estar dado por la presencia de centros de proliferación neural en el bulbo olfatorio (Lema et al., 2005) que permite la reposición de las neuronas muertas. Las CGE/CM han sido descritas en teleósteos y se encuentran relacionadas con las células mast de vertebrados superiores (Reite, 1998). Además de lo anterior, es probable que las CGE/CM estén involucradas en un proceso de remodelación neural siguiente al daño de los somas neurales en el bulbo olfatorio basado en la capacidad de síntesis y liberación de Factor de Crecimiento Neural (NGF) por las células mast descrito por Williams et al. (1995).

La gliosis observada en el telencéfalo asociada a neuronas con cambios degenerativos sin CGE/CM asociadas, puede indicar que las CGE/CM aceleran procesos de muerte celular, y que esta infiltración se debe a factores quimiotácticos liberados por células de la glia y/o componentes de neuronas degeneradas. Se ha demostrado que las células apoptóticas son detectables tan temprano como 5 minutos después de la lesión y 2 días posterior a la lesión los eventos apoptóticos comienzan a declinar (Zupanc, 2006). La apoptosis es un proceso que ocurre de manera frecuente en el sistema nervioso central y han sido descritos dos pasos asociados al proceso: 1) la rápida eliminación (a través de apoptosis) de las células dañadas (neuronas) y 2) la remoción de los detritos celulares resultantes por la acción de células de la microglia/macrófagos (Zupanc, 2006).

Aunque en uno de los animales del To también se halló infiltrado de CGE/CM en el telencéfalo, es de destacar que presenta menor severidad a la hallada en los T's de exposición al Roundup®. Adicionalmente la degeneración neuronal no fue hallada excepto en aquellas neuronas asociadas con CGE/CM. Sin embargo, los procesos de apoptosis en el encéfalo de los peces ocurren fisiológicamente y continúan en la etapa adulta debido a la génesis de neuronas no aptas durante los procesos de neurogeneración y regeneración neural, confinados principalmente al bulbo olfatorio y al cerebelo (Zupanc, 2006).

La mayor frecuencia de procesos de degeneración y apoptosis neuronal no asociada y asociada, respectivamente, a CGE/CM en el bulbo olfatorio (Figuras 30, 43, 44, 60, 61) indica un efecto del Roundup® sobre el sistema nervioso central, lo cual puede afectar la olfacción así como el comportamiento individual y grupal, el desempeño reproductivo de los

peces y tener repercusiones a nivel poblacional. Sin embargo, eventos de hipoxia tisular inducidos por las lesiones branquiales pueden estar ocasionando o contribuyendo a los procesos degenerativos neuronales no asociados a CGE/CM.

Las respuestas morfológicas de la región anterior del encéfalo, no documentadas en trabajos similares, obligan necesariamente, a plantear explicaciones y posibles mecanismos de patogénesis, con lo cual se sugieren algunas hipótesis sobre el aumento de tamaño de las CGE/CM observadas en el encéfalo y la acumulación de gránulos en su citoplasma (Figura 30, 21, 60 y 61):

- 1) inhibición de la liberación del contenido granular con síntesis continua de los componentes granulares, probablemente inducida por algún componente del Roundup® o debido a que las CGE/CM en el encéfalo se encuentran inmaduras y no son capaces de liberar su contenido de acuerdo con lo reportado por Vallejo y Ellis (1989).
- 2) síntesis incrementada de componentes granulares, sin degranulación completa de las mismas, acorde con la actividad de degranulación no citotóxica de las CGE/CM (Vallejo y Ellis, 1989). Probablemente las CGE/CM estén induciendo o acelerando procesos de muerte celular de forma específica e individual para una neurona para lo cual no necesiten llevar a cabo una degranulación completa.
- 3) el incremento de CGE/CM en el bulbo olfatorio hace parte de un mecanismo de remodelación neural siguiente al daño neuronal agudo, basado en la evidencia de síntesis y liberación de NGF por células mast (Williams et al., 1995) y en la capacidad de neurogeneración y regeneración neuronal en el cerebro de los peces (Lema et al., 2005; Zupanc, 2006).

Capítulo VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La exposición de juveniles de cachama blanca al herbicida Roundup®, al surfactante Cosmoflux® 411F y a la mezcla de herbicida más surfactante en la proporción y las concentraciones evaluadas en el presente trabajo resulta en alteraciones clínicas y anatomopatológicas en las branquias, hígado, riñones, piel y cerebro, indicando que estos órganos son blanco de la acción tóxica de estas sustancias. En contraste con lo afirmado por Solomon *et al.*, (2005) sobre la inocuidad del GP, los ensayos de este estudio demuestran lesiones evidentes en peces nativos cuando se exponen tanto a las sustancias individualmente como a las mezclas de aspersión usadas en el país.

Con base en la CL₅₀ del Cosmoflux® 411F se concluye que este confiere riesgo mínimo de toxicidad aguda para los peces. Sin embargo, las interacciones que pueden establecer los surfactantes con otros tóxicos alterando la biodisponibilidad de los mismos le confieren gran importancia en ecotoxicología.

La CL₅₀ determinada para la mezcla de Roundup® más Cosmoflux® 411F representa un efecto sinérgico. De este modo, las bases sobre las cuales se soporta la práctica de fumigación de cultivos de coca y amapola con Roundup® y Cosmoflux® 411F carecen de argumentos sólidos en tanto que se basan en datos de toxicidad del GP y no de la mezcla de aspersión, que como se demostró en el presente trabajo posee mayor toxicidad que la sumatoria de los efectos individuales de estas dos sustancias.

