

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL INSECTICIDA  
CLORPIRIFOS EN ABEJAS DOMÉSTICAS (APIS MELLIFERA)  
SUMINISTRADO VÍA ORAL CRÓNICA, MEDIANTE MÉTODOS  
ANALÍTICOS BASADOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA RESOLUCIÓN***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Química área de Especialización en Química  
Analítica y Memoria para optar al Título de Químico por:**

***CARLA CECILIA ARROYO RIVERA***

**Director de Tesis: Sr. Juan Ferrúz Rojas**

**Dr. Edwar Fuentes Pérez**

**Santiago-CHILE**

**Junio 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**CARLA CECILIA ARROYO RIVERA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Analítica y Título de Químico, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Sr. Juan Ferrúz Rojas**

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Edwar Fuentes Pérez**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**MSc. Inés Ahumada Torres**

---

**Dra. Tatiana Garrido Reyes**

---

**Dra. Jessica Martínez Arenas**

---

*A mi mamá, Mónica y  
en memoria de mi papá, Luis.*

*“Hay hombres que luchan un día y son buenos.  
Hay otros que luchan un año y son mejores.  
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.  
Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.”*

- Bertolt Brecht -

## AGRADECIMIENTOS

Cuando recién comenzaba mi proceso universitario, nueve años atrás, jamás se me cruzó por la cabeza que estaría donde estoy hoy académica, profesional y personalmente. Ha sido un proceso largo y extenuante, a veces parecía hasta imposible de lograr, pero las personas a quienes agradezco hoy hicieron el camino del aprendizaje mucho más llevadero y enriquecedor.

A todos los profesores por la dedicación y conocimiento entregados desde el primer día que pisé la facultad, en especial a mi patrocinador Edwar Fuentes, quien me acogió como una más de sus tesis, se preocupó y me ayudó como tal; sin usted hubiera sido aún más difícil terminar este proceso, estaré por siempre agradecida de su tiempo, disposición y buena voluntad. A mi comisión evaluadora: Tatiana e Inés quienes también fueron mis profesoras en pregrado, estoy muy feliz de que hayan podido ser parte de esta última etapa, muchas gracias por sus palabras de aliento y por siempre confiar en mis capacidades. También a Jessica, que sin conocernos su mentoría fue esencial para poder aprovechar los resultados obtenidos en este trabajo. A Juan, quién accedió a ser mi director de tesis en un momento crítico; gracias por sus consejos y su ingenio.

A Daniel Sanhueza, por ofrecerme realizar la tesis en Salimax y darme las facilidades para llevar a término este trabajo, aún en tiempos tan complejos como lo fue durante la pandemia. A Ángela por su disposición para enseñarme el manejo de las abejas y a Francisco, por facilitarme sus abejas para el estudio toxicológico de una manera desinteresada y por siempre creer y apoyar mis ideas.

A quienes fueron mis ayudantes y mentores en distintas etapas de mi vida universitaria; Pato y Pablo del laboratorio 404 de inorgánica, gracias por la paciencia, las enseñanzas y buenos momentos. A Inma y a Dani, por acogerme como una más en el laboratorio de química ambiental, me enseñaron y ayudaron mucho más de lo que creen. A Raúl, del laboratorio de radioquímica por las valiosas y gratificantes conversaciones.

A los pocos, pero buenos amigos que logré en pregrado; Dani, Pelao, Edu y Gustavo, por la compañía y los buenos momentos durante todos estos años. A JP, quién estuvo presente como un gran amigo desde el comienzo y hoy, caminamos juntos de la mano esta aventura, por todo el aguante, la confianza y el amor, sin ti no hubiera podido terminar de escribir. A

José, por tus sabios consejos, por cada palabra de aliento y por estar siempre presente. A Xime, por ser mi compañera y amiga de magíster, por todos los cursos y lloraditas, sin ti hubiera sido realmente aburrido el posgrado. A mis chicas del intercambio; Dani, Linda, Jime y Pauline, por hacer de mi estancia en España mejor de lo que lo siempre soñé.

A quienes también me acogieron como una familia en Ricoffee Tia Paty, Tio Richi, Cami y Cota, por la paciencia, el cariño y la sabiduría, hicieron de mí una mejor persona.

A mis primeros compañeros y amigos de trabajo; Karla, Chris, Brian, Silvi y Clau, por todos los consejos, los buenos momentos y el cariño. A David, por darme el primer empujón con la tesis, por enseñarme y formarme como un jefe y un amigo. A la Soa Ruth y Soa Gladys, por su gran corazón y buenos deseos.

A mis amigos de toda la vida, por quererme y aguantarme en los tiempos de crisis; Álvaro, Gonza, Cata, y ahora mi ahijado hermoso, Emilio.

A mi gente de la banquetera por apoyarme y siempre creer en mí; Key, Maxi, José, Belén, Mane, y a todo el equipo JG por tantos fines de semana de trabajo juntos.

A los tíos del laboratorio y de la biblioteca; Manuel, Claudio, Marcelo, Mario y Julio, por todo su cariño, me llevo los mejores recuerdos de nuestro tiempo juntos.

A Rodrigo, por creer en mis capacidades y darme las facilidades para terminar este trabajo. A Tomás, por escucharme y siempre tener una palabra de consuelo.

A mis abuelitos Margarita y Quico, que si bien nunca entendieron qué estudiaba siempre me apoyaron y se alegraron con cada logro. A Juan Carlos, por su apoyo incondicional y por siempre saber qué decir.

Pero por sobre todo a mi mamá, quien ha sido y es mi motor para seguir día a día, por nunca dejarme renunciar, por tus cálidos abrazos cuando creí que no podría terminar la universidad, por tu cariño y por ser tú, eres mi guía para todo. A mi papá, que me cuida y fortalece donde sea que esté, sé que siempre me acompañas. Los amo.

## **FINANCIAMIENTO Y LUGAR DE DESARROLLO**

Laboratorio Salimax

Laboratorio de toxicología y ecotoxicología

Unidad Analítica

## TABLA DE CONTENIDOS

Índice de tablas .....	X
Índice de figuras .....	XII
Abreviaturas.....	XIV
Resumen .....	XVI
Summary.....	XVII
1. Introducción .....	1
1.1. Importancia de las abejas en el medio ambiente.....	1
1.2. Pesticidas, uso y regulación en Chile.....	2
1.3. Exposición de abejas a pesticidas y sus efectos.....	4
1.4. Ensayos de toxicidad y bioacumulación o toxicidad dependiente del tiempo.....	10
1.5. Métodos analíticos de extracción empleados para determinar pesticidas.....	13
1.6. Métodos de cuantificación y detección de residuos de pesticidas. ....	16
2. Hipótesis.....	19
3. Objetivos .....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos. ....	19
4. Materiales .....	20
4.1. Estándares. ....	20
4.2. Solventes.....	20
4.3. Reactivos.....	20
4.4. Equipos. ....	20
4.5. Materiales.....	21
4.6. Softwares. ....	21
5. Métodos.....	22
5.1. Ensayos Analíticos.....	23
5.1.1. Preparación de Solución Stock.....	23
5.1.2. Evaluación del efecto matriz. ....	23
5.1.3. Método cromatográfico. ....	23
5.1.4. Validación del método.....	24



5.1.5.	Método de extracción de insecticidas en abejas (MSPD).....	24
5.2.	Ensayos toxicológicos.....	24
5.2.1.	Diseño experimental de los ensayos toxicológicos orales agudo y crónico... ..	24
5.2.2.	Ensayo de exposición oral agudo y determinación de la $DL_{50}$ . .....	25
5.2.3.	Ensayo de exposición crónica a insecticidas y toxicidad reforzada en el tiempo. .....	28
5.3.	Análisis estadísticos.....	33
6.	Resultados y discusión .....	34
6.1.	Validación de un método analítico. ....	34
	Determinación de clorpirifos por cromatografía líquida acoplada a DAD .....	34
	Efecto matriz .....	36
	Linealidad.....	37
	Límites de detección, cuantificación y recuperación .....	38
	Precisión: Repetibilidad .....	39
6.2.	Implementación del método MSPD para la extracción de clorpirifos desde abejas melíferas.....	39
6.3.	Verificación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de CPF en abejas melíferas, en condiciones de laboratorio.....	40
6.4.	Planteamiento de un diseño experimental para la exposición crónica de abejas domésticas al insecticida clorpirifos, mediante su dosificación por vía oral.....	44
6.6.	Determinación de la concentración de CPF en abejas domésticas .....	52
	Determinación analítica.....	52
	Determinación toxicológica .....	54
6.7.	Evaluación de signos clínicos .....	55
7.	Conclusión.....	59
8.	Referencias .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las propiedades químicas y físicas del insecticida clorpirifos (Edwards, 1975).....	6
<b>Tabla 2.</b> Persistencia de clorpirifos en diferentes matrices. (Mackay, Giesy, & Solomon, 2014).....	6
<b>Tabla 3.</b> Clasificación según toxicidad de pesticidas. (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 2014). .....	10
<b>Tabla 4.</b> Dosis letal media oral aguda en ng/abejas del insecticida clorpirifos. ....	11
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de linealidad y sensibilidad analítica para el método de extracción y detección de CPF en solvente y en matriz, donde R es el coeficiente de correlación, b la pendiente, Sb el error estándar de la pendiente, Syxerror estándar del estimado, S el inverso de la sensibilidad analítica ( $S_{y/x}/b$ ) y Sb(r) la linealidad ( $Sb/b*100$ ). ....	37
<b>Tabla 6.</b> Valores de LOD y LOQ obtenidos a partir del error estándar de la estimación en $\mu\text{g/mL}$ y ng/abeja.....	38
<b>Tabla 7.</b> Valores de recuperación promedio obtenidos en tres niveles distintos: 2 LOQ, 5 LOQ y 8 LOQ. ....	38
<b>Tabla 8.</b> Mortalidad acumulada observada y corregida, mediante la ecuación de Abbot, de los tratamientos estudiados a las 24 y 48 horas posteriores a la ingesta del ingrediente activo, CPF.....	41
<b>Tabla 9.</b> Valores promedio, por dosis, obtenidos al masar los comederos antes y después de ser suministrados a un grupo de 10 abejas y, dosis realmente consumida por abeja. ....	41
<b>Tabla 10.</b> Transformación de los porcentajes de mortalidad corregidos a valores probit. ....	42
<b>Tabla 11.</b> Valores de probit obtenidos para las dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas.....	42
<b>Tabla 12.</b> Valores promedio por réplica, de solución de sacarosa al 50% p/v contaminada con CPF, consumida diariamente por abeja y alimento promedio al finalizar el período de exposición por tratamiento, ambos en mg/a.....	45
<b>Tabla 13.</b> Dosis promedio ingerida diariamente en $\mu\text{g/g}$ .....	46
<b>Tabla 14.</b> Dosis diaria experimental y cantidad de alimento promedio ingerida por cada abeja. ....	46

<b>Tabla 15.</b> Mortalidad acumulada y porcentaje de mortalidad acumulada al cabo de 10 días para los distintos tratamientos y controles. ....	47
<b>Tabla 16.</b> Relación entre las variables dosis experimental, sacarosa consumida y mortalidad. ....	49
<b>Tabla 17.</b> Dosis promedio acumulada al finalizar el ensayo toxicológico de 10 días obtenida a partir de la suma de las dosis diarias promedio. ....	50
<b>Tabla 18.</b> Valores de probit obtenidos para las dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral crónico de 10 días. ....	50
<b>Tabla 19.</b> Concentración promedio de CPF en abejas al finalizar el ensayo toxicológico de 10 días evaluada mediante MSPD/HPLC-DAD.....	52
<b>Tabla 20.</b> Concentración promedio de CPF en abejas luego de un 100% de mortalidad evaluada mediante MSPD/HPLC-DAD. ....	53
<b>Tabla 21.</b> Valores utilizados para realizar el ajuste logarítmico de la C( $\mu\text{g/g}$ ) en función del t(días).....	54
<b>Tabla 22.</b> Datos diarios de mortalidad y comportamiento anormal de las abejas domésticas sometidas el ensayo de toxicidad oral crónica por 10 días, donde M, corresponde a la mortalidad, C.A. al comportamiento anormal, S el síntoma observado para el C.A y # el número de individuos. ....	56
<b>Tabla 23.</b> Continuación tabla 22.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> A la izquierda la estructura química general de los insecticidas organofosforados y a la derecha la estructura química del insecticida clorpirifos.....	3
<i>Figura 2.</i> Gráfico de importación y exportación de pesticidas en Chile desde el año 1960 hasta el año 2019, en miles de dólares. (Food and Agricultural Organization of the United States, 2022) .....	3
<i>Figura 3.</i> Durante el pecoreo las abejas se exponen a plaguicidas mediante tres rutas: (1) por contacto directo con aerosoles y/o partículas suspendidas en el aire; (2) por contacto indirecto con aerosoles y/o partículas suspendidas en superficies de plantas tratadas y (3) por la ingesta de polen, néctar o agua contaminada; (Sánchez-Bayo & Goka, <i>Impacts of pesticides on honey bees</i> , 2016) .....	7
<i>Figura 4.</i> Representación esquemática del mecanismo de acción de clorpirifos en la sinapsis nerviosa (Giesy & Solomon, 2014).....	9
<i>Figura 5.</i> Diagrama del proceso de tratamiento de muestras. ....	13
<i>Figura 6.</i> Diagrama con las técnicas de extracción analíticas para residuos de pesticidas desde muestras líquidas y sólidas.....	14
<i>Figura 7.</i> Diagrama del método de dispersión de matriz en fase sólida propuesto la extracción de pesticidas desde abejas. ....	16
<i>Figura 8.</i> Espectro UV del insecticida clorpirifos. ....	18
<i>Figura 9.</i> Ubicación de la comuna de Peumo, en la sexta región del Libertador Bernardo O'Higgins.....	22
<i>Figura 10.</i> Diseño experimental del ensayo de toxicidad oral agudo (arriba) y crónico (abajo) en abejas domésticas. ....	25
<i>Figura 11.</i> Recolección de abejas domésticas de la comuna de Peumo .....	29
<i>Figura 12.</i> Contenedor plástico donde se realizaron los ensayos toxicológicos.....	30
<i>Figura 13.</i> Esquema con las posibles interacciones hidrofóbicas entre CPF y C18. ....	34
<i>Figura 14.</i> Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-DAD para el insecticida CPF con el programa cromatográfico optimizado. En (A) señal de 1µg/mL de CPF en AcN, en (b) cromatograma de la matriz sin fortificar y en (c) cromatograma de la matriz fortificada con 1µg/mL de CPF. ....	35

<b>Figura 15.</b> A la derecha, calibrado en solvente y a la izquierda, calibrado en matriz. Se muestra la ecuación de la recta que describe a ambas curvas de calibrado, errores calculados con un 95% de confianza (línea naranja).....	36
<b>Figura 16.</b> Análisis de probit en función del log en base 10 de la dosis para el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas.....	43
<b>Figura 17.</b> En A, ajuste sigmoidal y en B, ajuste lineal para los datos de mortalidad (%) en función del logaritmo de la dosis a las 24 (línea verde) y 48 horas (línea roja) mediante el análisis de dosis-respuesta. ....	44
<b>Figura 18.</b> Curva de sobrevida para el ensayo de toxicidad oral crónico de 10 días en abejas domésticas. ....	48
<b>Figura 19.</b> Análisis de probit en función del log en base 10 de la dosis para el ensayo de toxicidad oral crónico 10 días.....	51
<b>Figura 20.</b> En A, ajuste sigmoidal y en B, ajuste lineal para los datos de mortalidad (%) en función del logaritmo de la dosis a los 10 días mediante un modelo estadístico log-logístico de tres parámetros.....	51
<b>Figura 21.</b> Ajuste exponencial para la concentración cuantificada para las distintas dosis administradas. ....	53
<b>Figura 22.</b> Ajuste log-log dosis versus tiempo para evaluar la ley de Haber. ....	55

## ABREVIATURAS

%p/v	: Porcentaje peso volúmen
°C	: Grados celsius
AchE	: Acetilcolinesterasa
AcN	: Acetonitrilo
C18	: Octadecilsilano
CPF	: Clorpirifos
CPFO	: Clorpirifos-oxón
DAD	: Arreglo de diodos
DDL50	: Dosis dietética letal media
DDT	: Diclorodifeniltricloroetano
DL20	: Dosis letal que inflige un 20 % de mortalidad
DL50	: Dosis letal media
DL80	: Dosis letal que inflige un 80 % de mortalidad
DLA50	: Dosis letal acumulada media
EC	: Concentrado emulsificable
ECD	: Detector de captura de electrones
EFSA	: Autoridad europea de seguridad alimentaria
FID	: Detector de ionización de llama
g	: Gramo
GC	: Cromatografía gaseosa
GR	: Granulado
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
IP	: Índice de polaridad
LC	: Cromatografía líquida
LLE	: Extracción líquido-líquido
LMR	: Límite máximo residual
LOD	: Límite de detección
LOQ	: Límite de cuantificación
mg	: Miligramo

mL	: Mililitro
MSPD	: Dispersión de matriz en fase sólida
NOEC	: Concentración sin efecto observado
NOEDD	: Dosis dietética sin efecto observado
OCDE	: Organización para la cooperación y el desarrollo económico
OP	: Organofosforado
PTFE	: Politetrafluoroetileno
QuEChERS	: Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe
rpm	: Revoluciones por minuto
SAG	: Servicio agrícola ganadero
SC	: Suspensión concentrada
SPE	: Extracción en fase sólida
SPME	: Micro-extracción en fase sólida
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
UV	: Ultravioleta-visible
WP	: Polvo mojable

## RESUMEN

Las abejas productoras de miel, en particular de la especie *Apis Mellifera*, se alimentan de una amplia variedad de vegetales y fuentes de agua, por ende, interactúan constantemente con el medioambiente. En consecuencia, tanto los subproductos como la abeja misma son utilizados como bioindicadores ambientales para el monitoreo de contaminantes, como metales pesados, radionucleidos y plaguicidas. En Chile, el crecimiento exponencial en la importación de plaguicidas está relacionado con el auge de la industria agrícola desde la década del sesenta. Debido a esto, el aumento en la venta de plaguicidas se produjo en un entorno no regulado y de fácil acceso, acompañado de una falta de conocimiento sobre su uso correcto, impacto en la salud humana y ambiental. A la fecha, el insecticida clorpirifos es uno de los más comercializados a nivel nacional y es uno de los pesticidas organofosforados que, por su alta lipofilicidad, tiende a bioacumularse en los tejidos grasos de las abejas a niveles subletales, produciendo una gran variedad de comportamiento anormales e incluso la muerte en un mediano plazo.

La presente tesis muestra un estudio toxicológico y analítico para evaluar el efecto de clorpirifos en abejas domésticas, así como su acumulación en las mismas. Para ello se validó un método analítico para la determinación de este insecticida a niveles traza en abejas domésticas (recolectadas en Peumo, Región del Libertador Bernardo O'Higgins); basado en MSPD y HPLC-DAD. El LOQ del método fue de 9,0 ng de clorpirifos por abeja. Las recuperaciones fueron superiores o iguales al 79% con un RSD < 7%.

Por otra parte, se sometieron abejas a ensayos de toxicidad oral agudo por 48 hrs y crónico por 10 días, obteniéndose un  $DL_{50}$  de 2,53  $\mu\text{g/g}$  y una  $DLA_{50}$  de 0,72  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Solo el grupo de abejas sometidas a una dosis intermedia de clorpirifos en el ensayo crónico, pero con el mayor consumo de alimento promedio diario, presentó concentraciones cuantificables del insecticida (23 ng/abeja). Mientras que en las abejas que fueron expuestas por 16 días, se presentaron concentraciones entre 25 y 175 ng/abeja. De acuerdo con el estudio toxicológico, clorpirifos podría ser considerado como un pesticida cuya toxicidad es reforzada en el tiempo. Este resultado es concordante con la bioacumulación exponencial en abejas obtenido mediante la determinación analítica. Sin embargo, debido a los sesgos observados durante el ensayo de toxicología crónico este resultado no es concluyente.



## SUMMARY

Honeybees, especially those of the species *Apis mellifera*, feed on a wide variety of vegetables and water sources from different locations and therefore constantly interact with the environment around the hive. Consequently, both the by-products and the bee itself are used as environmental bioindicators for the monitoring of contaminants, such as heavy metals, radionuclides, and pesticides. In Chile, the exponential growth in the import of pesticides is related to the “boom” of the agricultural industry in the sixties. Because of this, the increase in the sale of these pollutants occurred in an unregulated environment of free trade and easy access, accompanied by a lack of knowledge about the correct use of pesticides, their impact on human and environmental health. To date, chlorpyrifos is one of the most commercialized nationwide insecticides and, is also one of the organophosphate pesticides that, due to its high lipophilicity, tends to bioaccumulate in the fatty tissues of bees at sublethal levels, producing a wide variety of abnormal behavior and even in the medium term, death.

