

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



“EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE *Eisenia foetida* (LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA) EN LA DEGRADACIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y PROFENOFOS EN SUELOS, AREQUIPA-2014”

Presentado por el Bachiller en Farmacia y
Bioquímica:

GONZALES CONDORI, ELVIS GILMAR

**PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE.**

AREQUIPA – PERÚ

2016

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
CAPÍTULO II	8
MARCO teórico	8
CAPÍTULO III	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
1. Elección de la longitud de onda	32
2. Identificación de los tiempos de retención por HPLC	34
3. Extracción de profenofos y clorpirifos de suelos artificiales	34
4. Validación del método por HPLC	37
5. Evaluación del desempeño de <i>Eisenia foetida</i>	41
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	67

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento económico que me permitió culminar de manera satisfactoria la Maestría en Química del Medio Ambiente y el presente proyecto.

Agradezco a Joel Lucio Mamani López por participar activamente en el desarrollo del presente proyecto así como al Dr. José A. Villanueva Salas por brindarme su asesoría y confianza.

Quiero agradecer a mi familia y en especial a mi hermano Ever que siempre me apoyó moralmente y brindo consejos para poder culminar mis estudios y seguir adelante.

RESUMEN

Los pesticidas organofosforados como clorpirifos (Dorsán y Tifón) y profenofos (Selecrón) son usados con frecuencia en actividades agrícolas de la región Arequipa, su uso se ve en aumento debido a la presencia de múltiples plagas que amenazan a la producción de alimentos de origen vegetal. Producto de esta actividad los suelos se ven contaminados ya que estos pesticidas presentan una alta residualidad. El presente proyecto tuvo como finalidad evaluar la actividad de *Eisenia foetida* en la degradación de clorpirifos y profenofos a escala de laboratorio en suelos artificiales.

Para la cuantificación de clorpirifos y profenofos se validó un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) usando estándares primarios con pureza mayor al 99.5 % Sigma Aldrich. El método resultó ser lineal con coeficientes de correlación r^2 de 0.9994 y 0.9996 para profenofos y clorpirifos respectivamente, por otro lado el método fue preciso obteniéndose valores de desviación estándar relativa (DSR) menores a 2.7 % para ambos pesticidas. Así mismo resultó exacto con porcentajes de recuperación de 90.5 y 98.9 % para clorpirifos y profenofos respectivamente.

Los ensayos fueron realizados en suelos artificiales con humedad ajustada al 40 %, en ausencia de luz, temperatura ambiente y un pH del suelo aproximado a 7 durante 28 días. Por otro lado los suelos de estudio se contaminaron con aproximadamente 40 y 50 mg/Kg

de clorpirifos y profenofos respectivamente. Se evaluó un diseño factorial 2^2 siendo los factores Lombrices (20 individuos) y bacterias nativas del suelo.

En el blanco (ausencia de bacterias nativas y lombrices) los niveles de clorpirifos y profenofos disminuyeron en un 33.68 y 52.63 % de clorpirifos y profenofos respectivamente, lo que indica que profenofos se degrada con mayor rapidez que clorpirifos, ya que la OMS establece que cuando el pH es superior a 6 los pesticidas organofosforados tienden a hidrolizarse con mayor facilidad. La actividad de las bacterias nativas presentes en el suelo mostraron porcentajes de degradación de 37.16 y 63.52 % para clorpirifos y profenofos respectivamente, demostrando que la actividad bacteriana acompaña en el proceso de degradación de ambos pesticidas.

Eisenia foetida aceleró el proceso de degradación logrando al final del estudio porcentajes de degradación de 60.76 % para clorpirifos y 72.58 % para profenofos, lo que indica que este anélido presenta un desempeño positivo en el proceso de degradación de ambos pesticidas organofosforados. Finalmente se encontró que *Eisenia foetida* en presencia de los microorganismos en general del suelo potencian la actividad de degradación de ambos pesticidas ya que los niveles de clorpirifos y profenofos disminuyeron en un 74.85 y 75.64% respectivamente.

Palabras Clave: Clorpirifos, Profenofos, HPLC-DAD, *Eisenia foetida*, Bacterias nativas, Validación, Porcentaje de degradación.

SUMMARY

organophosphate pesticides such as chlorpyrifos (Dorsan and Typhon) and profenofos (Selecron) are often used in agricultural activities in the region of Arequipa, its use is increasing due to the presence of multiple pests that threaten food production from plants. Proceeds from this activity are contaminated as they have a high residual pesticides soils. This project is to evaluate the *Eisenia foetida* activity in the degradation of chlorpyrifos and profenofos laboratory scale in artificial soil.

For quantification of chlorpyrifos and profenofos a method by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using primary standards with higher purity of 99.5% Sigma Aldrich was validated. The method was linear ($r^2 > 0.995$) for the linear correlation coefficients r^2 of 0.9994 and 0.9996 for profenofos and chlorpyrifos, respectively, the coefficients change precise percentage lower than 2.7% for both pesticides, obtaining accurate recovery rates and 98.9 to 90.5 %chlorpyrifos and profenofos respectively.

The tests were performed in artificial soil moisture was adjusted to 40%, in the absence of light, temperature and pH of soil 7051 for 28 days. On the other hand soils they were contaminated with about 40 to 50 mg / kg of chlorpyrifos and study profenofos respectively. 22 factorial design are factors earthworms (20 individuals) and native soil bacteria was evaluated. Blank (no native bacteria and worms) and chlorpyrifos profenofos levels decreased by 33.68 and 52.63% respectively, indicating that degrades faster than profenofos chlorpyrifos as WHO establishes that when the pH is more than 7 organophosphate pesticides tend to hydrolyze faster. The activity of native bacteria in soil showed degradation percentages of 63.52 and 37.16 % for chlorpyrifos and profenofos

respectively, showing that bacterial activity plays an important role in the degradation of both pesticides.

Eisenia foetida accelerates the degradation process of making the final percentages of degradation study 60.76% to 72.58% of chlorpyrifos and profenofos, indicating that this annelid presents a positive performance in the degradation of both organophosphate pesticides. Finally, *Eisenia foetida* found that in combination with soil microorganisms generally improve the activity of both pesticides degradation as chlorpyrifos levels and decreased profenofos 74.85 75.64%, respectively.

Keywords : Chlorpyrifos , Profenofos , HPLC -DAD , *Eisenia foetida* , native bacteria , Validation, Percentage of degradation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los pesticidas desempeñan un papel importante en el control de numerosas plagas, gusanos cortadores, hongos, malezas y otros organismos afectan directamente a productos agropecuarios y forestales. Las actividades agrícolas son las que usan diversos agroquímicos entre ellos los plaguicidas, por lo que se considera que este sector productivo es el de mayor exposición a estos contaminantes. Las formas de exposición a los plaguicidas para los humanos y los animales comprenden la ingesta o consumo de alimentos contaminados, la absorción dérmica y la inhalación de vapores emitidos cuando los plaguicidas son rociados en el terreno de cultivo ²⁸.

En la actualidad se presenta una gran atención sobre los contaminantes ambientales con relación a la seguridad alimentaria ya que los residuos de plaguicidas son considerados como sustancias potencialmente tóxicas en los alimentos y constituyen un motivo de preocupación para los consumidores ^{6, 28}.

Los residuos de plaguicidas en los alimentos es producto del uso indiscriminado de éstos en la agricultura; la eliminación de los plaguicidas depende de diversos factores como el crecimiento propio del vegetal, la acción de agentes atmosféricos como el viento y la lluvia, el grado de solubilidad y volatilidad del plaguicida, el tipo de degradación química que sufra y la naturaleza del propio plaguicida ^{6, 28}.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el desempeño de *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana) en la degradación de los pesticidas organofosforados clorpirifos y profenofos en suelos artificiales

Objetivos Específicos

- 1) Preparar suelos artificiales contaminados para los estudios de degradación.
- 2) Aclimatar individuos de la especie *Eisenia foetida* a suelos artificiales.
- 3) Validar un método de determinación cuantitativa de los pesticidas clorpirifos y profenofos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- 4) Desarrollar un diseño factorial 2^2 para evaluar el desempeño de *Eisenia foetida* en la degradación de clorpirifos y profenofos

HIPÓTESIS

Debido a que existe referencia bibliográfica sobre la actividad de *Eisenia foetida* en la degradación de compuestos orgánicos, es probable que la actividad de este anélido influya en la degradación de los pesticidas organofosforados clorpirifos y profenofos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los compuestos organofosforados son un grupo de insecticidas que fueron usados por primera vez en 1938 por un grupo de químicos alemanes. Los organofosforados fueron introducidos como venenos nerviosos durante la segunda Guerra Mundial, y más tarde se desarrollaron a sustancias menos tóxicas. Los compuestos organofosforados se utilizan para el control de plagas en cultivos en la agricultura y en la ganadería.

Los pesticidas organofosforados se descomponen por procesos de hidrólisis rápidamente liberando fosfatos orgánicos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año se producen 220 000 muertes a causa de intoxicación por organofosforados.

Los organofosforados son plaguicidas junto a los carbamatos son inhibidores de la enzima colinesterasa. Son ésteres del ácido fosfórico que se caracterizan por ser fácilmente hidrolizables ya sea en medio húmedo o pH alcalino. Se absorben por todas las vías pero principalmente los problemas de intoxicación son por las vías oral y dérmica. Su principal acción es sobre la acetilcolinesterasa y la colinesterasa.

plasmática. Producen una unión irreversible por fosforilación enzimática, dando como resultado la inhibición de acetilcolinesterasa ^{6, 28}.

Se sabe que existen dos tipos de receptores para este neurotransmisor: el receptor muscarínico, y el receptor nicotínico. Inmediatamente, tras ser liberada del receptor, la acetilcolina es hidrolizada por la colinesterasa. Los organofosforados reaccionan con la zona esterásica de la colinesterasa formando una unión irreversible. La acetilcolina se acumula entonces en la hendidura sináptica, desencadenando múltiples de signos y síntomas ^{6, 28}.

Cuando la dosis tóxica es suficientemente alta, la pérdida de la función enzimática permite la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras conocida como efectos muscarínicos, en las uniones mioneurales del esqueleto así como los ganglios autónomos conocidos como efectos nicotínicos y en el sistema nervioso central. Ver Figura 2.

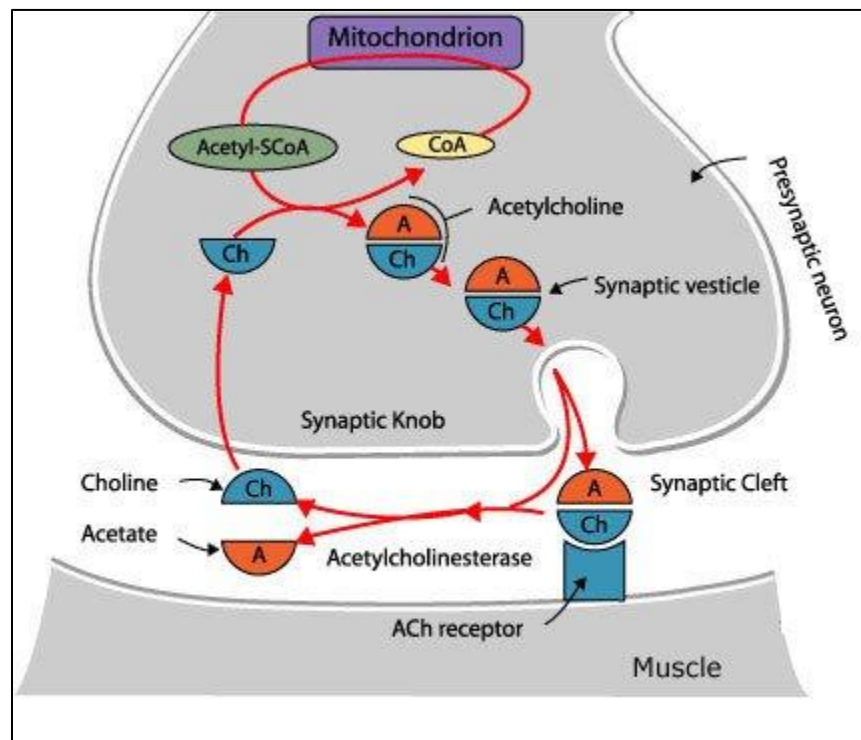


Figura 1. Esquema de sinapsis colinérgica

Cuando se acumulan altos niveles de acetilcolina en las uniones colinérgicas nerviosas con el músculo liso y las células glandulares puede causar contracción del músculo y

secreción, respectivamente. En las uniones músculo esqueléticas, puede causar espasmos musculares. Altas concentraciones de acetilcolina en el SNC causan alteraciones sensoriales y del comportamiento, incoordinación, depresión de la función motora y depresión respiratoria ^{6, 28}.

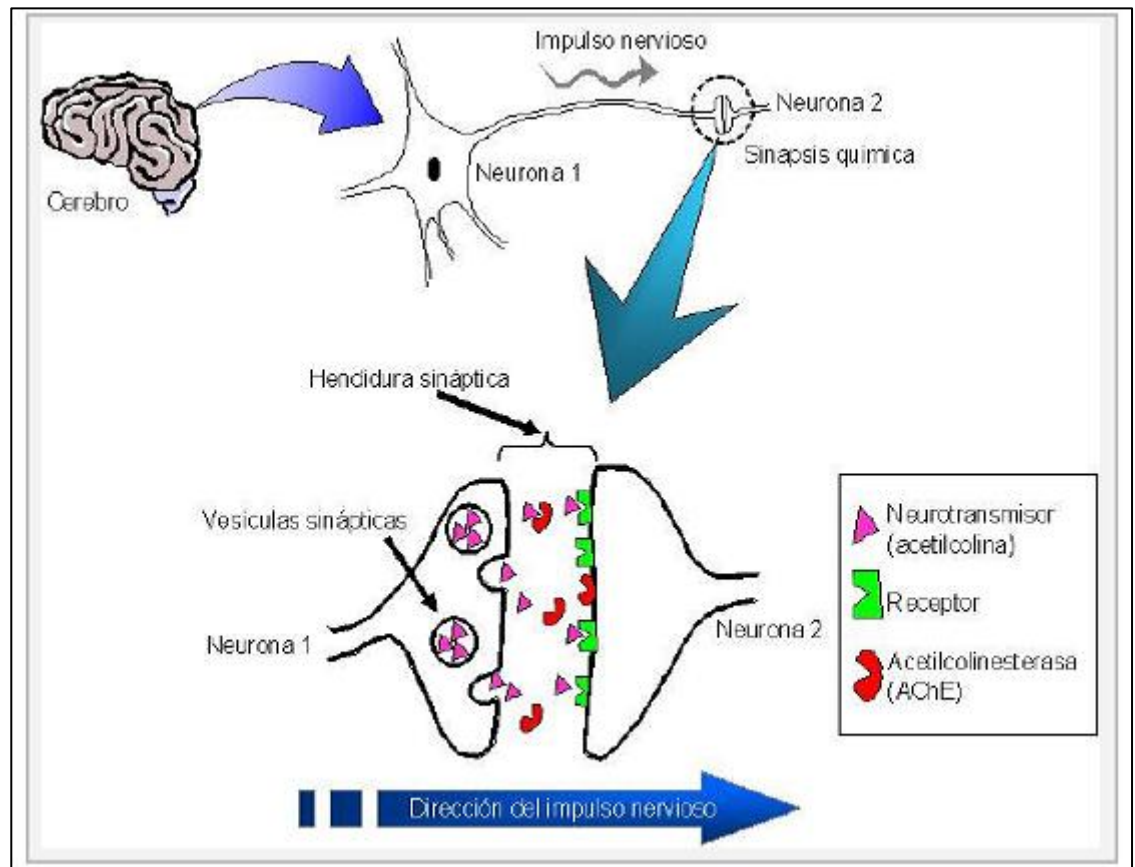


Figura 2. Mecanismo de acción tóxica de los organofosforados sobre la sinapsis colinérgica.

En la intoxicación por organofosforados se produce el siguiente cuadro clínico (Figura 3). El antídoto usado en casos de intoxicación es la atropina cuya acción se fundamenta en la competición por los receptores frente a la acetilcolina. La administración es por vía endovenosa con dosis iniciales de 1 a 5 mg, en solución salina ^{6, 28}.

EFFECTOS MUSCARÍNICOS	EFFECTOS NICOTÍNICOS	EFFECTOS SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
Miosis	Taquicardia (inicial)	Cefalea
Sudoración	Hipertensión (inicial)	Agitación
Visión borrosa	Vasoconstricción periférica	Psicosis
Lagrimo	Hiperexcitabilidad miocárdica	Confusión mental
Secreciones bronquiales	Midriasis	Convulsiones
Broncoconstricción	Astenia	Coma
Vómito	Fasciculaciones	Depresión respiratoria
Cólico abdominal	Debilidad muscular	
Diarrea	Aumento catecolaminas	
Sialorrea	Hiperglicemia	
Bradycardia	Hiperkalemia	

Figura 3. Manifestaciones clínicas por intoxicación aguda con organofosforados.

