



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Plaguicidas

**Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas
empleados en el cultivo del arroz en el Parque Natural de
La Albufera de Valencia**

Memoria de Tesis Doctoral
presentada por:

D. Oscar Andreu Sánchez

Para optar al grado de Doctor por la UPV

Directores:

Prof. Dr. José M^a. Carrasco Dorrien

Prof. Dr. Enrique Andreu Moliner

Tutor:

Prof. Dr. José M^a. Bellés Albert

VALENCIA, mayo 2008

RESUMEN

El fallado del arroz, producido por *Pyricularia oryzae*, es una importante enfermedad de este cereal que, en los años en que se presenta, causa graves pérdidas económicas. Por ello, actualmente, se utilizan sistemáticamente fungicidas para prevenir su posible aparición, tratamientos que en la mayor parte de los casos están injustificados, debido a que no se dan las condiciones necesarias para el desarrollo de este patógeno. Los tratamientos fitosanitarios, conllevan la emisión periódica o puntual de xenobióticos que, como residuos procedentes de estas tareas, llegan a los ecosistemas acuáticos a través de acequias, canales de desagüe e incluso vía aérea, ocasionando con ello importantes efectos sobre la biota. Estas sustancias pueden ser bioacumuladas por diferentes eslabones de las cadenas tróficas y llegar a alcanzar niveles altamente perjudiciales para el ecosistema. Aunque los niveles de la gran mayoría de productos fitosanitarios suelen encontrarse en proporciones suficientemente bajas como para no causar la muerte directa y repentina de los organismos acuáticos, es necesario conocer la capacidad de las especies para resistir y por lo tanto vivir en estos medios periódicamente contaminados y, además, acumular en sus tejidos los tóxicos del mismo (bioconcentración), sobre todo cuando el destinatario final puede ser el hombre.

Para establecer el riesgo derivado del uso de plaguicidas es necesario realizar una serie de estudios encaminados a evaluar el riesgo potencial para el medio ambiente (ERA), para dicha evaluación del riesgo se han llevado a cabo los siguientes estudios:

1. Determinar las pautas de evolución de los fungicidas considerados, en sistemas acuáticos, estudiando experimentalmente sus constantes de degradación por hidrólisis, biodegradación por microorganismo y algas.
2. Determinar la toxicidad, efectos subletales y actividad bioacumulativa de los plaguicidas empleados contra *Pyricularia oryzae* en P.N. de L'Albufera de Valencia en diferentes organismos diana presentes en el ecosistema acuático del Lago.
3. Determinar los niveles de contaminación y la evolución temporal de los residuos de fungicidas en las parcelas tratadas y en los canales de desagüe. Así como realizar un seguimiento de la contaminación en el P.N. de L'Albufera de Valencia analizando los valores de inmisión de los fungicidas seleccionados.
4. Evaluar los riesgos ambientales del uso de fungicidas en el cultivo del arroz de las zonas húmedas mediterráneas.

Para llevar a cabo estos estudios se han realizado análisis cromatográficos de muestras de agua tomadas en diferentes puntos del Lago de la Albufera de Valencia, determinando así las PEC (*Predicted Environmental Concentrations*) para cada compuesto. Posteriormente se establecieron los valores PNEC (*Predicted Non Effect Concentrations*) mediante ensayos de toxicidad con dos tipos de microorganismos acuáticos de ambientes estuarinos y de agua dulce. El Riesgo Ambiental de cada compuesto se establece por el ratio PEC/PNEC. Por último, se seleccionó el compuesto tebuconazol como compuesto modelo para realizar un ensayo de capacidad bioacumulativa en organismos vertebrados, para estos ensayos de bioacumulación se empleó el pez cebrá (*Danio rerio*) finalmente con los valores de bioacumulación se planteó un modelo matemático de la capacidad bioacumulativa para el resto de plaguicidas de la misma familia que el plaguicida ensayado en laboratorio.

RESUM

El fallat de l'arròs, produït per *Pyricularia oryzae*, és una important malaltia d'este cereal que, en els anys en què es presenta, causa greus pèrdues econòmiques. Per això, actualment, s'utilitzen sistemàticament fungicides per a previndre la seua possible aparició, tractaments que en la major part dels casos estan injustificats, pel fet que no es donen les condicions necessàries per al desenrotllament d'este patogen. Els tractaments fitosanitaris, comporten l'emissió periòdica o puntual de xenobiòtics que, com a residus procedents d'estes tasques, arriben als ecosistemes aquàtics a través de séquies, canals de desaiçue i inclús via aèria, ocasionant amb això importants efectes sobre la biota. Estes substàncies poden ser bioacumulades per diferents anelles de les cadenes tròfiques i arribar a aconseguir nivells altament perjudicials per a l'ecosistema. Encara que els nivells de la gran majoria de productes fitosanitaris solen trobar-se en proporcions prou baixes com per a no causar la mort directa i sobtada dels organismes aquàtics, és necessari conèixer la capacitat de les espècies per a resistir i per tant viure en estos mitjans periòdicament contaminats i, a més, acumular en els seus teixits els tòxics del mateix (bioconcentració), sobretot quan el destinatari final pot ser l'home.

Per a establir el risc derivat de l'ús de plaguicides és necessari realitzar una sèrie d'estudis encaminats a avaluar el risc potencial per al medi ambient (ERA), per a la dita avaluació del risc s'han dut a terme els estudis següents:

- Determinar les pautes d'evolució dels fungicides considerats, en sistemes aquàtics, estudiant experimentalment els seus constants de degradació per hidròlisi, biodegradació per microorganisme i algues.
- Determinar la toxicitat, efectes subletals i activitat bioacumulativa dels plaguicides empleats contra *Pyricularia oryzae* en P.N. de L'Albufera de València en diferents organismes diària presents en l'ecosistema aquàtic del Llac.
- Determinar els nivells de contaminació i l'evolució temporal dels residus de fungicides en les parcel·les tractades i en els canals de desaiçue. Així com realitzar un seguiment de la contaminació en el P.N. de L'Albufera de València analitzant els valors d'inmisió dels fungicides seleccionats.
- Avaluar els riscos ambientals de l'ús de fungicides en el cultiu de l'arròs de les zones humides mediterrànies.

Per a dur a terme estos estudis s'han realitzat anàlisis cromatogràfiques de mostres d'aigua preses en diferents punts del Llac de l'Albufera de València, determinant així les PEC (Predicted Environmental Concentrations) per a cada compost. Posteriorment es van establir els valors PNEC (Predicted Non Effect Concentrations) per mitjà d'assajos de toxicitat amb dos tipus de microorganismes aquàtics d'ambients estuarins i d'aigua dolça. El Risc Ambiental de cada compost s'establix pel ràtio PEC/PNEC. Per ultime, es va seleccionar el compost tebuconazol com compost model per a realitzar un assaig de capacitat de bioacumulació en organismes vertebrats, per a estos assajos de bioacumulació es va emprar el peix zebra (*Danio rerio*) finalment amb els valors de bioacumulació es va plantejar un model matemàtic de la capacitat bioacumulativa per a la resta de plaguicides de la mateixa família que el plaguicide assajat en laboratori.

ABSTRACT

The riceblast is produced by *Pyricularia oryzae* fungus, is an important disease of this cereal that, in the years in which appears, causes serious economic losses. For it, nowadays, they are in use systematically fungicidal to anticipate his possible appearance, treatments that in most of the cases are unjustified, due to the fact that they do not give themselves the conditions necessary for the development of pathogenic this one.

The pesticide treatments, they carry the periodic or punctual emission of xenobiotics that, as residues proceeding from these tasks, come to the aquatic ecosystems across irrigation ditches, channels of outlet and enclosedly airway, causing with it important effects on the biota. These substances can be bioaccumulated for different links of the trophic chains and manage to reach levels highly harmful to the ecosystem.

Although, the environmental levels of pesticides are very low to induce the direct and sudden death of the aquatic organisms. It is necessary to know the capacity of the aquatic species to resist and therefore to live in these contaminated environment.

To establish the risk derived from the use of pesticides it is necessary to perform many studies directed to evaluating the potential risk for the environment, for the above mentioned evaluation of the risk the following studies have been carried out:

1. To determine the guidelines of evolution of the considered fungicides, in aquatic systems, studying experimentally his degradation kinetics and, biodegradation process.
2. To determine the toxicity, sublethal effects and bioaccumulation of the pesticides used to control the riceblast in the Lake of Albufera Natural Park (ANP) in Valencia in different present representative organisms in the aquatic ecosystem.
3. To determine the levels of pollution and the temporary evolution of the residues of fungicides in the treated plots and in the irrigation channels. As well as to realize a follow-up of the pollution in the ANP analyzing the values of unmission of the selected fungicides.
4. To evaluate the environmental risks of the use of fungicides in the mediterranean paddy fields

To carry out these studies there have been realized chromatographic analyses of water samples taken in different points of the Albufera Lake of Valencia, determining the PEC (Predicted Environmental Concentrations) for every compound. Alter that, there were established the PNEC values (Predicted Non Effect Concentrations) by means of ecotoxicological tests in two types of aquatic microorganisms from estuarine and fresh water.

The ERA is established by means of the PEC/PNEC ratio. Finally, tebuconazole was selected as model to establish the Bioconcentration Factor in zebra (*Danio rerio*) finally with the theoretical BCF obtained in laboratory was designed a mathematical model based on the Mackay Fugacity Model for the rest of azolic pesticides.