This thesis shows a toxicological and analytical study to evaluate the effect of chlorpyrifos in domestic bees, as well as the bioaccumulation in them. To this end, an analytical method was validated for the determination of this insecticide at trace levels in domestic bees (collected in Peumo, Libertador Bernardo O'Higgins Region); based on MSPD and HPLC-DAD. The LOQ of the method was 9.0 ng of chlorpyrifos per bee. Recoveries were greater than or equal to 79% with an RSD < 7%.

On the other hand, bees were subjected to tests acute oral toxicity for 48 hours and chronic for 10 days, obtaining a  $LD_{50}$  of 2.53  $\mu\text{g/g}$  and a  $LCD_{50}$  of 0.72  $\mu\text{g/g}$ , respectively. Only the group of bees subjected to an intermediate dose of chlorpyrifos in the chronic trial, but with the highest average daily feed intake, presented quantifiable concentrations of the insecticide (23 ng/bee). While in bees that were exposed for 16 days, concentrations between 25 and 175 ng/bee were presented. According to the toxicological study, chlorpyrifos could be considered as a pesticide whose toxicity is reinforced over time. This result is consistent with the exponential bioaccumulation in bees obtained by analytical determination. However, due to the biases observed during the chronic toxicology trial this result is inconclusive.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia de las abejas en el medio ambiente.

En el mundo existen alrededor de 30.000 especies de abejas, pero solo unas pocas – cerca de 30 – son consideradas productoras de miel. En particular, la especie *Apis Mellifera*, también conocida como abeja europea, ha sido domesticada desde hace al menos 6.000 años, existiendo registros del manejo de colmenas que se remontan incluso al antiguo Egipto (National Research Council, 2007). Esta larga historia de domesticación ha dado lugar a su transporte internacional y distribución cosmopolita, incluyendo todos los continentes excepto la Antártida y, un par de islas en Oceanía. (Hung, 2017)

De particular relevancia es el rol de la abeja doméstica como polinizador en la agricultura moderna; puesto que dada su gran eficiencia en este proceso visitan metódicamente plantas y flores para la recolección de néctar y polen, y no las destruyen en el proceso (Devillers, 2002). En la polinización participan agentes abióticos, como viento y agua, pero son los agentes bióticos los más relevantes. En este sentido, cerca de 200.000 animales participan del proceso de polinización de 250.000 especies florales silvestres en nuestro planeta. Dentro de ellos, 1500 especies pertenecen a la familia de los vertebrados, como aves y mamíferos. Sin embargo, el protagonismo lo tienen los insectos, entre los que predominan las avispas, polillas, mariposas, escarabajos, abejas, entre otros. Siendo estas últimas, las responsables de polinizar entre el 60-70% de las flores del mundo, incluyendo casi 900 cultivos alimenticios, tales como manzanas, paltas, pepinos y calabazas (Brauman & Daily, 2014). En Chile, por ejemplo, los cultivos de arándanos, paltas y almendras dependen en su totalidad de la acción polinizadora de las abejas domésticas (Fraunhofer Chile Research, 2015).

Por otro lado, desde 1970 las abejas domésticas han sido utilizadas como bioindicadores ambientales de contaminantes, tales como: metales pesados, pesticidas y radionucleidos. En particular durante el proceso de recolección de néctar y producción de miel, las abejas están expuestas constantemente a la acción de contaminantes presentes en la cercanía de las colmenas, desde primavera hasta otoño, en un área que puede ser tan extensa como 7 km a la redonda (casi 40 km<sup>2</sup>). Así, varias características etológicas y morfológicas, como fácil crianza, omnipresencia, alta tasa de reproducción, alimentación natural, ciclo biológico lacónico y amplio rango de vuelo (Porrini, y otros, 2003), hacen de la abeja doméstica un indicador ambiental confiable. Las alteraciones químicas del medio ambiente en el que viven

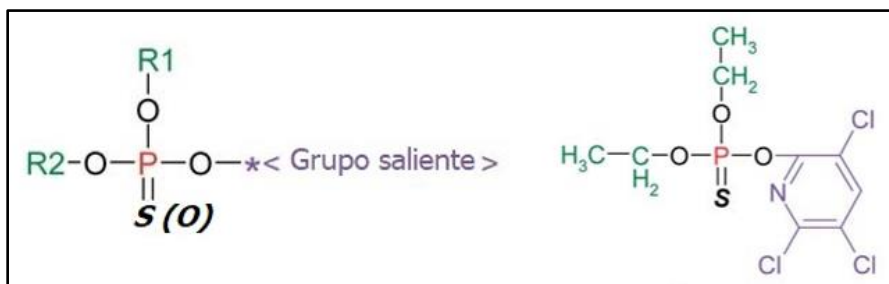
las abejas se evidencian a través de dos parámetros: (1) la mortalidad, principalmente causada por los residuos de pesticidas y, (2) la presencia en sus cuerpos o en productos de colmena de sustancias residuales, como metales pesados, radionucleidos y pesticidas, que pueden ser detectados mediante diferentes tipos de análisis químicos (Bargańska, Ślebioda, & Namieśnik, 2015).

Por ende, los beneficios más importantes y a su vez, en parte ignorados, para la vida humana y el medio ambiente que las abejas pueden ofrecer son: el mantenimiento de la biodiversidad floral y su rol como bioindicadores de contaminación ambiental.

## **1.2. Pesticidas, uso y regulación en Chile.**

Desde la antigüedad, las civilizaciones humanas han tratado de aplicar enfoques más efectivos y rápidos para cultivar y preservar sus recursos alimentarios. El cultivo de vegetación venenosa y nutritiva en el mismo lugar; así como el uso de azufre elemental y derivados, son un claro ejemplo de enfoques primitivos como protección contra insectos. Estos métodos fueron utilizados por varios milenios hasta el comienzo de la era de los pesticidas sintéticos, donde en 1939 Paul Müller, redefinió los usos del diclorodifeniltricloroetano sintetizado, más conocido como DDT para ser utilizado como insecticida. Sin embargo, este auge no duraría mucho, ya que en 1962 el libro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson, pondría en evidencia los efectos nocivos de este compuesto. (Abubakar, y otros, 2020)

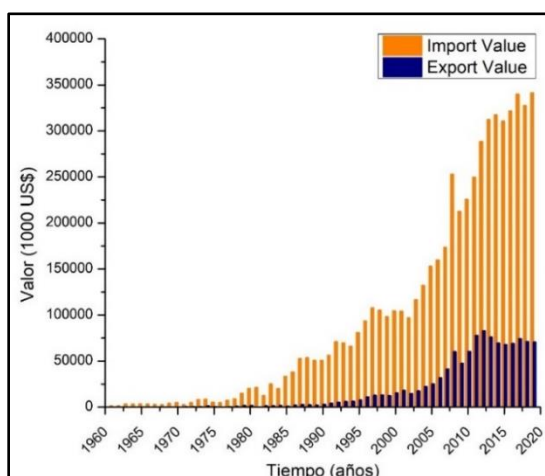
Una de las definiciones de pesticida es, entonces, cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier peste (Environmental Protection Agency, 2012). En particular, los insecticidas son un tipo de pesticida -al igual que los acaricidas, fungicidas o herbicidas- utilizados para controlar insectos ya sea, matándolos o evitando que participen en comportamientos indeseables o destructivos para el cultivo. A su vez, estos pueden ser clasificados en base a su estructura o modo de acción: por ejemplo, el clorpirifos (figura 1), además de ser un insecticida, acaricida y miticida; es un pesticida organofosforado y, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa. (Environmental Protection Agency, 2021)



**Figura 1.** A la izquierda la estructura química general de los insecticidas organofosforados y a la derecha la estructura química del insecticida clorpirifos.

Dentro de sus aplicaciones, a nivel nacional el clorpirifos se suele utilizar para matar insectos principalmente en frutas y semillas, tales como: almendros, cerezos, ciruelos, manzanos, perales, uva de mesa, maravilla, entre otros (Servicio Agrícola Ganadero, 2021).

Entre el año 2000 y 2017 las exportaciones agrícolas y agroindustriales en Chile tuvieron un incremento notable en diversidad y volumen (Pérez Silva & Valdés, 2019), posicionando esta actividad económica como la tercera más importante – solo después de la minería y la industria manufacturera -, con un total de \$6.559 millones de dólares anuales durante 2021 en exportación de frutas como las antes mencionadas (Banco Central, 2022). Este modelo agroexportador se caracteriza principalmente por dos factores: la producción industrial de monocultivo agrícola, como con la palta y, el uso indiscriminado y masivo de agroquímicos como con pesticidas y fertilizantes; exigiendo, por tanto, una importación cada vez mayor de estos productos para poder suplir las demandas de exportación. (figura 2)



**Figura 2.** Gráfico de importación y exportación de pesticidas en Chile desde el año 1960 hasta el año 2019, en miles de dólares. (Food and Agricultural Organization of the United States, 2022)

Si bien estos insecticidas son utilizados para aumentar la producción agrícola son también conocidos por provocar efectos secundarios altamente tóxicos en humanos e insectos no

diana y, su persistencia ambiental puede incluso generar bioacumulación en ciertas especies de importancia como las abejas (Torres-Palma & Serna-Galvis, 2018) (Mahajan, Verma, Chandel, & Chatterjee, 2021). Por ello en 2020 se prohibió el uso y comercialización de clorpirifos en Europa (European Commission, 2022) y, recientemente a finales de 2021, también en Estados Unidos, para usos agrícolas. (Environmental Protection Agency, 2021). Sin embargo, en Chile siguen existiendo 12 formulaciones cuyo principio es el clorpirifos autorizadas por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), organismo encargado de regular, restringir o prohibir la fabricación, importación, exportación, distribución, tenencia, venta y aplicación de plaguicidas de uso agrícola en el país. Y recién este año, durante el mes de febrero, se ha cancelado el uso del producto formulado Lorsban (que contiene un 75% p/p de clorpirifos) teniendo hasta noviembre del 2022 permitido el uso, distribución, exportación o venta. Por otra parte, en Chile existe una regulación para el control de residuos de pesticidas en productos alimenticios adoptada del Codex Alimentarius Internacional. En su última actualización, la resolución exenta Nro. 892 del 22 de octubre de 2020 del ministerio de salud, estipula los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas permitidos en alimentos para consumo humano, siendo para el clorpirifos entre 0,01 mg/kg y 2 mg/kg en distintas frutas, verduras y carnes (Ministerio de Salud, 2021). Sin embargo, en Chile, las matrices ambientales como el aire, suelo, agua para riego, no son reguladas ni monitoreadas para detectar residuos de plaguicidas (Coria & Elgueta, 2022).

### **1.3. Exposición de abejas a pesticidas y sus efectos.**

La contaminación del medio ambiente por sustancias tóxicas está relacionada tanto a la industrialización como a la agricultura intensiva. Los xenobióticos alcanzan los ecosistemas acuáticos y terrestres desde descargas y fugas de industrias, desechos del consumidor y basura urbana, escorrentía agrícola y forestal y, derrames accidentales. Algunas de estas sustancias, debido a su alta lipofiliidad, se acumulan en el tejido animal pudiendo afectar la habilidad de reproducción y desarrollo y, la capacidad de sobrellevar muchos otros factores de estrés en el ambiente al deprimir el sistema nervioso, endocrino o inmune. Por ende, es importante estimar el destino ambiental y los efectos eco-toxicológicos de distintos xenobióticos en especies características para cada ecosistema (Devillers, 2002)

Para las abejas domésticas, la ruta y forma de exposición a un plaguicida dependerá en gran medida de la formulación, del método de aplicación, de las propiedades fisicoquímicas y la persistencia del plaguicida en el ambiente, de las condiciones climatológicas y también, del comportamiento y preferencias de la misma abeja durante el pecoreo (Botías & Sánchez-Bayo, 2018).

Un producto formulado, es la mezcla final entre un ingrediente activo -en este caso un pesticida que controla una plaga-, un portador como un solvente o arcilla mineral y, otros ingredientes, como estabilizadores, protectores, colorantes o productos químicos que mejoran o realzan la actividad del pesticida (Fishel, 2010). En Chile, existen 88 denominaciones de formulaciones de plaguicidas adoptadas desde 2009 para uso agrícola. Específicamente, clorpirifos se comercializa como Polvo Mojable (WP), Concentrado Emulsionable (EC), Suspensión Concentrada (SC) y Granulado (GR) (Servicio Agrícola Ganadero, 2009).

El método de aplicación del plaguicida sobre el cultivo depende netamente de la formulación del plaguicida y este puede ser mediante un espray, una neblina, humo o en seco -directo al suelo o a la semilla- (Kumar, Singh, & Kodigenahalli Nagarajaiah, 2020). Por ejemplo, las formulaciones granulares no son solubles en agua, por ende, se usan directamente sobre el suelo o aguas superficiales como charcos, para evitar escorrentías. Aquellas formulaciones que sí son solubles en agua como los WP, pueden ser aplicados en forma de espray. Las formulaciones como los EC si bien no son directamente solubles en agua, también pueden ser aplicados como espray, ya que forman una emulsión con el aceite en el que son disueltos. Finalmente, las formulaciones SC pueden ser disueltas en agua o usadas como tratamiento para semillas, ya que su micro encapsulado -por una barrera polimérica- permite una liberación controlada o retardada, proporcionando mayor persistencia de los depósitos de pulverización en las superficies. (Matthews, Bateman, & Miller, 2014)

La persistencia de los plaguicidas está relacionada con la eficiencia de los procesos de transformación en condiciones naturales, mientras que el proceso de transporte está relacionado con las propiedades fisicoquímicas del compuesto. Por ende, si comparamos la persistencia de los plaguicidas, los organofosforados tienen una menor persistencia con relación a los organoclorados, ya que los procesos de transformación ambiental se efectúan

con mayor eficiencia sobre sus enlaces fosfoéster. (Narváez Valderrama, Palacio Baena, & Molina Pérez, 2012) Es más, en condiciones naturales, la degradación parcial de algunos plaguicidas como clorpirifos –que puede experimentar adsorción, hidrólisis, oxidación o fotólisis- genera subproductos de mayor toxicidad como el clorpirifos-oxon (CPFO) (Sud, Kumar, Kaur, & Bansal, 2020). Entre las propiedades fisicoquímicas de clorpirifos de la tabla 1 destacan los altos valores de  $\log k_{ow}$  y  $\log k_{oc}$ , los que a pesar de lo anterior expuesto, indican un alto potencial de acumulación en el suelo y en la biota.

**Tabla 1.** Resumen de las propiedades químicas y físicas del insecticida clorpirifos (Edwards, 1975)

<i>Propiedades</i>	<i>Parámetros a 20°C</i>
<i>Nombre IUPAC</i>	Fósforotioato de O,O-dietilo y de O-3,5,6-tricloro-2-piridilo
<i>Fórmula Química</i>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
<i>Masa Molecular</i>	350,6 g/mol
<i>Número CAS</i>	2912-88-2
<i>Solubilidad en agua</i>	1,05 mg /L
<i>Punto de ebullición</i>	42°C
<i>Presión de vapor</i>	1,43 mPa
<i>Log kow</i>	4,7
<i>Log koc</i>	3,73 g/ml
<i>Constante de Henry</i>	0,478 Pa•m <sup>3</sup> /mol

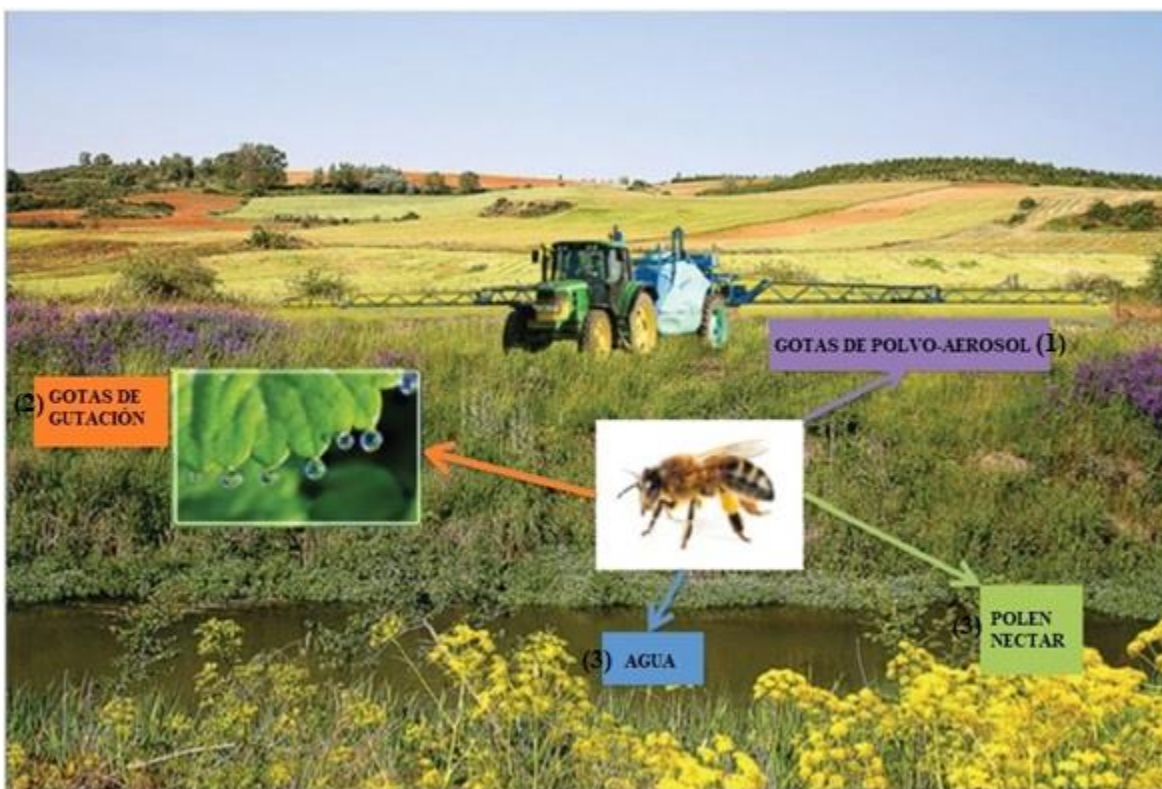
Entonces, la unidad de medida que permite evaluar este parámetro se conoce como vida media, es decir, la velocidad a la cual el plaguicida se descompone en diferentes matrices. En general, cuanto más larga sea la vida media, mayor será el potencial de movimiento del pesticida en cuestión (Mandal, y otros, 2020). Por ende, la persistencia de clorpirifos (tabla 2) depende principalmente de factores climáticos como la temperatura, precipitaciones, radiación y corrientes de aire y, de cómo estos interaccionan entre sí (Edwards, 1975).

**Tabla 2.** Persistencia de clorpirifos en diferentes matrices. (Mackay, Giesy, & Solomon, 2014)

<i>Matriz</i>	<i>Condición</i>	<i>Clorpirifos (días)</i>
---------------	------------------	---------------------------

<i>Suelos</i>	Cond. Aeróbicas	19 – 297
	Cond. Anaeróbicas	78 – 171
<i>Follaje</i>	Superficie	1 – 7
<i>Sedimentos</i>	Cond. Aeróbicas	20 – 24
	Cond. Anaeróbicas	58 – 223
<i>Agua</i>	pH 5-9	1.5 – 142
	pH < 5	16 – 210
	pH > 9	0.1 – 10

Considerando entonces todos los factores por los que se puede ver afectada la ruta de exposición de las abejas domésticas a los plaguicidas como clorpirifos, existen tres principales vías de exposición: por contacto directo, por contacto indirecto y por ingesta, tal como se muestra en la figura 3 (Renzi, 2013).



**Figura 3.** Durante el pecoreo las abejas se exponen a plaguicidas mediante tres rutas: (1) por contacto directo con aerosoles y/o partículas suspendidas en el aire; (2) por contacto indirecto con aerosoles y/o partículas suspendidas en superficies de plantas tratadas y (3) por la ingesta de polen, néctar o agua contaminada; (Sánchez-Bayo & Goka, *Impacts of pesticides on honey bees*, 2016)



La contaminación por contacto directo o por pulverización aérea es una de las formas más comunes de exposición de las abejas a plaguicidas, las cuales pueden contaminarse mientras sobrevuelan un campo de cultivo durante un tratamiento de pulverización. Esto ocurre principalmente por condiciones climáticas desfavorables, siendo las corrientes de viento el factor más importante a considerar, ya que las gotas de aerosol y polvo generado durante la aplicación pueden ser arrastradas por cientos de metros afectando incluso la vegetación circundante y, por ende, sumando una fuente adicional de contaminación residual para las abejas domésticas (Renzi, 2013) (Sánchez-Bayo & Goka, Impacts of pesticides on honey bees, 2016).