Clorpirifos

El clorpirifos es de color blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. Es un insecticida organofosforado de amplio espectro, que surge como alternativa al uso de metamidofos que es un insecticida actualmente prohibido debido a su alta toxicidad por lo cual el uso de pesticidas como el clorpirifos se viene incrementando. Sin embargo los metabolitos de este organofosforado presentan una amplia persistencia en el suelo. No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de plagas de cosechas⁶.

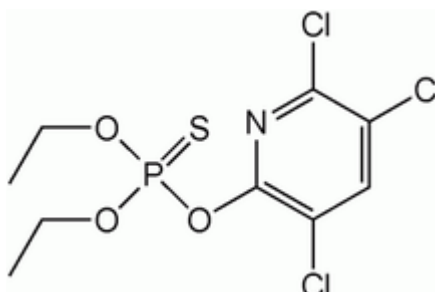


Figura 4. Clorpirifos.

Profenofos

Profenofos es un pesticida de amplio espectro. Es eficaz contra amplia gama de insectos masticadores, y chupadores, así como ácaros en diversos cultivos. Es un insecticida organofosforado que cuando es liberado en el aire, sus vapores reaccionan con radicales hidroxilo. La vida media de esta reacción es de 8.6 horas. Por su parte, su fracción adsorbida a las partículas es removida del aire cuando éstas se precipitan con la lluvia y el polvo. Este compuesto es estable a la fotólisis directa en el ambiente.

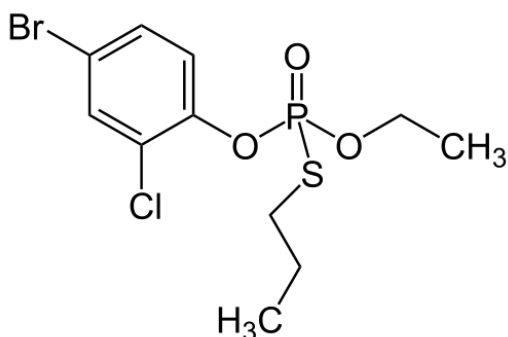


Figura 5. Profenofos.

Determinación de pesticidas organofosforados.

La elevada toxicidad de pesticidas que se encuentran en el medio ambiente ya sea suelo, agua o alimentos, justifica el uso de métodos analíticos sensibles, reproducibles, rápidos y económicos para la determinación de estos productos ^{14, 15}.

Los métodos cromatográficos como Cromatografía de Gases-MS (GC-MS) y Cromatografía Líquida (LC) son ampliamente usados para la determinación de estos agroquímicos. Los compuestos que se volatilizan con facilidad son analizados por Cromatografía de Gases. La Cromatografía Líquida presenta ventajas sobre la Gaseosa al momento de analizar muestras polares o de baja volatilidad.

Por otro lado los estándares de referencia son esenciales para la identificación y cuantificación en cromatografía ^{14, 15}.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CONCEPTO

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica de separación, usada principalmente para la separación de componentes de una muestra y su posterior cuantificación que se fundamenta en la interacción con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida ³⁷.

La fase estacionaria: en la mayoría de los casos está constituida por un sólido poroso, con un tamaño de partícula muy pequeño, cuya superficie es inerte.

La fase móvil: pasa a través de la columna a un flujo determinado transportando la muestra. Los solventes usados son de alto grado de pureza o mezcla de ellos ³⁷.

PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

La cromatografía líquida presenta un proceso de separación que tiene lugar en la columna, que es considerado como el corazón del sistema cromatográfico, ya que alrededor de él se monta un equipo de mayor o menos complejidad ³⁷.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

El cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.

Un eluato, que contiene la fase móvil, e idealmente, los componentes de la muestra separados en función de los tiempos de retención ³⁷.

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de los componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas. Así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene por más tiempo y el más afín a la fase móvil se retiene menos o eluye antes ³⁷.

RESERVORIO DE LA FASE MÓVIL

Se ubica en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de la gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.

Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba impidiendo así la obstrucción de los canales del sistema ^{30, 37}.

BOMBA

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los micro- filtros/minutos para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.

Básicamente existen dos tipo de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa) ^{30, 37}.

Características de las bombas

- **Caudal.** Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10.0 mL/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- **Exactitud en el caudal.** La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado. La importancia en la exactitud del caudal reside en la importancia que pueda darse a la exactitud en la determinación de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar.
- **Ruido.** El ruido (short-term) se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas recíprocas, y que conducen a variaciones en el caudal de solventes entregado en intervalos cortos de tiempo. Se origina en la detención (en

intervalos de tiempo muy breves) del caudal del líquido durante los movimientos habituales de la bomba (apertura-cierre de válvulas o movimiento de los pistones). A pesar de que cierto nivel de ruido es habitual, deficiencias en el sistema de bombeo como válvulas tapadas, burbujas de aire ocluidas en los cabezales o sellos en mal estado intensifican notoriamente su valor. Este parámetro es de importancia crucial para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de HPLC varían cuando varía el caudal de solvente.

- **Deriva.** La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (típicamente durante horas). La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos largos (por ejemplo toda la noche).
- **Sistema de corte.** Es conveniente que la bomba posea sistemas de corte de caudal cuando se superen valores límites de presión tanto superior como inferior. Este sistema de corte evita, en el primer caso, que excesos en la presión del sistema cromatográfico pueda dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores. En el segundo caso permite detectar las posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil. Estos sistemas pueden tener una importancia vital si se utilizan equipos automáticos sin la ayuda de operador^{30, 37}.

INYECTORES

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar^{30, 37}.

DETECTORES

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica^{30, 37}.

EL HORNO

- Debe ser estables +/- 0.2%.
- Debe contar con mecanismos de seguridad.
- Las columnas deben ingresar fácilmente a su compartimiento.
- Preferentemente debe conectarse el inyector dentro del horno^{30, 37}.

SISTEMAS DE TOMA Y PROCESAMIENTO DE DATOS

El resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- **Registrador gráfico**, que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- **Integrador**, que permiten no sólo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento para el cálculo de concentraciones.
- **Computadora**. Básicamente el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora de tipo personal que permita con el software apropiado tanto el registro grafico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como

computadoras que necesitan señales digitalizadas, se necesita una interface analógica digital que convierta la señal analógica entregada por el detector^{30, 37}.

BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, por lo cual se puede utilizar en la remoción de contaminantes en suelos y lechos acuáticos^{1, 17}.

Los microorganismos transforman y metabolizan aeróbicamente los compuestos orgánicos como los organofosforados hasta dióxido de carbono y agua. Es conocido que los microorganismos indígenas tienen la capacidad de adaptarse y eventualmente degradar cualquier compuesto orgánico natural sin asistencia del hombre; sin embargo, esta adaptación requiere la presencia de condiciones ambientales apropiadas tales como el pH, temperatura, el aceptor final de electrones, concentraciones de contaminante no tóxicas para los microorganismos y adecuadas condiciones de humedad y conductividad del medio, entre las más importantes. La ausencia de alguna o varias de las anteriores condiciones puede limitar parcial o totalmente la actividad biológica y es cuando la mano del hombre juega un papel fundamental en la optimización del proceso, ya sea mejorando estas condiciones para aumentar la población de microorganismos (bioaugmentación), este sería la acción principal de *Eisenia foetida* y manipulando genéticamente los microorganismos para la degradación específica de algunos compuestos químicos^{1, 17}.

FUNDAMENTACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIODEGRADACIÓN

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa, principalmente, en la serie de reacciones de óxido-reducción (cuyo fin es la obtención de energía) que se producen en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como dador

de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia ^{1, 17, 22, 46}.

Los aceptores más usados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio ^{1, 17, 22, 46}.

LOMBRIZ DE TIERRA

Los gusanos de tierra pertenecen al orden de los oligoquetos ya que presentan diminutas filas de cerdas en su cuerpo tanto en la parte ventral como lateral y que sirven como elementos de agarre durante el desplazamiento. Para cavar, la lombriz contrae los músculos longitudinales, luego se adelgaza y desliza. Las lombrices logran remover piedras de más de cincuenta veces su peso, o penetrar sin dificultad en terrenos compactados donde difícilmente podría tenerse acceso ^{32, 45}.

La boca es sólo un orificio con una cavidad. El cuerpo de la lombriz está ocupado en gran proporción por el canal digestivo. A medida que cava, incorpora tierra y materia orgánica y los alimentos presentes primero son humedecidos y pre-digeridos así posteriormente son aspirados por la faringe haciendo contracción de sus franjas musculares, simulando el efecto de una bomba succionadora ^{32, 45}.

En el esófago están presentes las glándulas calcíferas que se encargan de neutralizar la acidez de la materia vegetal. El papo empuja el alimento a la molleja, donde es molido con poderosas contracciones. Finalmente en el intestino se completa el resto de la digestión y la mayor parte de la absorción ^{32, 45}.

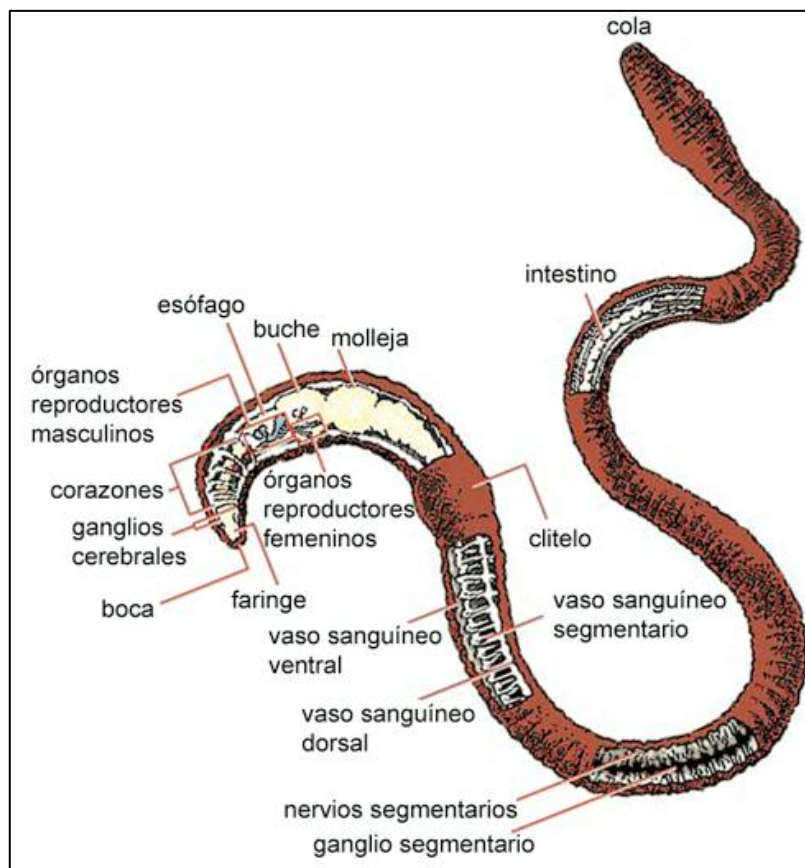


Figura 7. Anatomía interna de la Lombriz

LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (*Eisenia foetida*)

La lombriz *Eisenia foetida* es un anélido, de color rojo oscuro que puede medir en promedio de 6 a 8 cm de longitud, de 3 a 4 mm de diámetro y un peso aproximado de 1.4 g en edad adulta. Poseen una longevidad de hasta 16 años ⁽⁴⁾, se adapta a un amplio rango de temperaturas, pero su temperatura óptima es de 22°C y su máxima actividad sexual se logra cuando la temperatura del medio donde habita oscila alrededor de los 20°C. Las lombrices recién nacidas son de color blanco, se vuelven rosadas a los 5 ó 6 días y se convierten definitivamente a rojo oscuro de los 15 a 20 días, al nacer miden 1 mm ^{24, 32, 45}.

La lombriz roja es hermafrodita su cruce es recíproco, se aparea cada 7 días, se hace adulta a los 3 meses, tiempo en la que se encuentra con capacidad de reproducción, visualizándose un anillo de mayor espesor o diámetro que el resto del cuerpo llamado

clitellium ⁽²⁾. Durante la cópula cada lombriz recibe el esperma de la otra y lo retiene en su espermateca hasta el momento de la reproducción ^{24, 32, 45}.

Clasificación taxonómica.

Reino:	<i>Animal</i>
Tipo:	<i>Anélido</i>
Clase:	<i>Oligoqueto</i>
Orden:	<i>Opisthoro</i>
Familia:	<i>Lombricidae</i>
Género:	<i>Eisenia</i>
Especie:	<i>E. foetida</i>

Características internas.

Cutícula. Es una capa delgada de color marrón brillante, quitinosa, fina y transparente.

Epidermis. Se encuentra debajo de la cutícula, es un epitelio con células glandulares que producen una secreción mucosa que es responsable de la formación de la cutícula y del mantenimiento de la humedad y flexibilidad.

Capas musculares. Posee dos capas; una circular externa y otra longitudinal interna.

Peritoneo. Limita exteriormente con el celoma de la lombriz.

Celoma. Es una cavidad que contiene líquido celómico.

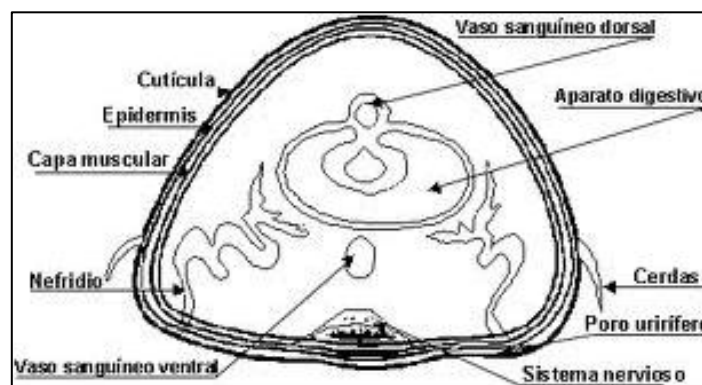


Figura 8. Características internas de *Eisenia foetida*.

Aparato circulatorio. Formado por vasos sanguíneos, uno dorsal y otro ventral. Por otro lado también posee capilares que llevan la sangre a todo el cuerpo. La sangre circula por un sistema cerrado constituido por cinco pares de corazones.

Aparato respiratorio. El intercambio de oxígeno se produce a través de la pared del cuerpo.

Aparato excretor. Formado por nefridios, dos para cada anillo. Las células internas son ciliadas y sus movimientos permiten retirar los desechos del celoma.

Sistema nervioso. Es ganglionar. Posee un par de ganglios supraesofágicos, de los que parte una cadena ganglionar.

La lombriz californiana se alimenta de animales, vegetales y minerales. Antes de comer tejidos vegetales los humedece con un líquido parecido a la secreción del páncreas humano, lo cual constituye una predigestión ^{14, 24, 32, 45}.

Ciclo de vida.

Son hermafroditas, no se autofecundan, por tanto es necesaria la cópula, la cual ocurre cada 7 o 10 días. Luego cada individuo coloca una cápsula (huevo en forma de pera de color amarillento) de unos 2 mm. De la cual emergen de 2 a 21 lombrices después de un periodo de incubación de 14 a 21 días, dependiendo de la alimentación y de los cuidados ver Figura 9 ⁽²⁶⁾. Experimentos realizados con diferentes sustratos con estiércol de bovino, cabra y gallinazo no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en relación a la población de lombrices y número de cápsulas ⁽¹⁰⁾.

Existe referencia detallada sobre el efecto de los organismos en los suelos, establecen que ciertas poblaciones de lombrices pueden llegar a ingerir más de 1000 toneladas de tierra por hectárea al año. Existe evidencia que afirma que las lombrices establecen una sinergia positiva con las micorrizas para la producción de plantas ^{24, 32, 45}.

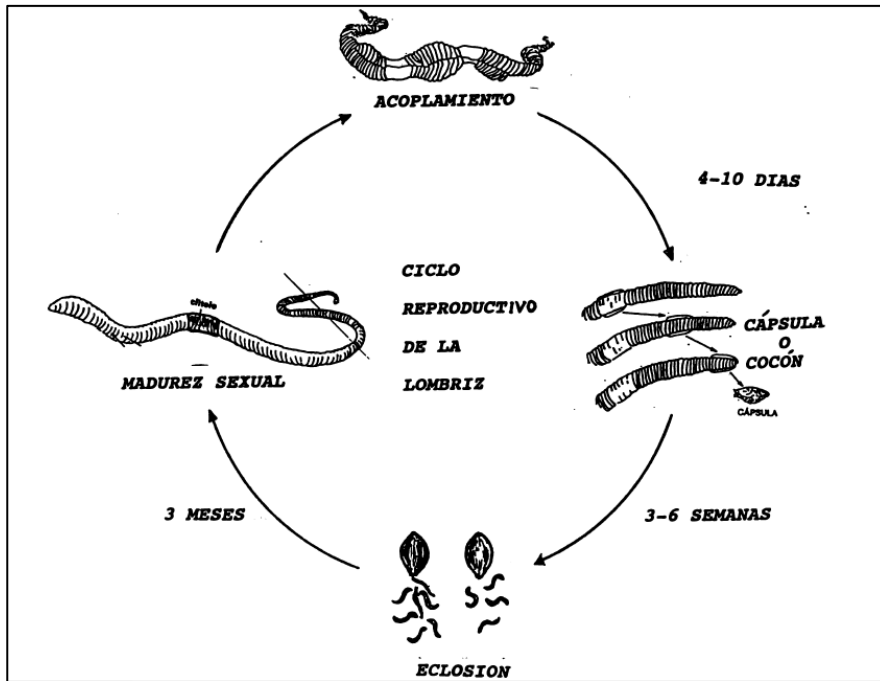


Figura 9. Ciclo de vida de *Eisenia foetida*

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA Y AMBIENTE UTILIZADO

Para el desarrollo del presente proyecto se obtuvieron individuos de la especie *Eisenia foetida* de los viveros de la ciudad de Arequipa, por otro lado los ensayos fueron realizados en el laboratorio de investigación del proyecto MERCURIO de la Universidad Católica de santa María.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Estándar de pesticidas Clorpirifos y Profenofos Sigma Aldrich.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Lombrices (*Eisenia foetida*).
- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución Agilent (HPLC-DAD)
- Balanza analítica.
- Micropipetas.
- Equipo EASYPURE II.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Éter etílico.