La exposición de juveniles de cachama blanca a las concentraciones evaluadas de Roundup®, Cosmoflux® 411F y la mezcla herbicida más surfactante inducen manifestaciones clínicas entre las que se cuentan reducción de la frecuencia opercular, retraso o ausencia de respuesta al estímulo visual y reducción de la actividad de nado.

Las lesiones halladas en branquias sugieren una actividad irritante de estas sustancias, desencadenando una serie de respuestas directas, producto de la acción del xenobiótico sobre la membrana branquial, y de efectos indirectos consistentes en cambios morfológicos como consecuencia del desarrollo de mecanismos compensatorios o adaptativos por parte de los peces.

Los cambios morfológicos en el hígado evidenciados principalmente en los experimentos de exposición al Roundup® y a la mezcla sugieren la existencia de alteraciones en el metabolismo de los lípidos y las proteínas sugiriendo posibles campos de investigación sobre los mecanismos de hepatotoxicidad de los componentes del Roundup®.

Se hace necesario dilucidar la estructura molecular del Cosmoflux® 411F con el fin de permitir la evaluación completa de sus posibles secuelas, facilitando tanto el análisis de su efecto como la implementación de medidas correctivas al mismo.

Los cambios degenerativos evidenciados en los somas neuronales en el telencéfalo sugieren un importante campo de investigación en el que se hace pertinente dilucidar la o las vías por la cual componentes del Roundup® y el Cosmoflux® 411F obtienen acceso al sistema nervioso central y establecer los mecanismos por lo cuales ocurre el daño neuronal. Dado que las lesiones en el sistema nervioso central fueron observadas incluso en las concentraciones evaluadas más bajas es posible que estas se desarrollen ante exposiciones crónicas o subcrónicas a concentraciones mucho más bajas presentes en el medio acuático lo cual puede afectar la supervivencia de los animales en el medio natural al afectar los procesos de olfacción así como el comportamiento individual y grupal, el desempeño reproductivo de los peces y tener repercusiones a nivel poblacional. Adicionalmente, la presencia de las CGE/CM asociadas a procesos degenerativos de los somas neuronales genera interrogantes acerca de la importancia fisiológica y fisiopatológica de estas células en procesos de regeneración neuronal y en la dinámica de daños neuronales ante la exposición a xenobióticos.

En Colombia se excede la dosis recomendada por los fabricantes, en la cual se estipula que el Roundup® Ultra se debe utilizar a concentraciones en la mezcla de aspersión de 1.6 a 7.7% p/v con una tasa de aspersión de

2.33 l/ha de Roundup® Ultra lo cual contrasta con la concentración en la mezcla de 44% p/v y la tasa de aspersión de 17.6 a 30.8 l/ha usada en Colombia.

Se recomienda el desarrollo de estudios sobre toxicidad aguda y crónica del Roundup® y el Cosmoflux® 411F en otros peces nativos con el propósito de determinar los efectos de la presencia de herbicidas a determinadas concentraciones en cuerpos de agua en los cuales puedan encontrarse especies más susceptibles, siendo de importancia ecológica y sanitaria, particularmente en Colombia.

Igualmente, es importante la realización de trabajos encaminados a evaluar la susceptibilidad de otras especies incluyendo plantas, macro y microinvertebrados, involucrados en la dinámica poblacional de ecosistemas acuáticos, con el fin de lograr un mayor acercamiento a los efectos de los herbicidas y sus mezclas.

.....

BIBLIOGRAFÍA

.....

1. Abdelghani, A.A., Tchounwou, P.B., Anderson, A.C., Sujono, H., Heyer, L.R., Monkiedje, A., 1997. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of Roundup, Garlon-3A, 2,4-D, and Syndets surfactant to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), bluegill sunfish (*Lepomis microchirus*), and crawfish (*Procambarus spp.*). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12: 237-243.
2. Abel, P.D., Skidmore JF., 1975. Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. *Wat. Res.* 9: 759-765.
3. Abel, P.D., 1976. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Fish. Biol.* 9: 441-446.
4. Alibhai, M.F., Stallings, W.C., 2001. Closing down on Glyphosate inhibition – with a new structure for drug discovery. *PNAS.* 8: 2944-2946.
5. Altinok, I., Capkin, E., Karahan, S., Boran, M., 2006. Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22: 20-26.
6. Anderson, M., Cacela, D., Beltman, D., Teh, S., Okihiro, M., Hinton, E., Denslow, N., Zelikoff, J., 2003. Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl-contaminated river. *Biomarkers.* 8: 371-393.
7. Bakke, D., 2003. Human and ecological risk assessment of nonylphenol polyethoxylate-based (npe) surfactants in forest service herbicide applications. USDA Forest Service Pacific Southwest Region (Region 5). *Pesticide Use Specialist.*

8. Banerjee, S., Bhattacharya, S., 1994. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, mercury, and ammonia. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 29: 265-275. (Abstract).
9. Benedetti, I., Albano, A.G., Mola, L., 1989. Histomorphological changes in some organs of the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* LeSueur, following short- and long-term exposure to copper. *J. Fish Biol.* 34, 273-280.
10. Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., 2004. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiologia*. 524: 53-66.
11. Berrill, M., Taylor, G., Savard, H., 1991. Are chloride cells involved in low pH tolerance and sensitivity? The mayfly possibility. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1220-1225.
12. Bettex-Galland, M., Hughes, G.M., 1973. Contractile filamentous material in the pillar cells of fish gills. *J. Cell Sci.* 13, 359-370.
13. Bhavan, P.S., Geraldine, P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat. Toxicol.* 50, 331-339.
14. BINLFA, 2002. Report on issues related to the aerial eradication of illicit coca in Colombia. Released by the Bureau for International Narcotics and Law Enforcement Affairs.
15. Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 853-873.
16. Brooke, L., 1993. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. *Report to the U.S. Environmental Protection Agency*, Duluth, MN (contract no. 68-C1-0034). Lake Superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior, Superior, Wis.
17. Burkhardt-Holm, P., Escher, M., Meier, W., 1997. Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout. *J. Fish Biol.* 50, 744-758.