Agradecimientos

Llegados a este punto, sentarse y escribir los agradecimientos es una tarea reconfortante por el simbolismo que encierra, y no menos complicada, por que recordar a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo, no es tarea fácil y siempre corremos el riesgo, nunca mejor dicho, de dejarnos a alguien en el teclado.

En primer lugar quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la subvención económica concedida para la realización del Proyecto "AGL-2002-04532-C03-01", y la concesión de una beca de investigación FPI, sin la cual difícilmente podría haberme dedicado en exclusiva a este complicado "negocio" de investigar....

Agradecer a mi tutor, José M^a Bellés, y mis directores, el tiempo y la dedicación prestada durante estos años, sin la cual esta tesis doctoral no habría visto la luz. Gracias al Prof. Dr. José M^a Carrasco Dorrien, por confiar en mí y permitirme trabajar en su Laboratorio; estos años a su lado han sido una experiencia enriquecedora e inolvidable. En segundo lugar, dar las gracias al Prof. Dr. Enrique Andreu Moliner, por ayudarme a entrar y a salir de este gran lío; es todo un referente para mí como investigador y como padre.

Quiero dar las gracias, muy especialmente, al personal del Laboratorio Agroalimentario de la Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana; por que parte de los análisis cromatográficos de esta tesis han sido realizados en sus fantásticas instalaciones, gracias al Dr. Miguel Gamón, su director, y a todo el personal de la Sección de Análisis de Residuos, en especial a Amparo, Belén, Rosa y Adolfo por su predisposición ante cualquier duda o problema, por sus charlas durante mis visitas y por su profesionalidad.

La vida en un laboratorio en ocasiones no es fácil, pero siempre hay gente que te hace la existencia menos complicada, no sabemos la importancia de una sonrisa, de un "buenos días" o de un "ánimo que ya queda menos" hasta que, como es el caso, nos sentamos y volvemos la mirada al pasado, gracias a Nancy y Ana por todos esos *cafeses* de la hora del recreo y los buenos ratos en el descanso y a Pepita, por los buenos ratos pasados, por su compañía y por facilitarme las cosas en todo momento.

También quiero agradecer al Dpto. de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia y al Dpto. de Biología funcional de la Universidad de Valencia la posibilidad de trabajar en sus laboratorios, y a su personal de administración y servicios, por facilitarme el trabajo dentro y fuera de ellos.

Quiero agradecer también a los compañeros de departamento del Área de Bioquímica, el apoyo y ánimo dados durante estos años, a los compañeros de Micro: M^a Ángeles, Rosa, Salut, Ana, etc, etc y como no, a Ramón por su amistad y ayuda con el Masas. A los alumnos que me han

“sufrido” estos años, y a las *projectandas* que han pasado por el Laboratorio a lo largo de estos años, en especial a Kristell y Laura. A Diego y Amparo del Dpto. de Producción Vegetal en la ETSMRE, por su ayuda con los tratamientos en los arrozales y su predisposición ante cualquier duda. Y como no, a las compañeras del Laboratorio de Ecotoxicología y Calidad Ambiental de la Universitat de Valencia, donde he realizado parte de la investigación, gracias a la Dra. Ferrando y Dras. Sancho y Villarroel, (Encarna y M^aJo en la vida civil....) por dejarme trastear en vuestra “casa”.

Quiero agradecer también al Dr. José Vicente Tarazona, director del Dpto. de Medio Ambiente del INIA y a todo su equipo, por permitirme trabajar en su laboratorio durante mi estancia, gracias en especial a Chema, Miguel y Patricia, por su amistad y apoyo en la distancia. Y, agradecer a la Dra. Cinta Porte, del CID-IIQAB y a su equipo, el trato recibido durante mi estancia de cuatro meses en su laboratorio, toda una experiencia.

Quiero recordar a Pepe, barquero del Palmar, por acompañarme durante estos años por toda La Albufera en busca de mis muestras de agua, gracias por hacerme los muestreos más amenos y entretenidos y por esa sabiduría popular tuya.

A los amigos que durante estos largos años han sufrido las ausencias del que escribe, a Santi, por esos “zumos de cebada” y por que te he tenido muy descuidado estos últimos meses. A Ramón y Amparito, por sus cenas y compañía y a la colla que está dispersa por toda L’Horta Nord. A Elena, mi *Katalana* favorita, Lidia y Jose y a tod@s los que son aunque no estén. ¿Y por qué no...? a Bamba (la *Canis lupus familiaris*) y Chicho (el *Felis silvestris catus*) por su compañía en las largas noches de WordTM, ExcelTM y SPSSTM.

Agradecer a mi madre, hermanos, abuela y al resto de familia: tí@s, primas, cuñadas y a mis suegros, el apoyo y los ánimos dados a lo largo de estos años.

Y en último lugar y no por ello menos importante, a Elena, la persona más importante en mi vida, gracias a ella he podido cerrar esta larga etapa, es un apoyo constante, una fantástica compañera y mejor persona. Gracias a ella por su amor, paciencia y por aportarme una visión diferente de la vida.

A Elena

“INTRODUCCIÓN A LAS FÁBULAS PARA ANIMALES”

Durante muchos siglos
la costumbre fue ésta:
aleccionar al hombre con historias
a cargo de animales de voz docta,
de solemne ademán o astutas tretas,
tercos en la maldad y en la codicia
o necios como el ser al que glosaban.
La humanidad les debe
parte de su virtud y su sapiencia
a asnos y leones, ratas, cuervos,
zorros, osos, cigarras y otros bichos
que sirvieron de ejemplo y moraleja,
de estímulo también y de escarmiento
en las ajenas testas animales,
al imaginativo y sutil griego,
al severo romano, al refinado
europeo,
al hombre occidental, sin ir más lejos.
Hoy quiero —y perdonad la petulancia—
compensar tantos bienes recibidos
del gremio irracional
describiendo algún hecho sintomático,
algún matiz de la conducta humana
que acaso pueda ser educativo
para las aves y para los peces,
para los celentéreos y mamíferos,
dirigido lo mismo a las amebas
más simples
como a cualquier especie vertebrada.
Ya nuestra sociedad está madura,
ya el hombre dejó atrás la adolescencia
y en su vejez occidental bien puede
servir de ejemplo al perro
para que el perro sea
más perro,
y el zorro más traidor,
y el león más feroz y sanguinario,
y el asno como dicen que es el asno,
y el buey más inhibido y menos toro.
A toda bestia que pretenda
perfeccionarse como tal
—ya sea
con fines belicistas o pacíficos,
con miras financieras o teológicas,
o por amor al arte simplemente—
no cesaré de darle este consejo:
que observe al *homo sapiens*, y que aprenda.

Ángel González

Índice General

Índice general.....	i
Íntemático.....	iii
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	ix

Índice temático

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. NECESIDAD DE ESTABLECER RESTRICCIONES A LA UTILIZACIÓN DE PLAGUICIDAS EN LAS ZONAS HÚMEDAS MEDITERRÁNEAS	3
I.1.1. Efectos de la contaminación de los ecosistemas por plaguicidas.....	3
I.1.2. Normativa europea sobre la protección ambiental de las zonas húmedas frente al uso de plaguicidas.....	6
I.2. INTERÉS Y DESCRIPCIÓN DEL PARQUE NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA ⁸	
I.3. CONTROL DEL HONGO PYRICULARIA ORYZAE CON FUNGICIDAS AZÓLICOS EN LOS ARROZALES DEL ENTORNO DE LA ALBUFERA DE VALENCIA	10
I.3.1. Introducción.....	10
I.3.2. Ciclo de <i>Pyricularia oryzae</i>	11
I.3.3. Sintomatología.....	11
I.3.4. Control.....	12
I.3.5. Propiedades de los fungicidas azólicos utilizados para el control de <i>Pyricularia oryzae</i> ¹³	
I.4. NECESIDAD DE LA EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES DEL USO DE FUNGICIDAS AZÓLICOS EMPLEADOS PARA EL CONTROL DE PYRICULARIA ORYZAE EN EL PARQUE NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA	16
I.4.1. Utilización de ensayos de toxicidad en evaluaciones de riesgo ambiental.....	18
I.4.2. Metodología para la evaluación del riesgo ambiental (ERA).....	20
II. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA	21
III. DEGRADACIÓN Y DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS AZÓLICOS EN MEDIOS ACUÁTICOS	25
III.1. INTRODUCCIÓN	27
III.2. HIDRÓLISIS EN MEDIO ACUOSO	27
III.2.1. Influencia del pH y la temperatura en la velocidad de hidrólisis del procloraz y tebuconazol.....	27
III.2.2. Material y métodos.....	28
III.2.2.1. Fungicidas estudiados.....	28
III.2.2.2. Reactivos y Disolventes.....	29
III.2.2.3. Condiciones de los ensayos de hidrólisis.....	30
III.2.2.4. Análisis de los residuos de fungicidas.....	32
III.2.2.5. Instrumental analítico.....	33
III.2.2.6. Cálculo de las concentraciones residuales.....	34
III.2.2.7. Cálculo de la vida media de los plaguicidas.....	35
III.3. PROCESOS DE FOTÓLISIS EN MEDIO ACUOSO	36
III.3.1. Efecto de la luz día y de la aireación en la pauta de evolución de la concentración de los plaguicidas en agua ultrapura estéril.....	36
III.3.2. Efecto de la luz ultravioleta en la pauta de evolución de la concentración de los plaguicidas en agua destilada.....	37
III.4. HIDRÓLISIS DE LOS FUNGICIDAS AZÓLICOS A 148°C EN AGUA ULTRAPURA	39
III.4.1. Introducción.....	39
III.4.2. Condiciones de los ensayos.....	39
III.5. ESTUDIO DE LOS PROCESOS BIÓTICOS QUE INFLUYEN LA DEGRADACIÓN Y DISIPACIÓN DE TEBUCONAZOL, PROCLORAZ Y CARBENDAZIMA	40
III.5.1. Introducción.....	40
III.5.2. Evolución de la concentración de procloraz, tebuconazol y carbendazima, en cultivos monoalgales y en aguas de la Albufera de Valencia. Condiciones del ensayo con cultivos monoalgales.....	41
III.6. RESULTADOS	44
III.6.1. Estudio de la hidrólisis de los fungicidas procloraz y tebuconazol en función del pH y de la Temperatura.....	44
III.6.2. Estudio de la hidrólisis del procloraz y tebuconazol bajo diferentes condiciones de iluminación y aireación.....	50
III.6.3. Estudio de la fotólisis de los fungicidas tebuconazol y procloraz por luz ultravioleta.....	54