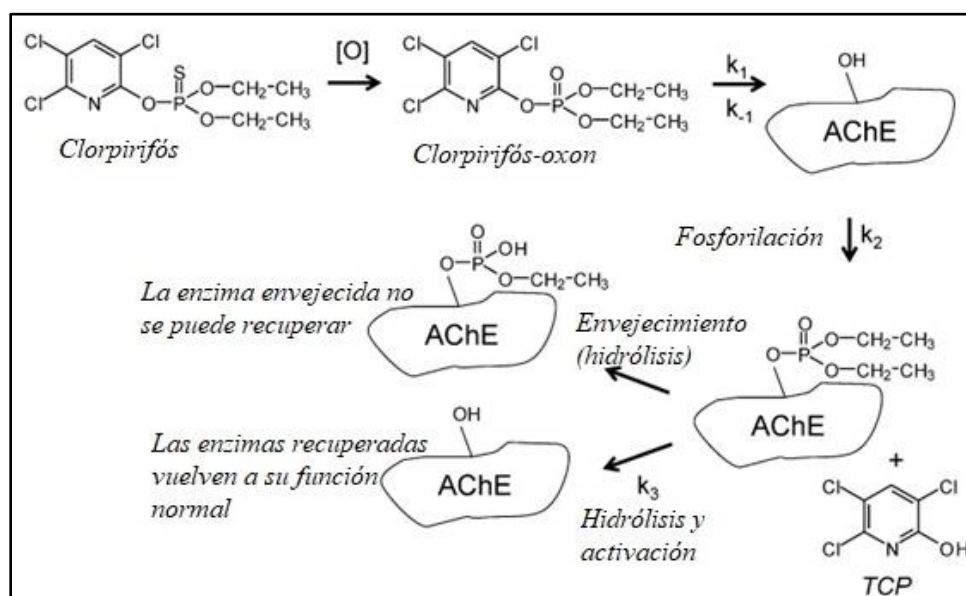
La exposición indirecta está relacionada directamente con la persistencia del pesticida, ya que algunos pueden persistir en la parte aérea de la planta manteniendo sus características tóxicas desde horas hasta incluso días después de ser aplicados. Otra vía de contacto indirecto es la dispersión de polvo generado a partir del uso de máquinas de aire comprimido en la siembra de maíz, donde las semillas son tratadas con plaguicidas. Estos residuos pueden incluso llegar al polen o néctar y eventualmente estar presentes en las gotas de gutación (Renzi, 2013).

Finalmente, la mayoría del tiempo las abejas domésticas están expuestas a plaguicidas mediante la ingesta de residuos encontrados en polen y néctar de plantas contaminadas, ya sea de cultivos tratados o de los alrededores. Estos residuos son llevados a las colmenas donde serán almacenados en forma de miel o pan de abeja, para luego formar parte de la alimentación de las larvas y de la abeja reina, afectando en igual medida a toda la colmena. Además de la comida, las abejas domésticas pueden ingerir agua contaminada de riachuelos, arroyos y charcos de las áreas agrícolas cercanas, agua que utilizan para mantener su temperatura corporal bajo control. (Sánchez-Bayo & Goka, Impacts of pesticides on honey bees, 2016)

Hay que tener en cuenta además que, a través de las diversas vías de exposición en el medio ambiente, las abejas domésticas no se ven amenazadas solo por uno o dos productos, sino por cócteles de muchos plaguicidas (Sánchez-Bayo & Goka, Impacts of pesticides on honey bees, 2016). Esta constante exposición que sufren las abejas domésticas a una gran variedad de plaguicidas, especialmente insecticidas como clorpirifos, conllevan a una

sobreestimulación en el sistema nervioso central, que aún a dosis como microgramos, puede producir convulsiones, parálisis e incluso la muerte (Botías & Sánchez-Bayo, 2018).

Los insecticidas OP más utilizados contienen un átomo de azufre unido al fósforo - como el insecticida clorpirifos- y necesitan ser bioactivados metabólicamente para ejercer su actividad biológica (o tóxica), ya que solo los compuestos con un enlace O=P son efectivos inhibidores de la AChE. Esta bioactivación consiste en una desulfonación oxidativa mediada por ciertas enzimas que conducen a la formación de un “oxon” o análogo del oxígeno del insecticida padre (figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática del mecanismo de acción de clorpirifos en la sinapsis nerviosa (Giesy & Solomon, 2014)

Por ende, tanto *in vivo* como en el ambiente CPF se transforma o activa en clorpirifos-oxon (CPFO), que es más reactivo con AChE (Mackay, Giesy, & Solomon, 2014). Como resultado de esta inhibición, la acetilcolina acumulada en la sinapsis causa una estimulación repetida e incontrolada del axón post sináptico. La interrupción del sistema nervioso que resulta es el efecto secundario que causa la muerte de la abeja (Giesy & Solomon, 2014). La reactivación de la AChE se puede lograr a través de una hidrólisis en agua sin embargo puede tomar varias horas e incluso días, lo que hace que esta acción sea persistente (Bloomquist, 2009).

#### 1.4. Ensayos de toxicidad y bioacumulación o toxicidad dependiente del tiempo.

Como se mencionó previamente, las abejas domésticas son uno de los grupos más utilizados como biomarcadores para evaluar el efecto adverso de agentes contaminantes, como metales pesados, plaguicidas y radionucleidos, en el ecosistema. Por esto, desde la década de 1980, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha desarrollado cerca de 150 métodos de prueba utilizados internacionalmente por los gobiernos, la industria y laboratorios independientes, para identificar y caracterizar los potenciales peligros de una amplia gama de productos químicos, en diferentes grupos objetivos como por ejemplo, el comportamiento e interacción de los pesticidas con peces, daphnias o abejas domésticas (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, 2017).

La ciencia que estudia estos efectos adversos sobre las partes que componen un ecosistema se denomina ecotoxicología. Esta rama estudia las principales características de los compuestos químicos que las hacen peligrosas para el ambiente, entre ellas su toxicidad, su persistencia en el ambiente y su potencial de bioacumulación (Planes & Fuchs, 2015). La toxicidad de los pesticidas se mide por valores de toxicidad aguda tópica y oral, expresada en dosis letal media ( $DL_{50}$ ), es decir, la cantidad de plaguicida que causa la muerte del 50% de los individuos expuestos al pesticida en ensayos de laboratorio de 24 o 48 horas. Aquellas dosis por debajo de la  $DL_{50}$  del animal, se consideran como dosis subletales y también pueden causar la mortandad en cierta proporción de individuos. En las abejas, la  $DL_{50}$  se expresa generalmente como la masa de sustancia administrada por animal sometido al ensayo (Botías & Sánchez-Bayo, 2018). Entonces, usando como referencia la  $DL_{50}$  por oral, los pesticidas pueden ser clasificados como no tóxicos, moderada o altamente tóxico, de acuerdo con los límites indicados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación según toxicidad de pesticidas. (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 2014).

<b>Clasificación</b>	<b>Según <math>DL_{50}</math> por vía oral (<math>\mu\text{g}/\text{abeja}</math>)</b>
<i>Prácticamente no tóxicos</i>	$DL_{50} > 11$
<i>Moderadamente tóxicos</i>	$10,9 < DL_{50} < 2$
<i>Altamente tóxicos</i>	$DL_{50} < 2$

Los insecticidas organofosforados como clorpirifos son considerados como altamente tóxicos, con  $DL_{50}$  incluso a nivel de ng/abeja (Botías & Sánchez-Bayo, 2018). En Chile, los residuos de este insecticida son uno de los más encontrados en ciertos vegetales como lechuga, albahaca y espinaca (Calderon, y otros, 2022) y, en subproductos apícolas como miel, polen o cera, con concentraciones que varían entre 1 y 10 ng/g o incluso hasta 180 ng/g (Balsebre Cajiao, 2018).

En la tabla N°4 se resumen las dosis letales media publicadas para clorpirifos basadas en el consumo de una abeja adulta en un ensayo oral agudo de entre 24-48 horas en laboratorio.

**Tabla 4.** Dosis letal media oral aguda en ng/abejas del insecticida clorpirifos.

<i>Plaguicida</i>	<i>DL<sub>50</sub> Oral Aguda (µg/abejas)</i>	<i>Referencia</i>
<i>Clorpirifos</i>	0,10	(Li, y otros, 2017)
	0,12	(World Health Organization, 2015)
	0,24	(Sánchez-Bayo & Goka, 2014)
	0,25	(Chmiel, Daisley, Pitek, Thompson, & Reid, 2020)
	0,36	(British Crop Production Council, 2011)
<i>Promedio</i>	0,21	

La evaluación de las dosis o concentraciones letales son una herramienta muy útil para comparar las toxicidades de diferentes analitos y diferentes formulaciones de plaguicidas. Sin embargo, en los cultivos de campo, las dosis de pesticidas más bajas generalmente se producen después de la aplicación inicial, ya que se degradan por diversos factores abióticos como la lluvia, la temperatura y la luz solar. De este modo, en dichos ambientes, los insectos pueden estar expuestos a concentraciones traza o subletales de este insecticida, pudiendo experimentar efectos relacionados a estos mismos en un mediano a largo plazo (Franca, Breda, Barbosa, Araujo, & Guedes, 2017). Si, la  $DL_{50}$  promedio de clorpirifos corresponde a 0,21 µg/abeja o aproximadamente 2,1 µg/g, cualquier dosis por debajo de esta concentración, ya sea 1/10, 1/50 o incluso 1/100, pueden ser consideradas como dosis subletales y producir efectos adversos en el comportamiento individual o social de la abeja cuando se expone por períodos prolongados de tiempo al insecticida en cuestión (Balsebre Cajiao, 2018). Es por esto que, en 2017, se desarrolla un nuevo estudio de toxicidad

oral crónica, cuya información generada revela los efectos toxicológicos producidos bajo las condiciones antes mencionadas.

Los parámetros que se evalúan en estos ensayos son principalmente: mortalidad, anomalías de comportamiento, concentración o dosis letal media ( $DL_{50}$ ), dosis dietética letal media ( $DDL_{50}$ ), concentración sin efecto observado (NOEC) y dosis dietética sin efecto observado (NOEDD) (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, 2017). Además, se pueden comparar los resultados obtenidos del estudio de toxicidad agudo -donde las abejas pueden morir rápidamente después de la aplicación del pesticida en cuestión-; con los de exposición crónica – donde a dosis subletales se puede ver afectado el comportamiento de pecoreo, salud y, en consecuencia, el correcto y normal desarrollo de las colonias de abejas (Organization for Economic Co-operation and Development, 2003).

Una dosis o concentración subletal, por ende, se define como la inducción de una no aparente mortalidad en la población experimental. En general, las concentraciones por debajo de la  $DL_{50}$  son consideradas subletales. Los efectos subletales están definidos como efectos biológicos, fisiológicos, demográficos o conductuales en individuos o poblaciones que sobreviven a la exposición de una sustancia tóxica a dosis letales o subletales, y estos se pueden manifestar como una reducción de la vida media, tasas de desarrollo, crecimiento poblacional, fertilidad, fecundidad, cambios en la proporción de sexos, deformidades, cambios en el comportamiento, alimentación, búsqueda y oviposición. Así los pesticidas pueden ejercer efectos sutiles o evidentes que deben tenerse en cuenta al momento de examinar su impacto total. (Franca, Breda, Barbosa, Araujo, & Guedes, 2017)

Dichos efectos pueden variar sustancialmente dependiendo de la dosis diaria, tiempo de exposición y edad de la abeja. Por ejemplo, insectos y otros animales envenenados con dosis acumulativas de más bajas concentraciones, como con los neonicotinoides, no mueren inmediatamente sino más bien después de una exposición prolongada, en oposición a la letalidad aguda inducida por dosis acumulativas más altas en períodos más cortos. Este fenómeno se ha denominado como “toxicidad acumulativa reforzada con el tiempo”, y ocurre después de que el animal en cuestión ha superado un nivel crítico de daño celular (Simon-Delso, San Martin, Bruneau, & Hautier, 2018).

Así, el fundamento clásico en toxicología que dice “la dosis hace el veneno” pasa a segundo plano cuando Fritz Haber establece que el tiempo de exposición determina la dosis

tóxica efectiva. La ley de Haber establece que la dosis que causa un efecto tóxico ( $E$ ) es el producto de la dosis aplicada ( $d$ ) y el tiempo de exposición ( $t$ ):  $E = d \cdot t$ . Esta expresión luego fue analizada y explicada matemáticamente por Druckery y Küpfmüller; asentando las bases para una mejor comprensión de la toxicidad de las sustancias químicas en general, y sobre todo de los pesticidas (Bommuraj, Chen, Birenboim, Barel, & Shimshoni, 2021).

Dado que la duración de la exposición no es menos importante que la dosis, y como se indicó, podría reforzar la toxicidad a dosis constantes, es de suma importancia caracterizar completamente la toxicidad dependiente del tiempo de cada plaguicida en una amplia gama de concentraciones, tal como lo indica EFSA, en su reporte del año 2013 (Bommuraj, Chen, Birenboim, Barel, & Shimshoni, 2021) (European Food Safety Authority, 2015).

### 1.5. Métodos analíticos de extracción empleados para determinar pesticidas.

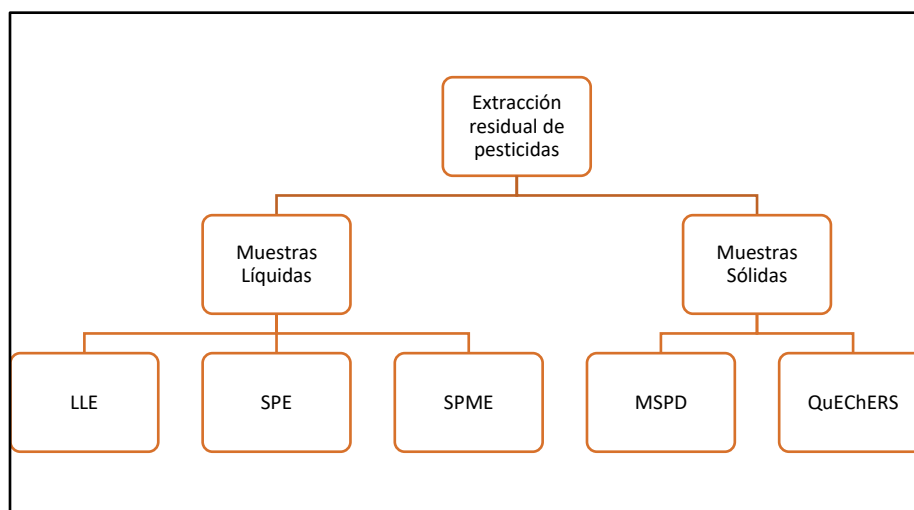
El análisis de contaminantes en matrices ambientales siempre es una tarea difícil; no solo por la complejidad de las muestras, sino que también por las bajas concentraciones a las que estos se encuentran presentes. Considerando estas dos variables, los protocolos para preparar muestras convencionales suelen no ser adecuados para obtener extractos limpios y enriquecidos (Ramos, 2012). Tal como se resume en la figura 5, luego del muestreo y preservación de las muestras, el primer paso en estos procesos usualmente consiste en una extracción exhaustiva, sin embargo, la esencia no selectiva de este paso hace obligatoria la subsiguiente purificación del extracto obtenido, antes de la determinación instrumental final, a menos claro, que tanto la separación como la detección sean altamente selectivas. (Barcellos Hoff & Mara Pizzolato, 2018)



*Figura 5. Diagrama del proceso de tratamiento de muestras.*

Los tratamientos analíticos involucrados tanto en el proceso de extracción como de purificación son usualmente llevados a cabo de forma discontinua, lo cual afecta significativamente el rendimiento y el costo del análisis (en términos de tiempo y consumo de reactivos), haciendo que el procedimiento sea más susceptible a la contaminación y la degradación del analito y, a menudo, resultando en la producción de residuos relativamente grandes (Ramos, 2012). Estas características explican por qué la preparación de la muestra es la responsable de 2/3 del tiempo total del análisis y más importante aún, es considerada la primera fuente de errores y discrepancias entre laboratorios (Barcellos Hoff & Mara Pizzolato, 2018). Por ende, el proceso de preparación de una muestra debe ser capaz de realizar, idealmente, la extracción y purificación de forma simultánea.

Dentro de los métodos de extracción más utilizados para el tratamiento de residuos de pesticidas (figura 6), ya sea en alimentos o en abejas y sus subproductos, se encuentra la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE), la micro-extracción en fase sólida (SPME), el método QuEChERS y la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)



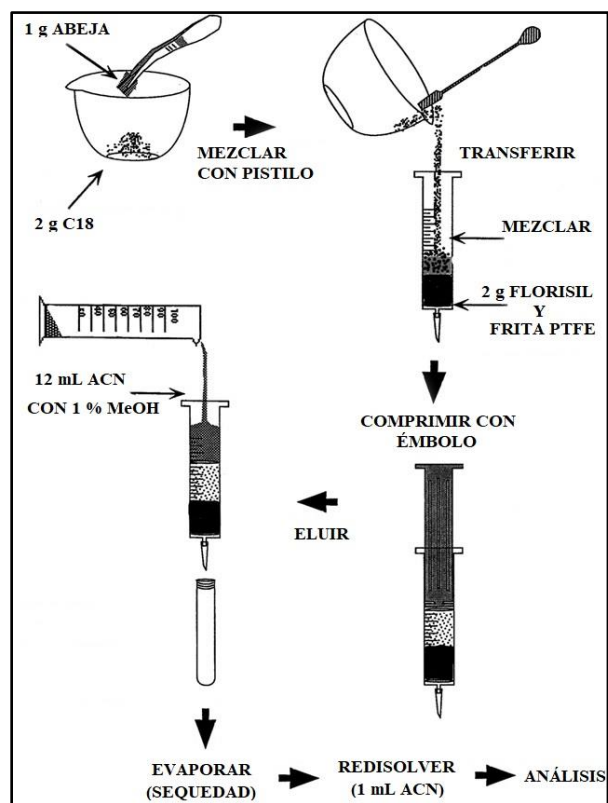
**Figura 6.** Diagrama con las técnicas de extracción analíticas para residuos de pesticidas desde muestras líquidas y sólidas.

Dentro de las técnicas de extracción de muestras líquidas, se encuentra la extracción líquido-líquido (LLE) siendo quizás, la técnica de extracción analítica más antigua y conocida para la extracción de residuos de pesticidas. Esta consiste en la extracción con un solvente orgánico inmiscible para luego ser centrifugada, concentrada o purificada antes del análisis final. Sin embargo, es un método laborioso que demanda tiempo y consumo de reactivos, además de la pérdida del analito debido a lo tedioso del procedimiento

experimental (Zhang, y otros, 2012) (Samsidar, Siddiquee, & Shaarani, 2017). Por otro lado, la técnica de extracción en fase sólida (SPE) es considerada un método conveniente por ser rápida y eficiente en el monitoreo de pesticidas en distintas formas y matrices. Sus principales ventajas son la reducción del tiempo de análisis, las bajas cantidades de solvente y la alta eficiencia en el descarte de sustancias interferentes. Sin embargo, aún presenta algunos inconvenientes como no poder elegir rápidamente los adsorbentes y disolventes de elución adecuados para el análisis multi-residual de un amplio rango de pesticidas con diferentes características fisicoquímicas, sin mencionar, el gasto adicional en el que se incurre al no poder reutilizar las columnas SPE (Zhang, y otros, 2012). La micro-extracción en fase sólida (SPME) combina el muestreo, la extracción, concentración e inyección de la muestra en un solo procedimiento, reduciendo así el uso de solventes orgánicos y complicaciones en el proceso, es decir, una miniaturización de la técnica SPE. No obstante, sigue siendo un procedimiento laborioso ya que el equilibrio entre la solución de la muestra y la fibra puede tomar mucho tiempo y necesitar condiciones de extracción rigurosas. Es más, estas fibras son caras y frágiles.

En cuanto a las técnicas de extracción de residuos de pesticidas sólidos, el método QuEChERS es el más reciente y uno de los más utilizados ya que es un procedimiento simple, menos laborioso y más amigable con el ambiente. Además, simplifica la extracción y limpieza en un solo paso durante el proceso de preparación de muestras otorgando así, resultados cuantitativos confiables (Zhang, y otros, 2012). Por otro lado, la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) además de poder analizar una amplia gama de analitos y matrices complejas, es de fácil ejecución y combina la extracción y la limpieza en un procedimiento de un solo paso (figura 7). También puede ser considerada como una técnica a microescala -en comparación a las técnicas convencionales- ya que generalmente utiliza pequeñas cantidades de muestra y bajos volúmenes de solvente, con valores entre 0,1 a 5,0 g y, 5 a 20 mL, respectivamente, lo cual concuerda con los principios de la química verde (Barcellos Hoff & Mara Pizzolato, 2018). La gran ventaja de esta técnica es entonces, la simultánea y efectiva extracción de los analitos de interés y la limpieza del extracto. Este proceso disminuye el número de etapas de la metodología analítica y, por ende, el error experimental total del método (Zhang, y otros, 2012) (Ramos, 2012).