18. Burton, D., Burton, M.P., Idler, D.R., 1984. Epidermal condition in post-spawned winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), maintained in the laboratory and after exposure to crude petroleum. *J. Fish Biol.* 25, 593-606.
19. Cengiz, E.I., Ünlü, E., 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish, *gambusia affinis* exposed to endosulfan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 290-296.
20. Cessna, A., Cain, N., 1992. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in strawberry fruit following spot and wiper applications. *Can. J. Plant Sci.* 72: 1359-1365.
21. Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F., 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* 48: 495-515.
22. Cox, C. Glyphosate (Roundup). *J Pestic Reform.* 1998; 18: 3-17.
23. Curran, W., 1999. Adjuvants for enhancing herbicide performance. *Agronomy Facts* 37. College of Agricultural Sciences-Cooperative Extension. Pennsylvania State University.
24. Dayeh, V.R., Chow, S.L., Schirmer, K., Lynn, D.H., Bols, N.C., 2004. Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 57: 375-382.
25. De Roos, A. J., Blair, A., Rusiecki, J. A., Hoppin, J. A., Svec, M., Dosemeci, M., Sandler, D. P., Alavanja, M. C., 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Health Persp.* 113: 49-54.
26. Descalzo, R., Punja, Z., Levesque, C., Rahe, J., 1996. Identification and role of pythium species as Glyphosate synergists on bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in different soils. *Mycol. Res.* 100: 971-978.
27. Dewar, A., Haylock, L., May, M., Beane, J., Perry, R., 2000. Glyphosate applied to genetically modified herbicide-tolerant sugar beet and “volunteer” potatoes reduces populations of potato cyst nematodes and the number and size daughter tubers. *Ann. Appl. Biol.* 136: 179-187.

28. Dorn, P., Salanitro, J., Evans, S., Kravetz, L., 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear non-ionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1751-1762.
29. Ducar, J., Tredaway, G., Macdonald, G., 2003. Adjuvants. *Series of Agronomy* Department, University of Florida. 5 p.
30. Evans, D.H., 2002. Cell Signaling and Ion Transport Across the Fish Gill Epithelium. *J. Exp. Zool.* 293: 336-347.
31. Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aqua. Toxicol.* 49: 243-250.
32. Ferguson, H.W., 1989. Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. 1st Edition. Iowa State University Press/Ames.
33. Ferguson, H.W., Morrison, D., Ostland, V.E., Lumsden, J., Byrne, P., 1992. Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Pathol.* 106, 255-265.
34. Figueroa, J., Martinez, E., Iregui, C.A., Eslava, P.R., 1999. Descripción de un caso de myxosporidiasis clínica en cachama blanca, *Piaractus brachypomus*. *Dalia. Revista de la Asociación Colombiana de Ictiólogos.* 3: 17-29.
35. Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 269-278.
36. Francis-Floyd, R., 1995. The use of salt in aquaculture. Fact Sheet VM 86. Series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
37. Gardner, S., Grue, C., 1996. Effects of Rodeo and Garlon 3A on nontarget wetland species in Central Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 441-451.

38. GEIR., 1985. Generic Environmental Impact Report. Control of vegetation of utilities & Railroad Rights of Way. Pub. By Harrison Biotech, Cambridge.
39. Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K., 2000. Ecotoxicological risk assesment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167: 35-120.
40. Gomez, L., Masot, J., Soler, F., Duran, E., Roncero, V., 1998. Structural and ultrastructural study of the gills of tench (*Tinca tinca* L.) after experimental poisoning with copper sulphate. *Revue Méd. Vét.* 149, 387-394.
41. Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 107-115.
42. Haaparanta, A., Valtonen, E.T., Hoffmann, R.W., 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *J. Fish. Biol.* 50, 575-591.
43. Hamilton, M., Russo, R., Thurston, R., 1977. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11: 714-719.
44. Haney, R., Senseman, S., Hons, F., 2002. Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *J. Environ. Qual.* 31: 730-735.
45. Hawkes, J.W., 1974. The Structure of Fish Skin. II. The Chromatophore Unit. *Cell. Tissue Res.* 149: 159-172.
46. Hildebrand, L.D., Sullivan, D.S., Sullivan, T.P., 1982. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup® herbicide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 93-98.
47. Hofer, R., Jeney, Z., Bucher, F., 1995. Chronic Effects Of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) And Ammonia On Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry At Water Criteria Limits. *Wat. Res.* 29: 2725-2729.

48. Iger, Y., Abraham, M., Dotan, A., Fattal, B., Rahamim E., 1988. Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *J. Fish Biol.* 33, 711-720.
49. Iger, Y., Balm, P.H., Jenner, H.A., Wendelaar-Bonga, S.E., 1995. Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 188-198.
50. Iger, Y., Jenner, H.A., Wendelaar Bonga, S.E., 1994a. Cellular responses in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Rhine water. *J. Fish. Biol.* 45, 1119-1132.
51. Iger, Y., Jenner, H.A., Wendelaar Bonga, S.E., 1994b. Cellular responses in the skin of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. *J. Fish. Biol.* 44, 921-935.
52. Iger, Y., Lock, R.A., Jenner, H.A., Wendelaar Bonga, S.E., 1994c. Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper. *Aquat Toxicol.* 29, 49-64.
53. Iger, Y., Lock, R.A., van der Meij, J.C., Wendelaar Bonga, S.E., 1994d. Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 342-350.
54. Ishibashi, Y., Ekawa, H., Hirata, H., Kumai, H., 2002. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. *Fish. Sci.* 68, 1374-1383.
55. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia.* 28, 121-127.
56. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* 18, 260-267.
57. Jones, T., Hunt, R., King, N., 1997. Veterinary pathology. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins Ed.