MÉTODOS

PRIMERA FASE DE ESTUDIO

Determinación de clorpirifos y profenofos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Para la identificación de los tiempos de retención de clorpirifos y profenofos se usaron estándares primarios Sigma Aldrich con una pureza mayor a 99.5 % usando un HPLC-DAD Agilent, columna Rp - 18 de 10 cm, una fase móvil de acetonitrilo: agua (60:40), un flujo de 2 mL/min a 205 nm y a una temperatura de 20 °C^{30,37}.

Se validara un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de clorpirifos y profenofos usando estándares de referencias. Siendo los parámetros a evaluar serán:

Extracción de clorpirifos y profenofos de suelos contaminados

Para la extracción de clorpirifos y profenofos de suelos se preparó un sistema de extracción (Figura 10) usando una jeringa de 20 mL en la cual se acondiciono con 2 capas de papel filtro y 2 g de sulfato de sodio anhidro, luego se adicionaron 5 g de muestra homogenizada la cual se pone en contacto con 5 mL de acetonitrilo grado HPLC, una vez asegurado el sistema de extracción se llevó a un sonicador por 15 minutos, se filtró al vacío (Figura 11), se volvió a extraer con otros 5 mL y se lavó la jeringa con 2 mL de acetonitrilo adicionales. Esta solución se filtró usando un Anotop de 45 µm y se procedió a leer por HPLC.^{4,16}

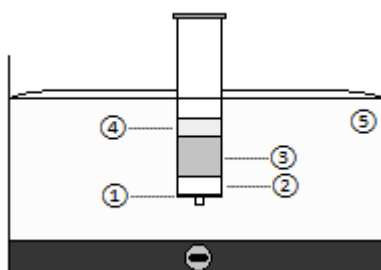


Figura 10. Sistema de extracción (1) papel filtro; (2) sulfato de sodio anhidro; (3) muestra; (4) acetonitrilo grado HPLC; (5) Ultrasonido.

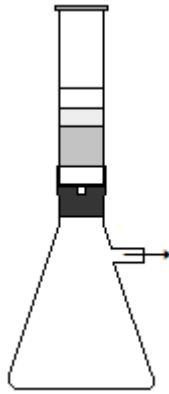


Figura 11. Sistema de filtración al vacío

Validación del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de clorpirifos y profenofos.

Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido ³⁷.

Preparación de la curva de calibración

En 6 fioles de 5 mL clase A se prepararon soluciones de clorpirifos y profenofos a concentraciones de (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0) mg/L en acetonitrilo grado HPLC a partir de una solución de 1000 mg/L preparada a partir de estándares primarios ³⁷.

Análisis Estadístico

El parámetro de linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del pesticida y su respuesta. También se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar usando la ecuación de la recta $y = a + bx$ ³⁷.

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i la concentración e Y_i , el valor medido en el ensayo i , Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de la regresión en un intervalo de confianza dado ($p = 0,05$) ³⁷..

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

Dónde:

El valor r igual a la unidad indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X e Y . según la USP el coeficiente de correlación lineal r^2 debe ser mayor o igual a 0.995.

PRECISIÓN

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea. La Precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetitividad del método analítico, bajo condiciones operativas normales ³⁷.

Es la dispersión de la medida alrededor de un valor medio.

Es una medida de la REPRODUCIBILIDAD del método.

Este ensayo se analiza con el mismo lote utilizado para la repetibilidad.

Análisis estadístico

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medido o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea³⁷.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , este por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{X} es el estimado de la medida de la población μ calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida). La precisión de un método deberá estudiarse sobre:

EXACTITUD

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse a lo largo de todo un rango³⁷.

Análisis Estadístico

La exactitud o bien podríamos llamarla “Inexactitud”. Debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia, Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

En el análisis de trazas (micro componentes), no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60 y 80 %. Para determinarlo puede utilizarse un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental, que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente $p = 0,05$ ³⁷.

En ese caso el valor t se calcula como:

$$t_{obt} = \frac{[100 - R]\sqrt{n}}{RSD}$$

Siendo R la recuperación porcentual

Si $t_{obt} < t_{tabla}$, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo ³⁷.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de *detección* y de *cuantificación*.

Límite de detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite.

Es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las

pruebas de límite solamente fundamenta que la cantidad del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad ³⁷.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, por ejemplo impurezas en materias primas y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la cantidad menor del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas ³⁷.

Análisis Estadístico

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: b

Se obtiene otra curva de calibración, leyendo cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}

Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco ³⁷.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n medidas individuales como

Límite de Detección:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

SEGUNDA FASE DE ESTUDIO**Evaluación del desempeño de *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana) en la degradación de clorpirifos y profenofos en suelos.****Obtención e identificación**

Para la evaluación del papel que desempeña *Eisenia foetida* en la degradación de pesticidas organofosforados se procedió con la obtención de lombrices de viveros de la ciudad de Arequipa, por otro lado fueron identificadas en el área de Zoología de la escuela de biología de la Universidad Nacional de San Agustín.

Preservación de los organismos

Eisenia foetida es un anélido que es utilizado para la evaluación eco toxicológica de sustancias en el suelo por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) y la Organización Internacional de Normalización (ISO). Las Lombrices fueron cultivadas en el Laboratorio de Investigación “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica de Santa María en suelos artificiales enriquecidos con materia orgánica y humedad ajustada a aproximadamente 40 % con la adición de agua destilada

35

Preparación de suelos de estudio

Los ensayos de degradación fueron desarrollados usando la metodología de estudios de toxicidad presentes en el test en suelos establecido por Organización para la

Cooperación Económica y Desarrollo (OECD). Los suelos fueron contaminados con clorpirifos y profenofos a una concentración entre 40 y 50 mg/L respectivamente, disolviendo cada organofosforado en 5 mL de éter de petróleo para luego dispersarlo homogéneamente en 150 g de arena, una vez evaporado el éter se procede a mezclar vigorosamente con 100 g tierra pómex ajustando la humedad al 40 % ³⁵..

Se evaluaron 2 grupos de estudio siendo el grupo 1 las muestras contaminadas con clorpirifos y grupo 2 con profenofos, por otro lado se usó un diseño factorial 2² para evaluar 4 subgrupos nombrándolos como A, B, C, D siendo A (suelo + 20 lombrices); B (suelo autoclavado + 20 lombrices); C (suelo); y D (suelo autoclavado). Se tomaron muestras cada 7 días por un mes y se determinaron las concentraciones de los organofosforados por HPLC ³⁵. El diseño factorial se puede observar a continuación

Variables		Flora Bacteriana	Lombrices
SUBGRUPOS	A	si	si
	B	no	si
	C	si	no
	D	no	no

En la Figura 12 se muestra el diagrama de experimentación general que se aplicó en el desarrollo del presente proyecto

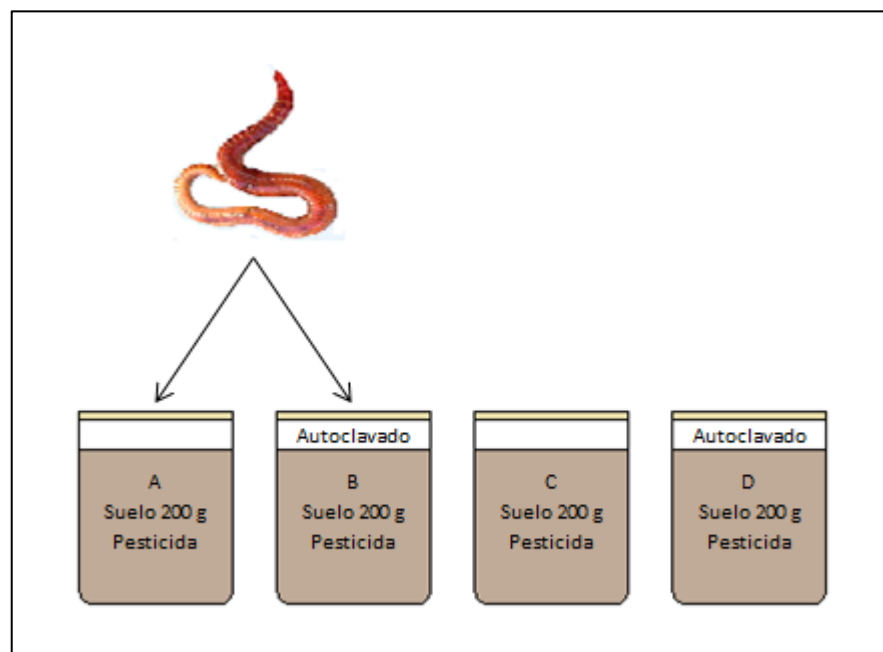


Figura 12. Diagrama de experimentación

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Elección de la longitud de onda

Para el desarrollo del presente proyecto fue necesario establecer una longitud de onda que involucre a ambos pesticidas, por lo cual se evaluaron soluciones de 3 mg/L de profenofos y clorpirifos en acetonitrilo grado HPLC preparadas a partir de estándares primarios con purezas mayores a 99.5 % obtenidos de Sigma Aldrich. Un volumen de 20 μ L de estas soluciones fueron analizados por HPLC-DAD a longitudes de onda entre 190 y 300 nm usando una columna Rp 18, una fase móvil de 60 % de acetonitrilo grado HPLC y 40 % de agua ultra pura a un flujo de 2 mL/min³⁷.

En la Figura 13 se observa el espectro de absorción correspondiente a profenofos en el cual se muestra un pico de absorción máximo a 205 nm, por otro lado en la Figura 14 se observa el espectro de absorción de clorpirifos que presenta 3 picos de absorción a 205, 230 y 290 nm siendo el primero el que representa el pico más alto. Por lo cual se optó por trabajar a una longitud de onda de 205 nm ya que ambos pesticidas presentan mayor sensibilidad a esta longitud onda.

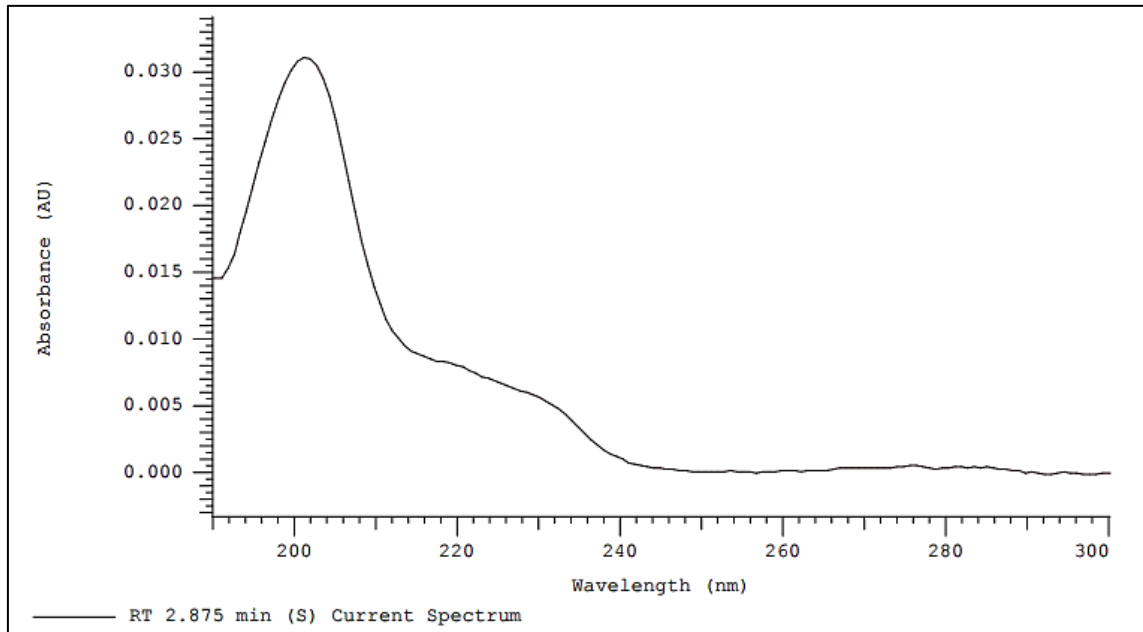


Figura 13. Espectro de absorción de profenofos (3.0 mg/L) por HPLC-DAD a longitudes de onda de 190 a 300 nm.

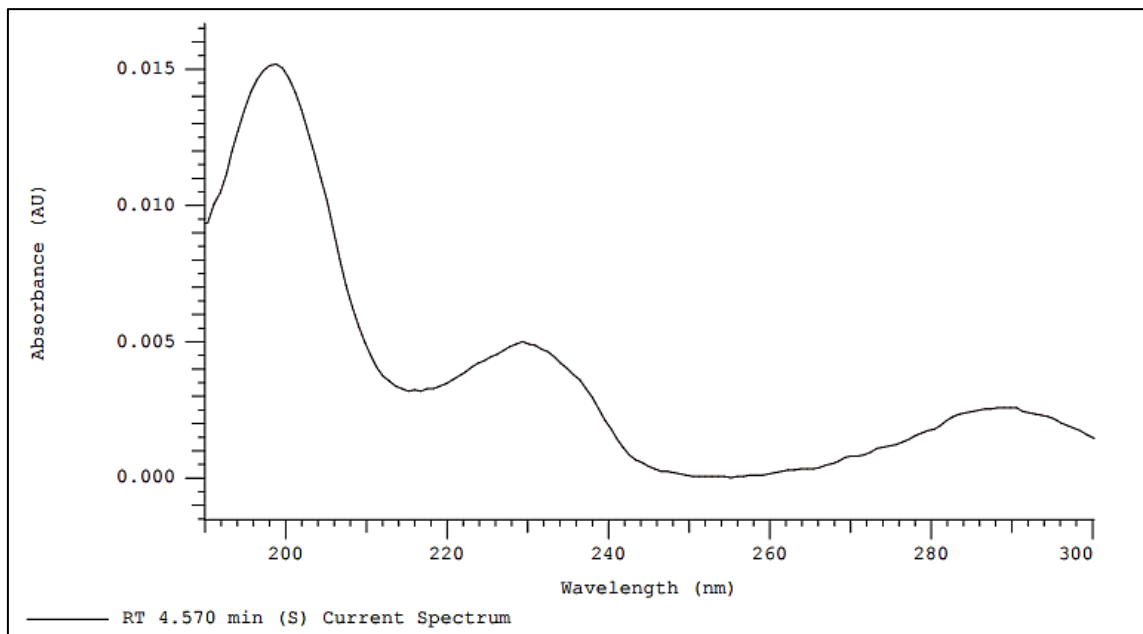


Figura 14. Espectro de absorción de clorpirifos (3.0 mg/L) por HPLC-DAD a longitudes de onda de 190 a 300 nm.

2. Identificación de los tiempos de retención de profenofos y clorpirifos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Una vez escogida la longitud de onda de trabajo (205 nm) se procedió a reconocer los tiempos de retención de los estándares de profenofos y clorpirifos de concentración de 3 mg/L siendo el volumen de inyección 20 μ L, usando una columna Rp 18, temperatura de 20 $^{\circ}$ C, una fase móvil de 60 % de acetonitrilo y 40 % de agua ultra pura a un flujo de 2 mL/min. En la Figura 15 se observa el cromatograma correspondiente a profenofos y clorpirifos siendo los tiempos de retención de 2.9 y 4.6 min respectivamente dando como resultado picos gaussianos ³⁷.