*Figura 7. Diagrama del método de dispersión de matriz en fase sólida propuesto para la extracción de pesticidas desde abejas.*

La aplicación de MSPD en la determinación de muestras sólidas ricas en grasa y pigmentos como los tejidos animales puede reducir el tiempo de análisis, aumentar el rendimiento, acortar el tiempo de respuesta, reducir el uso de solventes y la producción de residuos, y eliminar la formación de emulsiones que se observan en las extracciones clásicas, mientras se provee de resultados iguales o mejores que los métodos tradicionales (Balsebre Cajiao, 2018).

### 1.6. Métodos de cuantificación y detección de residuos de pesticidas.

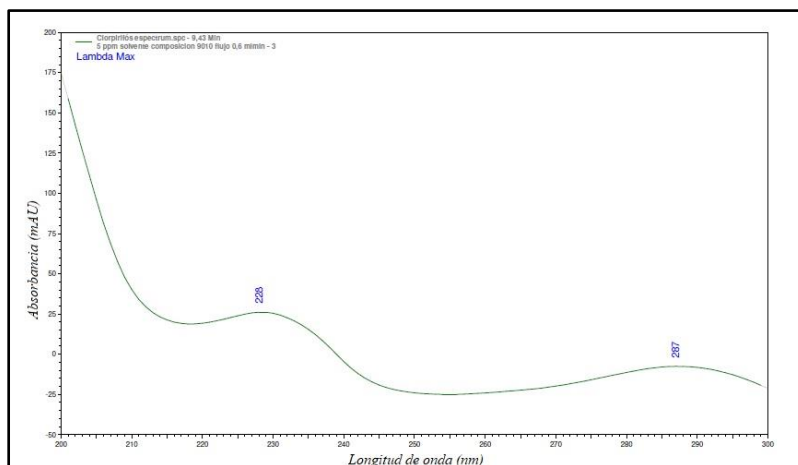
En Chile, los LMR establecidos para clorpirifos varían entre 0,01 y 2 mg/kg para diferentes frutas y vegetales. Por ende, para medir a niveles traza se necesitan métodos analíticos altamente selectivos, sensibles y precisos (Grimalt & Dehouck, 2016).

Las técnicas de separación más utilizadas para estos fines son la cromatografía gaseosa (GC) y la cromatografía líquida (LC), ambas acopladas a detectores MS/MS. Sin embargo, si bien estas poseen bajos límites de detección y permiten identificar con certeza los analitos de interés, son de alto costo en equipamiento y requieren de personal capacitado para su

utilización. Por otra parte, las técnicas cromatográficas asociadas a detectores específicos, como GC con detector de captura de electrones (ECD), con ionización de llama (FID) o de nitrógeno-fósforo y, la cromatografía líquida (LC) con detectores ultravioleta (UV), de arreglo de diodos (DAD), fluorescencia o electroquímica, a pesar de presentar una menor certeza en la identificación de los compuestos, pueden ser efectivamente utilizadas como métodos de *screening* para grandes números de muestras. Además, tienen bajos límites de detección y una certeza de identificación significativa en aquellas de alta especificidad en la detección -como la cromatografía con DAD. Asimismo, gracias a su menor costo de equipamiento y menor dificultad de uso se vuelven una buena alternativa para la rápida determinación de ciertos pesticidas de amplio uso, como lo es el insecticida clorpirifos. (Balsebre Cajiao, 2018)

En particular, la cromatografía líquida de alta resolución es utilizada como un método de determinación y a la vez de separación para plaguicidas de variada polaridad y no volátiles y/o térmicamente lábiles. Sin embargo, es importante considerar una serie de factores que influyen en el tiempo de retención del analito, los que pueden ser modificados con el fin de realizar esta determinación, por ejemplo, la fase estacionaria, la composición y el flujo de la fase móvil, entre otros (Samsidar, Siddiquee, & Shaarani, 2017).

Cuando la LC está acoplada a un detector DAD, nos permite obtener como resultado múltiples espectros a diferentes longitudes de onda para una sola muestra en tan solo 0,1 segundos, a diferencia del detector UV que solo puede detectar un espectro. De esta forma, con el DAD se puede comprobar que en el tiempo de retención del insecticida únicamente está presente dicha sustancia y no hay presencia de interferentes que coeluyan al mismo tiempo del analito de interés (figura 8). (Harvey, 2021)



**Figura 8.** Espectro UV del insecticida clorpirifos.

Teniendo en consideración lo expuesto, se propone a continuación un protocolo para la determinación de la bioacumulación o toxicidad dependiente del tiempo del insecticida clorpirifos en abejas domésticas de la comuna de peumo, mediante su exposición a un ensayo de toxicidad oral crónico por diez días y la posterior extracción del analito a través del método de dispersión de matriz en fase sólida y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos.

## **2. HIPÓTESIS**

La exposición oral crónica de abejas melíferas obreras al insecticida clorpirifos, genera la bioacumulación de este compuesto en los insectos a niveles trazas cuantificables mediante un método analítico basado en cromatografía líquida.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general.**

Evaluar la acumulación del insecticida clorpirifos suministrados vía oral crónica en abejas del tipo *Apis Mellifera* mediante un método analítico basado en MSPD asociado a cromatografía líquida acoplada a DAD.

### **3.2. Objetivos específicos.**

1. Validar un método analítico basado en cromatografía líquida para la determinación del insecticida clorpirifos en abejas melíferas.
2. Implementar el método analítico validado para la extracción de clorpirifos desde abejas melíferas mediante la dispersión de matriz en fase sólida.
3. Verificar, bajo condiciones de laboratorio, la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) del insecticida clorpirifos en abejas melíferas.
4. Plantear un diseño experimental que permita exponer abejas domésticas en forma crónica por diez días al insecticida clorpirifos, mediante su dosificación por vía oral.
5. Determinar la concentración del insecticida clorpirifos en las abejas melíferas expuestas de forma crónica, mediante el método de dispersión de matriz en fase sólida asociado a cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos.
6. Evaluar signos clínicos en abejas melíferas durante el período de exposición crónica al insecticida clorpirifos, tales como: comportamiento, vuelo, color, morfología y mortalidad, entre otros.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Estándares.

- Estándar Analítico Clorpirifos Pestanal<sup>TM</sup>, Sigma Aldrich, pureza:  $\geq 98.0\%$ , lote: BCCC1983, CAS: 2921-88-2, vence: 01/08/2024.
- Estándar Analítico Clorpirifos, Dr. Ehrenstorfer GmbH, pureza:  $\geq 99,6\%$ , lote: G989695, CAS: 2921-88-2, vence: 06/11/2024.

### 4.2. Solventes.

- Acetonitrilo para cromatografía líquida; LiChrosolv<sup>®</sup> obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,9\%$ , CAS: 75-05-8.
- Agua para cromatografía líquida; LiChrosolv<sup>®</sup> obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,8\%$ , CAS: 7732-18-5.
- Metanol para cromatografía líquida; LiChrosolv<sup>®</sup> obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,8\%$ , CAS: 67-56-1
- N-Hexano para análisis, Emsure ACS obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania), CAS: 110-54-3.
- Agua destilada para análisis, obtenida de Salimax.

### 4.3. Reactivos.

- Sacarosa para análisis bioquímico según farmacopea, obtenido de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania), CAS: 57-50-1.
- Sorbente Selctrasorb<sup>®</sup> C18 para dispersión de matriz en fase solida (MSPD) obtenidos de UCT (Bristol. PA, USA).
- Columnas de limpieza para extracción en fase sólida (SPE): Enviro-clean<sup>®</sup> florisil (15 mL, 2 g) y Clean-Up<sup>®</sup> (15 mL, 2g), ambas obtenidas de la empresa UCT.
- Dimetoato 40 EC de concentración 40% p/v obtenido de Anasac Chile S.A.

### 4.4. Equipos.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (Lachrom Elite-Hitachi Modelo L-2300) con detector de arreglo de diodos (L-2400) y su respectivo software (EZchrom Elite).

- Rotavapor modelo RV 10 Basic con baño termostático modelo HB 10 Basic, ambos obtenidos de IKA.
- Colector de vacío para SPE (Manifold).
- Microcentrífuga de laboratorio modelo Z 207 M obtenida de Hermle Labortechnik GmbH.
- Sonificador modelo estándar, número de catálogo 621.06.003 obtenido de IsoLab Laborgeräte GmbH.
- Cilindro de CO<sub>2</sub> obtenido de GasLab SpA.
- Vórtex mixer modelo KMC-1300V obtenido de Vision Bionex.
- Balanza Analítica 250g/0,0001g marca Adam modelo PW254.
- Termohigrómetro digital, marca Veto modelo A6031000.

#### **4.5. Materiales.**

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A (Matraces de vidrio de 5-10-25 mL, viales de vidrio de 1,5 mL, vasos de precipitado de 100-200 mL, matraz Erlenmeyer esmerilado de 100 mL)
- Micropipetas 10-100 µL, 20-200 µL y 100-200 µL.
- Puntas para micropipeta
- Tubos de centrifuga o falcón de 15 y 50 mL.
- Tubos de microcentrifuga o Eppendorf de 1 y 2 mL.
- Pipeta de Pasteur plástica de 3 mL
- Mortero de cerámica con pistilo.

#### **4.6. Softwares.**

- Statgraphics Centurion XVI.
- OriginPro 8.5

## 5. MÉTODOS

El siguiente estudio toxicológico fue realizado con abejas de la especie *Apis Mellifera* recolectadas de la comuna de Peumo, sexta región del Libertador General Bernardo O'Higgins (Figura 9) durante el verano meridional en los meses de enero y febrero del año 2022. Las recolecciones se llevaron a cabo un día antes de comenzar el ensayo toxicológico entre 7 y 9 am, y fueron realizadas mediante la extracción aleatoria de marcos dentro de una misma colmena.



**Figura 9.** Ubicación de la comuna de Peumo, en la sexta región del Libertador Bernardo O'Higgins.

El ensayo analítico fue realizado en las dependencias de *Salimax, Calidad en Certificación y Control*, en un laboratorio con aire acondicionado, humidificador y control de la luz. Por consiguiente, las abejas fueron trasladadas desde la comuna de Peumo a la comuna de Quinta Normal en Santiago, antes del mediodía para evitar cambios abruptos en las condiciones climáticas.

## **5.1. Ensayos Analíticos.**

### **5.1.1. Preparación de Solución Stock.**

Se preparó una solución stock de 1000 µg/mL de un estándar de clorpirifos disuelta en acetonitrilo, a partir de la cual se prepararon las soluciones estándares de concentración intermedias necesarias para la validación del método.

### **5.1.2. Evaluación del efecto matriz.**

Para determinar la existencia de efecto matriz en la muestra, se evaluó la linealidad de las siguientes concentraciones 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,5 µg/mL y 1 µg/mL, en AcN y en presencia de un extracto de abeja blanco obtenido mediante MSPD.

A partir de los datos obtenidos de este análisis, se comparó la sensibilidad (pendiente de la recta de calibrado) de ambos calibrados y se determinó la existencia de efecto matriz, por lo que los parámetros analíticos de linealidad, límite de detección, cuantificación y recuperación se establecieron a partir de los resultados obtenidos en presencia del extracto de abeja obtenido mediante MSPD.

### **5.1.3. Método cromatográfico.**

A partir de las soluciones stock de 1000 µg/mL se prepararon otras intermedias con el fin de determinar los tiempos de retención y optimizar la separación cromatográfica del insecticida clorpirifos, tanto en solvente como en matriz.

Para la determinación del tiempo de retención, longitud de onda máxima y optimización del método cromatográfico, se prepararon soluciones intermedias de 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,5 µg/mL y 1 µg/mL en acetonitrilo. La separación analítica y el análisis fue realizado con una columna Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm en un cromatógrafo líquido de alta resolución (Lachrom Elite-Hitachi Modelo L-2300) con detector de arreglo de diodos (L-2400). Los parámetros optimizados fueron la temperatura, el volumen de inyección y el flujo y la composición de la fase móvil. Parámetros que finalmente quedaron establecidos a 25°C con inyecciones de 20 µL y flujo constante e isocrático de 0,6 mL/min y composición 90:10 de acetonitrilo:agua.



#### **5.1.4. Validación del método.**

El método fue validado mediante la obtención de los siguientes parámetros analíticos: (1) linealidad, (2) precisión, (3) Recuperación, (4) Límite de Detección y (5) Límite de Cuantificación. Se analizó también un blanco de macerado de abeja para comprobar la ausencia de interferencias en el tiempo de retención del insecticida o, cercanas a ella.

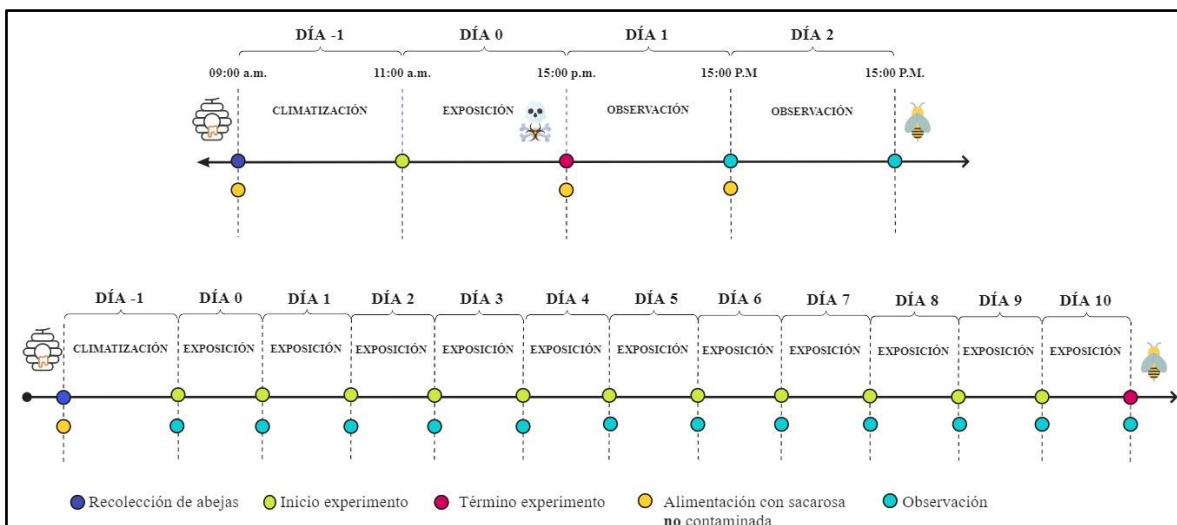
#### **5.1.5. Método de extracción de insecticidas en abejas (MSPD).**

Para la recuperación, se utilizó 1 g de abejas blanco no contaminadas fortificadas a tres niveles de concentración distintos -basados en los cálculos de LOD y LOQ en matriz- para determinar el rendimiento del método de extracción. El gramo de homogenizado de abeja fortificado se mezcló con 2 gramos de sorbente C18, en un mortero de cerámica hasta obtener una pasta semi seca. Esta pasta se trasvasió a una columna descartable con 2 g de adsorbente florisil y se cubrió con lana de vidrio silanizada. El lavado fue realizado con 10 mL de n-hexano y la extracción fue llevada a cabo con 12 mL de una mezcla de acetonitrilo con 1% de metanol. El volumen obtenido fue llevado a sequedad utilizando un rotavapor a 50°C y 200 rpm para posteriormente ser reconstituido con 1 mL de acetonitrilo. Con el objetivo de desprender y disolver los residuos de las paredes del balón de evaporación, éste se sonicó por 5 min a 20°C y la solución luego se centrifugó a 13.500 rpm por 15 min, para evitar introducir residuos no disueltos al sistema de inyección. Este proceso fue repetido tres veces para cada nivel de fortificación.

## **5.2. Ensayos toxicológicos.**

### **5.2.1. Diseño experimental de los ensayos toxicológicos orales agudo y crónico.**

La figura 10 presenta los diseños experimentales para evaluar la toxicidad oral aguda y crónica de clorpirifos en las abejas.



**Figura 10.** Diseño experimental del ensayo de toxicidad oral agudo (arriba) y crónico (abajo) en abejas domésticas.

En cada ensayo se evaluaron cinco grupos control denominados: (1) control positivo, (2) control negativo, (3) control solvente, (4) control evaporación y (5) control. Al primer grupo se le suministró una solución de sacarosa al 50% p/v contaminada con una determinada concentración de dimetoato, mientras que al segundo grupo se le alimentó solo con la solución de sacarosa. Al tercer grupo se le proporcionó una solución de sacarosa al 50% p/v, pero con un 2% de acetonitrilo. El cuarto grupo no contenía abejas en los contenedores ya que se utilizó para evaluar el porcentaje de evaporación de la solución de sacarosa. Finalmente, el grupo control incluye las cinco concentraciones evaluadas para la determinación de la  $DL_{50}$  en el ensayo de toxicidad oral aguda y las cinco concentraciones requeridas para el ensayo de toxicidad oral crónico.

### 5.2.2. Ensayo de exposición oral agudo y determinación de la $DL_{50}$ .

Los ensayos de toxicidad oral aguda son llevados a cabo para determinar la toxicidad inherente a cada pesticida en relación con las abejas domésticas en un período de 48 horas.

#### Principio del ensayo

Abejas adultas, en su mayoría (>80%) abejas obreras fueron expuestas a un rango de concentraciones del pesticida solubilizado en una solución de sacarosa al 50% p/v. Se registró la mortalidad diaria durante las 48 horas que dura el ensayo y se comparó con el control negativo. Se analizaron los resultados para calcular la  $DL_{50}$  al finalizar el estudio.

### **Validez del ensayo**

Para que el ensayo fuese válido, transcurridas las 48 horas la mortalidad promedio del grupo negativo no debe exceder el 10% y la  $DL_{50}$  del pesticida debe encontrarse dentro del rango estudiado.

### **Recolección de abejas**

La recolección de abejas se realizó la mañana anterior al inicio del experimento. Como la recolección fue realizada por un apicultor, este eligió un marco al azar de una colmena y capturó abejas desde el centro del marco en el cual había abejas de diferentes edades y castas.

### **Contenedores**

Los contenedores utilizados fueron de plástico, fáciles de limpiar y con orificios para una buena ventilación. Se agruparon de 10 abejas en cada contenedor.

### **Manipulación y alimentación**

El suministro de la solución de sacarosa contaminada y las observaciones fueron realizadas durante el día con luz artificial. La solución de sacarosa utilizada tenía una concentración óptima del 50% p/v. Luego del suministro de solución contaminada por 4 horas, la solución no contaminada fue suministrada de forma tal que las abejas tuvieron libre acceso a ella. Se utilizaron tubos eppendorf de 1.5 mL con orificios como comederos

### **Preparación de las abejas**

Las abejas fueron aclimatadas a las condiciones del laboratorio por 24 horas luego de su arribo. Una vez finalizado este proceso, fueron colocadas de forma aleatoria en los contenedores y pasaron por un proceso de inanición durante dos horas previo al suministro de la solución contaminada. El ensayo se realizó con aquellas abejas que no presentaron anomalías en el comportamiento.

### **Preparación de las dosis**

Como el pesticida no era soluble en agua, se diluyó en acetonitrilo. Las soluciones finales no superaron el 2% de solvente orgánico del total final suministrado.

Además de las soluciones contaminadas a distintas concentraciones, del control negativo y positivo, se realizó un control solvente para evaluar el efecto del solvente en las abejas durante el ensayo de toxicidad oral agudo.

### **Grupos control**

Para cumplir con los requerimientos estadísticos, se probaron cinco concentraciones del pesticida en cuestión junto con tres grupos control: positivo con dimetoato, negativo solo con la solución de sacarosa y solvente, con la cantidad de solvente añadido, 2% en este caso. Se hicieron triplicados de cada concentración, donde cada triplicado contaba con 10 abejas en su interior. La concentración del control positivo utilizada fue de 130 ng/abeja.

### **Administración de las dosis**

A cada grupo de abejas se le proporcionó un comedero con 200  $\mu$ L de una solución de sacarosa al 50% p/v contaminado con la concentración de pesticida a evaluar. Se monitoreó en el tiempo la cantidad de pesticida consumida por el grupo de 10 abejas mediante el masado del tubo eppendorf antes y después de suministrar la comida.

Una vez consumidos los 200  $\mu$ L y en un máximo de 4 horas, se cambia el contenedor con la solución contaminada por uno con una solución no contaminada de sacarosa al 50% p/v. Los contenedores se masan antes y después de ser suministrados para evaluar la concentración a la que realmente fueron expuestas las abejas.