58. Jonge, H., Jonge, L.W., Jacobsen, O.H., Yamaguchi, T., Moldrup, P., 2001. Glyphosate sorption in soils of different ph and phosphorus content. *Soil Sci.* 166: 230-238.
59. Jonsson, C.M., Toledo, M.C., 1993. Acute Toxicity of Endosulfan to the Fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 151-155.
60. Kegley, S., Neumeister, L., Martin, T., 1999. Disrupting the Balance. Ecological Impacts of Pesticides in California. Pesticide Action Network North America Regional Center. 105 p.
61. Key Center for Polymer Colloids. Last Modified: Thursday February 24, 2005. Disponible en Internet. www.kcpc.usyd.edu.au/discovery/9.5.5-short/9.5.5_introsurfactants.html
62. Koca, Y.B., Koca, S., Yildiz, S., Gürcü, B., Osañç, E., Tunçbas, O., Aksoy, G., 2005. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aidin/Turkey) with determination of water pollution. *Environ. Toxicol.* 20, 560-571.
63. Laurent, P., Perry, S.F., 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 259: 429-442.
64. Lema, S.C., Hodges, M.J., Marchetti, M.P., Nevitt, G.A., 2005. Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comp. Biochem. Physiol.* A. 141, 327-335.
65. Lewis, M.A., 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.* 25, 101-113.
66. Lin, H., Randall, D., 1995. Proton pumps in fish gills. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds), *Fish Physiology*. New York: Academic Press, pp. 229-255.
67. Linnenbach, M., Marthaler, R., Gebhardt, H., 1987. Effects of acid water on gills and epidermis in brown trout (*Salmo trutta* L.) and in tadpoles of the common frog (*Rana temporaria* L.). *Ann. Soc. Zool. Belg.* 117 (Suppl. 1), 365-374.

68. Lussier, S., Champlin, D., Livolsi, J., Poucher, S., Pruell, R., 2000. Acute toxicity of para-nonylphenol to saltwater animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(3): 617-621.
69. Macek, K.J., Krzeminski, S.F., 1975. Susceptibility of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) to nonionic surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 377-384.
70. Madsen, T., Buchardt, H., Nylén, D., Rathmann, A., Petersen, G., Simonsen, F., 2001. Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products CETOX *Environmental Project No. 615 Miljøprojekt.*
71. Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630-648.
72. Marc, J., Bellé, R., Morales, J., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., 2004a. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol. Sci.* 82, 436-442.
73. Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O., 2005. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 1-8.
74. Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., 2004b. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol. Cell.* 96, 245-249.
75. Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., Bellé, R., 2002. Pesticides Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 326-331.
76. Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G., Bellé, R., 2003. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ. Chem. Lett.* 1, 8-12.
77. McCormick, J.H., Jensen, K.M., Leino, R.L., Stokes, G.N., 1987. Fish blood osmolality, gill histology and oocyte atresia as early warning acid stress indicators. *Ann. Soc. Zool. Belg.* 117 (Suppl. 1), 309-319.

78. McWilliams, P., Payne, G., 2001. Bioaccumulation potential of surfactants: a review. *Presented at Chemistry in the Oil Industry VII, Royal Society of Chemistry & EOSCA, Manchester.*
79. Mezzanotte, V., Castiglioni, F., Todeschini, R., Pavan, M., 2003. Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants. *Bioresour. Technol.* 87: 87-91.
80. Mitchell, D.G., Chapman, P.M., Long, T.J., 1987. Acute toxicity of Roundup® and Rodeo® herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 1028-1035.
81. Mizuno, S., Misaka, N., Miyakoshi, Y., Takeuchi, K., Kasahara, N., 2002. Effects of starvation on melano-macrophages in the kidney of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Aquaculture.* 209, 247-255.
82. Monheit S., 2003. Glyphosate – based aquatic herbicides an overview of risk. p. 1-10. Disponible en: http://tearamundo.org/control_manage/docs/glyphosate_aqua_risk.pdf/. (Consultada el 09/05/2004).
83. Monroy, C.M., Cortés, A.C., Sicard, D.M., Groot de Restrepo, H., 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica.* 25, 335-345.
84. MONSANTO Europe S.A., 2005. Roundup® Ultra. Produkt-Sicherheitsdatenblatt Kommerzielles Produkt.
85. Morgan, J., Vigers, G., Farrell, A., Janz, D., Manville, J., 1991. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4©, Garlon 3A© and Vision© herbicides. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 73-79.
86. Morral, D.D., Belanger, S.E., Dunphy, J.C., 2003. Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotox. Environ. Safety.* 56: 381-389.
87. Munday, B.L., Nowak, B.F., Deavin, J.G., 1991. Toxicity of eucalypt-based pulp mill effluents as assessed by acute and chronic assays. In: *Environmental Fate and Effects of bleached pulp mill effluents. Proceedings of a SEPA, conference held at Grand Hôtel Saltsjöbaden, Stockholm, Sweden, 19-21.* Report 4031.

88. Neškovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 295-302.
89. Ní Shúilleabháin, S., Mothersill, C., Sheehan, D., O'Brien, N.M., O'Halloran, J., van Pelt, F.N., Kilemade, M., Davoren, M., 2006. Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 65: 332-341.
90. Nivia, E., 2001a. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas – Algunas aproximaciones. Conferencia “Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petroleo”. 2001a.
91. Nivia, E., 2001b. Cosmoflux 411F® coadyuvante adicionado al RoundUp Ultra® en la erradicación forzosa de cultivos ilícitos en Colombia. 2001b. (www.tni.org/drogas/research/cosmoflux.rtf Actualización de enero 12 de 2001).
92. Nosanchuk, J.D., Ovalle, R., Casadevall, A., 2001. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J. Infect. Dis.* 183: 1093-1099.
93. Oldham, J., Massey, R., Cryan, P., 2002. Aerial spraying in Colombia: health and environmental effects. The Institute for Science & Interdisciplinary Studies. Fact Sheet; 4 p.
94. Papadimitriou, J.C., Drachenberg, C.B., Brenner, D.S., Newkirk, C., Trump, B.F., Silverberg, S.G., 2000. “Thanatosomes”: A unifying morphogenetic concept for tumor hyaline globules related to apoptosis. *Hum Pathol.* 31, 1455-1465.
95. Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
96. Perschbacher, P.W., Stone, N., Ludwig, G.M., Guy, C.B., 1997. Evaluation of effects of common aerially-applied soybean herbicides and propanil on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture.* 157, 117-122.

97. Piccolo, A., Celano, G., Arienzo, M., Mirabella, A., 1994. Adsorption and desorption on glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci. Health B*. 1994; 29: 1105-1115.
98. Ramírez-Duarte, W.F., Rondón-Barragán, I.S., Vidal, H.H., Eslava-Mocha, P.R., 2004. Toxicidad del Roundup® en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), concentración letal 50, observaciones clínicas y lesiones asociadas. In: Memorias del II Congreso Colombiano de Acuicultura. X Jornada de Acuicultura IALL. Retos frente a la globalización de mercados, 27-29 Octubre 2004, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia., pp. 142-144.
99. Ramírez-Duarte, W.F., 2006. Evaluación anatomopatológica de los efectos tóxicos agudos del Roundup® en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Trabajo de grado en la modalidad investigativa para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta, Colombia.
100. Randi, A.S., Monserrat, J.M., Rodriguez, E.M., Romano, L.A., 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *J. Fish Dis*. 19, 311-322.
101. Read, N.G., 1991. The role of lysosomes in hyaline droplet nephropathy induced by a variety of pharmacological agents in the male rat. *Histochem. J*. 23: 436-443.
102. Reimschuessel, R., May, E.B., Bennett, R.O., Lipsky, M.M., 1988. Necropsy examination of fish. *The Veterinary Clinics of North America: Tropical Fish Medicine: Small Animal Practice*. 18, 427-433.
103. Reimschuessel, R., Bennett, R.O., May, E.B., Lipsky, M.M., 1989. Renal histopathological changes in the goldfish (*Carassius auratus*) after sublethal exposure to hexachlorobutadiene. *Aquat. Toxicol*. 15: 169-180.
104. Reimschuessel, R., Bennet, R.O., May, E.B., Lipsky, M.M., 1990. Renal tubular cell regeneration, cell proliferation and chronic nephrotoxicity in the goldfish *Carassius auratus* following exposure to a single sublethal dose of hexachlorobutadiene. *Dis. Aquat. Org*. 8: 221-224.

105. Reite, O.B., 1998. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish & Shellfish Immunol.* 8, 489-513.
106. Richmonds, C., Dutta, H.M., 1989. Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 123-130.
107. Roberts, R.J., Rodger, H.D., 2001. The pathophysiology and systematic pathology of teleost. In: Roberts, R.J. (Ed), *Fish Pathology*. Third Edition. Harcourt Publishers Limited, pp. 55-132.
108. Rondón-Barragán, I.S., 2006. Evaluación de los efectos anatomopatológicos y concentración letal 50 del surfactante cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Trabajo de grado en la modalidad investigativa para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta, Colombia.
109. Sarkar, B., Chatterjee, A., Adhikari, S., Ayyappan, S., 2005. Carbofuran- and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. *J. Appl. Ichthyol.* 21, 131-135.
110. Sastre, O.F., Hernández, G., Cruz-Casallas, P., 2004. Influencia del peso corporal y de la temperatura del agua sobre el consumo de oxígeno de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17, 1-16.
111. Schlicht, I., 1963. Experimentelle untersuchungen über die hyalintropfige eiweißspeicherung der leber. *Virchows Arch. path. Anat.* 336, 342-353.
112. Scott, A.L., Rogers, W.A., 1980. Histological effects of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 3, 305-316.
113. Servizi, J.A., Gordon, R.W., Martens, D.W., 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia* and trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 15-22.

114. Servos, M., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Wat. Qual. Res. J. of Canada*. 34: 123- 177.
115. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., Wortsman, J., 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84, 1155-1228.
116. Smart, G., 1976. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* 8, 471-475.
117. Solomon, K.R., Anadón, A., Cerdeira, A.L., Marshall, J., Sanín, L.H., 2005. Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América. 143 p.
118. Sprague, J.B., 1968. Avoidance reactions of salmonid fish to representative pollutants. *Wat. Res.* 2: 23 24.
119. Stagg, R.M., Shuttleworth, T.J., 1986. Surfactant effects on adrenergic responses in the gills of the flounder (*Platichthys flesus* L.). *J. Comp. Physiol. B.* 156, 727-733.
120. Stock, D., Holloway, P.J., 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Pest. Sci.* 38, 165-177.
121. Swedmark, M., Braaten, B., Emanuelsson, E., Granmo, C., 1971. Biological effects of surface active agents on marine animals. *Mar. Biol.* 9: 183-201.
122. Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., Banaszkiewicz, T., 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.* 50, 263-266.
123. Talmage, S., 1994. Environmental and human safety of major surfactants. Alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. The Soap and Detergent Association. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, United States. 374 p.