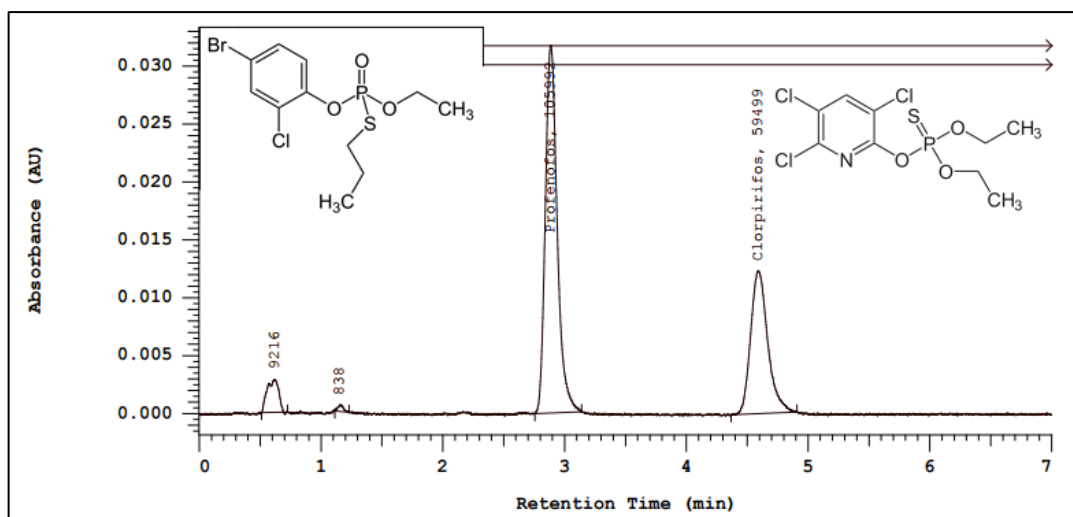


Figura 15. Cromatograma a 205 nm correspondiente a profenofos y clorpirifos con tiempos de retención de 2.9 y 4.6 minutos respectivamente.

3. Extracción de profenofos y clorpirifos de suelos artificiales.

Los suelos fueron contaminados con profenofos y clorpirifos disolviendo una cantidad determinada de cada organofosforado en 5 mL de éter de petróleo que fue dispersado en 120 g de arena fina lavada. Una vez evaporado el éter se mezcló homogéneamente con 80 g de tierra pómex logrando preparar los suelos artificiales con una humedad ajustada al 40 % enriquecida con cascaras de plátano ³⁷.

Se lograron extraer ambos pesticidas organofosforados de los suelos artificiales tomando una muestra de 5 g usando como solvente acetonitrilo en presencia de 2 g de

sulfato de sodio anhidro sometiendo el sistema a ultrasonido por 15 minutos (Figura 16), una vez terminado el procedimiento se extrajeron las soluciones al vacío (Figura 17). El procedimiento anterior se realizó por duplicado ⁴.

Una vez extraídos los pesticidas fueron filtrados usando filtros Anotop de 45 μm de diámetro de poro, luego 20 μL de esta solución fueron analizados por HPLC (Figura 19) a las condiciones cromatográficas ya establecidas ^{4,16}.

Al final del proceso detallado anteriormente se consiguió identificar picos simétricos a los mismos tiempos de retención que los estándares primarios (Figura 18).

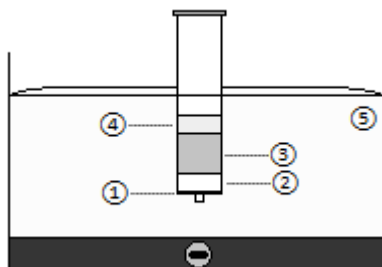


Figura 16. Sistema de extracción (1) papel filtro; (2) sulfato de sodio anhidro; (3) muestra; (4) acetonitrilo grado HPLC; (5) Ultrasonido.

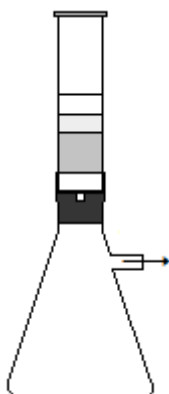


Figura 17. Sistema de filtración al vacío

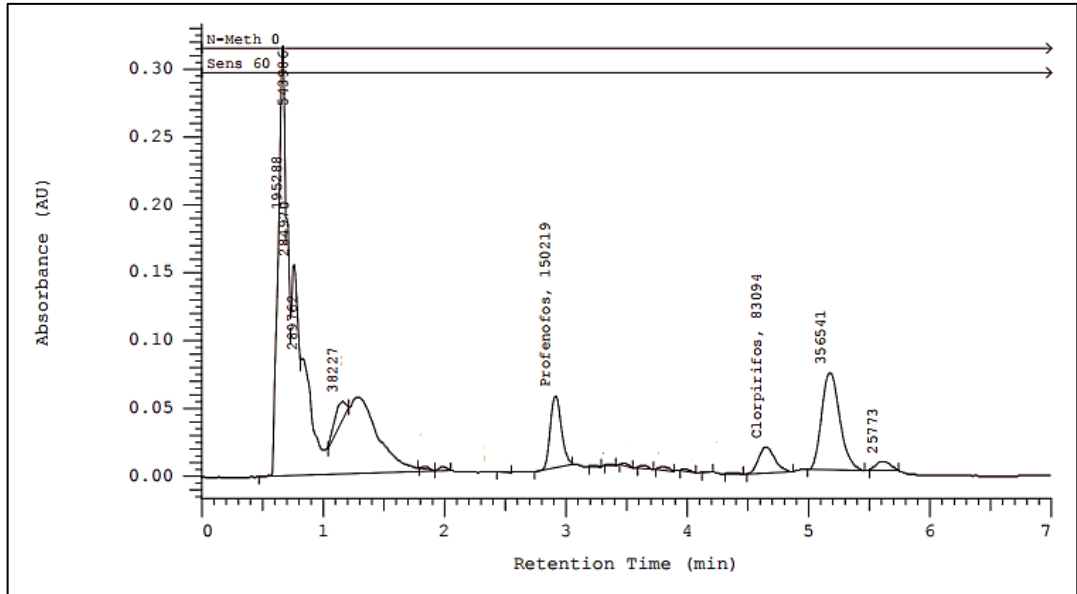


Figura 18. Cromatograma a 205 nm correspondiente a profenofos y clorpirifos en la muestra de suelo artificial con tiempos de retención de 2.9 y 4.6 minutos respectivamente.



Figura 19. Proceso de extracción y determinación por HPLC

4. Validación del método para la determinación de profenofos y clorpirifos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en suelos artificiales.

Linealidad

Para evaluar el parámetro de linealidad se prepararon soluciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/L de profenofos y clorpirifos a partir de estándares primarios Sigma a las condiciones cromatográficas ya establecidas. En las Tablas 1 y 2 se muestran las áreas promedio correspondientes a profenofos y clorpirifos respectivamente. Por otro lado el método presenta una correlación lineal entre la concentración versus respuesta, ya que en la Figura 20 se observa un coeficiente de correlación r^2 de 0.9994 para profenofos y 0.9996 para clorpirifos. Estos valores son mayores a 0.995 siendo este el valor mínimo para considerar a un método como lineal según la USP^{4, 37, 47}.

Las ecuaciones lineales fueron las siguientes: $y = bx + a$

– Para profenofos

–

$$y = 35281x + 512.05 \dots\dots \text{ecuación 1}$$

– Para clorpirifos

–

$$y = 20721x - 1781.1 \dots\dots \text{ecuación 2}$$

Tabla 1. Áreas correspondientes al análisis de profenofos por HPLC

Concentración (mg/L)	Área I	Área II	Área III	Promedio	s	CV %
0.5	18828.5	17157.5	17993.0	17993.0	835.5	4.6
1.0	36951.0	35045.0	35998.0	35998.0	953.0	2.6
1.5	55481.5	52712.0	54096.8	54096.8	1384.8	2.6
2.0	70454.0	68756.0	69605.0	69605.0	849.0	1.2
2.5	89474.0	89794.5	89634.3	89634.3	160.3	0.2
3.0	106804.0	105579.5	106191.8	106191.8	612.3	0.6

Tabla 2. Áreas correspondientes al análisis de clorpirifos por HPLC

Concentración (mg/L)	Área I	Área II	Área III	Promedio	s	CV %
0.5	9461.5	9178.0	8702.0	9113.8	383.8	4.2
1.0	18755.0	18631.5	17952.0	18446.2	432.4	2.3
1.5	29537.5	28703.5	29246.0	29162.3	423.2	1.5
2.0	39562.5	38806.0	39858.0	39408.8	542.6	1.4
2.5	50485.5	50295.0	49968.5	50249.7	261.5	0.5
3.0	60060.5	59767.0	61695.0	60507.5	1038.8	1.7

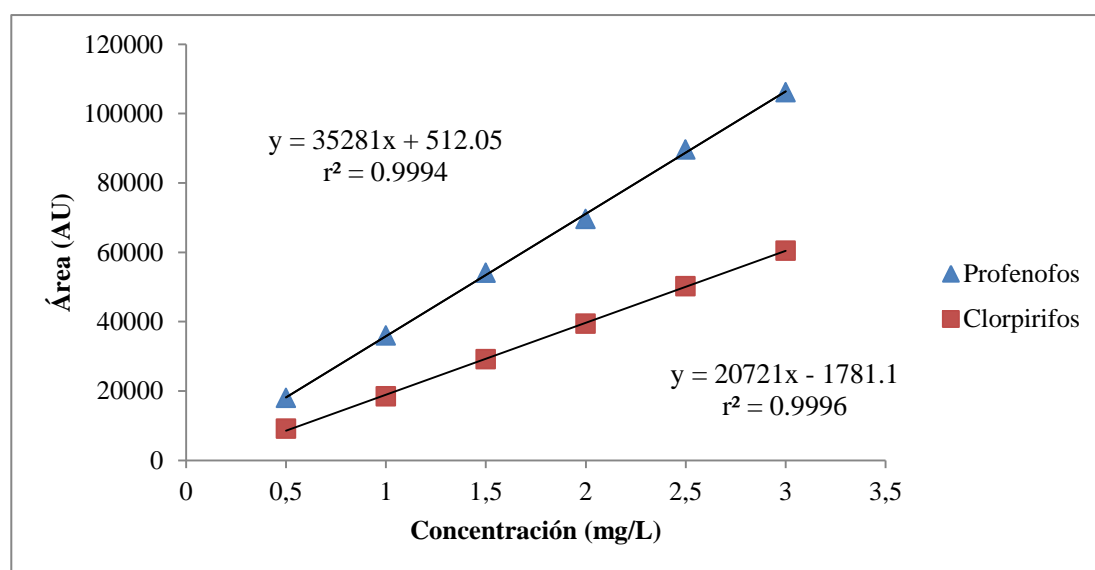


Figura 20. Gráfico de calibración de profenofos ($r^2=0.9994$) y clorpirifos ($r^2=0.9996$).

Límites de detección y cuantificación

Con los datos obtenidos en el desarrollo del parámetro de linealidad se calculó el límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) usando las siguientes formulas ³⁷.

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Los valores de Y_{bl} son los interceptos de las ecuaciones 1 y 2, siendo los valores de 512.05 y 1781.1 para clorpirifos y profenofos respectivamente, por otro lado los valores de S_{bl} fueron obtenidos de las ecuaciones de la recta graficando la concentración versus

desviación estándar de los datos de las Tablas 1 y 2 correspondientes a profenofos y clorpirifos respectivamente. Los resultados se muestran a continuación.

a. Concentración de profenofos vs desviación estándar de la Tabla 1.

$$y = -230.3x + 1202.2 \dots\dots \textit{ecuación 3}$$

Donde el valor del intercepto es 1202.2 que es igual a Sbl.

b. Concentración de clorpirifos vs desviación estándar de la Tabla 2.

$$y = 164.67x + 225.55 \dots\dots \textit{ecuación 4}$$

Donde el valor del intercepto es 225.55 que es igual a Sbl.

El valor de b es la pendiente de las ecuaciones 1 y 2 para (n=6) datos.

Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) para profenofos fueron de 0.1450 y 0.0477 mg/L respectivamente. Por otro lado los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) para clorpirifos y profenofos fueron de 0.0795 y 0.0484 mg/L respectivamente.

Precisión

Se evaluó el parámetro de precisión hallando el coeficiente de variación porcentual (CV %) o desviación estándar relativa (DSR) para lo cual se prepararon muestras de aproximadamente 1.5 mg/L de profenofos y 2.5 mg/L de clorpirifos. Dichas muestras fueron analizadas por HPLC y las áreas obtenidas se muestran en la Tabla 3 ³⁷.

Según la USP para que un método sea considerado preciso es necesario que el coeficiente de variación porcentual este por debajo de 2.7 %, en el presente proyecto se obtuvieron coeficientes de variación porcentual de 2.45 y 2.25 % para clorpirifos y profenofos respectivamente siendo este superior a los estipulado por dicha norma por lo cual se considera que el método es preciso ³⁷.

Tabla 3. Áreas correspondientes a clorpirifos y profenofos.

Número	Área	
	Profenofos	Clorpirifos
1	55533	49574
2	53080	50287
3	55482	53061
4	52712	50486
5	54097	50295
6	53404	49969
Promedio	54051.3	50611.8
Desviación Estándar	1216.4	1241.9
CV %	2.25	2.45

Exactitud

Se determinó la exactitud por el método del porcentaje de recuperación enriqueciendo a las muestras con una cantidad conocida de estándar (2.5 mg/L de cada organofosforado)^{39, 49}.

Se obtuvieron porcentajes de recuperación 90.48 % y 98.98 % para clorpirifos y profenofos respectivamente, interpretando el resultado como un método exacto al obtenerse resultados dentro del rango que establecido por la USP (porcentaje de recuperación entre 90 y 110 %) ³⁷.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación para clorpirifos y profenofos.

Nombre	Muestra (A)		Estándar (B)		Muestra + Estándar (C)		Recuperación	
	Área	(mg/L)	Área	(mg/L)	Área	(mg/L)	(C-A)/B	%
Clorpirifos	37399	1.89	50486	2.52	81331	4.01	0.84	90.48
	34105	1.73	50295	2.51	81331	4.01	0.91	
	31284	1.60	49969	2.50	81331	4.01	0.97	
Profenofos	72673	2.05	89474	2.52	157066	4.44	0.95	98.98
	67145	1.89	89795	2.53	157066	4.44	1.01	
	67255	1.89	89634	2.53	157066	4.44	1.01	

Watanabe⁴⁷ en su investigación propuso reducir el consumo de disolventes orgánicos peligrosos durante los procedimientos de extracción residuos de plaguicidas agrícolas, a partir de muestras antes de la determinación por HPLC DAD, dicho método consistía en usar la cantidad más pequeña posible de muestra que fue de 5.0 g utilizando 10 mL acetonitrilo: agua (1:1, v/v). Los efectos de la matriz de las muestras analizadas en el método fueron en general despreciablemente pequeños. Las recuperaciones medias

estaban en el rango desde 70 hasta 120 % para todos los plaguicidas con el coeficiente de los valores de variación inferiores al 20 % ⁴⁷.

En el presente proyecto se adaptó el método y se tomó como cantidad de muestra 5.0 g de suelo en acetonitrilo grado HPLC asistida por un baño de ultrasonido por 15 minutos logrando extraer e identificar los picos de los pesticidas ⁴. El efecto matriz también fue despreciable, además se lograron porcentajes de recuperación entre 90.48 y 98.98 % para clorpirifos y profenofos respectivamente, coeficientes de variación menores al 3% a diferencia de la investigación de Watanabe que logro valores de % CV entre 1 y 20 % esto puede que se deba a la cantidad de estándares usados (28 pesticidas) en su investigación y la concentración de los mismos, ya que usa concentraciones menores a 1 mg/Kg. A continuación en la Tabla 5 se muestran los resultados en resumen de los parámetros desarrollados en el proceso de validación del método.

Tabla 5. Parámetros de validación del método.

	r^2	DSR %	LD (mg/Kg)	LC (mg/Kg)	% de Recuperación.
Clorpirifos	0.9996	2.25	0.0484	0.0795	90.48
Profenofos	0.9994	2.45	0.0477	0.1450	98.98

5. Evaluación del desempeño de *Eisenia foetida* en la degradación de profenofos y clorpirifos en suelos artificiales

Para evaluar el desempeño de *Eisenia foetida* (Figura 9) se aclimataron a las lombrices por 7 días en el suelo artificial en ausencia de luz, además el sustrato orgánico (cascaras de plátano) disperso homogéneamente en el suelo, demostró ser suficiente para garantizar la dispersión de las lombrices por el medio (Figura 10) ³⁵.

Para el desarrollo del presente proyecto es necesario conocer información sobre la toxicidad aguda (LC_{50}) de ambos pesticidas por lo cual se tomó como referencia la investigación realizada por Chen *et. al.* (2014) donde se evaluó la LC_{50} y los parámetros correspondientes para la toxicidad aguda en *Eisenia foetida* con la prueba de suelo artificial (7 y 14 días) método especificado por la OECD. Chen encontró que clorpirifos presentaba valores de LC_{50} de 421,3 y 384,9 mg/Kg a los 7 y 14 días respectivamente ⁷.

Chakra⁵ estudio la toxicidad aguda, alteraciones morfológicas y efectos histológicos de profenofos en *Eisenia foetida*, encontrando valores LC₅₀ a las 24 y 48 horas de 290.2 y 225.9 mg/L respectivamente para profenofos. Estos estudios favorecieron en gran medida al presente proyecto para determinar las concentraciones de estudio teniendo en cuenta que Chen y Chakra reportan que clorpirifos presenta una mayor toxicidad aguda con respecto a profenofos⁵.

En la presente se desarrolló un diseño factorial 2² siendo los factores a evaluar, las lombrices (20 individuos, Figura 21) y las bacterias nativas del suelo, por lo cual se siguieron los lineamientos establecidos por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) contaminando ocho suelos de 250 g, con aproximadamente 40 y 50 mg/Kg de clorpirifos y profenofos respectivamente. Se dividieron en dos grupos de estudio siendo el grupo 1 las muestras contaminadas con clorpirifos y grupo 2 con profenofos³⁵.