III.6.4. Estudio de la estabilidad térmica a 148°C	56
III.6.5. Evolución de la concentración de carbendazima y procloraz en cultivos monoalgales	58
III.6.6. Evolución de las concentraciones de carbendazima y tebuconazol en disoluciones en agua de la Albufera de Valencia	60
IV. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES AMBIENTALES PREDECIBLES	63
IV.1. INTRODUCCIÓN	65
IV.1.1. Justificación	65
IV.1.2. Antecedentes	66
IV.1.3. Plan de trabajo	67
IV.1.4. Material y Métodos	68
IV.1.4.1. Época de muestreos de aguas en el Lago de la Albufera	68
IV.1.4.2. Selección de los puntos de muestro.	69
IV.1.4.3. Muestreo en parcelas experimentales	72
IV.1.4.4. Toma de muestras de las aguas de la Albufera y de las parcelas experimentales.	74
IV.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO DE LA ALBUFERA	75
IV.2.1. Acondicionamiento de la muestra	76
IV.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)	76
IV.2.2.1. Extracción con discos 3M™ Empore® para el análisis de compuestos fungicidas en aguas Naturales del P.N. de La Albufera de Valencia	76
IV.2.2.2. Extracción de carbendazima en muestras de agua del P.N. de La Albufera de Valencia	78
IV.2.4. Determinación de los niveles de plaguicidas en muestras de agua de La Albufera de Valencia	80
IV.2.5. Separación, identificación y determinación cuantitativa de la carbendazima	81
IV.2.6. Separación, identificación y determinación cuantitativa de los fungicidas azólicos y algunos insecticidas y herbicidas.	81
IV.2.6.1. Condiciones cromatográficas	82
IV.2.6.2. Adquisición de datos	83
IV.2.7. Validación de los métodos analíticos	84
IV.2.7.1. Ensayos de recuperación del método analítico	84
IV.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE FUNGICIDAS EN LAS AGUAS TRAS LOS TRATAMIENTOS EN PARCELAS EXPERIMENTALES	85
IV.3.1. Aplicación de plaguicidas en parcelas experimentales	85
IV.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LAS AGUAS DE LA ALBUFERA DE VALENCIA, DURANTE LA ÉPOCA DE LOS TRATAMIENTOS CON FUNGICIDAS REALIZADOS EN LOS AÑOS 2003 A 2005	87
IV.4.1. Introducción	87
IV.4.2. Resultados y discusión	88
IV.4.2.1. Carbendazima	89
IV.4.2.2. Flusilazol	91
IV.4.2.3. Procloraz	92
IV.4.2.4. Propiconazol	94
IV.4.2.5. Tebuconazol	96
IV.4.2.6. Triciclazol	98
IV.4.2.7. Otros plaguicidas detectados	101
IV.4.2.8. Parámetros estadísticos descriptivos correspondientes al análisis de fungicidas	102
IV.4.2.9. Frecuencia de la contaminación por los fungicidas estudiados en las aguas del lago de la Albufera de Valencia	106
IV.4.3. Conclusiones del estudio de concentraciones ambientales predecibles en las aguas del Lago de La Albufera de Valencia	106
IV.5. EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LAS AGUAS DE LAS PARCELAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON FORMULADOS COMERCIALES	107
IV.5.1. Presentación de los resultados	107
IV.5.2. Diseño experimental	107
IV.5.3. Resultados y discusión	108
IV.5.3.1. Concentración residual de los fungicidas en parcelas experimentales	108

IV.5.3.2. Análisis de la Varianza (ANOVA) correspondiente a los análisis de residuos de fungicidas analizados en la aguas de los arrozales (parcelas experimentales)	118
IV.5.4. Conclusiones y comentarios al estudio estadístico	123
IV.5.5. Discusión de los resultados obtenidos en el análisis de fungicidas en las aguas de las parcelas experimentales	128
V. ENSAYOS DE TOXICIDAD EN COMPUESTOS FUNGICIDAS AZÓLICOS	135
V.1. INTRODUCCIÓN	137
V.1.1. Toxicidad de los plaguicidas	137
V.1.2. Utilización de bioensayos en la valoración de los efectos toxicológicos de los plaguicidas	138
V.1.3. Bioensayos de toxicidad	139
V.1.4. Efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos.	145
V.2. JUSTIFICACIÓN	147
V.3. OBJETIVOS	149
V.4. MATERIAL Y MÉTODOS	150
V.4.1. Compuestos químicos ensayados	150
V.4.2. Material biológico empleado para los ensayos de toxicidad	151
V.4.3. Condiciones de ensayo	152
V.4.3.1. Ensayo de toxicidad con <i>Thamnocephalus platyurus</i>	152
V.4.3.2. Ensayo de toxicidad con <i>Artemia franciscana</i>	152
V.4.4. Preparación de las diluciones de tóxico y desarrollo del ensayo	153
V.4.5. Sembrado y llenado de la placa	154
V.4.6. Incubación de la placa y lectura de resultados	155
V.4.7. Lectura de placas y cálculo de la CE ₅₀	155
V.4.8. Test de referencia	155
V.4.9. Análisis estadístico de los ensayos de toxicidad	156
V.5. RESULTADOS	156
V.5.1. Ensayos con <i>Artemia franciscana</i> y los compuestos fungicidas y las formulaciones comerciales utilizadas	156
V.5.2. Ensayos con <i>Thamnocephalus platyurus</i> en los compuestos plaguicidas y formulados comerciales	159
V.6. DISCUSIÓN	163
V.7. CONCLUSIONES	166
VI. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (BCF) EN PECES Y MODELIZACIÓN DEL PROCESO CON EL MODELO DE FUGACIDAD DE MACKAY (1991)	167
VI.1. INTRODUCCIÓN	169
VI.2. OBJETIVOS	172
VI.3. MATERIAL Y MÉTODOS	172
VI.3.1. Compuestos químicos y reactivos empleados	172
VI.3.2. Diseño experimental	173
VI.3.3. Ensayo de toxicidad del tebuconazol en <i>Danio rerio</i>	174
VI.3.4. Preparación y toma de muestras de agua y tejido	174
VI.3.5. Extracción y purificación de tebuconazol en muestras de agua y de tejido de pez ..	175
VI.3.5.1. Muestras de Agua	175
VI.3.5.2. Muestras de tejido de pez	176
VI.3.6. Análisis de Plaguicidas en muestras de agua y tejido de pez	177
VI.3.7. Validez del método analítico	180
VI.4. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA BIOCOCENTRACIÓN DE TEBUCONAZOLE EN PEZ CEBRA	181
VI.5. RESULTADOS Y DISCUSION	184
VI.5.1. Análisis de las muestras de peces	184
VI.5.2. Análisis de las muestras de agua	184
VI.5.3. Cálculo del Factor de Bioconcentración	185
VI.6. MODELIZACIÓN DEL BCF CON EL MODELO ESPECÍFICO DE FUGACIDAD DE MACKAY (1991)	190

VI.6.1. Concepto de fugacidad	190
VI.6.2. Modelo de fugacidad de Mackay (1991)	191
VI.6.3. Evaluación de la distribución ambiental, de los fungicidas azólicos, mediante el modelo de fugacidad.	193
VI.6.4. Verificación de la capacidad Bioacumulativa de los compuestos fungicidas en peces mediante el modelo específico de Mackay (1991).....	195
VII. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DERIVADOS DEL USO DE FUNGICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL ARROZ EMPLEADOS CONTRA <i>PYRICULARIA ORYZAE</i>	197
VII.1. INTRODUCCIÓN.....	199
VII.1.1. Métodos de Evaluación del Riesgo Ambiental en ecosistemas acuáticos	200
VII.2. OBJETIVO FINAL DEL TRABAJO REALIZADO	201
VII.3. MATERIAL Y METODOS	201
VII.3.1. Evaluación del Riesgo Ambiental	201
VII.3.2. Cálculo del cociente PEC/PNEC	202
VII.3.2.1. Evaluación de la relación concentración-efecto. (PNEC).....	202
VII.3.2.2. Evaluación de la Exposición (PEC).....	202
VII.3.2.3. Caracterización del Riesgo (PEC/PNEC)	203
VII.3.3. Cálculo del índice de riesgo a escala local (I ₂).....	204
VII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	206
VII.4.1. Evaluación del Riesgo Ambiental mediante el Cálculo del cociente PEC/PNEC (según DOCE N° L 161/9, 1994).....	206
VII.4.2. Cálculo del índice de riesgo a escala local (I ₂).....	209
VII.5. CONCLUSIONES	212
VIII. CONCLUSIONES FINALES	215
VIII.1. Degradación y disipación de los fungicidas azólicos en medios acuáticos.....	217
VIII.2. Evaluación de las Concentraciones Ambientales Predecibles	217
VIII.3. Ensayos de toxicidad con fungicidas azólicos	218
VIII.4. Determinación experimental del Factor de Bioconcentración (BCF) en peces y modelización del proceso con el modelo de fugacidad de Mackay (1991)	218
VIII.5. Evaluación de Riesgos Ambientales derivados del uso de fungicidas azólicos, aplicados en el cultivo del arroz, para el control de <i>Piricularia oryzae</i>	219
IX. BIBLIOGRAFÍA	221
ANEXO 1	243