### **Condiciones del ensayo**

El ensayo fue realizado en un laboratorio cerrado con aire acondicionado, humidificador y control de la luz. La temperatura se mantuvo a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , la humedad relativa entre 35 y 37% y la luz apagada durante todo el ensayo, excepto cuando se realizaban las observaciones.

### **Duración**

El ensayo se extendió por 48 horas después de consumida la solución con sacarosa contaminada.

## **Observaciones**

La mortalidad se registra una vez terminado el tiempo de suministro de solución contaminada (a las 4 horas) y luego a las 24 y 48 horas de exposición. También se registró la cantidad de alimento consumido en los mismos intervalos de tiempo antes mencionados.

Finalmente, se anotaron todos los comportamientos anormales observados durante las 48 horas que duró el ensayo.

### **5.2.3. Ensayo de exposición crónica a insecticidas y toxicidad reforzada en el tiempo.**

El ensayo de toxicidad oral crónico de 10 días en abejas melíferas fue basado en la guía N°245 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD).

Tal y como dice en la guía, para este ensayo se pueden usar tanto principios activos como productos formulados, sin embargo, en este caso se utilizó un estándar analítico de clorpirifos de pureza  $\geq 99,6\%$ , obtenido de Dr. Ehrenstorfer GmbH. Además, se empleó Dimetoato 40 EC, de concentración 40% p/v obtenido de Anasac Chile S.A como sustancia de referencia para verificar la sensibilidad de las abejas y la validez del sistema de estudio.

## **Principio del ensayo**

Abejas adultas, en su mayoría (>80%) abejas obreras fueron expuestas a un rango de concentraciones del pesticida solubilizado en una solución de sacarosa al 50% p/v. Se registró la mortalidad diaria y los comportamientos anormales durante los diez días que duró el ensayo. Los efectos crónicos fueron evaluados mediante la comparación con el control negativo. Se analizaron los resultados para calcular la  $DL_{50}$  y la  $DLA_{50}$  al finalizar el estudio.

## **Validez del ensayo**

Para que el ensayo fuese válido, transcurridos los diez días la mortalidad promedio del grupo negativo y del grupo solvente no deben exceder el 15%. De igual forma, la mortalidad promedio del grupo positivo debe ser mayor al 50% al finalizar el ensayo.

## Recolección de abejas

La recolección de abejas se realizó un día antes de comenzar el ensayo y no se utilizó ningún tipo de sedante en el proceso. Este procedimiento se realizó directamente desde los marcos de la colmena (Figura 11). Sin embargo, no se pudo garantizar la homogeneidad etaria ni la salud de las abejas recolectadas, ya que las colmenas están ubicadas en una zona agrícola de la comuna de Peumo con una alta cantidad de cultivos frutales en las cercanías pertenecientes a distintos agricultores. Una vez en el laboratorio, las abejas fueron aclimatadas por 24 horas a las condiciones del lugar y fueron alimentados con una solución de sacarosa al 50% p/v a libre disposición.



*Figura 11. Recolección de abejas domésticas de la comuna de Peumo .*

## Contenedores

Los contenedores utilizados fueron de plástico, fáciles de limpiar y con ventilación moderada (figura 12). Se colocaron grupos de 10 abejas por contenedor, donde cada uno contaba con el espacio suficiente para el libre movimiento de estas (mínimo 200 cm<sup>3</sup>).



*Figura 12. Contenedor plástico donde se realizaron los ensayos toxicológicos.*

### **Alimentación**

La alimentación tanto para el control, como para las sustancias de prueba y de referencia se elaboró a base de una solución de sacarosa al 50 % p/v.

### **Preparación de las soluciones**

Como el insecticida utilizado no era soluble en agua, se utilizó acetonitrilo como disolvente del pesticida. Por ende, las soluciones finales con las que se alimentaron las abejas contenían sólo un 2% de acetonitrilo total. Además, se adicionó un grupo control denominado como “control solvente” para evaluar el efecto del acetonitrilo en las abejas durante el ensayo toxicológico.

La solución stock fue almacenada a 4°C y se utilizó durante el período que duró el ensayo. Sin embargo, las soluciones con las que se alimentaron a las abejas fueron preparadas cada cuatro días y en el intertanto se mantuvieron refrigeradas junto con la solución madre.

### **Grupos control**

Se eligieron cinco concentraciones cincuenta veces menor (dosis subletales) que la  $DL_{50}$  obtenida a partir del ensayo de toxicidad oral agudo.

Cada concentración debió ser realizada en triplicado, conteniendo 10 abejas por contenedor por tratamiento.

### **Sustancia de Referencia**

Con el fin de evaluar la sensibilidad de las abejas y la confiabilidad del ensayo, se incluyó un grupo de referencia en el ensayo o también denominado *grupo control positivo*. La referencia utilizada fue dimetoato al 40% p/v, ya que esta produce al menos un 50% de mortalidad en el grupo de abejas.

### **Exposición (alimentación)**

La exposición de las abejas a la alimentación fue a libre disposición y los comederos fueron reemplazados a diario en un intervalo de  $24 \pm 2$  horas con comida fresca. Las soluciones fueron suministradas mediante un tubo eppendorf de 2 mL con orificios para facilitar el consumo de las abejas y la determinación diaria de alimento consumido mediante masado inicial y final del comedero.

### **Evaporación**

Dadas las condiciones ajustadas en el laboratorio, se evaluó la posible evaporación de las soluciones de sacarosa de los comederos de las jaulas. Esta medición se realizó en contenedores sin abejas con comederos previamente masados que contenían la solución de sacarosa al 50% p/v en triplicado. Los contenedores fueron colocados bajo las mismas condiciones ambientales a las que fueron expuestas las abejas durante el ensayo y en el cambio diario de comederos, estos se vuelven a masar y se reemplazan por unos nuevos. Así, el porcentaje de evaporación se pudo restar del consumo de alimento diario calculado para obtener un consumo corregido,



### **Condiciones del ensayo**

Las abejas fueron mantenidas en oscuridad total (excepto durante la observación) y bajo condiciones climáticas controladas tales como, temperatura promedio de  $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de 30 – 40 %. Estos parámetros fueron registrados a diario con un termohigrómetro digital.

### **Duración**

Las abejas fueron expuestas continuamente a las soluciones de sacarosa contaminadas por un período de diez días. La duración total del ensayo desde la recolección fue de once días.

### **Almacenamiento**

Una vez transcurridos los diez días, las abejas fueron adormecidas con dióxido de carbono y homogenizadas en un mortero de cerámica. El homogenizado se divide de tal manera que cada tubo eppendorf de 1,5 mL tenga 1 gramo de abejas. Finalmente, los tubos fueron almacenados a  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

### **Observaciones**

Tanto la mortalidad como los comportamientos anormales de las abejas fueron registrados diariamente a la misma hora comenzando a las  $24 \pm 2$  horas después del inicio del ensayo (alimentación inicial). Estas fueron observadas cuantitativamente según las siguientes categorías:

- **m** = moribundas (abejas que no pueden caminar y muestran un débil movimiento en piernas y antenas en respuesta a pequeñas estimulaciones como luz o soplo de aire, se pueden recuperar, pero generalmente mueren).
- **a** = afectadas (las abejas siguen en pie e intentan caminar, pero muestran claros signos de coordinación reducida, hiperactividad, agresividad, aumento de la higiene, temblores, etc.)
- **c** = calambres (las abejas contraen su abdomen o su cuerpo entero) .
- **ap** = apatía (las abejas solo muestran reacciones lentas o tardías a distintas estimulaciones como luz o soplos de aire; éstas se quedan inmóviles).
- **v** = vómitos.

Cualquier otra anomalía en el comportamiento de las abejas que no estuvo incluida en esta lista fue anotada y descrita claramente. Luego de los diez días de exposición se realizaron las evaluaciones finales de la mortalidad y el consumo de alimentos y, a partir de entonces, la prueba se termina adormeciendo a las abejas con dióxido de carbono.

### **5.3. Análisis estadísticos.**

Los análisis estadísticos utilizados para la validación analítica del método, como regresión lineal e interpolación fueron realizados en el software Statgraphics Centurion XV.I, al igual que el método de Kaplan-Meier y análisis probit que fueron empleados para la obtención de la curva de sobrevivencia y la  $DL_{50}$ , respectivamente.

Para los análisis logarítmicos y otro tipo de ajustes sigmoidales, se utilizó el software OriginPro 8.5, empleado para realizar el análisis de la curva de dosis-respuesta en la obtención de la  $DL_{50}$ .

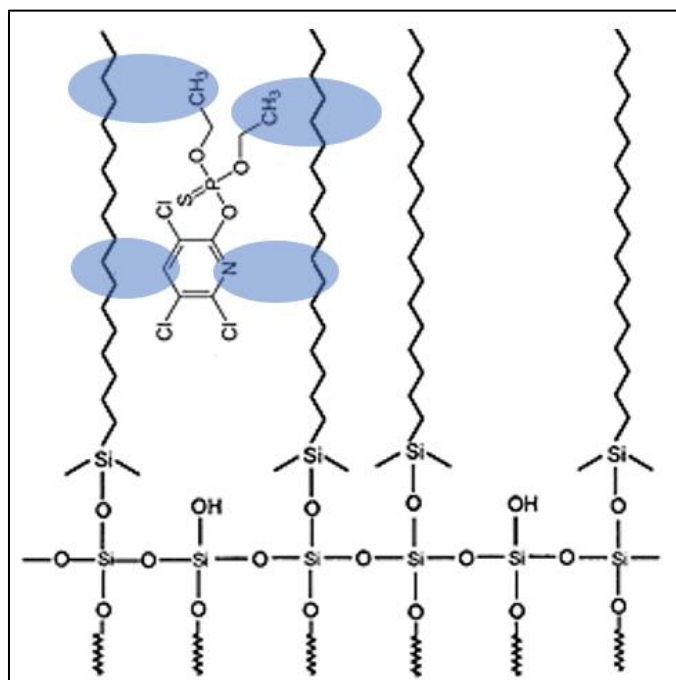
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Validación de un método analítico.

Teniendo en consideración las propiedades químicas y físicas del insecticida clorpirifos tales como la solubilidad, volatilidad y polaridad, en conjunto con otros factores como la persistencia y su degradación o bio-activación al metabolito clorpirifos-oxon, fue necesario optimizar y validar un método cromatográfico que permitiera determinar y cuantificar el insecticida en el menor tiempo de elución y con la mejor resolución posible en una matriz orgánica compleja.

#### Determinación de clorpirifos por cromatografía líquida acoplada a DAD

Se decidió trabajar con cromatografía de reparto en fase reversa ya que las características del analito así lo indicaban. CPF es un insecticida de baja polaridad y elevada hidrofobicidad ( $\log K_{ow} \geq 4,7$ ) ambas propiedades indicadoras de la técnica de separación a utilizar. La fase estacionaria utilizada fue una columna apolar C18 la cual, con su extensa cadena carbonada, favorece las interacciones hidrofóbicas con el analito (Figura 13).



*Figura 13. Esquema con las posibles interacciones hidrofóbicas entre CPF y C18.*

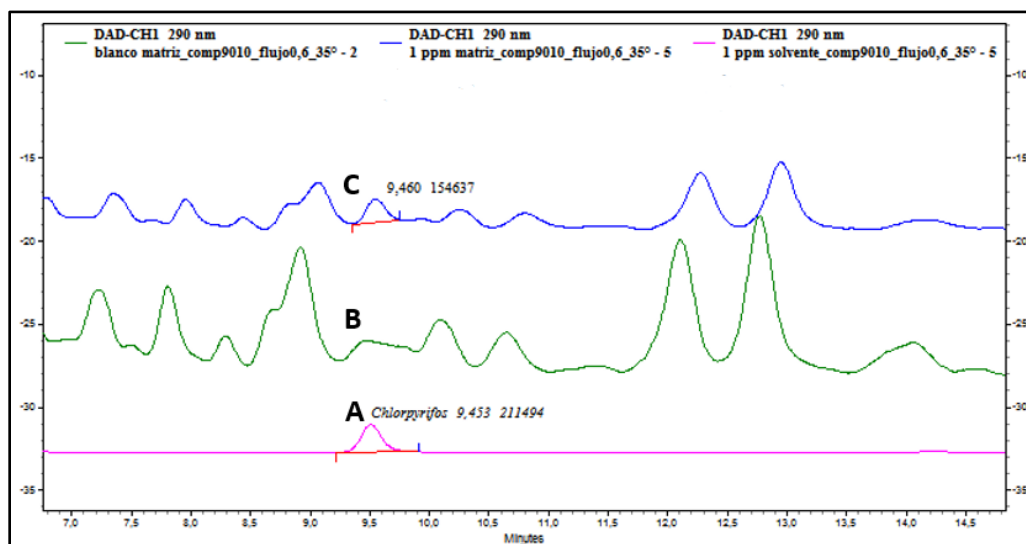
El uso de C18 como fase estacionaria llevó a la consiguiente elección de la mezcla agua (índice de polaridad 10.2) y AcN (IP 5.8), permitiendo así eluir y separar una amplia

variedad de compuestos con hidrofobicidad creciente al incrementar el contenido de AcN en la mezcla, eluyendo primero los componentes del extracto de matriz y luego el analito.

Por otro lado, el uso del detector DAD permitió obtener el espectro de absorbancia de CPF pudiendo así identificarlo y diferenciarlo de cualquier otra señal del extracto de abeja que pudiera aparecer cercana al tiempo de retención del analito (figura 8).

Una vez establecido el método de detección a utilizar, se realizó la identificación cualitativa de CPF. Para esto, se prepararon tres soluciones (figura 14), donde la primera corresponde a una dilución directa en acetonitrilo de la solución stock de CPF con una concentración final de 1 µg/mL, la segunda es solamente el extracto de abeja o matriz blanco sin contaminar y la tercera es el extracto de abeja fortificado con una solución de CPF de concentración 1 µg/mL.

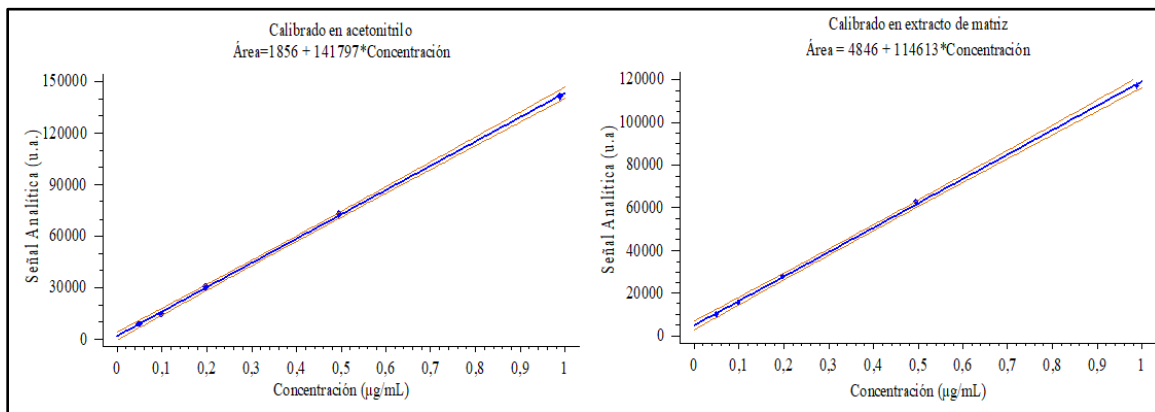
En la figura 14 se puede observar que el tiempo de retención para CPF en el extracto de matriz (9,4 ± 0,1 min) es el mismo que en AcN. Es decir, existe una interferencia de la matriz que co-eluye con el CPF. Por ello se evaluó en primer término el efecto de matriz por comparación de las pendientes de las curvas de calibrado realizadas en solvente y matriz. Posteriormente se validó el método analítico mediante la evaluación de la linealidad, límite de detección, de cuantificación, recuperación y precisión.



**Figura 14.** Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-DAD para el insecticida CPF con el programa cromatográfico optimizado. En (A) señal de 1µg/mL de CPF en AcN, en (b) cromatograma de la matriz sin fortificar y en (c) cromatograma de la matriz fortificada con 1µg/mL de CPF.

## Efecto matriz

En la figura 15 se presentan las curvas de calibrado obtenidas con los patrones de CPF preparados en AcN y matriz.



**Figura 15.** A la derecha, calibrado en solvente y a la izquierda, calibrado en matriz. Se muestra la ecuación de la recta que describe a ambas curvas de calibrado, errores calculados con un 95% de confianza (línea naranja).

El efecto matriz puede ser expresado, de acuerdo con la ecuación 1, como un porcentaje de la reducción o aumento en la respuesta del detector para la señal de CPF presente en el extracto de matriz en comparación con la señal presente en acetonitrilo.

$$\text{Efecto matriz (\%)} = \left( \frac{b_{\text{matriz}}}{b_{\text{solvente}}} - 1 \right) \times 100 \quad \text{ecuación 1.}$$

Donde  $b_{\text{matriz}}$  corresponde a la pendiente de la curva de calibrado en matriz y  $b_{\text{solvente}}$  a la pendiente de esta en solvente. Según (Quatrin, Pizzutti, Gebler, Dias, & Cardoso, 2020) si el efecto matriz calculado con la ecuación 1, supera el  $\pm 20\%$  se debe aplicar un método de cuantificación distinto o usar una curva de calibrado en matriz. Teniendo en cuenta que el análisis fue realizado mediante HPLC-DAD, este efecto suele ser causado por la interferencia de los componentes de la matriz que eluyen cerca o en el mismo tiempo de retención del analito. A bajas concentraciones, el efecto matriz puede llegar a ser tan importante debido a la competencia generada entre matriz y analito por los sitios activos de la columna cromatográfica, que produce una sobrestimación o subestimación de las señales cromatográficas. Considerando los valores de las pendientes presentadas en la figura 15, el efecto matriz calculado para este estudio fue el siguiente:

$$\text{Efecto matriz} = \left[ \left( \frac{114613}{141797} \right) - 1 \right] \times 100$$

$$\text{Efecto matriz} = -19,2\%$$

En este caso, el efecto matriz corresponde a una supresión de las señales analíticas en 19,2 %. Si bien este valor no supera el  $\pm 20\%$ , igualmente podría ser considerado como un efecto matriz leve. Por ende, para todos los fines cuantitativos se utilizaron los estándares preparados en extractos de abejas blanco para evitar y minimizar cualquier ambigüedad relacionada con los efectos inducidos por la matriz.

Por consiguiente, junto con los parámetros habituales que se evaluaron para validar el método analítico - linealidad, LOD, LOQ, recuperación y precisión -, también se determinó el efecto matriz, presentado como un porcentaje del aumento o disminución de la señal analítica de CPF en matriz respecto a la señal en acetonitrilo.

## Linealidad

El intervalo de concentraciones utilizado para las curvas de calibración en solvente y matriz corresponde a las que se estima estarían presentes en las muestras a analizar. Este comprende cinco concentraciones desde 0,05 a 1  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla 1 se presentan los parámetros de linealidad y sensibilidad obtenidos.

**Tabla 5.** Parámetros de linealidad y sensibilidad analítica para el método de extracción y detección de CPF en solvente y en matriz, donde *R* es el coeficiente de correlación, *b* la pendiente, *S<sub>b</sub>* el error estándar de la pendiente, *S<sub>y/x</sub>* error estándar del estimado, *S* el inverso de la sensibilidad analítica (*S<sub>y/x</sub>*/*b*) y *Sb(r)* la linealidad (*Sb/b*\*100).

<i>Clorpirifos</i>	<i>R</i>	<i>b</i>	<i>S<sub>b</sub></i>	<i>S<sub>y/x</sub></i>	<i>S</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Sb(r)</i> (%)
<i>Acetonitrilo</i>	0,99985	141797	1444	1121	0,008	1,02
<i>Extracto de abeja</i>	0,99981	114613	1290	1002	0,009	1,13

El valor del coeficiente de correlación *r* indicó una alta relación entre las variables correspondientes a la señal analítica y la concentración tanto en solvente como en matriz. La linealidad fue evaluada mediante una prueba estadística de ajuste (*lack of fit test*) para determinar si el modelo es adecuado para describir los datos observados en el rango estudiado. El valor *p* = 0,8944 indica que la regresión es significativa y que el modelo lineal

es adecuado entre 0,05 y 0,1 mg/L. Además, el valor obtenido a partir del parámetro  $S_b(r)$  entrega una mejor representación de la linealidad ya que relaciona la desviación estándar de la pendiente con la pendiente, obteniendo un valor aceptable menor al 5%. Por otra parte, la sensibilidad del método fue determinada mediante el inverso de sensibilidad analítica, obteniendo valores de 0,009  $\mu\text{g/mL}$  para el calibrado en matriz.