Tabla 6. Diseño factorial 2²: factores: Bacterias Nativas y lombrices (*Eisenia foetida*) y subgrupos de estudio A, B, C, D.

	VARIABLES	BACTERIAS NATIVAS	LOMBRICES
Subgrupos	A	si	si
	B	no	si
	C	si	no
	D (Blanco)	no	no

Como se observa en la Tabla 6 en cada grupo se evaluaron 4 subgrupos nombrándolos como A, B, C y D siendo los aspectos a evaluar en cada uno de ellos los siguientes; en “A” la actividad de *Eisenia foetida* junto a bacterias nativas del suelo; en “B” el desempeño de *Eisenia foetida*; en “C” la actividad bacteriana; y en D no interfieren factores por lo que representó el blanco (ver Figura 22).

Se tomaron muestras cada 7 días durante 28 días y se determinaron las concentraciones de los organofosforados por HPLC bajo las condiciones de extracción y determinación ya establecidas.



Figura 21. *Eisenia foetida* “lombriz roja californiana”



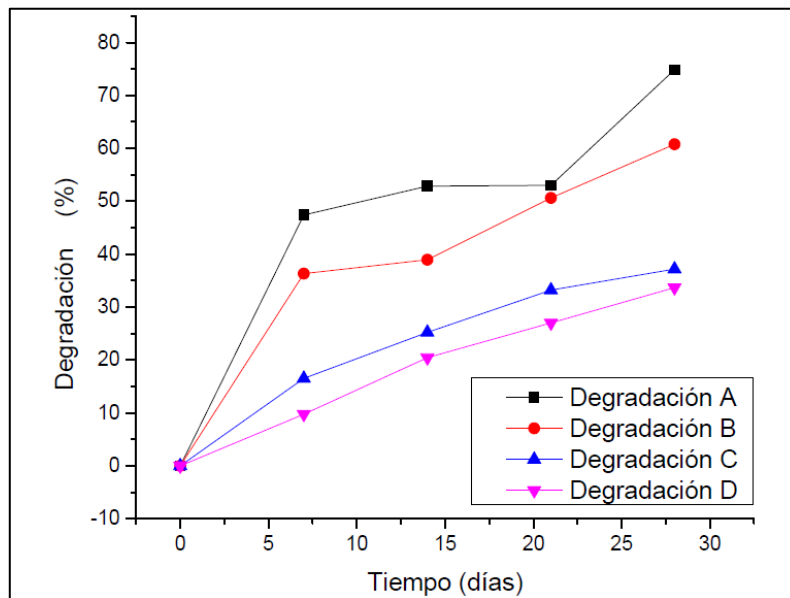
Figura 22. Contenedores de suelo artificial con pesticidas protegidos de la luz.

En las Figuras 23 y 24 se puede observar que al final del tratamiento en los subgrupos A, donde interaccionaron tanto lombrices como bacterias se lograron disminuir los niveles de clorpirifos y profenofos en un 74.85 y 75.64 % respectivamente. Por otro lado en los subgrupos B, que contenían presencia únicamente lombrices con suelo autoclavado, se determinaron porcentajes de degradación de 60.76 % para clorpirifos y 72.58 % para profenofos. En los subgrupos C que contenían solo bacterias nativas se determinaron porcentajes de degradación de 32.18 y 63.52 % para clorpirifos y profenofos respectivamente. Además en los subgrupos D (Blanco) que solo contenían suelo autoclavado contaminado con ambos pesticidas organofosforados se determinaron porcentajes de degradación de 33.68 % para clorpirifos y 52.63 % para profenofos (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Degradación porcentual de clorpirifos hasta el día 28

Tiempo	Degradación			
	A	B	C	D
Días	%	%	%	%
0	0	0	0	0
7	47.41	36.32	16.53	9.74
14	52.84	38.94	25.21	20.43
21	53.01	50.61	33.20	27.01
28	74.85	60.76	37.18	33.68

A continuación se muestra el gráfico de la degradación porcentual de clorpirifos correspondiente a los datos expuestos en la Tabla 7

**Figura 23.** Degradación de clorpirifos en los subgrupos A, B, C y D hasta el día 28**Tabla 8.** Degradación porcentual de profenofos hasta el día 28

Tiempo	GRUPO			
	A	B	C	D
Días	%	%	%	%
0	0	0	0	0
7	42.41	20.33	20.19	14.15
14	50.70	33.23	37.04	30.68
21	64.73	62.50	52.09	38.40
28	75.64	72.58	63.52	52.63

A continuación se muestra el gráfico de la degradación porcentual de profenofos correspondiente a los datos expuestos en la Tabla 8

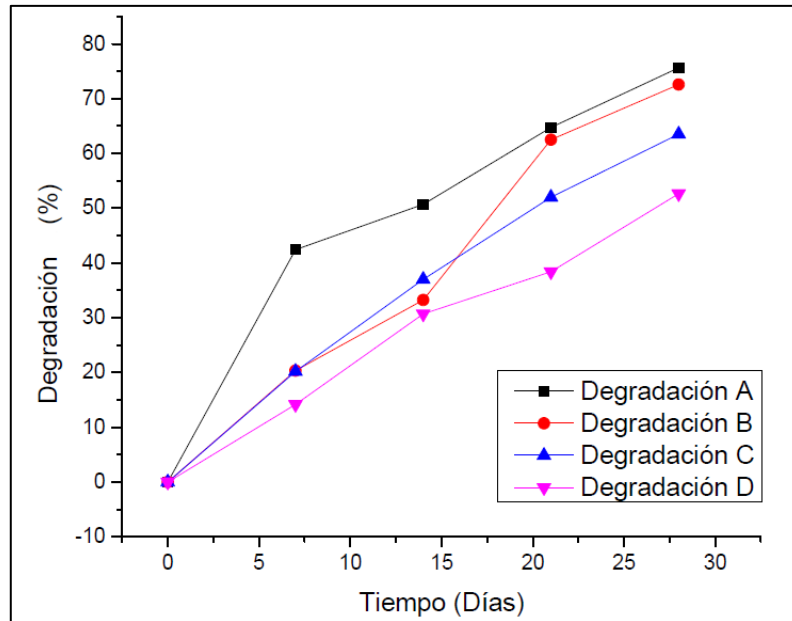


Figura 24. Degradación de clorpirifos en los subgrupos A, B, C y D hasta el día 28

Se observó que en todos los subgrupos de tratamiento se produce una mayor degradación de profenofos con respecto a clorpirifos.

Degradación de pesticidas en suelos auto clavados sin lombrices (BLANCO)

La organización mundial de la salud (WHO) reporta que a 25 °C en medios tamponados a los pH 5 y 7 el periodo de degradación de clorpirifos es de aproximadamente 72 días y a pH 9 el tiempo de vida media disminuye drásticamente hasta 16 días, esto debido al proceso de hidrólisis que afecta directamente a los pesticidas organofosforados produciendo la ruptura de la molécula liberándose tiosulfatos. De igual manera se reporta que profenofos tiende a disminuir de manera más drástica en cuanto al aumento de pH en comparación al clorpirifos.

Tay⁴⁴ evaluó la hidrólisis de clorpirifos en medios acuosos tamponados en diferentes condiciones de temperatura y pH, encontrando que la vida media de clorpirifos es relativamente estable en medio ácido. Sin embargo la velocidad de degradación aumentó a medida que el pH se eleva, así como la temperatura también mostró un significativo efecto sobre la tasa de hidrólisis. Tay demostró que a partir de un pH de 7 el proceso de hidrólisis es más agresivo y sigue una cinética de primer orden ⁴⁴.

Por ello si analizamos las Figuras 25 y 26 se observa que en ambos Blancos de cada grupo de investigación los niveles de clorpirifos y profenofos disminuyen su concentración hasta lograr un porcentaje de degradación 33.68 y 52.63 % respectivamente esto podría deberse a procesos de hidrólisis ya que el pH del suelo se reportó como 7.051 durante el tratamiento.

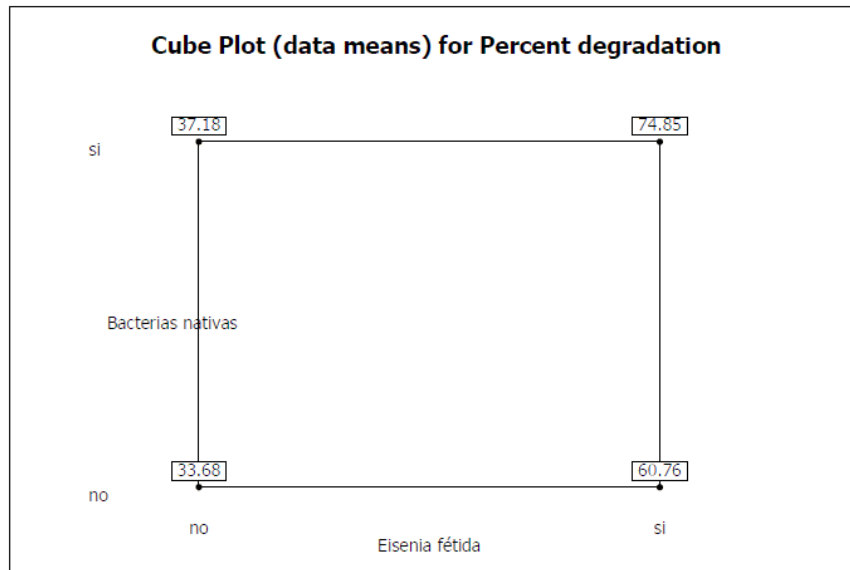


Figura 25. Gráfico de cubo para el porcentaje de degradación para clorpirifos

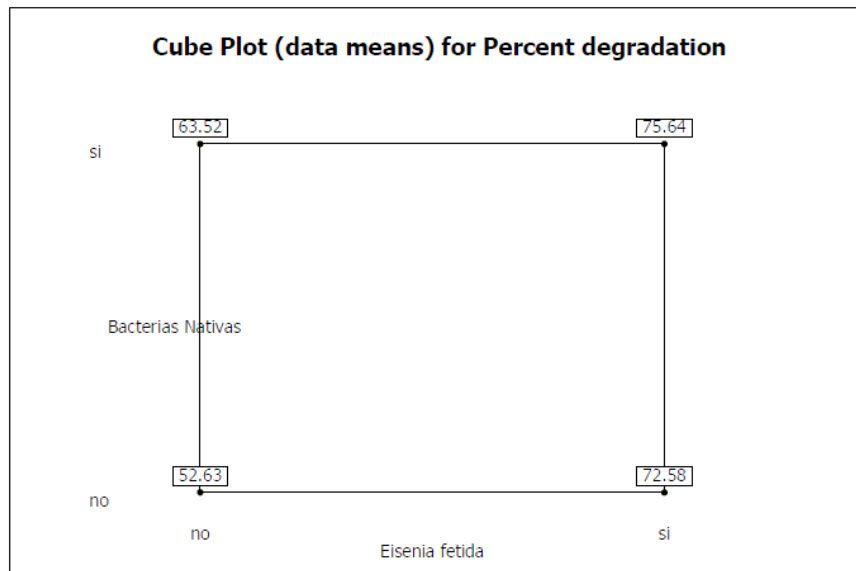


Figura 26. Gráfico de cubo para el porcentaje de degradación para profenofos.

Degradación asistida por bacterias nativas

En los subgrupos C de ambos pesticidas organofosforados donde estaban presentes las bacterias nativas del suelo, presentaron degradación.

Swapnil⁴³ evaluó la degradación de un consorcio bacteriano *Exiguobacterium* sp BCH4 y *Rhodococcus* sp. BCH2 para la degradación de acefato logrando degradar 75.85 % en 6 días siendo la concentración inicial 50 mg/L ⁴³.

En el presente proyecto se obtuvo una degradación de clorpirifos y profenofos de 37.18 y 63.52 % respectivamente (Fig. 25 y 26), esto podría deberse directamente a la actividad bacteriana del suelo, demostrando así una buena actividad ya que el suelo estuvo exento de nutrientes que favorezcan el crecimiento bacteriano, a diferencia de Swapnil que si empleo dichas condiciones en su investigación, sin embargo no se puede concluir esto debido a que se ha demostrado que los procesos de hidrólisis juegan un papel importante por lo cual el porcentaje hallado no necesariamente puede deberse a la actividad de bacterias sino a otros tipos de microorganismos o el tiempo de vida media de los pesticidas ⁴³.

Desempeño de *Eisenia foetida* en la degradación de profenofos y clorpirifos

En las Figuras 25 y 26 se observa que *Eisenia foetida* disminuyó en 60.76 % y 72.58 % los niveles clorpirifos y profenofos respectivamente, esta actividad podría deberse a que estos anélidos procesan la tierra para la obtención de humus involucrando la alcalinización de la tierra en su tracto digestivo, logrando incrementar los procesos de hidrólisis ³⁶.

Corso¹¹ en su investigación sobre Estudio cinético de la degradación fotocatalítica oxidativa de rodamina B con ZnO y luz solar hace uso de las derivadas de su cinética de degradación para expresar la degradación de Rodamina B en unidades de velocidad.

Degradación de clorpirifos

En la Figura 27 se puede observar que el subgrupo B que solo contenía lombrices en ausencia de microorganismos propios del suelo, clorpirifos presentó una degradación desde 43.41 mg/L hasta 17.03 mg/L a los 28 días del tratamiento.

El modelo matemático que describe la Figura 15 fue un modelo polinomial de cuarto orden en cual se muestra a continuación.

$$y = [Cp](t) = a_0 - a_1t + a_2t^2 - a_3t^3 + a_4t^4$$

Dónde:

[Cp]: Concentración en mg/L de Clorpirifos.

t: tiempo (días) .

[Cp](t): Concentración de clorpirifos en función del tiempo.

a_0 : Intercepto con el eje "y".

a_1, a_2, a_3 y a_4 : Pendientes.

$$[Cp](t) = 43.205 - 5.0056t + 0.5548t^2 - 0.0259t^3 + 0.0004t^4$$

A continuación se observa el gráfico que corresponde a la ecuación anterior

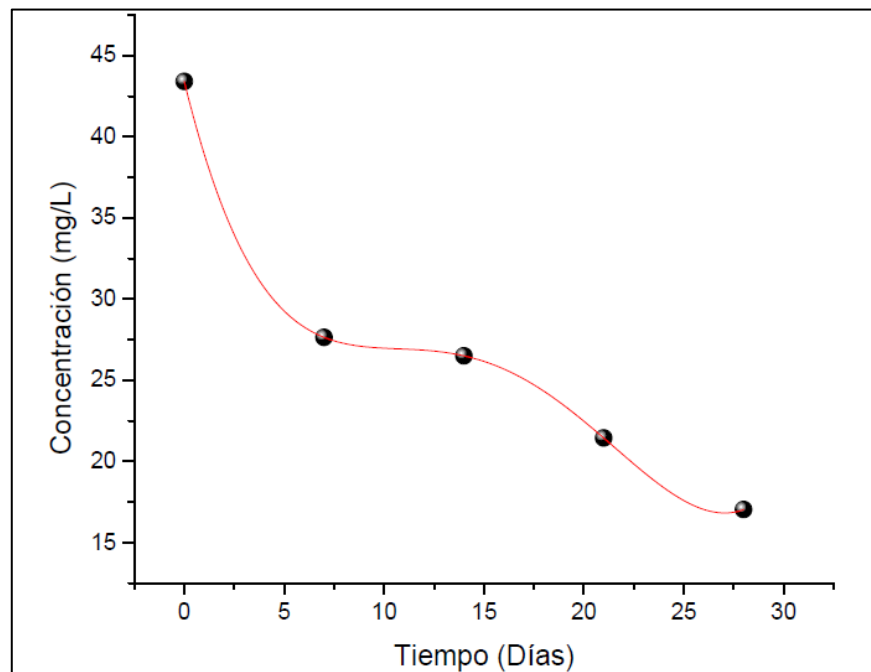


Figura 27. Degradación de la concentración de clorpirifos en función del tiempo.

Pero es necesario aclarar que el modelo matemático es solo válido hasta el día 28. Por otro lado para evaluar la velocidad de degradación “ $\vec{v}(t)$ ” de clorpirifos en presencia de *Eisenia foetida* se expresó dicho modelo en su primera derivada y los resultados se muestran a continuación:

$$v(t) = \frac{d([Cp](t))}{dt} = \frac{d(43.205 - 5.0056t + 0.5548t^2 - 0.0259t^3 + 0.0004t^4)}{dt}$$

La ecuación que se muestra a continuación representa a la velocidad (concentración/días) con la que clorpirifos se degrada en función del tiempo.

$$\vec{v}(t) = -5.0056 + 1.1096t - 0.0777t^2 + 0.0016t^3$$

El gráfico correspondiente a esta ecuación se muestra a continuación en la Figura 28. Esta ecuación polinómica de tercer orden representa a la velocidad de degradación de clorpirifos que no es constante, esto podría deberse al comportamiento de las lombrices durante el periodo de estudio, ya que al inicio del tratamiento los 20 individuos se dispersaron por todo el envase presentando una buena movilidad, esto debido a que las lombrices estaban aclimatadas previamente al medio no contaminado, sin embargo, a partir de la segunda semana empezaban a agruparse y se ubicaban cerca de la superficie. Este comportamiento se mantuvo hasta aproximadamente la tercera semana pudiendo ser el tiempo de aclimatación del anélido al medio contaminado con clorpirifos ya que, a partir de este día su movimiento empezó a incrementarse de nuevo. El comportamiento expuesto anteriormente pudo influir directamente con la velocidad de degradación de clorpirifos (Figura 28).