Índice de Figuras

Figura I.1. Localización geográfica del Parque Natural. de la Albufera de Valencia	8
Figura I.2. Tratamientos con helicóptero (izquierda) y tractor cuba (derecha) contra <i>Pyricularia oryzae</i>	12
Figura I.3. Enfoque general para la evaluación de riesgo (Fuente: Encina y Díaz, 2001)	17
Figura III.1. Distribución energética de las lámparas Sylvania G15T8 utilizadas en los ensayos de fotodescomposición	38
Figura III.2. Hidrólisis del tebuconazol en disoluciones acuosas tamponadas a pH = 2; 7.5 y 12 y a 12, 22 y 37° C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L	47
Figura III.3. Hidrólisis del procloraz en disoluciones acuosas tamponadas a pH = 2; 7.5 y 12 y a 12, 22 y 37° C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L	48
Figura III.4. Vida media del tebuconazol en función del pH y T ^a de las disoluciones acuosas tamponadas a pH: 2, 7.5 y 12 y a tres temperaturas diferentes: 12, 22 y 37° C. con una concentración inicial de 5 mg/L	49
Figura III.5. Vida media del procloraz en función del pH y T ^a de las disoluciones acuosas tamponadas a pH: 2, 7.5 y 12 y a tres temperaturas diferentes: 12, 22 y 37° C. con una concentración inicial de 5 mg/L	49
Figura III.6. Fotólisis del tebuconazol en disoluciones acuosas, iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5mg/L	51
Figura III.7. Fotólisis del procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5mg/L	53
Figura III.8. Fotólisis del tebuconazol, carbendazima y procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con luz ultravioleta ($\lambda_{max} = 254 \text{ nm}$), con concentraciones iniciales de 5 mg/L	55
Figura III.9. Degradación de carbendazima, tebuconazol y procloraz en disoluciones acuosas calentadas a 148 °C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L	57
Figura III.10. Disipación de carbendazima y procloraz en cultivos puros de 4 especies de algas características de la Albufera de Valencia. Se indica el porcentaje de degradación tras 8 días..	60
Figura III.11. Evolución de carbendazima, tebuconazol y procloraz en disoluciones acuosas calentadas a 148 °C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L	61
Figura IV.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo de las aguas del Lago de La Albufera de Valencia	69
Figura IV.2. Fotografías realizadas en los puntos de muestreo	71
Figura IV.3. Parcela experimental en la que se aprecian las diferentes bandas de aplicación con las variedades de arroz cultivadas	73
Figura IV.4. Imagen satélite de la parcela experimental a 95 msnm. Apreciamos las bandas de tratamiento, las 3 entradas de agua desde el campo contiguo y el canal de drenaje. Al pie de imagen, se muestra el esquema de distribución de las bandas de tratamiento. (Tomada de Google Earth®; Mayo de 2007).	73
Figura IV.6. Mesa de extracción a vacío Alltech™ para cartuchos de SPE (izquierda). Sistema de extracción para discos 3M™ Empore® (derecha)	77
Figura IV.7. se muestra el protocolo seguido para la extracción de carbendazima en muestras de agua con cartuchos Oasis® MCX	80
Figura IV.8. Cromatograma de un patrón de fungicidas azólicos	83
Figura IV.9. Mochila Maruyama empleada en los trabajos de aplicación de los formulados comerciales en las parcelas experimentales (Izquierda). Vista general de la parcela durante las aplicaciones (derecha)	86
Figura IV.10. Niveles de concentración de carbendazima ($\mu\text{g/L}$) en las muestras de aguas de La Albufera, según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.	90
Figura IV.11. Niveles de concentración de flusilazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005	91
Figura IV.12. Niveles de concentración de procloraz en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.	93
Figura IV.13. Niveles de concentración de propiconazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005	95
Figura IV.14. Niveles de concentración de tebuconazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005	97

Figura IV.15. Niveles de concentración de triclazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.	99
Figura IV.16. Distribución de los niveles de residuos de fungicidas en el periodo de estudio 2003-2005	100
Figura IV.17. Gráfica de barras de las concentraciones de fungicidas en las bandas de tratamiento tras la aplicación de las formulaciones comerciales en el año 2004	110
Figura IV.18. Gráficas de barras correspondientes a las concentraciones de fungicidas en las aguas de las entradas a la parcela experimental antes de la aplicación de los formulados comerciales, en el año 2004.....	112
Figura IV.19. Gráfica de barras de las concentraciones de fungicidas en las bandas de tratamiento tras la aplicación de las formulaciones comerciales en el año 2005.....	114
Figura IV.20. Gráficas de barras correspondientes a las concentraciones de fungicidas en las aguas de las entradas a la parcela experimental antes de la aplicación de los formulados comerciales, en el año 2005.....	115
Figura V.1. Estudio estadístico de la toxicidad de los fungicidas en <i>A. franciscana</i> . Los asteriscos (*) incluidos en la intersección de cada columna indican diferencias significativas en la toxicidad entre los dos compuestos comparados.	158
Figura V.2. ANOVA de las EC ₅₀ de los ensayos realizados con <i>T. platyurus</i>	160
Figura V.3: Comparación de EC _{50-24h} para <i>Artemia franciscana</i> y <i>Thamnocephalus platyurus</i> de las materias activas y formulados estudiados.	162
Figura V.4. Relación entre la toxicidad hallada para <i>T. platyurus</i> y <i>A. franciscana</i>	162
Figura V.5. Relaciones de toxicidad entre los 2 grupos de compuestos: Materias activas y formulados comerciales	163
Figura V.6. Regresión entre las EC ₅₀ de <i>Thamnocephalus platyurus</i> y las EC ₅₀ de <i>Daphnia magna</i> , <i>Salmo trutta</i> y Bluegill fish.	165
Figura VI.1. Cromatograma de una muestra de pez fortificada con 0.25 µg/g de tebuconazol.	178
Figura VI.2. Espectro de iones del tebuconazol correspondiente a una muestra de agua del tanque de exposición, con 0.25 mg/L de tebuconazol, tomada antes de añadir los peces.....	179
Figura VI.3. Cromatograma TIC de una muestra de un extracto de pez.....	179
Figura VI.4. Concentración del fungicida tebuconazol en el agua.....	186
Figura VI.5. Concentración del fungicida tebuconazol en el Pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	187
Figura VI.6. Bioconcentración del fungicida tebuconazol en el Pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	188
Figura VI.7 Esquema del Modelo de fugacidad propuesto por Mackay (1991)	192

Indice Tablas

Tabla I.1. Materias activas autorizadas, al inicio del presente trabajo en 2003, para control de <i>Pyricularia oryzae</i>	13
Tabla I.2. Estructura y propiedades de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*	14
Tabla I.3. Toxicidad para diferentes organismos de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*	15
Tabla I.4. Datos de estabilidad de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*	16
Tabla III.1. Características de las formulaciones fungicidas empleadas en el Parque Natural de la Albufera de Valencia, contra el hongo <i>Pyricularia oryzae</i> , y correspondientes a las materias activas que se han estudiado.	28
Tabla III.2. Características de las materias activas empleadas en este estudio.....	29
Tabla III.3. Soluciones tampón utilizadas para conseguir los distintos valores de pH.....	30
Tabla III.4. Accesorios y condiciones, empleados para el análisis por HPLC de los residuos de plaguicidas, en los ensayos de degradación/disipación.....	34
Tabla III.5. Características técnicas de las lámparas germicidas utilizadas.	38
Tabla III.6. Composición del medio nutritivo " <i>Bold's Bassal Medium</i> " (BBM), empleado en los ensayos con algas	42
Tabla III.7. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de tebuconazol en función del pH y Temperatura	44
Tabla III.8. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de Procloraz en función del pH y de la Temperatura	45
Tabla III.9. Evolución de la concentración de tebuconazol en disoluciones acuosas, aireadas y expuestas a una lámpara de luz día, concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.	50
Tabla III.10. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de procloraz en diferentes condiciones de iluminación y aireación.	52
Tabla III.11. Evolución de la concentración de los fungicidas carbendazima, procloraz y tebuconazol, en disoluciones acuosas, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L, expuestas a una lámpara de luz ultravioleta ($\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$), con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.	54
Tabla III.12. Vida media de la carbendazima, procloraz y tebuconazol en disoluciones acuosas del orden de 5 mg/L sometidas a 148° C.....	57
Tabla III.13. Concentración residual, a los 8 días, en disoluciones de 0.1 mg/L de carbendazima o procloraz, en cultivos monoalgales puros.	58
Tabla III.14. Evolución de la concentración de carbendazima, procloraz, y tebuconazol en agua procedente de la Albufera de Valencia.	61
Tabla IV.1. Fechas de muestreo de aguas del Lago realizadas durante el periodo de estudio.....	68
Tabla IV.2. Características de los puntos de muestreo.....	71
Tabla IV.3. Fechas de muestreo en la parcela experimental de Sueca.	73
Tabla IV.4. Condiciones comatográficas para el análisis de la carbendazima, en muestras de aguas de la Albufera	81
Tabla IV.5. Condiciones comatográficas para el análisis por cromatografía de gases de los fungicidas azólicos y otros plaguicidas.	82
Tabla IV.6. Condiciones para la espectrometría de masas.....	83
Tabla IV.7. Resultados del estudio de recuperación* del método analítico	84
Tabla IV.8. Dosis de aplicación recomendadas por el fabricante	86
Tabla IV.9. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de carbendazima ($\mu\text{g/L}$)	89
Tabla IV.10. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de procloraz ($\mu\text{g/L}$) ..	93
Tabla IV.11. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración propiconazol ($\mu\text{g/L}$)..	94
Tabla IV.12. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración tebuconazol ($\mu\text{g/L}$)..	96
Tabla IV.13. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de triciclazol ($\mu\text{g/L}$) ..	98
Tabla IV. 14. Concentraciones residuales de malation, propanil, molinato y simazina encontrados a lo largo de los años 2003 a 2005.....	101
Tabla IV.15. Parámetros estadísticos correspondientes a los análisis de fungicidas realizados durante los años 2003 a 2005	102
Tabla IV.16. Número de muestras con contenidos iguales o superiores al límite de cuantificación, por compuesto y por año de muestreo.	103