### Límites de detección, cuantificación y recuperación

Se usó el error estándar de la estimación de la concentración ( $S_{y/x}$ ) para determinar los valores de LOD y LOQ, los cuales se obtuvieron como 3,3 y 10 veces este valor, respectivamente. La tabla 6 resume los valores obtenidos. El valor de LOQ obtenido permitió determinar la presencia de CPF a niveles sobre los 9 ng de CPF por abeja.

**Tabla 6.** Valores de LOD y LOQ obtenidos a partir del error estándar de la estimación en  $\mu\text{g/mL}$  y ng/abeja.

<i>Clorpirifos</i>	<i><math>S_{y/x}</math></i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
<i>En <math>\mu\text{g/mL}</math></i>	0,009	0,030	0,090
<i>En ng/abeja</i>	1	3	9

Para la evaluación del parámetro de recuperación se fortificaron extractos de abeja no contaminados en triplicado a tres niveles distintos dentro del rango de linealidad y fueron sometidos al procedimiento de extracción y detección optimizados. Estos niveles fueron determinados según el LOQ, siendo los niveles de fortificado dos, cinco y ocho veces el LOQ. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Valores de recuperación promedio obtenidos en tres niveles distintos: 2 LOQ, 5 LOQ y 8 LOQ.

<i>Fortificado (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>	<i>Recuperación (%)</i>			<i>RSD (%)</i>	
	<i>Réplicas</i>		<i>Promedio</i>		
<i>0,15</i>	113	96	104	103	6.1
<i>0,45</i>	92	94	85	91	4.8
<i>0,75</i>	72	81	81	79	5.9

La recuperación promedio en los tres niveles varió entre un 79 – 103%, con RSD menor a 7%. Estos resultados se consideran adecuados de acuerdo con los parámetros de validación analítica establecidos en la guía de calidad de la Conferencia Internacional sobre

Armonización (ICH) de 1995, donde establece un intervalo de recuperaciones entre 70-120%, con RSD menor al 20%, lo que indicaría un desempeño aceptable del método de extracción MSPD y de detección mediante HPLC-DAD para CPF y, por ende, su validación analítica. (European Medicines Agency, 1995)

### **Precisión: Repetibilidad**

La precisión del método cromatográfico fue obtenida mediante la evaluación de la dispersión de los resultados, es decir, la repetibilidad. Este parámetro es estudiado para un mismo método, analito y laboratorio en días distintos, para lo cual un extracto de abeja no contaminada obtenido mediante MSPD fue fortificado a tres niveles de concentración (2•LOQ; 5•LOQ y 8•LOQ), e inyectado por tres días distintos durante un período de tres semanas. El resultado se presenta en la tabla 7 con valores de RSD menores al 7%, lo que demuestra que el error en las mediciones debido al instrumento no es relevante para el estudio y por ende, el método es preciso.

### **6.2. Implementación del método MSPD para la extracción de clorpirifos desde abejas melíferas.**

La técnica MSPD está descrita desde 2007 (Barker, 2007), y ha sido optimizada para la extracción de distintos analitos de interés desde diferentes matrices sólidas orgánicas. Para la extracción de CPF desde abejas, se empleó la metodología basada en MSPD descrita en (Balsebre, Báez, Martínez, & Fuentes, 2018), con leves modificaciones.

Tal como se describió en la sección de métodos, para realizar la MSPD se mezcló 1,0 g de homogenizado de abejas con 2 gramos de sorbente C18 y la mezcla obtenida se trasvasió a una columna descartable de 15 mL con 2 g de adsorbente florisil. Se evaluó la recuperación de CPF empleando dos columnas de la empresa UCT: Clean-up ® y Enviro-clean ®; esta última fabricada con un sorbete de mayor pureza y con fritas de PTFE. Los porcentajes de recuperación obtenidos con las columnas Clean-up oscilaron entre 39% y 71% para el nivel más bajo y alto del fortificado, respectivamente; por lo que se decidió utilizar las columnas Enviro-clean cuyos porcentajes de recuperación variaron entre 79 y 103%, como se puede observar en la tabla 7.



Como resultado del proceso MSPD (Figura 7) se obtuvo un extracto de color amarillo claro, atribuido a los pigmentos no adsorbidos por el florisil, y un pequeño residuo amarillo insoluble en acetonitrilo (solvente usado para la reconstitución final) que se eliminó por centrifugación antes del análisis cromatográfico. A diferencia de lo reportado por Balsebre y col., (2018), el solvente utilizado para la reconstitución final fue ACN y no acetona, ya que al utilizar un HPLC-DAD no se requiere que el solvente tenga elevada volatilidad, además de que el primero ha sido utilizado como disolvente para CPF y como fase móvil. Las recuperaciones de CPF desde abejas aplicando el método MSPD a tres niveles de concentración, estuvieron comprendidas entre un 79% y 103% (Tabla 7) tal como se mencionó con anterioridad.

### **6.3. Verificación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de CPF en abejas melíferas, en condiciones de laboratorio.**

La tabla 4 presenta valores de  $DL_{50}$  de clorpirifos en abejas reportados en bibliografía; con un valor promedio de 0,21  $\mu\text{g}/\text{a}$  o 2,1  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Este valor sirvió como referencia para el ensayo de toxicidad oral aguda y determinación experimental de la  $DL_{50}$ . Cabe señalar que el ensayo de toxicidad oral aguda para abejas domésticas está descrito por la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, 2017), y en él se establece que se deben analizar al menos cinco concentraciones con un factor no superior a 2.5 que cubran el rango para la  $DL_{50}$ . Por ende, se decidió estudiar el comportamiento para cinco tratamientos o rangos de dosis entre 1,0 a 3,0  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Los datos experimentales obtenidos de este ensayo de toxicidad oral aguda de 24 y 48 horas son resumidos en la tabla 8.

**Tabla 8.** Mortalidad acumulada observada y corregida, mediante la ecuación de Abbot, de los tratamientos estudiados a las 24 y 48 horas posteriores a la ingesta del ingrediente activo, CPF.

Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	Mortalidad (%)			
	24 hrs	24 hrs corr.	48 hrs	48 hrs corr.
1,0	3	3	10	0
1,5	7	7	20	11
2,0	10	10	23	15
2,5	17	17	40	34
3,0	20	20	50	45
Control negativo	0	0	10	0
Control positivo	100	100	100	100
Control solvente	10	10	17	8

Los porcentajes de mortalidad acumulada observados a las 24 y 48 horas de administrada la solución de sacarosa contaminada para cada tratamiento, fueron corregidos contra los resultados del control negativo, utilizando la ecuación de Abbot (ecuación 2). Esta corrección se aplica de forma estándar a la evaluación de bioensayos para poder comparar, en las condiciones trabajadas, con otros ensayos. Los porcentajes de mortalidad corregidos (tabla 8) son utilizados para el cálculo de la  $DL_{50}$ .

$\% \text{Mortalidad}_{corr.}$

$$= 100 * \left( \frac{\% \text{Sobrevivencia del CN} - \% \text{Sobrevivencia en tratamiento}}{\% \text{Sobrevivencia del CN}} \right)$$

ecuación 2.

Por otra parte, los comederos que contenían las soluciones contaminadas fueron masados antes y después de ser proporcionado a las abejas para determinar la cantidad de alimento consumido por individuo y, por ende, la verdadera dosis de CPF que ingirió cada abeja. Estos valores se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Valores promedio, por dosis, obtenidos al masar los comederos antes y después de ser suministrados a un grupo de 10 abejas y, dosis realmente consumida por abeja.

Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	Masa promedio de sacarosa suministrada (mg)	Masa promedio de la cantidad de sacarosa realmente consumida (mg)	Dosis realmente consumida ( $\mu\text{g/g}$ )
---------------------------	---	---	---

1,0	225,7	163,1	0,7
1,5	227,5	170,5	1,1
2,0	228,2	140,3	1,2
2,5	221,2	169,4	1,9
3,0	228,7	173,3	2,3

Una vez corregidos los valores de dosis que consumió cada abeja en promedio, se procede a determinar la  $DL_{50}$  a las 48 horas, para el estudio de toxicidad oral aguda en abejas domésticas. Los datos fueron evaluados mediante el Análisis Probit, el cual mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una respuesta a dicho estímulo. Para esto se utilizaron los porcentajes de transformación a “probits” presentados en la tabla 10.

**Tabla 10.** Transformación de los porcentajes de mortalidad corregidos a valores probit.

% kill	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
00	—	2·67	2·95	3·12	3·25	3·36	3·45	3·52	3·59	3·66
10	3·72	3·77	3·82	3·87	3·92	3·96	4·01	4·05	4·08	4·12
20	4·16	4·19	4·23	4·26	4·29	4·33	4·36	4·39	4·42	4·45
30	4·48	4·50	4·53	4·56	4·59	4·61	4·64	4·67	4·69	4·72
40	4·75	4·77	4·80	4·82	4·85	4·87	4·90	4·92	4·95	4·97
50	5·00	5·03	5·05	5·08	5·10	5·13	5·15	5·18	5·20	5·23
60	5·25	5·28	5·31	5·33	5·36	5·39	5·41	5·44	5·47	5·50
70	5·52	5·55	5·58	5·61	5·64	5·67	5·71	5·74	5·77	5·81
80	5·84	5·88	5·92	5·95	5·99	6·04	6·08	6·13	6·18	6·23
90	6·28	6·34	6·41	6·48	6·55	6·64	6·75	6·88	7·05	7·33

Para valores de mortandad de un 45% correspondiente a la dosis más alta suministrada, la tabla de transformación a probit se lee de izquierda a derecha, buscando primero el valor de la decena en la primera columna y luego buscando el valor de la unidad en la primera fila obteniendo así un valor de probit de 4,87 para la última dosis. La tabla 11 muestra los valores de probit para las diferentes dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas.

**Tabla 11.** Valores de probit obtenidos para las dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas.

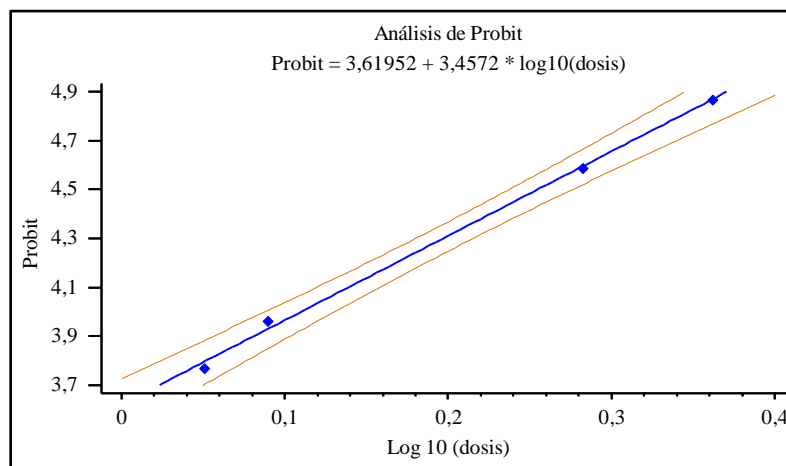
Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	$\text{Log}_{10}$ Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	Mortalidad (%)	Probit
0,7	-0,14	0	-

1,1	0,05	11	3,77
1,2	0,09	15	3,96
1,9	0,28	34	4,59
2,3	0,36	45	4,87

Del análisis estadístico de probit se obtuvo la siguiente regresión lineal:  $y = 3,46 * \log x + 3,62$ , (cuyo gráfico se presenta en la figura 16); con un valor de  $R^2 = 0,9990$  ( $p = 0,001$ ). A partir de la regresión se calculó el valor para la obtención de la  $DL_{50}$ , mediante la interpolación de un valor de probit tal, que pudiera obtener el 50% de mortandad, es decir, 5,00.

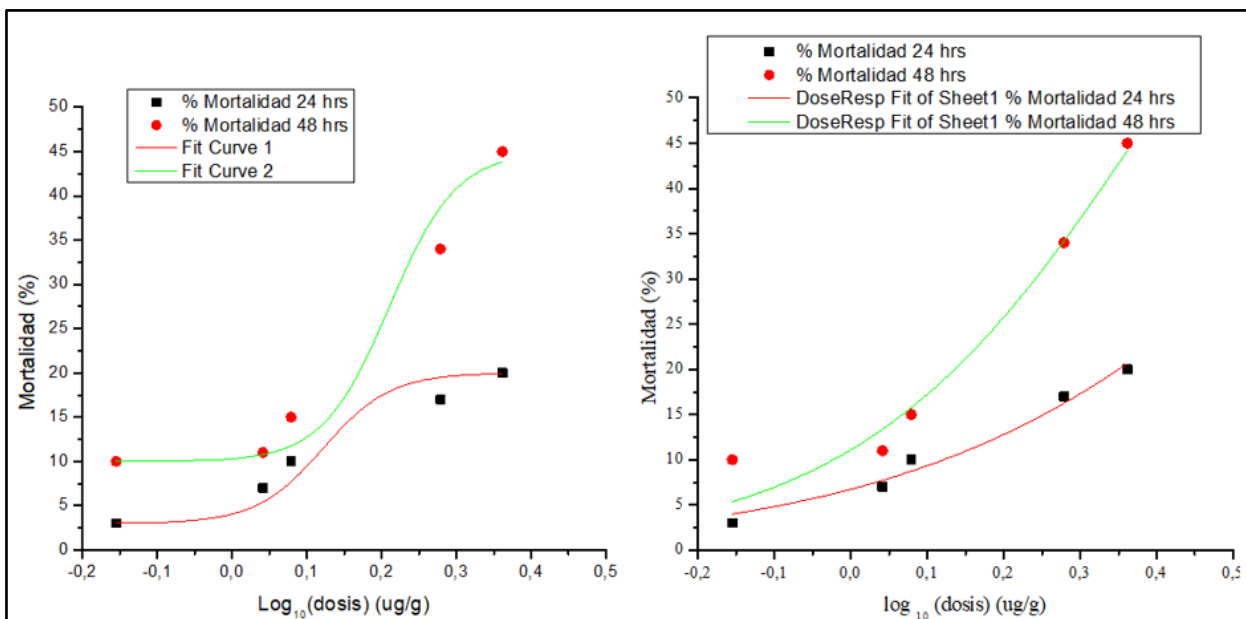
$$5,00 = 3,46 * \log x + 3,62$$

$$x = 2,51 \mu g/g$$



**Figura 16.** Análisis de probit en función del log en base 10 de la dosis para el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas.

Para corroborar gráficamente esta información, se realizó un gráfico de dosis-respuesta a las 24 y 48 horas de suministrado el insecticida (figura 17). Tanto el análisis de probit como el gráfico de dosis respuesta permiten transformar una curva de respuesta sigmoideal a lineal y luego realizar una regresión lineal sobre la relación de las dos variables estudiadas, mortalidad y dosis. Las curvas ajustadas presentaron valores de  $R^2 = 0,9678$  ( $p < 0,05$ ) lo que demuestra un ajuste adecuado de los datos a estos modelos.



**Figura 17.** En A, ajuste sigmooidal y en B, ajuste lineal para los datos de mortalidad (%) en función del logaritmo de la dosis a las 24 (línea verde) y 48 horas (línea roja) mediante el análisis de dosis-respuesta.

La ventaja del gráfico de dosis-respuesta es que no solo entrega el valor para la  $DL_{50}$ , sino que también entrega los correspondientes a la  $DL_{20}$  y  $DL_{80}$ . Como solo interesa el valor que nos entrega el 50% de mortalidad, este corresponde a 2,55 µg/g. El cual es muy similar al obtenido mediante el análisis de probit y similar al valor promedio de los reportados en bibliografía (tabla 4), lo cual valida la determinación experimental del  $DL_{50}$  trabajando en las condiciones de laboratorio establecidas. El promedio entre los valores obtenidos por ambos análisis estadísticos es de 2,53 µg/g o 253 ng/a.

#### **6.4. Planteamiento de un diseño experimental para la exposición crónica de abejas domésticas al insecticida clorpirifos, mediante su dosificación por vía oral.**

A partir de la guía 245 de la OCDE, se planteó un diseño experimental para exponer abejas domésticas a un ensayo de toxicidad oral crónico utilizando CPF, en condiciones de laboratorio. Transcurridos los 10 días, se registraron los valores correspondientes a consumo de solución de sacarosa, dosis de CPF ingerida, mortalidad y sobrevivencia.

#### **Corrección de la dosis diaria de exposición**

Para obtener las cantidades de alimento ingerido por abeja y, por consiguiente, las dosis de CPF a las que las abejas fueron realmente expuestas; se masaron los comederos antes y después de ser ofrecidos a cada réplica de cada tratamiento. A partir de los datos experimentales se calculó la diferencia y se dividió por la cantidad de abejas en cada contenedor, promediando los valores de las réplicas. Además, se realizó un control solo con la solución de sacarosa para evaluar el porcentaje de evaporación y aplicar una corrección por la cantidad de CPF evaporado. Los valores de consumo de la solución de sacarosa diario y promedio por abeja se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12.** Valores promedio por réplica, de solución de sacarosa al 50% p/v contaminada con CPF, consumida diariamente por abeja y alimento promedio al finalizar el período de exposición por tratamiento, ambos en mg/a.

Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	$\bar{x}$
0,10	72,8	81,5	82,9	88,8	58,4	116,1	24,4	50,4	47,8	29,2	65,2
0,15	52,1	86,2	83,6	86,3	60,7	119,1	43,2	50,2	68,2	68,7	71,8
0,20	63,3	84,6	73,9	79,0	63,1	112,9	23,3	82,6	118,6	120,6	82,2
0,25	71,4	88,3	84,2	86,0	52,5	110,0	31,7	50,1	91,2	58,7	72,4
0,30	58,1	86,7	77,3	82,4	56,3	112,8	24,5	46,9	72,8	80,2	69,8
C. Negativo	77,0	93,1	80,3	82,1	70,6	139,1	50,0	71,8	85,5	70,0	82,0
C. Positivo	37,0	87,0	56,0	46,9	28,7	66,0	38,7	38,7	69,7	62,5	53,1
C. Solvente	76,8	98,4	82,6	77,4	63,3	118,8	34,8	63,3	73,6	60,8	75,0

Asumiendo un comportamiento lineal e ideal del insecticida CPF, el cálculo de la dosis a la que fue expuesta realmente cada abeja se obtiene de la siguiente manera, considerando como ejemplo a la dosis menor en el primer día de exposición (tabla 12):

$$\frac{1842,6 \text{ mg}}{0,1 \mu\text{g CPF}} = \frac{72,8 \text{ mg}}{x \mu\text{g CPF}}$$

$$x = 0,004 \mu\text{g CPF} / \text{abeja}$$

$$x = 0,04 \mu\text{g CPF} / \text{g}$$

Donde 1842,6 mg corresponde a la cantidad promedio de las réplicas de la solución de sacarosa al 50% p/v que fue ofrecida a las abejas para el día 1 a la dosis más baja y que contenía 0,1  $\mu\text{g}$  de CPF.

Este procedimiento se realizó para calcular la dosis diaria a la que realmente fueron expuestas las abejas, ya que este valor depende de la cantidad de alimento consumido y, la

cantidad de abejas vivas al finalizar el período de observación de  $24 \pm 2$  horas. Estos valores se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13.** Dosis promedio ingerida diariamente en  $\mu\text{g/g}$

<b>Dosis (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 8</b>	<b>Día 9</b>	<b>Día 10</b>
0,10	0,040	0,047	0,047	0,051	0,033	0,070	0,015	0,029	0,026	0,012
0,15	0,045	0,075	0,070	0,082	0,057	0,145	0,018	0,031	0,039	0,036
0,20	0,075	0,103	0,087	0,109	0,055	0,104	0,013	0,026	0,032	0,035
0,25	0,103	0,136	0,125	0,126	0,078	0,169	0,037	0,056	0,108	0,062
0,30	0,097	0,149	0,132	0,142	0,098	0,202	0,047	0,077	0,140	0,135

Es importante considerar que las cantidades de alimento consumido solo indican la dosis a la que realmente fueron expuestas y no da indicio de toxicidades o posibles efectos acumulativos. La diferencia en cuanto a las dosis de exposición diarias se debe a que los tratamientos y réplicas están conformados a partir de grupos etarios y castas heterogéneas, por ende, los hábitos alimenticios pueden variar considerablemente de abeja en abeja.

Por otro lado, a partir de los resultados calculados se obtuvieron las dosis promedio reales consumidas o experimentales por tratamiento, en lugar de la dosis que fueron ofrecidas o teóricas; las que se resumen en la tabla 14.