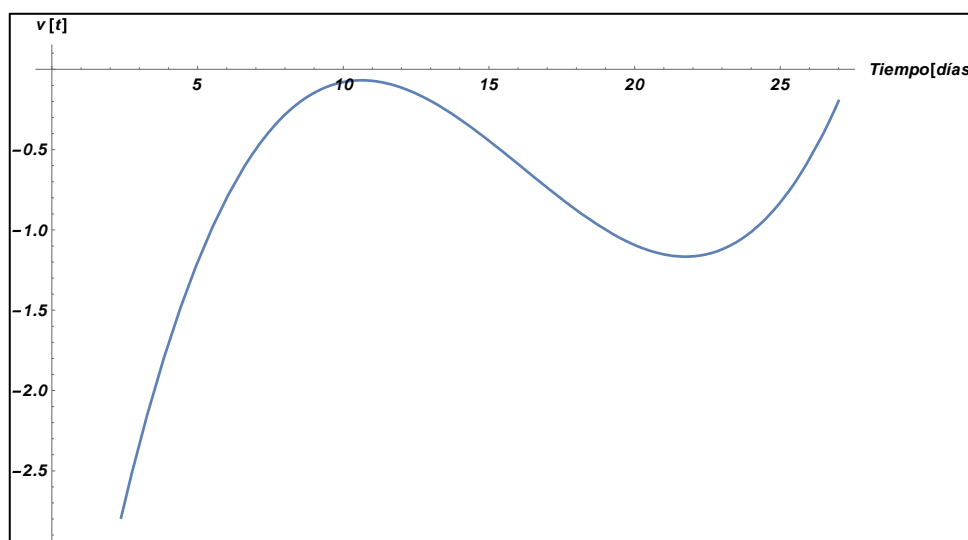


Figura 16. Velocidad de degradación de clorpirifos por *Eisenia foetida*

Como se puede observar en la Figura 16 la velocidad de degradación no es constante si no cambiante en función de los días del tratamiento, para evaluar esto fue necesario usar la aceleración " $\vec{a}(t)$ ", los resultados se muestran a continuación.

$$\vec{a}(t) = \frac{d(\vec{v}(t))}{dt} = \frac{d(-5.0056 + 1.1096t - 0.0777t^2 + 0.0016t^3)}{dt}$$

La ecuación que se muestra a continuación representa a la aceleración (velocidad/días) que evalúa el cambio de la velocidad de degradación de clorpirifos en función del tiempo.

$$\vec{a}(t) = 1.1096 - 0.1554t + 0.0048t^2$$

Esta ecuación cuadrática se esquematiza en la Figura 17 donde se observa que la velocidad del proceso de degradación de clorpirifos disminuye drásticamente hasta aproximadamente el día 29, sin embargo a partir de este día la velocidad de degradación se incrementa, pudiendo deberse a que una vez aclimatadas las lombrices incrementan su movilidad y por lo tanto su actividad, lo cual fue proporcional a la velocidad de degradación de dicho pesticida.

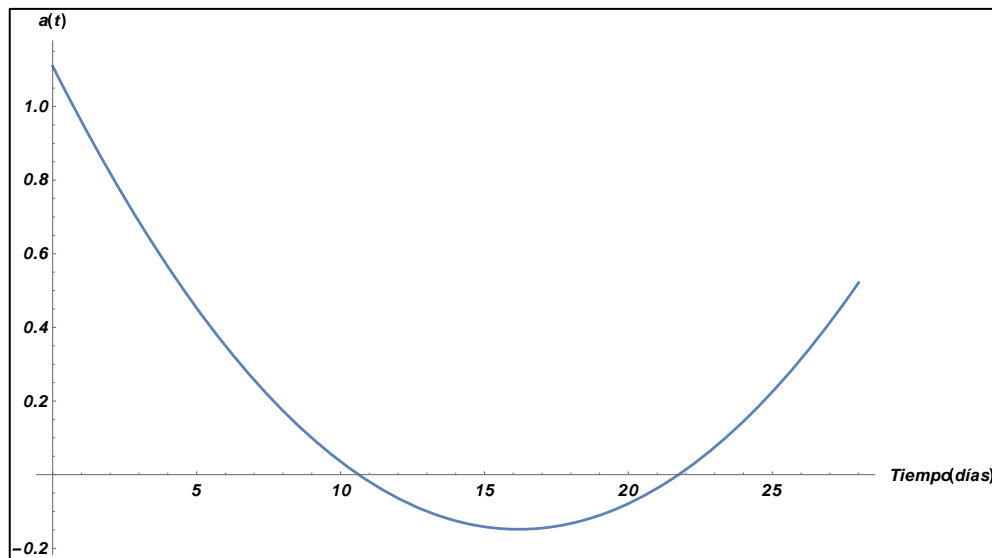


Figura 29. Aceleración de degradación de clorpirifos por *Eisenia foetida*

Degradación de profenofos

En la Figura 30 se observa que el subgrupo B que contenía lombrices en medio previamente autoclavado presento una disminución desde una concentración de 47.62 mg/L hasta 13.06 mg/L de profenofos.

El modelo matemático que describe el proceso se puede observar en la Figura 30 siendo una ecuación polinomial de cuarto orden la cual se muestra a continuación.

$$y = [Pf](t) = a_0 - a_1t + a_2t^2 - a_3t^3 + a_4t^4$$

Dónde:

[Pf]: Concentración en mg/L de Profenofos.

t: tiempo (días) .

[Pf](t): Concentración de profenofos en función del tiempo.

a_0 : Intercepto con el eje "y".

a_1, a_2, a_3 y a_4 : Pendientes.

$$[Pf](t) = 47.616 - 3.1836t + 0.4159t^2 - 0.0261t^3 + 0.0005t^4$$

A continuación se observa el gráfico que corresponde a la ecuación anterior

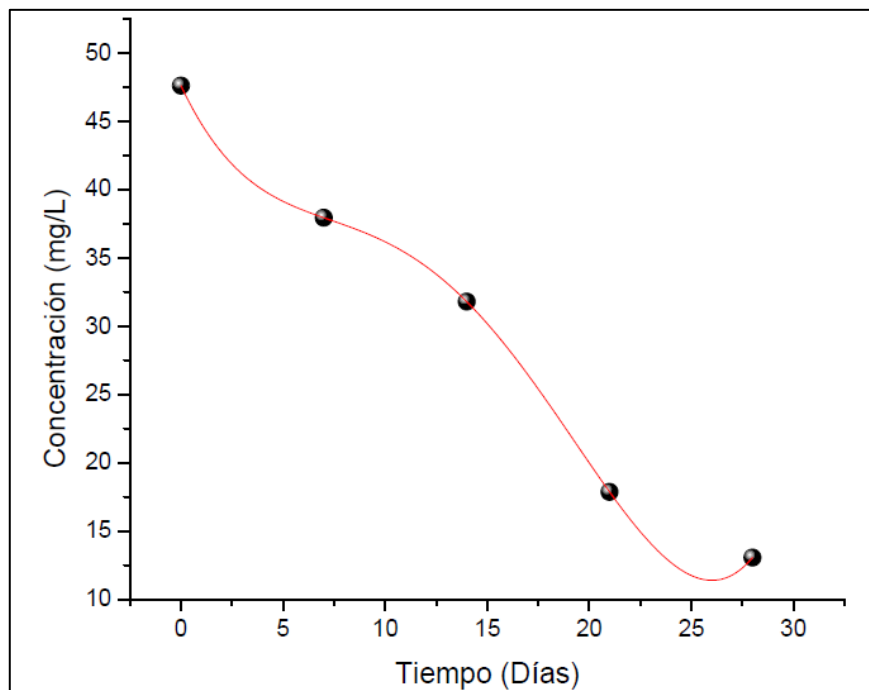


Figura 30. Degradación de la concentración de profenofos en función del tiempo.

Pero es necesario aclarar que el modelo matemático es solo válido hasta el día 25. Por otro lado para evaluar la velocidad de degradación “ $\vec{v}(t)$ ” de profenofos en presencia de *Eisenia foetida* se expresó dicho modelo en su primera derivada y los resultados se muestran a continuación:

$$\vec{v}(t) = \frac{d([Cp](t))}{dt} = \frac{d(47.616 - 3.1836t + 0.4159t^2 - 0.0261t^3 + 0.0005t^4)}{dt}$$

La ecuación que se muestra a continuación representa a la velocidad (concentración/días) con la que profenofos se degrada en función del tiempo.

$$\vec{v}(t) = -3.1836 + 0.8318t - 0.0783t^2 + 0.002t^3$$

En gráfico correspondiente a la ecuación $\vec{v}(t)$ se muestra en la Figura 19. Esta ecuación polinómica de tercer orden representa a la velocidad de degradación de profenofos, se puede observar una velocidad no constante, esto podría deberse al comportamiento de las lombrices durante el periodo de estudio, ya que al inicio del tratamiento los 20 individuos se dispersaron por todo el envase presentando una buena movilidad, esto debido a que las lombrices estaban aclimatadas previamente al medio no contaminado, sin embargo, a partir de la segunda semana empezaban a agruparse y se ubicaban cerca de la superficie. Este comportamiento se mantuvo hasta aproximadamente la tercera semana pudiendo ser el tiempo de aclimatación del anélido al medio contaminado con profenofos ya que, a partir de este día su movimiento empezó a incrementarse de nuevo. El comportamiento expuesto anteriormente pudo influir directamente con la velocidad de degradación de profenofos (Figura 31).

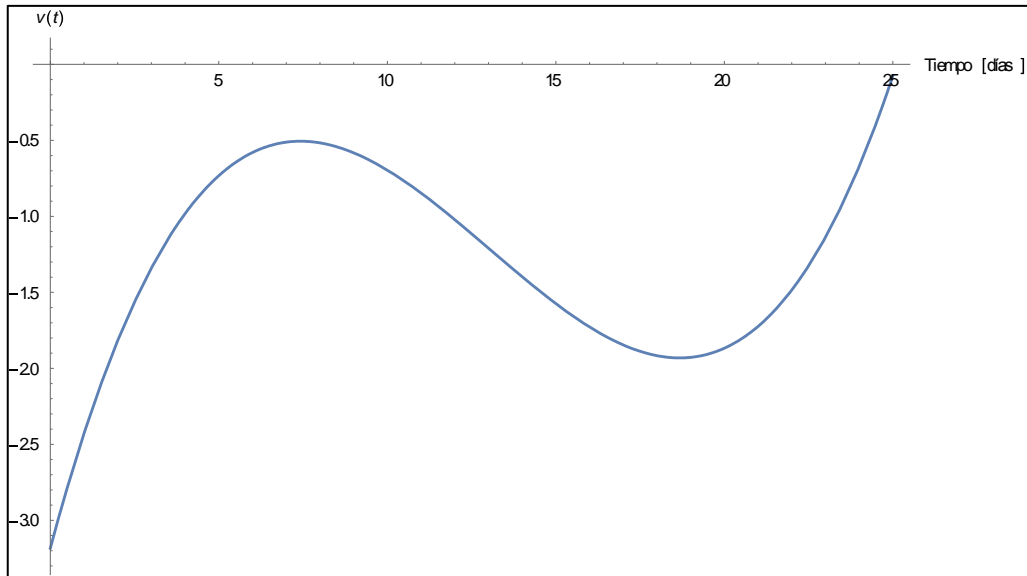


Figura 31. Velocidad de degradación de profenofos por *Eisenia foetida*

Como se puede observar en la Figura 31 la velocidad de degradación no es constante si no cambiante en función de los días del tratamiento, para evaluar esto fue necesario usar la aceleración " $\vec{a}(t)$ ", los resultados se muestran a continuación.

$$\vec{a}(t) = \frac{d(\vec{v}(t))}{dt} = \frac{d(-3.1836 + 0.8318t - 0.0783t^2 + 0.002t^3)}{dt}$$

La ecuación que se muestra a continuación representa a la aceleración (velocidad/días) que evalúa el cambio de la velocidad de degradación de profenofos en función del tiempo.

$$\vec{a}(t) = 0.8318 - 0.1566t + 0.006t^2$$

Esta ecuación cuadrática se esquematiza en la Figura 32 donde se observa que la velocidad del proceso de degradación de clorpirifos disminuye drásticamente hasta aproximadamente el día 16, sin embargo a partir de este día la velocidad de degradación se incrementa, pudiendo deberse a que una vez aclimatadas las lombrices incrementan su movilidad y por lo tanto su actividad, lo cual fue proporcional a la velocidad de degradación de profenofos.

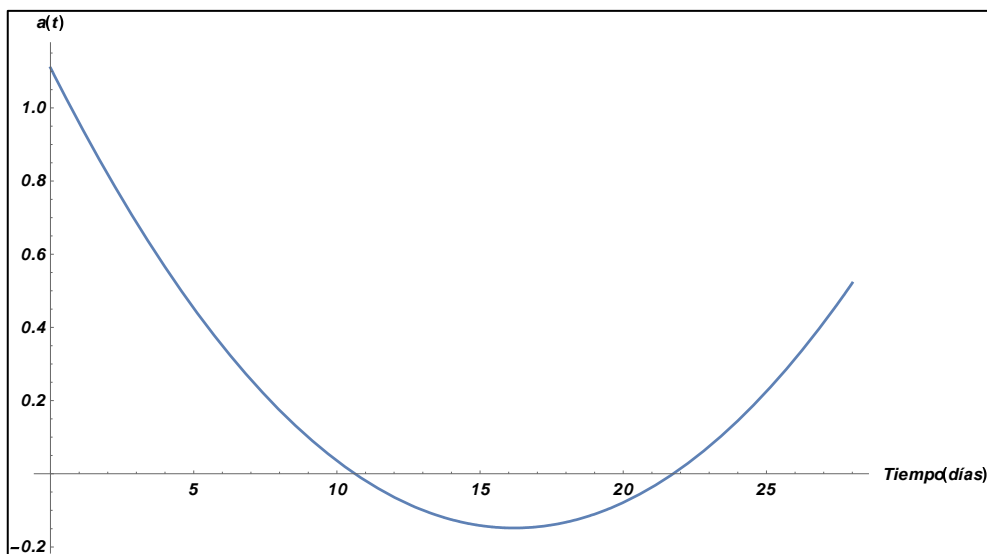


Figura 32. Aceleración de degradación de profenofos por *Eisenia foetida*

Qixing³⁶ evaluó la tasa de degradación natural de metamidofos en comparación con la actividad de *Eisenia fétida* así como la presencia de cobre. Qixing determinó que la vida media de metamidofos en Phaiozem fue reducido a 5,08 días cuando estaban presentes las lombrices, siendo el efecto de desintoxicación asistida por las lombrices *E. fétida*. En el presente proyecto se logró evidenciar que *Eisenia foetida* podría incrementar el proceso de degradación de los pesticidas organofosforados clorpirifos y profenofos³⁶.

Givaudan¹⁸ cuya hipótesis era la aclimatación de las lombrices de tierra a los productos químicos orgánicos (plaguicidas). Por lo cual, la capacidad de adaptación fue evaluada en dos poblaciones de lombrices de tierra (*Aporectodea caliginosa*) que presentaban un tiempo de exposición de 20 años a los contaminantes orgánicos del suelo como epoxiconazol un fungicida usado en todo el mundo. Se observó que la tasa de respiración se incrementó en ambos gusanos expuestos a fungicidas en comparación con los controles, esto puede explicar el por qué las lombrices se ubican cerca de la superficie, por otro lado los recursos de glucógeno se redujeron en la misma proporción en las dos poblaciones, pero con mayor rapidez para expuesta por 7 días que para la población expuesta previamente 28 días¹⁸. La proteína soluble y la mayoría de los contenidos de aminoácidos aumentaron sólo en la población expuesta previamente, lo que sugiere un mecanismo de detoxificación¹⁸.

En el presente proyecto las lombrices fueron obtenidas de viveros de la ciudad de Arequipa en los cuales no se reportó uso de insecticidas, por lo cual las lombrices se aclimataron en el desarrollo del proyecto. Como lo indica Givaudan el periodo para que las lombrices se aclimaten a un medio contaminado con pesticidas es de 7 a 28 días, esto justificaría los resultados obtenidos ya que en las Figuras 28 y 31 se observa que el periodo de aclimatación es aproximadamente de 12 días, en este tiempo aumenta la respiración de los anélidos y los depósitos de glucógeno empiezan a disminuirse por lo cual la lombrices disminuyen su movilidad³⁶.

Desempeño de *Eisenia foetida* en presencia de bacterias nativas del suelo

En las Figuras 25 y 26 se observan que la degradación en los subgrupos A donde estaban presentes tanto lombrices como microorganismos del suelo, fueron de 75.64 y 74.85 % de profenofos y clorpirifos respectivamente. Por otro lado cabe destacar que si se evalúa el efecto promedio de la degradación en presencia de *Eisenia foetida* y bacterias nativas por separado, este se ve afectado más por *Eisenia foetida* tanto para clorpirifos para como para profenofos (Figuras 33 y 34).