Tabla IV.17. Niveles de fungicidas en las aguas del Lago de La Albufera, en la época de aplicación de los compuestos indicados, durante el periodo 2003-2005*.....	103
Tabla IV.18. Distribución de muestras con contenido en fungicidas igual o superior al límite de cuantificación por compuesto y punto de muestreo.....	104
Tabla IV.19. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de los residuos de los fungicidas analizados en las aguas de la Albufera, distribuidos por años de estudio y por punto de muestreo.....	104
Tabla IV.20. Niveles de fungicidas en las aguas del Lago de la Albufera, en la época de aplicación de los compuestos indicados, durante el periodo 2003-2005*.....	105
Tabla IV.21. Niveles concentración ($\mu\text{g/L}$) de los fungicidas encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, en el año 2004, y sus parámetros estadísticos..	109
Tabla IV.22. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las entradas de agua a las parcelas experimentales, antes de los tratamientos, en el año 2004 y sus parámetros estadísticos.....	111
Tabla IV.23. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, en la campaña 2005 y sus parámetros estadísticos.....	113
Tabla IV.24. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de los canales de entrada a las parcelas experimentales, antes de los tratamientos, en la campaña 2005 y sus parámetros estadísticos.....	114
Tabla IV.25. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, durante el periodo de estudio y su estudio estadístico.....	116
Tabla IV.26. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las entradas de agua a parcelas experimentales, antes de los tratamientos, durante el periodo de estudio y sus parámetros estadísticos.....	117
Tabla IV.27. ANOVA de los residuos de plaguicida en función del punto de muestreo.....	118
Tabla IV.28. ANOVA de los residuos de plaguicida en función de la fecha de muestreo.....	119
Tabla IV.29. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de procloraz en las parcelas experimentales.....	120
Tabla IV.30. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de flusilazol en las parcelas experimentales.....	120
Tabla IV.31. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de triciclazol en las parcelas experimentales.....	121
Tabla IV.32. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de propiconazol en las parcelas experimentales.....	122
Tabla IV.33. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de carbendazima en las parcelas experimentales.....	122
Tabla IV.34. Datos empleados para el cálculo de las concentraciones teóricas máximas en la parcela experimental tras el tratamiento con los formulados comerciales en el año 2004.....	125
Tabla IV.35. Datos empleados para el cálculo de las concentraciones teóricas máximas en la parcela experimental tras el tratamiento con los formulados comerciales en el año 2005.....	125
Tabla IV.36. Resumen de los resultados del estudio llevado a cabo por Belmonte <i>et al.</i> (2005). Valores en $\mu\text{g/L}$	129
Tabla IV.37. Resumen de los resultados del estudio llevado a cabo por Padovani <i>et al.</i> (2006).....	131
Tabla V.1. Criterios para la selección de especies en los tests de toxicidad según Rand, 1995.....	140
Tabla V.2. Relación de organismos utilizados en bioensayos de toxicidad.....	143
Tabla V.3. Características de las formulaciones comerciales empleadas en los ensayos de toxicidad.....	151
Tabla V.4. Características de las materias activas empleadas en los ensayos de toxicidad.....	151
Tabla V.5. Composición del medio de cultivo para el ensayo con <i>Thamnocephalus platyurus</i>	152
Tabla V.6. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Artemia franciscana</i>	156
Tabla V.7. $\text{EC}_{50-24\text{h}}$ de las sustancias analizadas ordenadas por orden decreciente en su toxicidad para <i>A. franciscana</i>	158
Tabla V.8. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Thamnocephalus platyurus</i>	159
Tabla V.9. $\text{EC}_{50-24\text{h}}$ de las sustancias analizadas ordenadas por orden decreciente en su toxicidad para <i>T. platyurus</i>	160
Tabla V.10. Valores de $\text{LC}_{50-24\text{h}}$ para materias activas y sus formulados..... en <i>A. franciscana</i> y <i>T. platyurus</i>	161

Tabla V.11. Resumen de valores de toxicidad calculados para diferentes organismos acuáticos, para cada uno de las materias activas estudiadas	165
Tabla VI.1. Características fisicoquímicas del agua empleada en el ensayo de Bioacumulación	173
Tabla VI.2. Condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de concentraciones residuales de tebuconazol en muestras de agua y pez	177
Tabla VI.3. Concentración de tebuconazol en muestras de peces	184
Tabla VI.4. Concentración de tebuconazol en muestras de agua	185
Tabla VI.5. Distribución ambiental de los fungicidas estudiados* (% en cada uno de los cuatro compartimentos).....	193
Tabla VI.6. Propiedades de los fungicidas utilizados en el cultivo del arroz para el control de <i>Pyricularia oryzae</i>	194
Tabla VI.7. Factor de Bioconcentración de los fungicidas utilizados en el cultivo del arroz, para el control de <i>Pyricularia oryzae</i>	195
Tabla VII.1. Clasificación del riesgo ambiental según el CR.	204
Tabla VII.2. Índice de Riesgo a escala local (I_2)*	205
Tabla VII.3. Porcentaje de reparto de los fungicidas en los 4 compartimentos ambientales según el modelo de Fugacidad de Mackay de Nivel I.	207
Tabla VII.4. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Thamnocephalus platyurus</i>	208
Tabla VII.5. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Artemia franciscana</i>	208
Tabla VII.6. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Thamnocephalus platyurus</i> . Cálculo del CR para La Albufera y para arrozal	209
Tabla VII.7. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en <i>Artemia franciscana</i> . Cálculo del CR para La Albufera y para arrozal	209
Tabla VII.8. Índice de Riesgo a escala local (I_2).....	210
Tabla VII.9. I_2 a escala local para <i>Thamnocephalus platyurus</i>	211
Tabla VII.10. I_2 a escala local para <i>Artemia franciscana</i>	211

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. NECESIDAD DE ESTABLECER RESTRICCIONES A LA UTILIZACIÓN DE PLAGUICIDAS EN LAS ZONAS HÚMEDAS MEDITERRÁNEAS

I.1.1. Efectos de la contaminación de los ecosistemas por plaguicidas

La contaminación de los ecosistemas acuáticos por plaguicidas puede ser directa, por la aplicación directa a las aguas de alguicidas o de otros plaguicidas usados en agricultura (por ejemplo, en el cultivo del arroz con inundación) salud pública (p.e., control del desarrollo de mosquitos) etc.; o indirecta, por la movilidad de los compuestos aplicados desde el aire o directamente a los suelos. Esta contaminación puede alcanzar en ocasiones un elevado riesgo para la flora y la fauna de los ecosistemas acuáticos, produciendo la desaparición de especies y, como consecuencia, la pérdida de equilibrio en las cadenas tróficas. Además, puede provocar la reducción de la calidad del agua, como recurso utilizable, y la contaminación de los acuíferos, o de otros compartimentos ambientales, como el suelo (Barberá, 1989). Por ello, en diversos lugares de la Unión Europea se exige que los productos fitosanitarios utilizados en el cultivo del arroz, en las proximidades de los Parques Nacionales o áreas protegidas, posean unos perfiles medio ambientales y ecotoxicológicos muy favorables, para la protección de los ecosistemas. Las mismas exigencias existen cuando se reutiliza de agua para otros fines, como el abastecimiento de agua potable (Buendía, 2000).

La movilización de los plaguicidas con las aguas superficiales de ríos, arroyos y torrentes, permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables, respecto de la zona de aplicación. Además se producen procesos de acumulación, que tienen lugar cuando el contaminante transportado entra en los lagos, donde la corriente es menor y la sedimentación de los sólidos en suspensión se halla favorecida.

La evolución de los plaguicidas en los ambientes acuáticos está significativamente influenciada por factores abióticos (fotólisis, volatilización, hidrólisis y absorción) y por factores bióticos (bioacumulación y biotransformación).

Por ello, el empleo incontrolado de estos compuestos puede suponer un grave riesgo y efectos negativos. Uno de estos efectos es la presencia de residuos de plaguicidas, y sus metabolitos, en el medio ambiente y en los alimentos (Cebrián *et al.*, 1988). La presencia de estos residuos depende en gran medida del grado de persistencia de los plaguicidas, que es muy diverso; mientras unos se degradan con rapidez, otros son muy persistentes y, para su desaparición, precisan de amplios periodos de tiempo. En muchos casos, el suelo y las aguas subterráneas se convierten en reservas ambientales de estos residuos, desde los cuales se pueden desplazar, a través de una gran variedad de rutas, a la atmósfera, aguas y organismos vivos, donde sufren diferentes procesos de acumulación, degradación y disipación (Goodman *et al.*, 1992).