124. Thiagarajah, A., Hartley, W.R., Major, S.E., Broxson, M.W., 1996. Gill histopathology of two species of buffalo fish from a contaminated swamp. *Mar. Environ. Res.* 42, 261-266.
125. Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 121, 307-320.
126. Timbrell, J., 1999. Principles of biochemical toxicology. 3th edition. Taylor & Francis ed. p. 405.
127. Tolls, J., Kloepper-Sams, P., Sijm, D., 1994. Surfactant bioconcentration – a critical review. *Chemosphere.* 29: 693-717.
128. Torstensson, N., Lundgren, L., Stenström, J., 1989. Influence of climate and edaphic factors on persistence of glyphosate and 2,4-D in forest soils. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 18: 230-239.
129. Urawa, S., 1996a. Host-parasite interactions. The pathobiology of ectoparasitic protozoans on hatchery-reared pacific salmon. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery.* (50): 23-32.
130. Urawa, S., 1996b. Pathogenicity and host-parasite interactions. The pathobiology of ectoparasitic protozoans on hatchery-reared pacific salmon. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery.* (50), 57-65.
131. Vallejo, A.N., Ellis, A.E., 1989. Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* 13: 3-148.
132. Vidal-Barrios, H. H., 2006. Alteraciones clínicas y morfológicas en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) expuestos a la mezcla de Roundup® y Cosmoflux® 411F. Trabajo de grado en la modalidad investigativa para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta, Colombia.

133. Ward, G. S., Parrish, P. R., 1982. manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 6. Ensayos de toxicidad. FAO, Doc. Tec. Pesca.
134. Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C., Stocco, D.M., 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health. Persp.* 108: 769-776.
135. Water, Sanitation and Health Team., 2003. Guidelines for Drinking-water Quality: Recommendations. 3th Edition. Editorial: World Health Organization. p. 379.
136. Wendelaar Bonga, S.E., van der Meij, J.C., van der Krabben, W.A., Flik, G., 1984. The effect of water acidification on prolactin cells and pars intermedia PAS-positive cells in the teleost fish *Oreochromis* (formerly *Sarotherodon*) *mossambicus* and *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res.* 238, 601-609.
137. WHO., 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. Geneva: *World Health Organization*.
138. Wilhelm, M., Silver, R., Silverman, A.J., 2005. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2238-2248.
139. Williams, G., Kroes, R., Munro, L., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and Its active ingredient, Glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2000; 31: 117-165.
140. Williams, R.M., Bienenstock, J., Stead, R.H., 1995. Mast cells: The neuroimmune connection. *Chem. Immunol.* 61, 208-235.
141. Wind, T., Belanger, S.E., 2006. Acute and Chronic Toxicity of Alcohol Ethoxylates to the Green Alga, *Desmodesmus* (= *Scenedesmus*) *subspicatus*, and the Subsequent Development of Structure Activity Relationships. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 218-225.
142. Witt, J., 1998. Agricultural spray adjuvants. Extension Chemist and Toxicologist Oregon State University. 5123 Comstock Hall Cornell University Ithaca, New York. Last Modified: 05/08/1998 © 2002 Cornell University- on-line.

143. Wong, D., Dorn, P., Chai, E., 1997. Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1970-1976.
144. Wood, C.M., McDonald, D.G., 1987. The physiology of acid/aluminium stress in trout. *Ann. Soc. Zool. Belg.* 117 (Suppl. 1), 399-410.
145. Yang, R., Thurston, V., Neuman, J., Randall, D.J., 2000. A physiological model to predict xenobiotic concentration in fish. *Aquat. Toxicol.* 48, 109-117.
146. Zupanc, G.K., 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A.* 7, 1-22.

.....



PROPÓSITO DE LA OBRA...

.....

¿En verdad nos interesa la competitividad futura?

Mi querido amigo Pedro Eslava me ha solicitado generosamente que plasme algunas palabras en comentario a su valerosa decisión de publicar, junto con sus dos discípulos, la obra que en este momento se encuentra en sus manos.

A manera de soporte contextual, la obra se inicia con una muy cuidadosa y detallada revisión de información sobre distintos aspectos del tóxico elegido como base para la erradicación de los cultivos ilícitos en Colombia: el glifosato, en mezcla con el tensoactivo Cosmoflux® 411F; de manera previa se hace mención histórica a otros tóxicos utilizados con anterioridad con el mismo objetivo. La revisión incluye los aspectos de política desde el año 1992, en que se comienza a usar el glifosato, hasta el presente, período de tiempo en que los distintos gobiernos han adoptado este herbicida como base para el control de los cultivos ilícitos; se pone de relieve el nulo impacto que el uso de esta sustancia ha tenido en la erradicación o el errático efecto en la disminución de la áreas cultivadas con plantas ilegales. Transita por los efectos ambientales y las repercusiones sociales en las poblaciones afectadas, tradicionalmente las indígenas, y la escasa atención que sus reclamos tienen a pesar de los daños palpables que el herbicida tiene sobre su salud y sus cultivos. Cita las características químicas de los compuestos. Concluye esta primera parte con los conflictos fronterizos que la aspersión del tóxico ha generado cuando su uso afecta cultivos y personas en países vecinos. Sin embargo, como el elemento más contrastante con el propósito de la obra, los autores aportan lo que los gobiernos hasta ahora han considerado su indiscutible soporte conceptual para la erradicación de las plantas ilícitas con base en sustancias tóxicas: los estudios científicos.