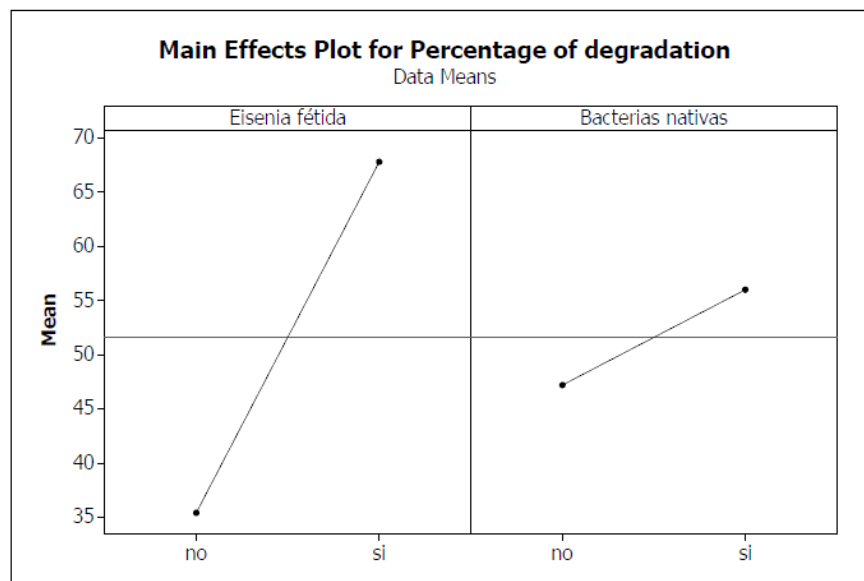


Figura 33. Efecto promedio del porcentaje de degradación de *Eisenia foetida* vs bacterias nativas en la degradación de clorpirifos.

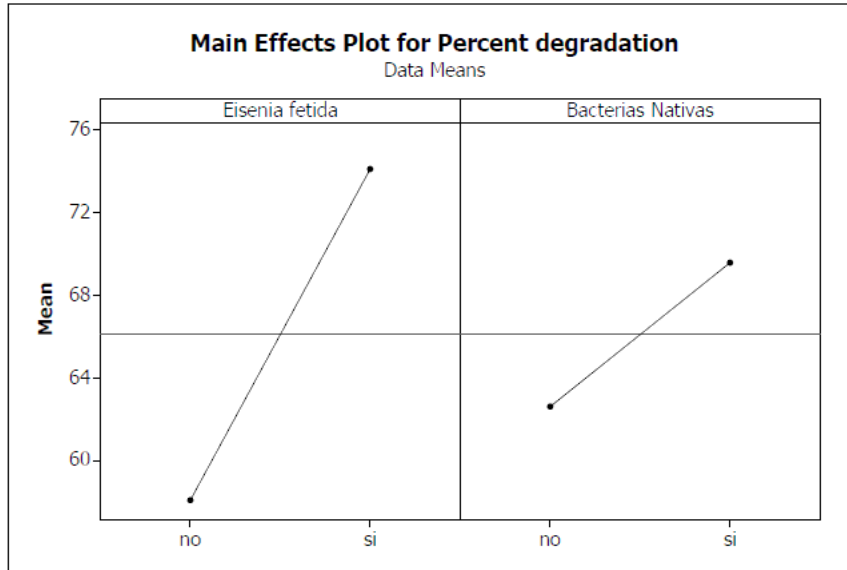


Figura 34. Efecto promedio del porcentaje de degradación de *Eisenia foetida* vs bacterias nativas en la degradación de profenofos.

En las Figuras 35 y 36 se muestra la interacción de *Eisenia foetida* y bacterias nativas del suelo en la degradación de clorpirifos y profenofos pudiéndose interpretar que los ambos factores juegan un papel de sinergismo en la degradación de ambos pesticidas ya que estudios revelan que la actividad de *Eisenia foetida* favorece en el crecimiento bacteriano. Por lo cual la degradación es superior en comparación cuando se evalúa estos dos factores por separado.

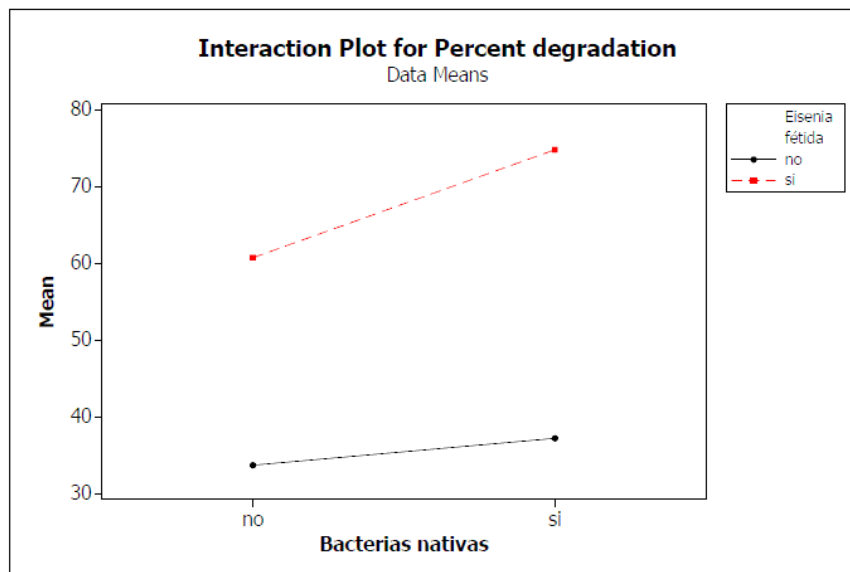


Figura 33. Diagrama de interacción de *Eisenia foetida* y bacterias nativas en el porcentaje de degradación de clorpirifos.

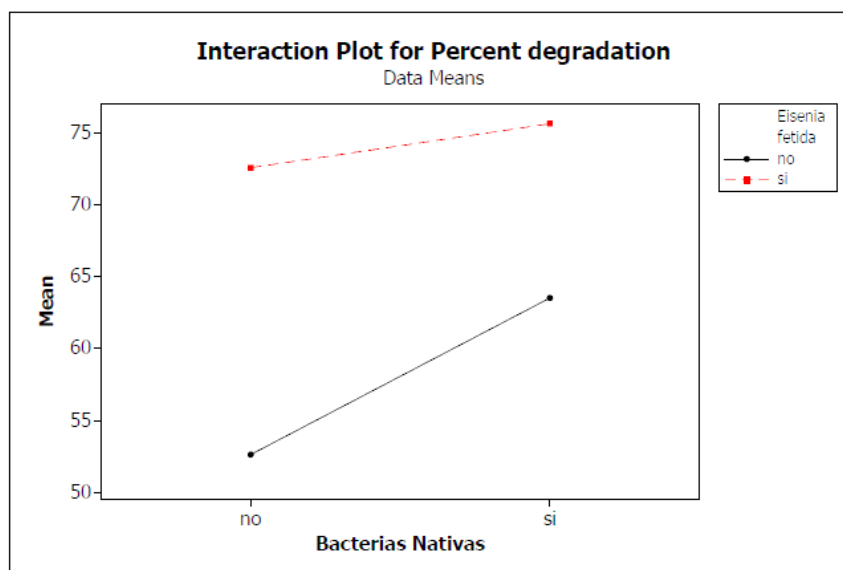


Figura 34. Diagrama de interacción de *Eisenia foetida* y bacterias nativas en el porcentaje de degradación de profenofos.

En medida que, en el suelo no solo existen bacterias si no otro tipo de microorganismos Yan⁴⁹ evaluó la influencia de la inoculación con el hongos micorrícicos arbusculares (HMA), *Glomus caledonium L.* y / o lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) en procesos de fitorremediación de un suelo contaminado con PCB por un cultivo de raigrás durante 180 días. La plantación de raigrás, raigrás inoculados con las lombrices de tierra, raigrás inoculado con HMA, y raigrás co-inoculadas con HMA y lombrices de tierra disminuyeron significativamente contenidos iniciales de PCB del suelo por 58.4, 62.6, 74.3 y 79.5 %, respectivamente. Claramente se observa que *Eisenia foetida* presenta actividad en la degradación de este contaminante orgánico, sin embargo en combinación con hongos incrementa en gran medida la velocidad de degradación de PCB⁴⁹.

En el presente proyecto se observó que también existe un incremento de la degradación de clorpirifos y profenofos en suelos en los cuales estaban presentes tanto lombrices como microorganismos (Tablas 7 y 8).

Finalmente se desarrolló diagramas de Pareto de efectos de los factores *Eisenia foetida* (A) y bacterias nativas (B) frente a su responsabilidad en los efectos de degradación (Figuras 37 y 38). En ambos casos los factores individuales como en conjunto AB no interfieren de manera negativa en el proceso ya que los valores F a un nivel de

confianza del 95 % fueron de 167.6 para clorpirifos y 132.9 para profenofos, y dichos valores no interaccionan con ningún factor.

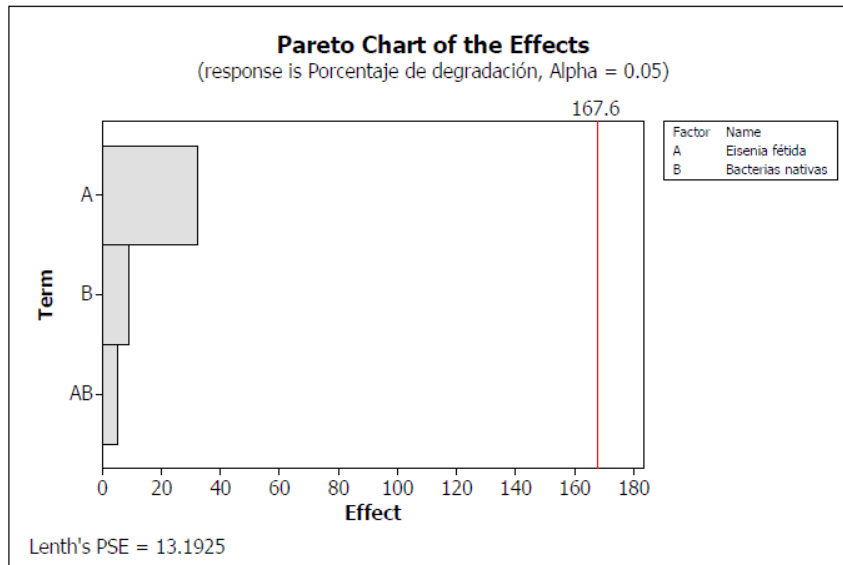


Figura 37. Diagrama de Pareto para la degradación de clorpirifos

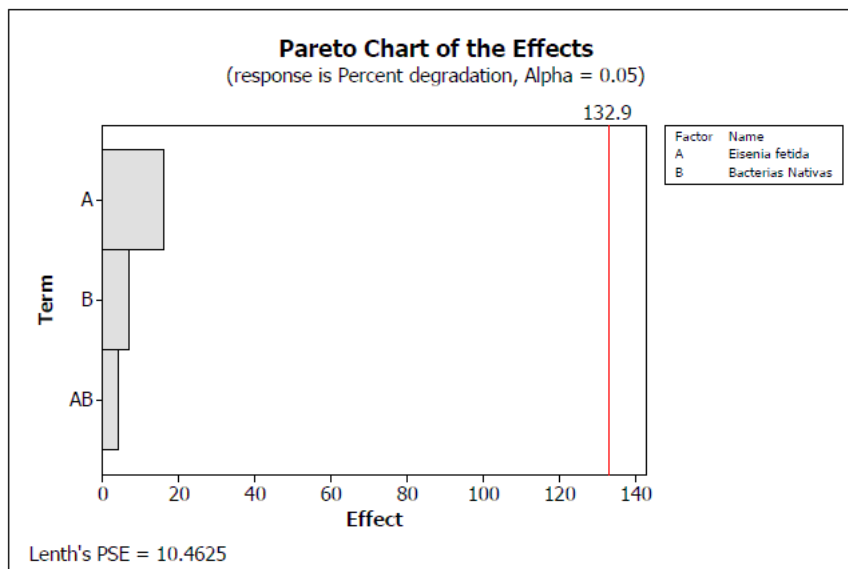


Figura 38. Diagrama de Pareto para la degradación de profenofos

CONCLUSIONES

- 1) Se aclimató a *Eisenia foetida* a medios de suelo artificial cuya composición fue de 120 g de arena fina lavada, 80 g de tierra pómex, enriquecida con cascara de plátano con una humedad ajustada al 40 % en ausencia de luz
- 2) El método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) para la determinación de ambos pesticidas resultó ser lineal ($r^2 > 0.995$) obteniéndose coeficientes de correlación lineal r^2 de 0.9994 y 0.9996 para profenofos y clorpirifos respectivamente, preciso con coeficientes de variación porcentual menores a 2.7 % para ambos pesticidas, exacto obteniendo porcentajes de recuperación de 90.5 y 98.9 % para clorpirifos y profenofos respectivamente.
- 3) Se evaluó un diseño factorial 2^2 siendo los factores Lombrices (20 individuos) y bacterias nativas del suelo a temperatura ambiente, en ausencia de luz y un pH del suelo 7.051, durante 28 días en suelos contaminados en laboratorio a concentraciones de 40 y 50 mg/Kg de clorpirifos y profenofos respectivamente.
- 4) Ambos pesticidas organofosforados sufren procesos de hidrólisis debido a la influencia del pH (7.051) degradándose a los 28 días hasta 33.68 y 52.63 % para clorpirifos y profenofos respectivamente. Profenofos es más susceptible que clorpirifos a la hidrólisis.
- 5) La actividad bacteriana y otros microorganismos del suelo mostraron porcentajes de degradación de 37.16 y 63.52 % para clorpirifos y profenofos respectivamente, demostrando que la actividad bacteriana juega un papel importante en el proceso de degradación de ambos pesticidas.
- 6) *Eisenia foetida* acelera el proceso de degradación logrando porcentajes de degradación de 60.76 % para clorpirifos y 72.58 % para profenofos, lo que indica que este anélido presenta un desempeño positivo en el proceso de degradación de ambos pesticidas organofosforados.
- 7) *Eisenia foetida* en combinación con los microorganismos en general del suelo desempeñan un papel de sinergismo frente a la degradación de ambos pesticidas ya que los niveles de clorpirifos y profenofos disminuyeron en un 74.85 y 75.64 % respectivamente al final del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Betancur, B., (2013). Corredor biorremediación de suelo contaminado con el pesticida 1,1,1- tricloro-2,2'bis(p-clorofenil)etano (DDT) mediante protocolos de bioestimulación y adición de surfactante. Universidad Nacional de Colombia, 33-40.
2. Bor C. (1999). WuImpurity analysis of methamidophos with chromatographic methods. *Analytica Chimica Acta* 395, 257-263.
3. Castellanos, B., Ceballosa, A., Hernández S., Carrazanaa J. (2013). Removal of benzo (a) pyrene from soil using an endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* *Applied Soil Ecology*. 62– 69.
4. Castro J. (2002). Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente. Madrid. Universidad Autónoma de Madrid.
5. Chakra R., Venkateswara R. (2008). Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 574–582.
6. Chen C., Yanhua W., Xueping Z, Yongzhong Q. (2014). Comparative and combined acute toxicity of butachlor, imidacloprid and chlorpyrifos on earthworm *Eisenia fétida*. *Chemosphere*. 100, 111–115.
7. Chen S, Liu C, Peng C, Liu H, Hu M. (2012) Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. *PLoS ONE* 7(10). DISPONIBLE EN PUBMED.

8. Chui-Fan Z., Yu-Jun W. (2013). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia foetida*). *Environmental Pollution*. 180, 71-77.
9. Contreras S., Alvarez D. (2008). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*) *Soil Biology & Biochemistry* 40,1954–1959.
10. Contreras S., Alvarez D., Montes J., Van-Cleemput O. (2009). Emission of nitrous oxide from hydrocarbon contaminated soil amended with waste water sludge and earthworms. *appliedsoil ecology* 41, 69 – 76.
11. Corso L., (2011). Estudio Cinético de la degradación fotocatalítica oxidativa de Rodamina B con ZnO y luz solar. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 267-274.
12. Coutiño E., Hernández B., Gutiérrez R., Dendooven L. (2010). The earthworm *Eisenia fetida* accelerates the removal of anthracene and 9, 10-anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 525-529.
13. Dendoovena, L., Alvarez, D., Contreras R. (2011). Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil. A mini-review biología, 187– 192.
14. Díaz, D., Cova, L., Castro, A., García, D., Perea, F. (2008). Dinámica del crecimiento y producción de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida Sav.*) en cuatro sustratos a base de estiércol bovino. *Agricultura Andina*. 39-55.
15. Dolores M., Aragonese P., Tarazona J. (2011). Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 2133–2140.