La conservación de los ecosistemas acuáticos es de suma importancia debido a su alta densidad de especies, a su complicada red alimenticia y a que todos los organismos acuáticos están inmersos generalmente en el medio acuoso de forma ineludible a lo largo de sus vidas (Miyamoto *et al.*, 1990). Por otra parte, los ambientes acuáticos pueden servir como reservas o sumideros de los plaguicidas, los cuales pueden afectar a algunas características propias de estos ecosistemas como la estructura (diversidad) y función (transferencia de energía y nutrientes) y, una reducción de la diversidad provocada por un tóxico, hace inestable al ecosistema (Rand y Petrocelli, 1985), como está ocurriendo en el lago de La Albufera de Valencia y otras zonas húmedas similares.

Los ecosistemas acuáticos se adaptan mediante una gran variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos a situaciones de estrés, como supone la presencia de sustancias tóxicas, sin serias implicaciones para la biota endémica; pero, cuando la concentración de contaminantes tóxicos alcanzan niveles superiores a la capacidad de asimilación de los ecosistemas, aparecen importantes efectos en la supervivencia, desarrollo, reproducción o conducta (p.e., movilidad) de los organismos (Anderson y De Apollonia, 1988).

Hay que tener en cuenta que la contaminación de los ecosistemas acuáticos, por plaguicidas, produce una gran variedad de efectos, los cuales dependen de algunos factores básicos como la concentración de plaguicida, el tiempo de

exposición, las características ambientales del ecosistema y la presencia de otros tóxicos. De igual manera, el efecto producido sobre la biota variará según las especies de las que se trate, de la edad y de las condiciones de los organismos expuestos (Rand, 1995). Si dichos efectos son directos pueden producir la muerte y reducción del número de organismos afectados en un corto periodo de tiempo. Si por el contrario los efectos son indirectos, su nivel de afectación se observa al transcurrir un cierto intervalo de tiempo tras la exposición, provocando la reducción de la densidad y competición intra-específica, migración, recolonización y cambios en la diversidad de las especies del ecosistema. Un claro ejemplo de efecto indirecto puede observarse en el lago de La Albufera de Valencia, donde el aporte de nutrientes de origen antrópico unido a los niveles de contaminación de las aguas ha motivado la masiva afloración de algas desplazando a otras especies superiores presentes anteriormente, pasando las algas a colonizar la totalidad del Lago (Soria, 1997).

En un ecosistema acuático, los plaguicidas afectan particularmente a la base de la cadena trófica, los productores primarios, que son utilizados como alimento por los organismos filtradores (Ware and Roan, 1970). La presencia de residuos de plaguicidas puede inhibir los procesos fotosintéticos del fitoplancton y otras plantas acuáticas; cualquier tipo de interferencia en el proceso de fotosíntesis afectará al balance natural que hay entre los componentes interdependientes de los ecosistemas acuáticos (Lal, 1982). El impacto completo o parcial de los plaguicidas sobre la población de una especie conduce a un desequilibrio de otras unidades del ecosistema que están en interacción (Mulla y Mian, 1981).

La evaluación de los riesgos de los plaguicidas en ambientes acuáticos precisa información sobre su toxicidad. Los efectos ecológicos que producen dependen de su actividad biológica y de su estabilidad, que cambian en las diferentes condiciones ambientales. En ecosistemas naturales, próximos a zonas agrícolas, es probable que ciertos plaguicidas estén presentes a concentraciones bajas pero persistentes, causando efectos subletales (reproducción, desarrollo...) en un gran número de especies del ecosistema. Sin embargo, hay que tener presente, que las complejas interacciones entre los plaguicidas y los componentes abióticos y bióticos del ecosistema pueden favorecer o disminuir su toxicidad sobre los organismos

acuáticos (Maly, 1980). Por este motivo, parece necesario estudiar el comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente, cómo se comportan bajo determinadas condiciones abióticas como la degradación por luz solar, comportamiento frente a cambios de pH u oxígeno disuelto, ciclos de temperatura a lo largo del día y las interacciones entre estas variables. Por otro lado, la capacidad degradadora de los microorganismos, presentes en el medio, frente a estas sustancias también ayudará a realizar una correcta Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) así como a comprender los procesos de biodegradación y establecer de una forma más concreta los niveles de inmisión en un determinado sistema acuático,

1.1.2. Normativa europea sobre la protección ambiental de las zonas húmedas frente al uso de plaguicidas

Según la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas se considera que: *el agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal.*

Esta Directiva establece que una política de aguas eficaz y coherente debe tener en cuenta la vulnerabilidad de los ecosistemas acuáticos situados cerca de las costas y los estuarios, o en golfos o mares relativamente cerrados, como lo son los humedales mediterráneos, puesto que el equilibrio de todas estas zonas depende en buena medida de la calidad de las aguas continentales que fluyen hacia ellas.

Asimismo, la protección del estado de las aguas en las cuencas hidrográficas proporcionará beneficios económicos, al contribuir a la protección de las poblaciones piscícolas, incluidas aquellas que tienen su hábitat cerca de las costas.

Por ello, se hace necesario interrumpir o reducir progresivamente la contaminación por vertido, emisión o pérdida de sustancias peligrosas prioritarias entendiéndose como tal aquellas *sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo* y que a la hora de determinarlas se debe tener en cuenta el principio de cautela, en particular al

determinar los efectos potencialmente negativos que se derivan del producto y al realizar la evaluación científica del riesgo.

Por último, destacar que el objetivo final de esta importante Directiva en materia de calidad de aguas, es establecer un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas que prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos y, con respecto a sus necesidades de agua, de los ecosistemas terrestres y humedales directamente dependientes de los ecosistemas acuáticos;

Para llevar a cabo el control de la calidad de las aguas la Directiva establece en su Artículo 6 que los Estados miembros velarán por que se establezca uno o más registros de todas las zonas incluidas en cada demarcación hidrográfica que hayan sido declaradas objeto de una protección especial en virtud de una norma comunitaria específica relativa a la protección de sus aguas superficiales o a la conservación de los hábitat y las especies que dependen directamente del agua (ver Anejo IV de la citada Directiva); tal es el caso del P.N. de L'Albufera de Valencia, integrada en la Red Natura 2000 del Ministerio de Medio Ambiente como *ZEPA* (Zona de Especial Protección para las Aves) y *LIC* (Lugar de Importancia Comunitaria) (MMA, Red Natura 2000).

I.2. INTERÉS Y DESCRIPCIÓN DEL PARQUE NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA

La Albufera de Valencia constituye uno de los principales ambientes lagunares costeros del Mediterráneo. Se encuentra ubicado a 10 Km al sur de la ciudad de Valencia, entre las desembocaduras de los ríos Turia y Júcar (Figura 1). Dada su importancia ecológica, este hábitat fue declarado Parque Natural mediante el Decreto 89/1986, de 8 de julio, y el 8 de mayo de 1990 e incorporado a la *Lista de Zonas Húmedas de Importancia Internacional* en la Convención Ramsar¹

Posteriormente, el 8 de junio de 1994, en virtud de la directiva 94/24/CE fue declarada *Zona de Especial Protección para las Aves* (ZEPA). Igualmente se haya amparada por la Directiva 92/5510/CE, relativa a la Conservación de los Hábitats y la Fauna y Flora Silvestres.

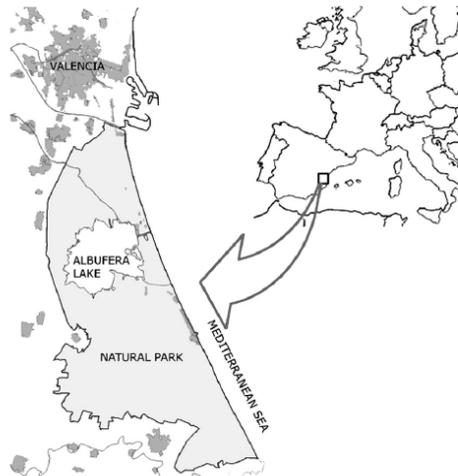


Figura I.1. Localización geográfica del Parque Natural. de la Albufera de Valencia

¹ Ramsar, Irán, 1971. www.ramsar.org

El área protegida tiene una extensión próxima a las 21.120 hectáreas (ha), entre los que cabe destacar el marjal, el lago y la barra o cordón litoral. El marjal constituye el ambiente más característico de La Albufera y el de mayor extensión. El cultivo del arroz es el principal aprovechamiento del marjal y ocupa actualmente dos tercios de la superficie total del Parque Natural (14.000 ha).

El Lago de la Albufera cuenta con una superficie de 2.837 ha, lo que representa aproximadamente un 10% de toda la superficie del P.N. Se sitúa en el centro ocupando un área circular de unos 6 km. de diámetro; la profundidad media es de unos 80 cm. oscilando entre los 30 cm. en zonas próximas a la desembocaduras de canales como el de Massanassa y los 1.50 m. en zonas del centro del lago o en la Gola de Pujol.

Originalmente su extensión era mayor, pero se ha visto reducida por continuos aterramientos naturales y los aportados para ganarle terreno al lago y posibilitar el cultivo del arroz.