**Tabla 14.** Dosis diaria experimental y cantidad de alimento promedio ingerida por cada abeja.

<b>Dosis teórica (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Dosis experimental promedio (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Cantidad de alimento consumido diario promedio (mg/a)</b>
0,10	0,037	65,2
0,15	0,060	71,8
0,20	0,064	82,2
0,25	0,100	72,4
0,30	0,122	69,8
<i>C. Negativo</i>	-	82,0
<i>C. Positivo</i>	-	53,1
<i>C. Solvente</i>	-	75,0

La dosis diaria promedio a la que realmente fueron expuestas las abejas corresponden en promedio a un 38% de la dosis diaria teórica y son alrededor de 50 veces menor que la  $DL_{50}$  calculada en el ensayo de toxicidad oral agudo de 48 horas, lo que las categoriza como dosis subletales. Para todos los cálculos posteriores, se utilizaron los valores de la dosis diaria promedio experimental y no los valores de la dosis teórica.

### Cálculo y corrección de la mortalidad

Tal y como lo indicaba la guía 245 de la OCDE, cada  $24 \pm 2$  horas se observaron las mortalidades y comportamientos anormales para cada réplica de cada tratamiento en el mismo intervalo de tiempo en el que se cambiaba el comedero con la solución de sacarosa fresca. El registro de mortalidad diaria acumulada y el porcentaje de mortalidad se presentan en la tabla 15. Además, se determinó la mortalidad corregida utilizando la ecuación de Abbott (ecuación 2) al igual que en el cálculo para obtener la  $DL_{50}$  aguda.

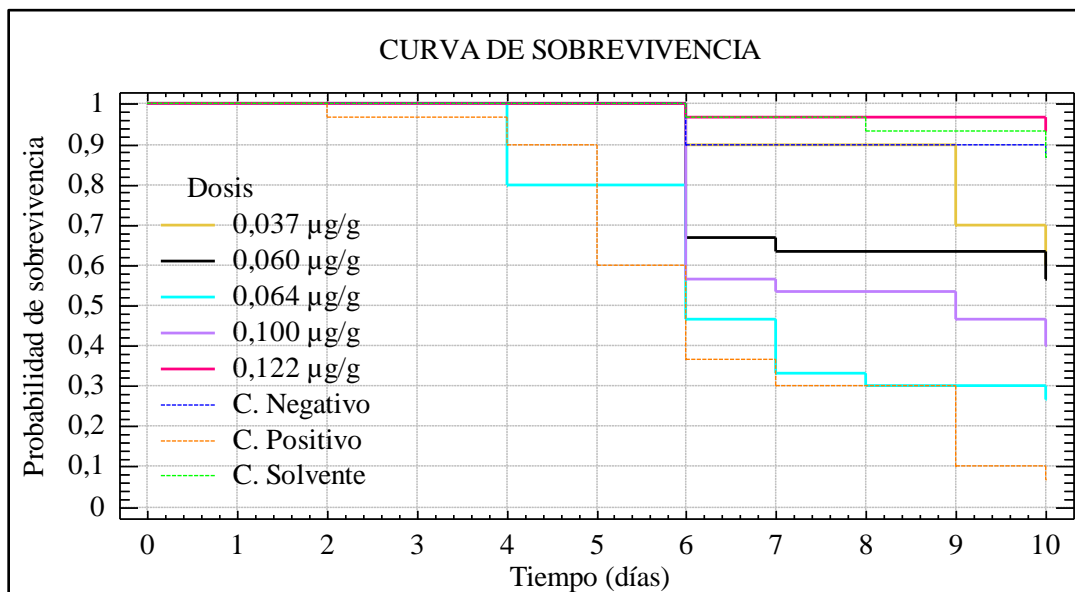
**Tabla 15.** Mortalidad acumulada y porcentaje de mortalidad acumulada al cabo de 10 días para los distintos tratamientos y controles.

<i>Dosis diaria</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>Día</i> 1	<i>Día</i> 2	<i>Día</i> 3	<i>Día</i> 4	<i>Día</i> 5	<i>Día</i> 6	<i>Día</i> 7	<i>Día</i> 8	<i>Día</i> 9	<i>Día</i> 10	<i>Mortalidad</i> (%)	<i>Mortalidad</i> <i>corregida</i> (%)
0,037	0	0	0	0	0	3	3	3	9	12	40	30
0,060	0	0	0	0	0	10	11	11	11	13	43	34
0,064	0	0	0	6	6	16	20	21	21	22	73	69
0,100	0	0	0	0	0	13	14	14	16	18	58	51
0,122	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	7	-8
<i>C. N.</i>	0	0	0	0	0	3	3	3	3	4	14	0
<i>C. P.</i>	0	1	1	3	12	19	20	21	27	28	93	92
<i>C. S.</i>	0	0	0	0	0	1	1	2	2	4	20	7

A partir de esta información se construyó la curva de sobrevida que muestra la probabilidad de que un evento ocurra en un intervalo de tiempo específico con el estadístico de Kaplan-Meier, en este caso, la probabilidad que una abeja muera en el intervalo de observación de  $24 \pm 2$  horas. En la figura 18 se muestra la curva de sobrevida obtenida. En primer lugar, se observó que el control negativo presentó un porcentaje de mortalidad del 14%, valor inferior al 15% máximo que este debe tener para la validez del ensayo. Sin embargo, para el control solvente, el porcentaje de mortalidad fue de 20%, el cual se encuentra por encima del criterio de validez del 15%. Esto puede significar que el 2% de acetonitrilo utilizado como solvente igualmente afecta la longevidad de las abejas, o que produce un efecto tóxico que conlleva a



la muerte del individuo o que, considerando la diversidad etaria y de casta, algunas abejas son más susceptibles al efecto de este solvente orgánico.



**Figura 18.** Curva de sobrevivencia para el ensayo de toxicidad oral crónica de 10 días en abejas domésticas.

Para una curva de sobrevivencia se espera que a medida que aumenta la dosis la probabilidad de sobrevivencia sea menor. Sin embargo, como se observa en la figura 18, el porcentaje de mortalidad acumulado promedio para las dosis de 0,064 y 0,122 µg/g, no siguió dicha tendencia. La causa de esto puede estar relacionada con la cantidad de alimento consumido por los grupos expuestos, ya que aquellas abejas que fueron expuestas a una dosis diaria de 0,064 µg/g fueron las que tuvieron el mayor consumo de solución de sacarosa (similar al consumo del control negativo) como se observa en la tabla 16; llegando a una mortalidad del 69%. Mientras que aquellas expuestas a una dosis diaria de 0,122 µg/g están entre los dos grupos que menos solución de sacarosa consumieron (incluso un 15% menos que el control negativo). Esto puede deberse a que la dosis que contenía mayor concentración de CPF provocó un efecto repelente alejando a las abejas del comedero (Urlacher, y otros, 2016). La tabla 16 resume la relación entre dosis experimental de CPF a las que fueron expuestas las abejas, la sacarosa consumida y la correspondiente mortalidad. Tal como se observa en la tabla, aún con la corrección de la mortalidad las dosis 0,064 µg/g y 0,122 µg/g

no siguieron la tendencia dosis-mortalidad; lo que indica que existen otros factores asociados probablemente a la diversidad etaria y/o genética de las abejas entre los grupos.

**Tabla 16.** Relación entre las variables dosis experimental, sacarosa ingerida y mortalidad, ordenados por mortalidad corregida ascendente.

<i>Dosis teórica</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>Dosis experimental</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>Sacarosa ingerida</i> ( $\text{mg/a}$ )	<i>Mortalidad</i> (%)	<i>Mortalidad</i> <i>corregida</i> (%)
0,30	0,122	69,8	7	-
0,15	0,037	65,2	40	30
0,10	0,060	71,8	43	34
0,25	0,100	72,4	58	51
0,20	0,064	82,2	73	69
<i>C. Negativo</i>	-	82,0	14	0
<i>C. Positivo</i>	-	53,1	93	92
<i>C. Solvente</i>	-	75,0	20	7

Obviando los dos grupos “anómalos” observados, se corroboraría la ley de Fritz Haber, la cual sugiere que el efecto tóxico de un producto ( $E$ ) depende directamente de la dosis aplicada ( $d$ ), que en este caso es calculada a partir de la cantidad de sacarosa ingerida, y del tiempo de exposición ( $t$ ).

$$E = d * t \quad \text{ecuación 3.}$$

Con respecto al 93% de mortalidad del control positivo, este corresponde a más de un 50% lo que demuestra la sensibilidad de las abejas y la confiabilidad del ensayo.

### 6.5. Determinación de la dosis letal acumulada, $DLA_{50}$

Al igual que en el ensayo de toxicidad agudo, luego de las correcciones efectuadas, se determinó la dosis letal acumulada ( $DLA_{50}$ ), correspondiente al valor que produce una mortalidad del 50%. Esta se calculó mediante un análisis probit y posteriormente corroborada con un ajuste logarítmico de la dosis acumulada versus el porcentaje de mortalidad o gráfico de dosis-respuesta. Los valores considerados para el cálculo se resumen en la tabla 17.

**Tabla 17.** Dosis promedio acumulada al finalizar el ensayo toxicológico de 10 días obtenida a partir de la suma de las dosis diarias promedio.

<b>Nro. Dato</b>	<b>Dosis experimental (µg/g)</b>	<b>Dosis experimental promedio acumulada (µg/g)</b>	<b>Mortalidad corregida (%)</b>
1	0,037	0,37	30
2	0,060	0,60	34
3	0,064	0,64	69
4	0,100	1,00	51
5	0,122	1,22	-

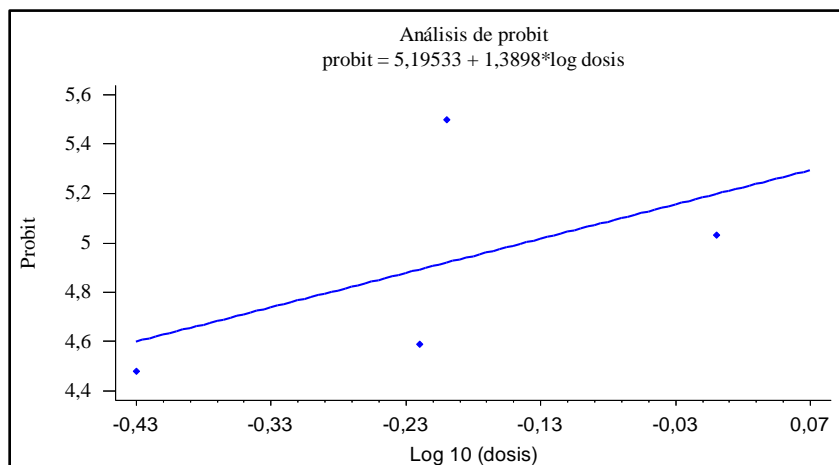
Cabe mencionar que el valor correspondiente a la dosis 0,122 µg/g fue eliminado para realizar los cálculos de  $DLA_{50}$ , ya que, al hacer la corrección con el control negativo el porcentaje de mortalidad da un valor negativo. En la tabla 18 se presentan los valores de probit obtenidos para las dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral crónico de 10 días.

**Tabla 18.** Valores de probit obtenidos para las dosis ingeridas por abejas domésticas en el ensayo de toxicidad oral crónico de 10 días.

<b>Dosis (µg/g)</b>	<b>Log<sub>10</sub> Dosis (µg/g)</b>	<b>Muerte (%)</b>	<b>Probit</b>
0,37	-0,4	30	4,48
0,60	-0,3	34	4,59
0,64	-0,2	69	5,50
1,00	0,0	51	5,03
1,22	0,1	-	-

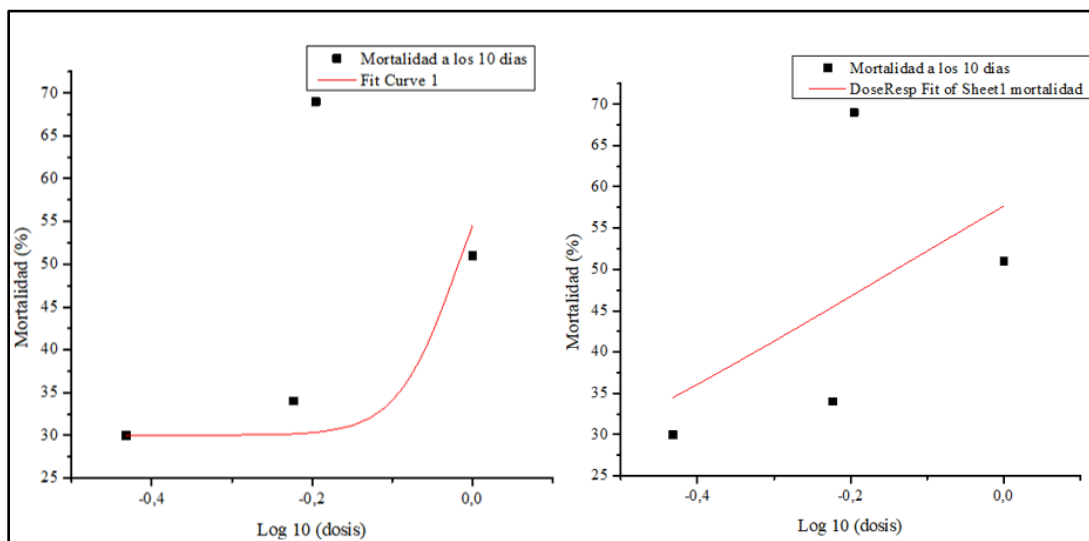
Del análisis estadístico de probit se obtuvo la siguiente regresión lineal:  $y = 1,39 * \log x + 5,20$ , (cuyo gráfico se presenta en la Figura 19); con un valor de  $R^2 = 0,52050$  ( $p = 0,4750$ ). A partir de la regresión se calculó el valor para la obtención de la  $DLA_{50}$ , mediante la interpolación de un valor de probit tal, que pudiera obtener el 50% de mortandad, es decir, 5,00.

$$5,00 = 1,39 * \log x + 5,20 \quad x = 0,72 \mu\text{g/g}$$



**Figura 19.** Análisis de probit en función del log en base 10 de la dosis para el ensayo de toxicidad oral crónico 10 días.

Para corroborar gráficamente esta información, los datos experimentales se ajustaron a un modelo logístico de tres parámetros también llamado en toxicología como dosis-respuesta, el cual relaciona el porcentaje de mortalidad al cabo de los 10 días versus el logaritmo de las dosis. La figura 20 muestra las curvas ajustadas.



**Figura 20.** En A, ajuste sigmoideal y en B, ajuste lineal para los datos de mortalidad (%) en función del logaritmo de la dosis a los 10 días mediante un modelo estadístico log-logístico de tres parámetros

Como se observa en la figura 20, los datos experimentales no se ajustaron adecuadamente al modelo ( $R^2 = 0,2864$ ,  $p = 0,0698$ ), lo que se atribuye a que durante el ensayo toxicológico de diez días se presentaron sesgos en diversas etapas. El valor de  $DLA_{50}$  entregado por el ajuste logístico es de  $0,72 \mu\text{g/g}$  o  $72 \text{ ng/a}$ , similar al otorgado por el análisis de probit. Este valor es casi 4 veces menor que el  $DL_{50}$  obtenido para el ensayo de toxicidad

aguda de 48 horas (2,53 µg/g); lo que indicaría que efectivamente hay acumulación o como lo llama (Bommuraj, Chen, Birenboim, Barel, & Shimshoni) una toxicidad dependiente del tiempo o reforzada con el tiempo.

## 6.6. Determinación de la concentración de CPF en abejas domésticas

La evaluación de la posible toxicidad acumulativa de un plaguicida fue ser realizada de dos formas complementarias, una analítica y otra toxicológica.

### Determinación analítica

Se realizó la determinación de CPF acumulado en las abejas al finalizar el ensayo toxicológico de 10 días mediante el método analítico previamente validado. La tabla 19 presenta los resultados obtenidos.

*Tabla 19. Concentración promedio de CPF en abejas al finalizar el ensayo toxicológico de 10 días evaluada mediante MSPD/HPLC-DAD.*

<i>Dosis promedio diaria (µg/g)</i>	<i>Concentración (ng/abeja)</i>	<i>Sacarosa diaria consumida promedio (mg)</i>	<i>Mortalidad (%)</i>
0,037	< 3 (LOD)	65,2	30
0,060	< 3 (LOD)	71,8	34
0,064	23	82,2	69
0,100	< 9 (LOQ)	72,4	51
0,122	-	69,8	-

El único valor de concentración de CPF sobre el LOQ correspondió al grupo de abejas expuestas a una dosis promedio de 0,064 µg/g (23 ng/abeja). Cabe señalar que este grupo fue el que presentó el mayor consumo promedio diario de sacarosa y el que presentó el mayor porcentaje de mortalidad; por lo que era esperable que presentaran una mayor acumulación de CPF luego de 10 días de exposición, tal como lo revela el resultado analítico.

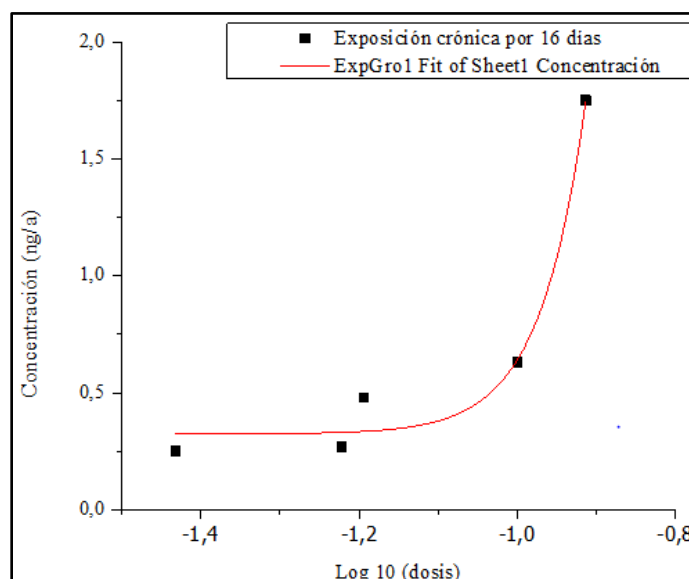
La concentración de CPF en los grupos expuestos a las dosis más bajas fue inferior al LOD, es decir, < de 3 ng/a y la dosis de 0,100 µg/g fue menor al LOQ, es decir, < de 9 ng/abeja. Por otra parte, cabe señalar que para el grupo expuesto a 0,122 µg/g, la mortalidad durante el ensayo fue solo de 3 individuos; por lo que no fueron sometidos al proceso de extracción mediante MSPD, ya que este procedimiento fue validado para tratar 1 g de abejas (10 individuos). Considerando este punto, se decidió continuar el estudio hasta el 100% de

mortalidad de los individuos en todos los grupos, con el fin contar con las 10 abejas necesarias para determinar el CPF y así evaluar su acumulación en el tiempo. De esta forma se continuó alimentando a las abejas que sobrevivieron los primeros diez días del ensayo con las mismas dosis que en un principio hasta el 100% de mortalidad, el cual se observó 6 días después de finalizado el ensayo. Estos resultados, correspondientes a 16 días de exposición, se presentan en la tabla 20.

**Tabla 20.** Concentración promedio de CPF en abejas luego de un 100% de mortalidad evaluada mediante MSPD/HPLC-DAD.

<i>Dosis promedio diaria (µg/g)</i>	<i>Concentración (ng/abeja)</i>	<i>Mortalidad (%)</i>
0,037	25	
0,060	27	
0,064	48	100
0,100	63	
0,122	175	

Para todas las dosis suministradas se obtuvieron valores de concentración de CPF cuantificables y proporcionales a las mismas; con un incremento exponencial de la concentración en abejas ( $R^2 = 0,9606$ ;  $p = 0,0119$ ) tal como se observa en la figura 21.



**Figura 21.** Ajuste exponencial para la concentración cuantificada para las distintas dosis administradas.

Esto demuestra que, en los seis días adicionales de exposición, en los cuales se produjo el 100% de muerte de las abejas, hubo una acumulación del insecticida en el organismo ya que se logró cuantificar una mayor concentración de CPF en cada dosis de exposición. Esto

corroborar también la ley de Haber, ya que la toxicidad sí depende del tiempo de exposición. Por otro lado, si las abejas hubieran consumido la dosis teórica que se planteó al comienzo del ensayo probablemente se hubieran podido observar cambios en el período establecido de 10 días. Cabe señalar que durante estos 6 días adicionales que se extendió el experimento, no se realizó el registro diario del número de abejas muertas, cantidad de alimento consumido ni comportamiento anormal.

### **Determinación toxicológica**

Por otra parte, la evaluación toxicológica corresponde al tratamiento de los datos experimentales basados en la ley de Haber y son llevados a cabo siguiendo el protocolo recomendado por la guía 245 de la OCDE, perteneciente a (Cresswell, 2017), de la Universidad de Exeter. Es importante mencionar que, para esta parte del tratamiento de datos, se utilizaron los resultados obtenidos durante el período que duró el ensayo con todas las correcciones hechas anteriormente y excluyendo la dosis de 0,122 ug/g por las razones antes expuestas.