16. Etelka M., Éva V., Gabriella K. (2001). Comparison of Extraction Methods to Monitor Pesticide Residues in Surface Water¹, Journal of Chromatographic Science. 39.
17. Fernandez M., Aragonese, P. (2011). Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2133–2140.
18. Giuvaudan N., Wiegand C, Binet F. (2014). Acclimation of earthworms to chemicals in anthropogenic landscapes, physiological mechanisms and soil ecological implication. Soil Biology & Biochemistry. 73, 49-58.
19. Glenda G., Karin K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. Chemosphere. 84,651–656.
20. Gómez J., Sizmur T., Collins C., Hodson M. (2011). Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. Environmental Pollution. 159, 616-622.
21. Gómez J., Sizmur T., Collins C., Mark E. (2011). Hodson Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. Environmental Pollution. 616-622.
22. González E., Hernández C., Gutiérrez R., Dendooven L. (2010). The earthworm *Eisenia fetida* accelerates the removal of anthracene and 9, 10 anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil International Biodeterioration & Biodegradation. 525-529.

23. Hernández B., Ortíz A., Martínez S., Noa J., Luna M., Dendoovenb L. (2013). Removal of benzo (a) pyrene from soil using an endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). *Applied Soil Ecology* 70, 62– 69.
24. Hernández, J., Ramírez, N., Bracho, B., Faría, A. (1999). Caracterización del crecimiento de la lombriz roja (*Eisenia spp.*), bajo condiciones de clima cálido. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* 25:139-147.
25. Hurtado, C., Gutiérrez M.(2005). Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas órganos fosforados *Rev.fac.med.unal* vol.53, 244-258.
26. Jacobo R., Camposa, L. (2014). Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. *Applied Soil Ecology*. 79,10–25.
27. Jixin T., Hans L. (2002). Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 48, 35–42.
28. Perez A, Segura A., Garcia R. (2008). Organophosphate pesticide residues in broccoli(*Brassica oleracea*) heads determined by gas chromatography. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(2): 103-110.
29. Juan C., Sanchez C., Narvaez P., Sabat S., Martínez Mocillo. (2014) Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Science of the Total Environment*. 490,445–455.
30. Koujiro, F., Chie N., Yasufumi, K., Hideki, C., Ryoza O. (1997). Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *Journal of Chromatography B*. 369–373.
31. Manoj K. Tiwari, Saumyen G. (2014). Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments, *waterre search* 51, 73-85.

32. Martines, C., Romero, L., Corlay, A. (1999). Lombricultura y abonos orgánicos. Simposium Internacional Primera Reunion Nacional. 17-28.
33. Montoya, S., Páez C. (2008). Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales , Universidad Tecnológica de Pereira. 36-53.
34. Nath D., Azizul H., DaeYun H. (2014). Cloning and expression of ophB gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic Pseudomonas sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. Ecotoxicology and Environmental Safety. 108, 135–141.
35. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS (1984) Earthworm, Acute Toxicity Tests" 206, 1-9.
36. Qixing Z., Mele Q., Jidong L. (2008). Ecological detoxification of methamidophos by earthworms in phaeozem co-contaminated with acetochlor and copper. applied soil ecology 4, 8 – 145.
37. QUATTROCCHI OA; ABELARIA SI; LABA EF. (1992). Introducción a la HPLC Aplicación y Practica, Argentina, Artes Gráficas Farro, primera edición.
38. Serrano R., López F., Hernández F. (2010). Automated sample clean-up and fractionation of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl and metabolites in mussels using normal-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 778, 151-160.
39. Silvia M. Contreras-Ramos, Dioselina Álvarez-Bernal, Luc Dendooven. 2009). Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost. Applied soil ecology 41, 269 – 276.

40. Singera A., Jurya W., Luepromchaia E., Yahng C., Crowley D. (2001). Contribution of earthworms to PCB bioremediation. *Soil Biology & Biochemistry*. 33, 765-776.
41. Singera A.C., Jurya W., (2001). Contribution of earthworms to PCB bioremediation *Soil Biology & Biochemistry*.765-776.
42. Smídová K., Hofman J. (2014). Uptake kinetics of five hydrophobic organic pollutants in the earthworm *Eisenia fetida* in six different soils. *Journal of Hazardous Materials* 267, 175– 182.
43. Swapnil S., Yogesh B. (2012). Biodegradation of acephate using a developed bacterial consortium and toxicological analysis using earthworms (*Lumbricus terrestris*) as a model animal. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 69, 1-9.
44. Tay J., Marinah M., Norhayati M. (2010). hydrolysis of chlorpyrifos in aqueous solutions at different temperatures and pH. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 14,50 – 55.
45. Tineo, A., (1994). Crianza y manejo de lombrices de tierra con fines agrícolas. *Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza*. 3-16.
46. Torres, K., Montoya, T. (2009). biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. *Universidad Nacional de Colombia*.32-60.
47. Watanabe E., Kobara Y., Baba K., Eun H. (2014). Aqueous acetonitrile extraction for pesticide residue analysis in agricultural products with HPLC-DAD. *Food Chemistry* 154, 7–12.

48. Yadav, M., Srivastva, N., Upadhyay, S., Suresh K., (2014). Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. in a continuous packed bed bioreactor. *Bioresource Technology* 265–269.
49. Yan L., Mang L., Fang P., Yun W., Min L. (2014). Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. *Chemosphere* 106,44–50.
50. Yanhua W., Chen C., Yongzhong Q. (2015). Toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*. 284, 233–240.
51. Zachary A. Hickman, Brian J. Reid. (2008). Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International* 34, 1072–1081.
52. Zhou S., Duan C. (2007). Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*. 19, 854-858.

ANEXOS

Tablas de Resultados

Clorpirifos			Profenofos		
Lombriz + Bacterias			Lombriz + Bacterias		
tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)	tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)
0	43.41	0.00	0	47.62	0.00
7	22.83	47.41	7	27.42	42.41
14	20.47	52.84	14	23.47	50.70
21	20.40	53.00	21	16.79	64.73
28	10.92	74.85	28	11.60	75.64
Lombriz			Lombriz		
tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)	tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)
0	43.41	0.00	0	47.62	0.00
7	27.64	36.32	7	37.94	20.33
14	26.50	38.94	14	31.79	33.23
21	21.44	50.61	21	17.86	62.50
28	17.03	60.76	28	13.06	72.58
Bacterias			Bacterias		
tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)	tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)
0	38.98717	0.00	0	48.27	0.00
7	31.6285329	16.53	7	38.52	20.19
14	29.1568892	25.21	14	33.25	37.00
21	27.0194775	33.20	21	30.51	52.00
28	24.4930364	37.18	28	17.61	63.52
Blanco			Blanco		
tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)	tiempo (días)	Concentración (mg/L)	Degradación (%)
0	38.98717	0.00	0	48.27	0.00
7	35.189801	9.74	7	41.44	14.15
14	34.3772313	20.43	14	33.46	30.68
21	28.4568148	27.01	21	33.19	38.40
28	25.8555225	33.68	28	22.87	52.63

Tratamiento de datos por Wolfram Mathematica 10 (clorpirifos)

```
a1 = 0.0004  
a2 = 0.0259  
a3 = 0.5548  
a4 = 5.0056  
a5 = 43.205
```

```
0.0004
```

```
0.0259
```

```
0.5548
```

```
5.0056
```

```
43.205
```

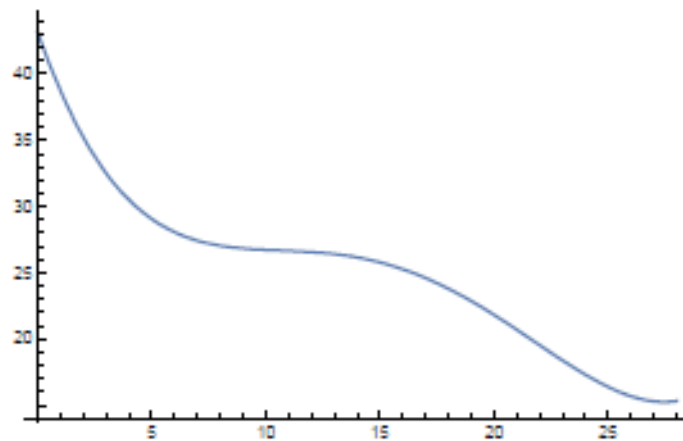
```
f[x_] := a1 * x^4 - a2 * x^3 + a3 * x^2 - a4 * x + a5
```

```
f[x]
```

```
43.205 - 5.0056 x + 0.5548 x^2 - 0.0259 x^3 + 0.0004 x^4
```

```
43.205 - 5.0056 x + 0.5548 x^2 - 0.0259 x^3 + 0.0004 x^4
```

```
Plot[43.205 - 5.0056 x + 0.5548 x^2 - 0.0259 x^3 + 0.0004 x^4, {x, 0, 28}]
```

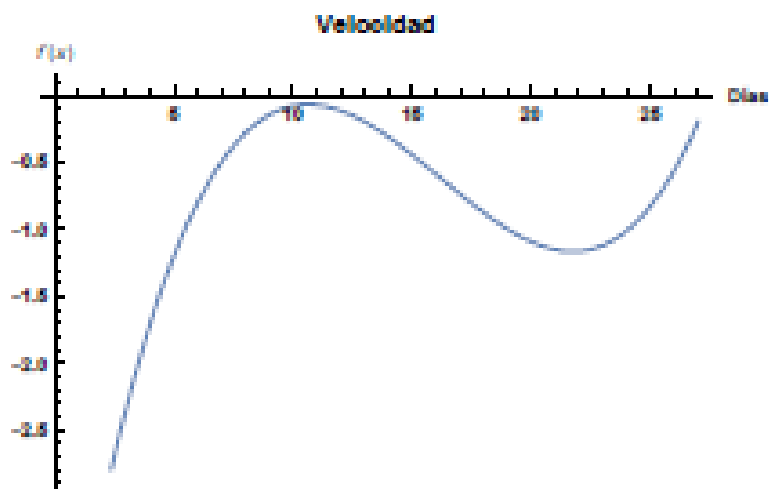


```
f'[x]
```

```
-5.0056 + 1.1096 x - 0.0777 x^2 + 0.0016 x^3
```

```
Plot[-5.0056 + 1.1096 x - 0.0777 x^2 + 0.0016 x^3, {x, 0, 27}]
```

```
Show[%41, AxesLabel -> {HoldForm[Días], HoldForm[f'(x)]},  
PlotLabel -> HoldForm[Velocidad]]
```

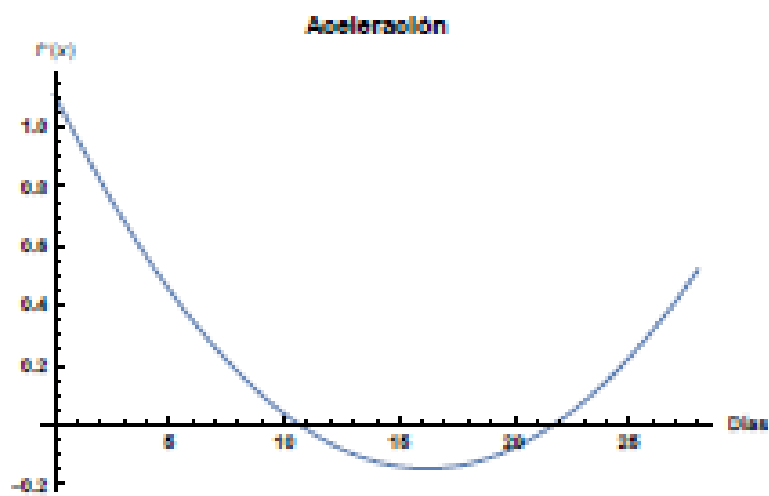


$f''(x)$

$$1.1096 - 0.1554 x + 0.0048 x^2$$

```
Plot[1.1096 - 0.1554 x + 0.0048 x^2, {x, 0, 28}]
```

```
Show[%43, AxesLabel -> {HoldForm[Días], HoldForm[f''(x)]},  
PlotLabel -> HoldForm[Aceleración]]
```



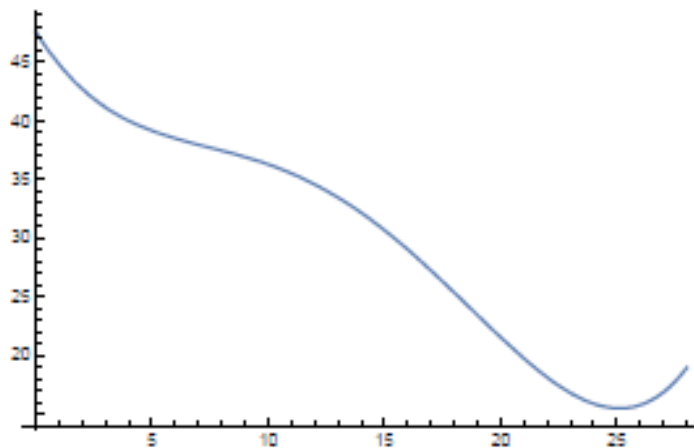
Tratamiento de datos por Wolfram Mathematica 10 (profenofos)

```
f[x_] := 0.0005 * x^4 - 0.0261 * x^3 + 0.4159 * x^2 - 3.1836 * x + 47.616
```

```
f[x]
```

```
47.616 - 3.1836 x + 0.4159 x^2 - 0.0261 x^3 + 0.0005 x^4
```

```
Plot[47.616 - 3.1836 x + 0.4159 x^2 - 0.0261 x^3 + 0.0005 x^4, {x, 0, 28}]
```

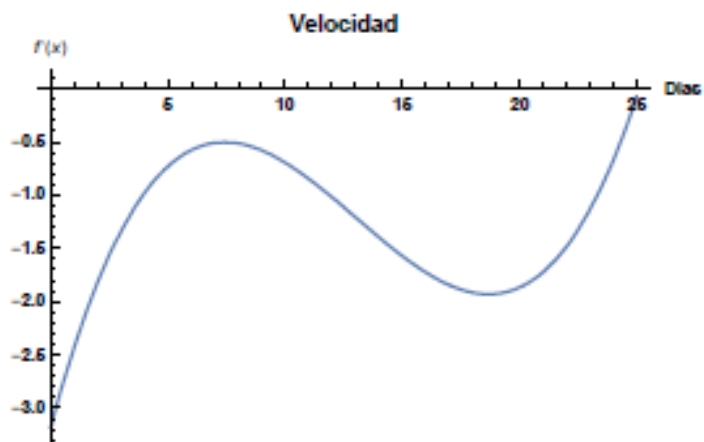


```
f'[x]
```

```
-3.1836 + 0.8318 x - 0.0783 x^2 + 0.002 x^3
```

```
Plot[-3.1836 + 0.8318 x - 0.0783 x^2 + 0.002 x^3, {x, 0, 25}]
```

```
Show[%18, AxesLabel -> {HoldForm[Días], HoldForm[f'[x]]},  
PlotLabel -> HoldForm[Velocidad], LabelStyle -> {GrayLevel[0], Bold}]
```



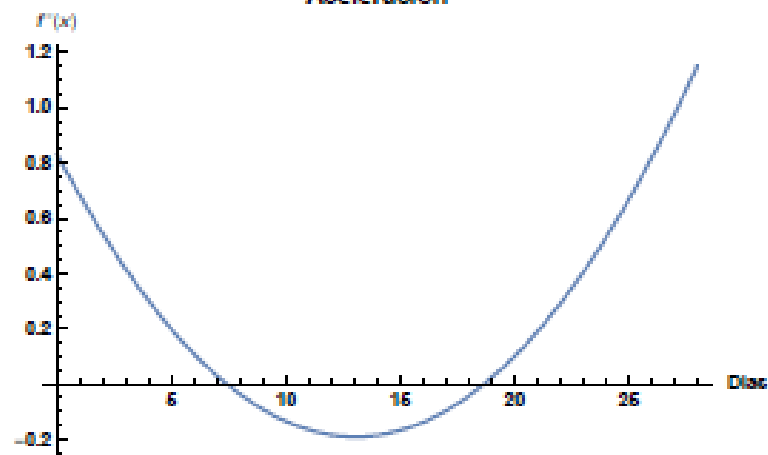
```
f''[x]
```

```
0.8318 - 0.1566 x + 0.006 x^2
```

```
Plot[0.8318 - 0.1566 x + 0.006 x^2, {x, 0, 28}]
```

```
Show[%20, AxesLabel -> {HoldForm[Días], HoldForm[f''[x]}],  
PlotLabel -> HoldForm[Aceleración], LabelStyle -> {GrayLevel[0], Bold}]
```

Aceleración



```
Show[%23, ImageSize -> Large]
```

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

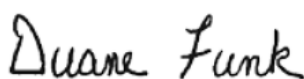
Product Name	Dursban, analytical standard
Product Number	442573
Product Brand	SUPELCO
CAS Number	2921-88-2
Molecular Formula	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Molecular Weight	350.59

TEST

LOT LB98768V RESULTS

PDF Format

Please [click here](#) to obtain the Certificate of Analysis in PDF format.



Duane Funk
Quality Manager
Bellefonte, Pennsylvania USA

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Profenofos, PESTANAL [®] , analytical standard
Product Number	45632
Product Brand	SIAL
CAS Number	41198-08-7
Molecular Formula	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS
Molecular Weight	373.63

TEST

LOT SZBC352XV RESULTS

PDF Format

Please [click here](#) to obtain the Certificate of Analysis in a PDF format.



Katja Vogler
Quality Management
Seelze, Germany