Alrededor del lago existe una intrincada red de canales, barrancos y acequias, algunos de los cuales vierten sus aguas en él y otros que conectan los numerosos arrozales entre sí. Por ellos se vierten residuos procedentes de la actividad agrícola, además de los vertidos de origen urbano e industrial (GVA, 1991).

La pesca conjuntamente con el cultivo del arroz han sido las dos actividades más importantes que se han desarrollado en el humedal. En el año 1250 se creó la Comunidad de Pescadores del Palmar y desde entonces la pesca de la anguila europea y la angula (*Anguilla anguilla*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la llisa (*Mugil cephalus*) y la carpa (*Cyprinus carpio*), y mucho más recientemente el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) han centrado la actividad económica de los pescadores (Peña, 2002)

El otro pilar económico que sustenta L´Albufera es el del cultivo del arroz, este cereal introducido por los árabes hacia finales del siglo XIV se ha cultivado de forma tradicional hasta mediados del siglo pasado, cuando el cultivo pasó a ser explotado

de forma intensiva, hecho motivado por la mecanización del campo y la introducción de abonos (nitrogenados y fosforados) y plaguicidas, que aumentaron los rendimientos por hectárea de cultivo y de forma indirecta causaron el descenso de la pesca en el lago (un 90% respecto a la década pasada). Algunos autores como Boluda *et al.* (2002) y Soria (1987) concluyeron que la alta concentración de metales pesados de origen industrial, los elevados niveles de plaguicidas usados en la agricultura de la zona y las aguas urbanas sin depurar que se vierten a los canales de riego que alimentan el Lago son las causantes de la contaminación, la elevada eutrofia y toxicidad de las aguas del P.N. de la Albufera de Valencia.

I.3. CONTROL DEL HONGO *Pyricularia oryzae* CON FUNGICIDAS AZÓLICOS EN LOS ARROZALES DEL ENTORNO DE LA ALBUFERA DE VALENCIA

Esta tesis se ha centrado en la investigación de los efectos ambientales y en la evaluación de los riesgos ambientales de los fungicidas asociados al control de *Pyricularia oryzae*, hongo que se desarrolla en la parte final del cultivo (julio, agosto) y que es el causante del “fallado” o “añublo” del arroz.

I.3.1. Introducción

Pyricularia oryzae ha sido considerada como la principal fungosis del arroz debido a su amplia distribución y su poder destructivo bajo condiciones favorables. La piriculariosis es una plaga criptogámica compleja debido a la variabilidad patogénica y la rapidez con la que este hongo vence la resistencia de la planta de arroz. El micelio del hongo produce una sustancia tóxica, conocida como pericularina, que inhibe el crecimiento y desarrollo de la planta. El inóculo se queda en los restos del cultivo infectando el cultivo siguiente (Santamarina *et al.*, 2005).

1.3.2. Ciclo de *Pyricularia oryzae*

La *Pyricularia oryzae* se desarrolla cuando las temperaturas oscilan entre 22-29° C y se alcanzan elevadas humedades relativas (en torno al 90%), condiciones que deben darse durante al menos 12-14 horas. El momento más crítico del ataque del hongo es inicio de espigado (estado de zurrón). En estos momentos el ataque se produce en el cuello de las espigas de arroz cortando el aporte de savia y al cabo de varios días la espiga aparece blanca y vacía produciendo el llamado "fallado". También puede producir daños una vez emergida la espiga provocando el fallado de granos e incluso espiguillas, además de producir decoloraciones que deprecian el grano².

El aumento de la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en el agua de riego favorece el desarrollo del hongo; siendo una de las posibles causas de la última infección desarrollada en La Albufera de Valencia, ya que parte del agua con la que se riegan los arrozales procede de una depuradora cercana³.

1.3.3. Sintomatología

El hongo produce manchas o lesiones en las hojas de forma alargada, de color marrón amarillento uniforme y más tarde con centros grisáceos y bordes de color marrón que toman tonalidades grisáceas en el centro cuando esporula el hongo.

También produce daños en los nudos, granos y en la panícula o zonas cercanas a la base se producen lesiones oscuras que junto con la producción de toxinas provoca que la espiga no se llene, quedándose vacía y blanca (Santamarina *et al.*, 2005)

²http://www.aym.juntaex.es/servicios/boletin/anteriores/ano2004/antboletin22_2004.htm

³ www.infoagro.com

1.3.4. Control

Es importante tener en cuenta que cualquier método de control de esta enfermedad ha de acoplarse a las condiciones particulares del cultivo, época de siembra, aportes de abonos, densidad de siembra, climatología, variedades, etc. En plena campaña habrá que utilizar fungicidas adecuados, teniendo en cuenta que el grano está ya presente y guardando los plazos de seguridad adecuados para la recolección. En algunas ocasiones, los organismos oficiales realizan tratamientos aéreos para combatir a este hongo, en el caso de Valencia son las cooperativas o los propios agricultores los que de forma individual o colectiva realizan tratamientos aéreos desde helicóptero, o mediante pulverizadoras motorizadas. En la Figura I.2 se muestra el tratamiento aéreo contra piricularia en campos próximos a la autovía del Saler



Figura I.2. Tratamientos con helicóptero (izquierda) y tractor cuba (derecha) contra *Pyricularia oryzae*

En la Tabla I.1 se muestran las materias activas, autorizadas en España en 2003 (fecha de inicio de los estudios), para control de *Pyricularia oryzae* en arroz, junto con las dosis de aplicación y la presentación del producto.

Tabla I.1. Materias activas autorizadas, al inicio del presente trabajo en 2003, para control de *Pyricularia oryzae*.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Carbendazima 12,5% + Flusilazol 25% (p/v)	0.5 L/ha	Suspensión concentrada (SC)
Isoprotiolano 40% EC* (p/v)	1.5 L/ha	Concentrado emulsionable (EC)
Kasugamicina 5%+Cobre 45%	0.1-0.15 Kg/hL	Polvo mojable (WP)
Kasugamicina 8%	30-50g/hL	Polvo mojable (WP)
Procloraz 45%	0.50-1 L/ha	Emulsión de aceite en agua (EW)
Procloraz 46%	0.50-1 L/ha	Polvo mojable (WP)
Tebuconazol 25% p/v	1 L/ha	Emulsión de aceite en agua (EW)
Triflumizol 30%	0.15 kg/ha	Polvo mojable (WP)
Triciclazol 75%	0.30 Kg/ha	Polvo mojable(WP)

Datos obtenidos de Liñan (2002) y en MAPA

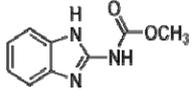
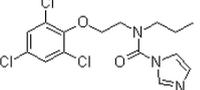
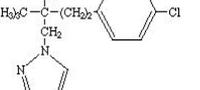
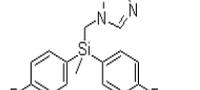
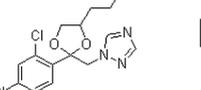
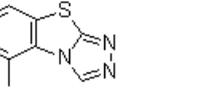
*Prohibida su utilización desde 2003

I.3.5. Propiedades de los fungicidas azólicos utilizados para el control de *Pyricularia oryzae*

Entre los compuestos químicos utilizados para el control de *Pyricularia oryzae*, para el estudio de riesgos ambientales, hemos seleccionado los fungicidas azólicos carbendazima, flusilazol, procloraz, propiconazol y tebuconazol, por su eficacia, frecuencia de uso en los arrozales próximos al lago de la Albufera de Valencia, y escasez de datos referentes a los riesgos que supone, el uso de estos compuestos, para los organismos característicos de los ecosistemas húmedos.

Los riesgos ambientales de los compuestos químicos están directamente relacionados con sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que su vez dependen de su estructura molecular, en la que existen grupos funcionales y características electrónicas que fijan su comportamiento ambiental. Por ello, en las Tablas I.2 se exponen las estructuras químicas y propiedades fisico-químicas de los fungicidas azólicos seleccionados para este estudio. Además en las Tabla I.3 y I.4 se exponen algunos datos representativos de la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos y los datos de estabilidad química bajo diferentes condiciones.

Tabla I.2. Estructura y propiedades de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*