Este protocolo prueba la relación entre la dosis de CPF en la dieta de las abejas domésticas, denotada como C, y la duración de la exposición que se requiere para producir un nivel específico de mortalidad (50%,  $DLA_{50}$ ), denotado como t, parámetros que son ajustados a la ecuación de (Druckrey & Küpfmüller, 1949)

$$c * t^b = constante \quad \text{ecuación 4.}$$

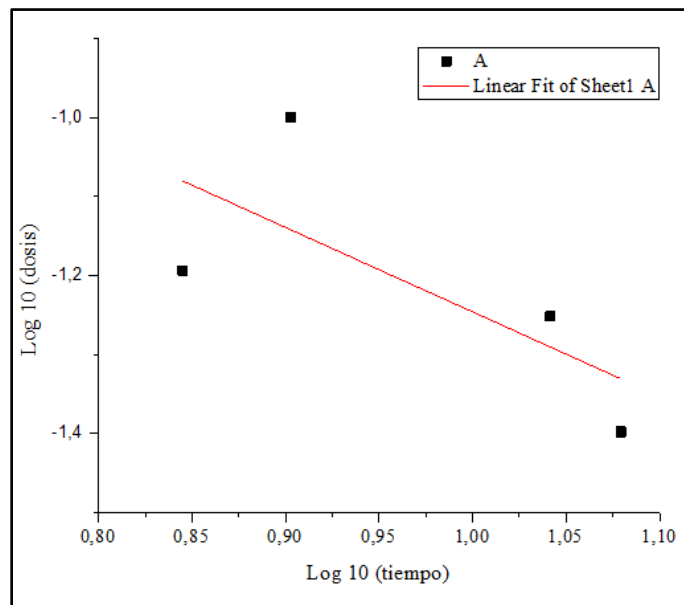
Esta relación se ajustó en ejes transformados logarítmicamente y la pendiente de la relación, b, se determinó mediante regresión lineal para evaluar la toxicidad dependiente del tiempo de cada uno de los tratamientos. Los valores empleados para el cálculo se presentan en la tabla 21; donde los valores de t representan el tiempo en el que se produce el 50% de mortalidad y se obtiene individualmente para cada tratamiento a partir de un ajuste sigmoideal-logarítmico del porcentaje de mortalidad diaria en función del día. La figura 22 muestra el ajuste logarítmico de la dosis versus tiempo para evaluar la ley de Haber.

**Tabla 21.** Valores utilizados para realizar el ajuste logarítmico de la C(μg/g) en función del t(días).

<i>Dosis o C (μg/g)</i>	<i>T (días) para alcanzar 50% de mortalidad</i>
-------------------------	---

0,037	12
0,060	11
0,064	7
0,100	8

La ecuación obtenida a partir de este ajuste logarítmico ( $y = -0,16 - 1,07 * x$ ) ( $R^2 = 0,2419$ ,  $p = 0,2967$ ); sigue la ley de Haber para la mortalidad en función de la dosis. Para valores de  $b < -1$ , según (Bommuraj, Chen, Birenboim, Barel, & Shimshoni, 2021), CPF ejercería una toxicidad reforzada en el tiempo o se bioacumularía. Mientras que para valores de  $b > -1$  ocurriría una desintoxicación disminuida por el tiempo. En este caso  $b$  toma un valor levemente inferior a  $-1$  por lo que indicaría toxicidad acumulada en el tiempo. Este resultado es concordante con la bioacumulación exponencial de CPF en abejas obtenido mediante la determinación analítica. Sin embargo, debido a los sesgos observados durante el ensayo de toxicología crónico el resultado no es concluyente.



*Figura 22. Ajuste log-log dosis versus tiempo para evaluar la ley de Haber.*

## 6.7. Evaluación de signos clínicos

En la tabla 22 se muestra un resumen con los datos experimentales correspondientes a mortalidad y comportamiento anormal de las abejas observado en cada réplica, de cada tratamiento, en el período de observación de  $24 \pm 2$  horas de alimentadas con la solución de



sacarosa al 50% p/v con y sin clorpirifos, con dimetoato y con acetonitrilo. Los síntomas son clasificados como:

- a: agresividad
- ap: apatía
- c: canibalismo
- hp: hiperactividad
- h: heces
- m: moribundas

**Tabla 22.** Datos diarios de mortalidad y comportamiento anormal de las abejas domésticas sometidas al ensayo de toxicidad oral crónica por 10 días, donde M, corresponde a la mortalidad, C.A. al comportamiento anormal, S el síntoma observado para el C.A y # el número de individuos.

#	Dosis (µg/g)	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4			Día 5		
		M #	C.A. #	S.	M #	C.A. #	S.	M #	C.A. #	S.	M #	C.A. #	S.	M #	C.A. #	S.
1	0,040	0	0	-	0	3	a	0	0	h	0	0	-	0	0	-
2		0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-
3		0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-	0	0	-
1	0,0556	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-
2		0	0	h	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
3		0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-
1	0,064	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	1	m
2		0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-
3		0	0	h	0	0	-	0	0	-	6	0	-	6	0	-
1	0,100	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h
2		0	0	-	0	2	a	0	0	h	0	0	-	0	0	-
3		0	0	-	0	1	Ap	0	0	h	0	0	-	0	0	-
1	0,122	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-
2		0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-
3		0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-	0	0	-
1	C. N.	0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-
2		0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	h
3		0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-	0	0	-
1	C. P.	0	0	h	2	0	-	2	0	-	3	0	-	5	0	-
2		1	0	-	1	0	-	1	0	h	1	0	-	3	0	-
3		0	0	-	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	1	m
1	C. ACN	0	0	-	0	0	h	0	0	-	0	0	-	0	0	-
2		0	0	-	0	0	h	0	0	-	1	0	-	1	0	-

Durante los primeros cinco días en los que fue desarrollado el ensayo, se observaron mayoritariamente heces en la mayoría de los contenedores y ciertos comportamientos hiperactivos al momento de realizar el cambio de los comederos.

Tabla 23. Continuación tabla 22

#	Dosis ( $\mu\text{g/g}$ )	Día 6			Día 7			Día 8			Día 9			Día 10		
		M #	C.A. #	S. S.	M #	C.A. #	S. S.	M #	C.A. #	S. S.	M #	C.A. #	S. S.	M #	C.A. #	S. S.
1	0,040	1	0	-	1	0	-	1	0	-	3	0	-	4	0	-
2		1	0	-	1	4	a	1	1	m	4	0	-	5	0	-
3		1	0	-	1	0	-	1	0	-	2	0	-	3	0	-
1	0,056	8	1	a	8	0	-	8	0	-	8	0	-	8	0	-
2		2	0	-	2	0	-	2	0	-	2	0	-	4	0	-
3		0	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-
1	0,064	3	0	-	3	0	-	5	0	-	6	0	-	7	0	-
2		7	2	a	7	0	-	9	0	-	9	0	-	9	0	-
3		6	0	-	6	0	-	6	0	-	6	0	-	6	0	-
1	0,100	3	0	-	3	0	-	3	3	m	4	0	-	4	0	-
2		4	1	a	4	0	-	4	0	-	5	0	-	6	0	-
3		6	2	m	7	0	-	7	0	-	7	0	-	8	0	-
1	0,122	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-
2		0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
3		0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1	0	-
1	C. N.	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-
2		1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-
3		1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	2	0	-
1	C. P.	7	3	C	7	0	-	7	1	a	8	0	-	8	0	-
2		7	3	C	8	0	-	9	0	-	9	0	-	10	0	-
3		5	5	C	6	0	-	6	1	a	8	0	-	10	0	-
1	C. ACN	0	0	-	0	0	-	0	1	m	1	0	-	2	0	-
2		1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	2	0	-

En general el síntoma que más se observó entre réplicas de tratamiento después del sexto día fue hiperactividad (hp) o apatía (Ap) el día anterior a su muerte. Aquellas abejas utilizadas en el control positivo mostraron signos claros de agresividad (a) entre ellas y canibalismo (c). Desde el primer período de observación se pudo observar heces (h) en casi todas las jaulas (no asociable a un número de individuos). Además, durante los días que duró el ensayo, no se observaron cambios en la morfología de las abejas ni en el color. El vuelo de cada individuo se vio claramente reducido a pesar de que los contenedores son lo suficientemente amplios para contener 10 abejas. Esto puede deberse a que las abejas pasaron la mayoría del

tiempo, > 20 horas, a oscuras y solo en el período de observación se observaron más inquietas.

Está comprobado que el uso del insecticida clorpirifos, incluso a concentraciones trazas, tiene profundos efectos no solo en cuanto a la mortalidad, sino también en la especificidad de la memoria apetitiva mediada por el olfato y otros aprendizajes de las abejas domésticas que conllevarían a la muerte en corto a mediano plazo (Urlacher, y otros, 2016).

## 7. CONCLUSIÓN

La técnica de MSPD demostró ser un método de extracción confiable y aceptable para la determinación de residuos de plaguicidas en abejas. Esta técnica acoplada a un sistema de detección de cromatografía líquida de alta resolución permitió llegar a LOQ del orden de los ng/abeja y recuperaciones superiores o iguales al 79% con un RSD < 7%.

Los análisis toxicológicos propuestos por la OCDE para la evaluación de la toxicidad de los pesticidas en abejas a corto -ensayo agudo- y mediano -ensayo crónico- plazo aplicados en el presente estudio, permitieron determinar una  $DL_{50}$  para clorpirifos de 2,53  $\mu\text{g/g}$  y una  $DLA_{50}$  de 0,72  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Con relación a la posible bioacumulación o toxicidad reforzada en el tiempo de clorpirifos; solamente en el grupo de abejas sometidas a una dosis intermedia en el ensayo crónico, pero que presentaron el mayor consumo de alimento promedio diario, se observaron concentraciones cuantificables del insecticida (23 ng/abeja). Mientras que en las abejas que fueron expuestas por 16 días, se presentaron concentraciones entre 25 y 175 ng/abeja. De acuerdo con el estudio toxicológico, clorpirifos podría ser considerado como un pesticida cuya toxicidad es reforzada en el tiempo. Este resultado es concordante con la bioacumulación exponencial en abejas obtenido mediante la determinación analítica. Sin embargo, debido a los sesgos observados durante el ensayo de toxicología crónico este resultado no es concluyente. De todas formas, el resultado analítico evidencia una bioacumulación del insecticida en el tiempo y con ello la idea de que aún a dosis subletales el uso de este pesticida es tóxico y dañino para abejas.

Es necesaria una reevaluación de los estudios de toxicidad crónica, los cuales debiesen ser realizados con concentraciones reales de campo y/o por un período de tiempo más extenso, ya que las abejas están expuestas a contaminantes desde el día en el que nacen en sus colmenas hasta que mueren en los campos de cultivo.

## 8. REFERENCIAS

- Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., . . . Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2020). Chapter 3 - Pesticides, History, and Classification. En C. Egbuna, & B. Sawicka, *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (págs. 29-42).
- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (2014). *Guía de Evaluación de Riesgos de Plaguicidas para las Abejas*.
- Balsebre Cajiao, A. (2018). Determinación de pesticidas organofosforados, organohalogenados y neonicotinoides, en abejas de apiarios de la V y VI región en Chile. (*Tesis de Magíster*). Universidad de Chile, Santiago.
- Balsebre, A., Báez, M. E., Martínez, J., & Fuentes, E. (2018). Matrix solid-phase dispersion associated to gas chromatography for the assessment in honey bee of a group of pesticides of concern in the agricultural field. *Journal of Chromatography A*, 47-54.
- Banco Central. (24 de Febrero de 2022). *Banco Central Chile*. Obtenido de <https://www.bcentral.cl/en/web/banco-central/foreign-trade-of-goods-excel>
- Barcellos Hoff, R., & Mara Pizzolato, T. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: a review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *Trends in Analytical Chemistry*.
- Bargańska, Ż., Ślebioda, M., & Namieśnik, J. (2015). Honey bees and their products - bioindicators of environmental contamination. *Environmental Science and Technology*.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods*, 151-162.
- Bloomquist, J. R. (2009). Insecticides: Chemistries and characteristics. En U. o. Minnesota, *Integrated Pest Management*. Florida.

- Bommuraj, V., Chen, Y., Birenboim, M., Barel, S., & Shimshoni, J. (2021). Concentration- and time-dependent toxicity of commonly encountered pesticides and pesticide mixtures to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*.
- Botías, C., & Sánchez-Bayo, F. (2018). Papel de los plaguicidas en la pérdida de polinizadores. *Ecosistemas*, 34-41.
- Brauman, K., & Daily, G. (2014). Ecosystem Services. En D. S. Elias, *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (págs. 1148-1154). Elsevier.
- British Crop Production Council. (2011). *The pesticide manual : a world compendium*.
- Calderon, R., García-Hernández, J., Palma, P., Leyva-Morales, J., Zambrano-Soria, M., Bastidas-Bastidas, P., & Godoy, M. (2022). Assessment of pesticide residues in vegetables commonly consumed in Chile and Mexico: Potential impacts for public health. *Journal of Food Consumption and Analysis*.
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honeybees: A rol for probiotics as mediators of environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*.
- Coria, J., & Elgueta, S. (2022). Towards safer use of pesticides in Chile. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Cresswell, J. E. (2017). *Haber's Law Test - Manual*. Exeter.
- Devillers, J. (2002). The ecological importance of honeybees and their relevance to ecotoxicology. En J. Devillers, & M.-h. Pham-Delegue, *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals* (págs. 1-11). Londres: Taylor and Francis Group.
- Druckrey, H., & Küpfmüller, K. (1949). Dosis und Wirkung. Beiträge zur theoretischen Pharmakologie. 515 - 645.
- Edwards, C. A. (1975). Factors that affect persistence of pesticides in plants and soils. *Pure and Applied Chemistry*, 39 - 56.

- Environmental Protection Agency. (2012). Chapter 6 - Insecticides and environmental pesticide control. Subchapter II - Environmental pesticide control. En E. P. Agency, *United States Code, 2013 Edition* (pág. Sec. 136). U.S. Government Publishing Office.
- Environmental Protection Agency. (2021). *Chlorpyrifos*. EPA Press.
- European Commission. (10 de Marzo de 2022). *European Comission*. Obtenido de Chlorpyrifos & Chlorpyrifos-methyl: [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/chlorpyrifos-chlorpyrifos-methyl\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/chlorpyrifos-chlorpyrifos-methyl_en)
- European Food Safety Authority. (2015). The 2013 European Union report on pesticide residues un food. *EFSA Journal*, 1-169.
- European Medicines Agency. (1995). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY*.
- Fishel, F. M. (2010). *Pesticide Formulations*. Florida.
- Food and Agricultural Organization of the United States. (22 de Marzo de 2022). *FAOSTAT*. Obtenido de Pesticides Trade: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RT>
- Franca, S. d., Breda, M., Barbosa, D., Araujo, A., & Guedes, C. (2017). The sublethal effects of insecticides in insects. En V. D. Shields, *Biological control of pest and vector insects* (pág. Chapter 2). Maryland.
- Fraunhofer Chile Research. (2015). *Polinización y agricultura sustentable*. Santiago: Fraunhofer Chile.
- Giesy, J. P., & Solomon, K. R. (2014). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Board.
- Grimalt, S., & Dehouck, P. (2016). Review of analytical methods for the determination of pesticide residuos in grapes. *Journal of Chromatography A*, 1 - 23.

- Harvey, D. (2021). *Analytical Chemistry*. LibreTexts.
- Hung, K.-L. J. (2017). The worldwide importances of honeybees as pollinators in natural habitats.
- Kumar, G., Singh, S., & Kodigenahalli Nagarajaiah, R. P. (2020). Detailed Review on Pesticidal Toxicity to Honey Bees and Its Management. En R. E. Rebolledo Ranz, *Modern Beekeeping: Bases for Sustainable Production* (págs. 13-34). Londres: IntechOpen.
- Li, Z. G., Huang, J. N., Ma, C. S., Xiao, L. C., Zhao, Y. Z., Nie, H. Y., & Su, S. K. (2017). Effects of Sublethal Concentrations of Chlorpyrifos on Olfactory Learning and Memory Performances in Two Bee Species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Sociobiology*, 174-181.
- Mackay, D., Giesy, J. P., & Solomon, K. R. (2014). Fate in the Environment and Long-Range Atmospheric Transport of the Organophosphorus Insecticide, Chlorpyrifos and Its Oxon. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in terrestrial and Aquatic Systems in the United States* (pág. 3). London: Springer Open.
- Mahajan, R., Verma, S., Chandel, S., & Chatterjee, S. (2021). Organophosphate pesticide: usage, environmental exposure, health effects, and microbial bioremediation. En S. Das, & H. R. Dash, *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (págs. 473-490). India.
- Makino, Y., Oshito, S., Murayama, Y., Mori, M., Kawagoe, Y., & Sakai, K. (2009). Nondestructive analysis of chlorpyrifos on apple skin using uv reflectance. *Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers)*, 1955 - 1960.
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., Vithanage, M., Patra, A. K., & Manna, M. C. (2020). Impact of agrochemicals on soil health. En M. Prasad, *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation. Pesticides and Chemical Fertilizers* (págs. 161-187). Sri Lanka: Elsevier.



- Matthews, G. A., Bateman, R., & Miller, P. (2014). *Pesticide Application Methods*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd.
- Ministerio de Salud. (15 de 03 de 2021). *Biblioteca del Congreso Nacional de Chile*. Obtenido de <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?i=1152226>
- Narváez Valderrama, J. F., Palacio Baena, J. A., & Molina Pérez, F. J. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Gestión y Ambiente*, 27-38.
- National Research Council. (2007). Status of Pollinators in North America. En N. R. Council, *Status of Pollinators in North America* (págs. 18-22). Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. (09 de 10 de 2017). *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico*. Obtenido de OCDE: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-245-honey-bee-apis-mellifera-l-chronic-oral-toxicity-test-10-day-feeding\\_9789264284081-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-245-honey-bee-apis-mellifera-l-chronic-oral-toxicity-test-10-day-feeding_9789264284081-en)
- Organization for Economic Co-operation and Development. (12 de 02 de 2003). *OECD*. Obtenido de <https://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/2956551.pdf>
- Pérez Silva, R., & Valdés, A. (2019). *Análisis de la evolución y desempeño agroexportador de Chile, 2000-2017*. Santiago: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias -Odepa-.
- Planes, E., & Fuchs, J. (2015). Cuales son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencia e Investigación*, 45-62.
- Porrini, C., Sabatini, A. G., Girotti, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., . . . Celli, G. (2003). Honeybees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 63-70.
- Quatrin, G. D., Pizzutti, I. R., Gebler, L., Dias, J. V., & Cardoso, C. D. (2020). New analytical method for chlorpyrifos determination in biobeds constructed in Brazil: Development and validation. *Journal of Chromatography B*.

- Ramos, L. (2012). Critical Overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 84-98.
- Renzi, M. T. (2013). *Effects of pesticides on honey bees (Apis mellifera L.) : study of a specific rour of exposure and evaluation of biochemical-phhysiological changes in the assessment of the pesticides toxicity*. Bolonia: Agricultural Sciences.
- Risher, J. F., & Navarro, H. A. (24 de 03 de 2022). *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)*. Obtenido de Toxicological Profile For Chlorpyrifos: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>
- Samsidar, A., Siddiquee, S., & Shaarani, S. M. (2017). A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 188-201.
- Sánchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees: A risk assessments. *PLoS ONE*.
- Sánchez-Bayo, F., & Goka, K. (2016). Impacts of pesticides on honey bees. En E. D. Chambó, *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research* (pág. Chapter 4).
- Servicio Agrícola Ganadero. (2009). *Resolución 5392*. Santiago.
- Servicio Agrícola Ganadero. (2021). *Lista de Plaguicidas Autorizados*. Santiago.
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., & Hautier, L. (2018). Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. *Nature*, 1-11.
- Sud, D., Kumar, J., Kaur, P., & Bansal, P. (2020). Toxicity, Natural and Induced degradation of Chlorpyrifos. *Journal of Chilean Chemical Society*, 4807 - 4816.
- Torres-Palma, R. A., & Serna-Galvis, E. A. (2018). Chapter 7 - Sonolysis. En S. C. Ameta, & R. Ameta, *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment-Emerging Green Chemical Technology* (págs. 177-213).

Urlacher, E., Monchanin, C., Riviere, C., Richard, F.-J., Lombardi, C., Michelsen-Heath, S., . . . Mercer, A. R. (2016). Measurements of Chlorpyrifos levels in forager bees and comparison with levels that disrupt honey bee odor-mediated learning under laboratory conditions. *Journal of Chemical Ecology*.

World Health Organization. (2015). WHO Specifications and evaluations for public health pesticides.

Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., & Chen, F. (2012). A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*, 900-925.