.....

Tienen varios inconvenientes los citados soportes oficiales, además de tener un carácter eminentemente documental, el estudio solicitado por el gobierno en el año 2005, se basa, a su vez, en una deficiente evidencia experimental de acuerdo con los rigores de la actividad científica; se debe señalar que la comprobación de las propiedades tóxicas de una sustancia es de tal complejidad que hacen falta estudios muy bien diseñados durante muchos años, circunstancia no comprobada con el producto que nos ocupa. Adicionalmente, la academia nacional ya ha señalado otra serie de inconsistencias estructurales al informe encargado por el gobierno. Es necesario resaltar que además de las ciencias sociales el país cada vez desarrolla más su capacidad científica en las ciencias naturales, y que para nuestros problemas en estas disciplinas específicas ya no es suficiente predicar como argumento de autoridad que la investigación se hizo en tal o cual país. Ya hay instituciones y científicos nacionales capaces de abordar las preguntas de nuestra realidad natural con la suficiente solvencia intelectual no sólo para refutar resultados de investigaciones llevadas a cabo en otros lugares, a veces de manera inconveniente, sino de aportar resultados más rigurosos y confiables para nuestra sociedad.

Como corolario de la primera parte del libro se podría decir que seguimos aferrados a la ancestral idea de que nosotros no somos parte de nuestros problemas, que su solución depende de personas extranjeras, máquinas, herramientas o sustancias químicas, pero nunca de nosotros mismos como ciudadanos responsables. Entonces, a conflictos de índole social, económico y político, les aplicamos soluciones tecnológicas de índole químico, con la esperanza de que rindan efectos milagrosos, es la renuncia a aceptar los correctos diagnósticos de los problemas desde el interior de la propia sociedad para aplicar las enmiendas adecuadas.

La segunda parte del libro, que corresponde al aporte novedoso de los autores, demuestra con hechos incontestables que los tóxicos empleados analizados en condiciones experimentales más rigurosas, sí tienen efectos deletéreos sobre uno de los organismos acuáticos que normalmente habitan en regiones donde ellos son empleados. Hay por lo menos tres o cuatro hallazgos que además de incontrovertibles resultan preocupantes: las lesiones en encéfalo, las de las branquias, piel e hígado, esto de por sí en cualquier lugar del mundo sería motivo suficiente para detener el uso de los productos.

Los gobiernos, todos, han querido minimizar la responsabilidad sobre la devastación ambiental que están causando tanto sus acciones de control como el negocio de los narcóticos, creen que transfiriendo su responsabilidad al enemigo, los negociantes de las drogas ilícitas, y fabricando para ello un falso dilema quedan a salvo de su responsabilidad para con la naturaleza y la sociedad. El expediente que se utiliza es trasladarle a la opinión pública el falso dilema: fíjense, los delincuentes utilizan unas sustancias muy dañinas para la ecología y nosotros nos vemos forzados a utilizar otras de “menor impacto”. Como excusa, durante los primeros años de experimento, pase, pero cuando el círculo vicioso supera las décadas, y cuando el objetivo de erradicación no se consigue, el falso dilema se nos devuelve de forma acusadora a toda la sociedad: ¿a quién le correspondía romper el círculo vicioso, a la delincuencia o a la autoridad? Tal vez allí radica el núcleo central de nuestra tragedia nacional: salvo contadas y honrosas excepciones, ¿en ocasión histórica alguna hemos tenido algo similar a la autoridad?

Paradójicamente, la lógica de los falsos dilemas utilizada en sentido inverso tendría consecuencias acusadoras de índole planetario para los gobernantes: que es mas grave, dejar que por cuenta de los cultivos ilícitos se degraden algunas zonas de alto valor ecológico pero no perseguirlos, la persecución es mas bien para los noticieros, al fin de cuentas la demanda por los narcóticos se ha estabilizado, o fumigarlos, como es la política actual y acelerar el tiempo de la devastación en la medida que las metástasis por todo el país cada vez son de ciclo mas corto. Una pregunta pertinente entonces sería: ¿qué es más costoso en términos ecológicos, tener unas pocas y limitadas zonas degradadas ecológicamente o inmensas áreas devastadas con una floreciente colonización y degradación humana típicas de la visión de desarrollo imperante? Pero acá se conecta otro problema central a la temática que nos ocupa: ¿Es verdad que a nuestros gobiernos les interesa nuestro futuro o siquiera nuestro desarrollo como sociedad?, o para ponerlo en la terminología oficial, ¿en verdad les interesa nuestra competitividad futura? Porque no hay argumento que valga para convencer a nuestros dirigentes que los pueblos compiten desde sus riquezas y fortalezas, algunas heredadas de sus naturalezas, otras adquiridas en momentos históricos en que el afán de depredación no había llegado tan lejos. Resulta que nuestras riquezas naturales, la biodiversidad, son nuestra fortaleza y desde este momento histórico en adelante serán nuestra

arma de negociación mas poderosa dentro del conjunto mundial, pero se constata que no, que nuestros gobiernos han resuelto que no, que lo mejor es plantar monocultivos donde antes hubo una inmensa riqueza comunitaria llena de variedad. Muchos de los nuevos empresarios de los monocultivos “competitivos”, provienen precisamente de los cultivos que se ha pretendido erradicar, bien conocidos son sus métodos de hacerlos rendir según sus mezquinos intereses, además, podemos presumir el trato que le darán a la naturaleza ahora a su disposición.

Por último, es apenas lógico hacer un reconocimiento a la Universidad de los Llanos y saludar la valerosa decisión y el meritorio aporte de los colegas responsables de esta obra.

Carlos Arturo Iregui Castro

MV. DMV.

Profesor Emérito

Universidad Nacional de Colombia

Director del Grupo de Investigación en Patobiología Veterinaria

Investigación urgente y pertinente

Esta obra es un ejemplo claro de respuesta oportuna a un problema social de magnitud global, por parte de la universidad colombiana.

Los grandes problemas del mundo ya no son locales sino globales, pues sus efectos recaen no sólo a nivel local donde se produce el fenómeno, sino a nivel planetario; nuestros vecinos del Ecuador así lo han captado y por ello quieren alertarnos a los colombianos anestesiados y desmoralizados ante el espectáculo cotidiano de la violencia contra el ser humano y contra la naturaleza.

Los autores nos ilustran sobre los efectos de “la fumigación” de una mezcla tóxica en el corto plazo y queda por evaluar qué ocurrirá en el largo plazo y, de manera más sutil y soterrada, a lo largo y ancho de las cadenas tróficas de las cuales el ser humano es el principal usuario.

El Imperio estadounidense tiene que deshacerse de todos los químicos que produce y que en su propio territorio no puede asperjar... y por otro lado llegan los químicos que realimentan la guerra, que generan complejos fenómenos de poder expresados en decisiones contrarias a la ética, que van llevando a nuestros líderes a la corrupción y a la picota pública.

Pero mientras tengamos universidad e intelectuales, el futuro es menos oscuro.

Felicitaciones a los autores!

Jorge Ossa Londoño, MV, Ph.D.

Profesor Emérito, jubilado,
Universidad de Antioquia

La defensa de la cosmovitalidad

Este libro, resultado de una investigación muy bien sustentada y documentada, realizado por un equipo de jóvenes investigadores de la Universidad de los Llanos, encabezados por el doctor Pedro Eslava, es una muestra concluyente de los efectos nocivos del glifosato aplicado a la fumigación de cultivos de coca, para los peces de las aguas adyacentes a las áreas de cultivo, ejemplares de Cachama blanca utilizados en los experimentos resultaron afectados al ser expuestos a la mezcla asperjada.

Aun cuando los científicos no hacen ninguna afirmación que no puedan sustentar, es presumible pensar que el daño en peces de alguna manera pueda afectar a otros seres vivos. Esta afirmación resulta muy valiosa por cuanto desautoriza afirmaciones de los políticos y de otras fuentes presuntamente científicas sobre lo inocuo del uso del glifosato. Investigaciones de este tipo contribuyen a la defensa de la Cosmovitalidad que defendemos en la Escuela Filosófica del Vitalismo Cósmico.

Darío Botero Uribe

Profesor Emérito

Universidad Nacional de Colombia.

Creador de la Escuela Filosófica del Vitalismo Cósmico.

Y ahora, actuar en consecuencia...

Es frecuente que se cometan errores por falta de conocimiento y profundidad en el mismo cuando se pretende abordar programas y proyectos que implican el manejo de los recursos naturales y los grupos humanos que constituyen una sociedad. En el conocimiento radica la diferencia entre una sociedad avanzada que pretende el beneficio de todos sus integrantes y es allí donde radica la verdadera capacidad competitiva.

Este libro constituye un aporte valioso sobre el conocimiento del uso e impacto del glifosato y sus mezclas, utilizado en Colombia para el control de cultivos ilícitos. Los resultados y análisis reportados, obligan, una vez se tiene este conocimiento científico, a revisar y discutir el uso de este sistema de control en el país.

Extrapolar resultados es riesgoso y poco serio desde la perspectiva científica, pero lo preocupante de los hallazgos reportados del impacto del glifosato y sus mezclas, en peces nativos, genera muchas inquietudes y preocupaciones. En la Orinoquia, un sistema natural hídrico por excelencia, con el 30% del área total de la Cuenca del Orinoco, sistema hidrológico ribereño considerado el tercero mas importante de los aportantes de agua al Atlántico, obliga, desde el conocimiento, a reflexionar y cuestionar sobre el efecto que puede estar causando el uso del glifosato y sus mezclas en la riqueza del recurso ictiológico de la Orinoquia. Desde luego, existe la misma pregunta sobre su impacto sobre la biodiversidad regional y nacional.

El trabajo de investigación que sustenta el libro, hace honor a la responsabilidad que tiene la universidad de generar conocimiento y desde su aporte critico, contribuir al desarrollo de la sociedad. Un reconocimiento a los autores del libro, por el trabajo hecho y su contribución en un tema de interés nacional y mundial. Queda ahora la responsabilidad de quienes toman las decisiones, de analizar objetivamente el conocimiento reportado y actuar según el criterio científico que soporte su proceder.

Alvaro Ocampo Durán

Profesor Investigador

Zootecnista, MSc, PhD, DIC

Universidad de los Llanos

.....

Este libro terminó de imprimirse en los talleres de
la Editorial Juan XXIII en el mes de abril de 2007,
Villavicencio, Meta - Colombia

Tiraje: 1.000 ejemplares.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
DE LA ORINOQUIA COLOMBIANA



IALL
INSTITUTO DE ACUICULTURA
DE LOS LLANOS