Parámetro	Carbendazima	Procloraz	Tebuconazol	Flusilazol	Propiconazol	Tricliclazol
Estructura molecular						
Fórmula empírica	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	C ₉ H ₇ N ₃ S
Peso Molecular	191.2	376.5	307.81	315.4	342.2	189.24
N° C.A.S	10605-21-7	67747-09-5	107534-96-3	85509-19-9	60207-90-1	41814-78-2
Grupo	Benzimidazoles	Imidazoles	Triazoles	Triazoles	Triazoles	Benzotriazoles
Nombre químico	1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo	propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl]-1H-imidazole-1-carboxamide	a-[2-(4-chlorophenyl) ethyl]-a-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol	bis(4-fluorofenil)-metil-(1H-1,2,4-triazol-1-il-metil) silano	(+) 1-[2-(2,4-diclorofenilo)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il-metil]-1H-1,2,4-triazol.	5-metil-1,2,4-triazol-3,4-benzo-1,3-tiazol.
Nombre IUPAC	benzimidazol-2-il-carbamate de metilo	1-N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl] carbamoylimidazole	a-tert-butyl-a-(p-chlorophenethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol	bis(4-fluorofenil) metil (1H-1,2,4-triazol-1-il-metil) silano	(±)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il-metil]-1H-1,2,4-triazol	5-metil-1,2,4-triazol-3,4- benzothiazole.
Coefficiente de partición octanol-agua Kow a pH 7 y 22 °C	log P = 1.55	log P = 4.4	log P = 3.7	log P = 3.7 a pH 7 y 25°C	log P = 3.72 a pH 6.6 y 25°C	log P = 1.39 a pH = 7 y 25 °C.
Punto de fusión	302-307 °C	38.5-41°C	104.7 °C	55°C	180 °C, a 0.1 mm Hg	187-188°C
Presión de vapor a 20 °C	<0.67x10 ⁻⁶ mm Hg (<90 µPa)	0.57x10 ⁻⁹ mm Hg (75,97 nPa)	0.00975x10 ⁻⁶ mm Hg (1,3 µPa)	0,109x10 ⁻³ mm Hg (14.6 mPa).	. <3x10 ⁻⁶ mm Hg (<400 µPa)	0.2026x10 ⁻⁶ mm Hg (27 µPa).
Densidad a 20 °C	1.45	1.42			1.27	
Solubilidad en agua, a 24°C,	28 mg/L a pH 4; 8 mg/L a pH 7; 7 mg/L a pH 8	55 mg/L	32 mg/L	54 mg/L a pH 7.2; 45 mg/L a pH 7.8 y 900 mg/L a pH 1.1, a 20°C	110 mg/L a 20°C	700 mg/L, a 25 °C
Solubilidad en disolventes orgánicos, a 24 °C, en g/L	En hexano: 0.0005 En acetona: 0.3, En etanol: 0.3 En dimetilformamida: 5	En kg/L: acetona 3.5, cloroformo, dietiléter, tolueno y xileno 2.5	En diclorometano: 200-500; En 2-propanol: 100-200, En tolueno 50-100, En n-hexano 2-5.	>2 kg/L	En hexano: 60 g/kg (47 g/L) Miscible con acetona, diclorometano, isopropanol, metanol y octanol	g/L a 25 °C: cloroformo >500, diclorometano 33, metanol 25, acetona, acetonitrilo y ciclohexanona 10, benceno 4.2, xileno 2.1, hexano <0.1

*Tomlin (2000)

Tabla I.3. Toxicidad para diferentes organismos de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*

Toxicidad en	carbendazima	Procloraz	Tebuconazol	Flusilazol	Propiconazol	Triciclazol
Aves	CL50, 8 días, en codorniz: >10000 ppm.	DL50 Oral aguda en codorniz: 590 mg/kg.	DL50 Oral aguda en <i>Colinus virginianus</i> : 1988 mg/kg.	DL50 Oral aguda en pato salvaje: >1590 mg/kg.	DL50 Oral aguda en <i>Colinus virginianus</i> : >2510 mg/kg.	DL50 Oral aguda en <i>Colinus virginianus</i> : >100 mg/kg.
	CL50, 8 días, en pato salvaje: >10000 ppm	DL50 Oral aguda en pato salvaje: 3132 mg/kg.	DL50 Oral aguda en <i>Coturnix japonica</i> : 4438 mg/kg. DL50 Oral aguda en <i>Serinus canarius</i> : <1000 mg/kg.		DL50 Oral aguda en <i>Coturnix japonica</i> : 2223 mg/kg.	DL50 Oral aguda en pato salvaje: >100 mg/kg.
Peces y organismos acuáticos	CL100, en <i>Leuciscus idus</i> : >100 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Lepomis macrochirus</i> : 2,2 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Leuciscus idus</i> : 8,7 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Lepomis macrochirus</i> : 1,7 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Cyprinus carpio</i> : 6,8 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Carassius auratus</i> (alevines): 13,5 mg/l.
	CL50, 96 h, en <i>Cyprinus carpio</i> : 4 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Rasbora heteromorpha</i> : 2,8 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 6,4 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 1,2 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Procambarus acutus</i> : 42 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Lepomis macrochirus</i> : 1,96 mg/l.
	CL50, 96 h, en <i>Lebistes reticulatus</i> : 200 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 1 mg/l.	CL50, 48 h, en <i>Daphnia spp.</i> : 10-25 mg/l.	CL50, 48 h, en <i>Daphnia magna</i> : 3,4 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 5,3 mg/l.	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 1,62 mg/l.
	CL50, 96 h, en <i>Salmo gairdneri</i> : 2,3 mg/l.	CL50, 48 h, en <i>Daphnia magna</i> : 4,3 mg/l.			CE50, 48 h, en <i>Daphnia magna</i> : 4,8-11,5 mg/l.	CL50, 48 h, en <i>Daphnia magna</i> : >20 mg/l.
	CL50, 48 h, en <i>Daphnia magna</i> : 0,13-0,22 mg/l.					
Abejas	DL8,34: 48,34 µg/abeja.	DL50 Oral: 61 µg/abeja. DL50 Contacto: 51 µg/abeja.	Sin daños en ensayos de laboratorio y al aire libre.	DL50, >150 µg/abeja.	DL50 Oral: >100 µg/abeja. DL50 Contacto: >100 µg/abeja.	
Mamíferos	DL50 Oral en rata: >15000 mg/kg.	DL50 Oral en rata: 1600 mg/kg	DL50 Oral en rata: 3933 mg/kg.	DL50 Oral en rata : 674 mg/kg.	DL50 Oral en rata: 1517 mg/kg.	DL50 Oral en rata: 305-314 mg/kg.
	DL50 Oral en perro: >2500 mg/kg.	DL50 Oral en ratón: 2400 mg/kg.	DL50 Oral en ratón: 3023 mg/kg.		DL50 Oral en conejo: 1344 mg/kg.	DL50 Oral en ratón: 250 mg/kg.
	DL50 Oral en ratón: >15000 mg/kg.				DL50 Oral en ratón: 1490 mg/kg.	DL50 Oral en perro: >50 mg/kg.

*Tomlin (2000)

Tabla I.4. Datos de estabilidad de los fungicidas azólicos contemplados en este trabajo*

Carbendazima	Estabilidad >1 año en almacenamiento normal en envase original no abierto. Estable >2 años a <50 °C. Se descompone lentamente en soluciones alcalinas pero es estable en ácidas (formando sales solubles en agua como el fosfato). Hidrólisis a 22 °C: 50% >35 días a pH 5 y pH 7 y 124 días a pH 9. Forma sales con los ácidos; fosfato de carbendazima con solubilidad 9 g/L a pH 2.
Flusilazol	Estable más de 2 años en condiciones normales de almacenamiento. Estable a temperaturas de hasta 310 °C y a la luz.
Procloraz	Estabilidad: estable en agua a pH 7 y 20 °C. Se descompone en ácidos y álcalis concentrados, en presencia de luz solar y con calentamiento prolongado a altas temperaturas (200 °C) pero es estable hasta 100 °C.
Propiconazol	Estable hasta 320 °C. No existe hidrólisis significativa.
Tebuconazol	Estable a la hidrólisis en medios ácidos, neutros y alcalinos. Vida media a pH 4-9 y 20 °C, >1 año
Triziclazol	Termoestable hasta el p.f. No se degrada fácilmente por la luz UV. Estable a la hidrólisis a pH 3, 6 y 9 durante 30 días a temperaturas de 25, 37 y 52 °C. Se descompone en KOH 0,1 N. Almacenar a temperaturas superiores a 0 °C.

*Tomlin (2000)

I.4. NECESIDAD DE LA EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES DEL USO DE FUNGICIDAS AZOLICOS EMPLEADOS PARA EL CONTROL DE PYRICULARIA ORYZAE EN EL PARQUE NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA

Mediante el proceso científico denominado **evaluación del riesgo** se establece la probabilidad de que se produzcan efectos adversos sobre el hombre, los animales, las plantas o el medio ambiente como resultado de la exposición a uno o más agentes estresantes (EPA, 1984). La evaluación del riesgo es, por tanto, una potente herramienta para organizar y evaluar la información necesaria para la toma de decisiones. No es una ciencia en sentido estricto, no da respuestas, sino que facilita información para contestar preguntas y en muchos casos, permitir la toma de decisiones reguladoras.

La valoración de riesgo de una sustancia potencialmente nociva está en función de varios factores: la exposición a la sustancia, los efectos resultantes de esta exposición y los organismos expuestos a la sustancia contaminante. De esta forma, la valoración del riesgo ambiental se puede definir como “la valoración cuantitativa de la probabilidad de que se verifique un cierto efecto ambiental como resultado de la exposición a una sustancia contaminante” (Vighi y Bacci, 1998).

Una valoración preliminar del riesgo se puede deducir en función de valoraciones de la concentración ambiental de un agente tóxico potencial, de

informaciones sobre los efectos derivadas de estudios toxicológicos o de estudios relativos a las estructuras poblacionales del ecosistema potencialmente expuesto.

Para la evaluación del riesgo se deberán valorar, tanto, factores intrínsecos a la sustancia a examen (actividad biológica, propiedades físico-químicas que influyan en la distribución, etc.) como factores extrínsecos dependientes de las características de las emisiones (cantidad usada y modalidad de emisiones sobre el medio ambiente) o de las propiedades ambientales (sistemas biológicos, características de los ecosistemas, etc.).

La *Evaluación de Riesgos* determina la naturaleza y magnitud del riesgo. El término *análisis de riesgo* se ha usado frecuentemente como un sinónimo de evaluación de riesgos. Debe interpretarse que además de la evaluación, el análisis incluye los métodos para hacer un mejor uso de los resultados de la evaluación. En el *manejo de los riesgos* se diseña la respuesta de control, reducción o eliminación de riesgos utilizando la información producida por la evaluación y el análisis, en el contexto de los recursos técnicos, valores sociales, económicos y políticos (Peña *et al.*, 2001)

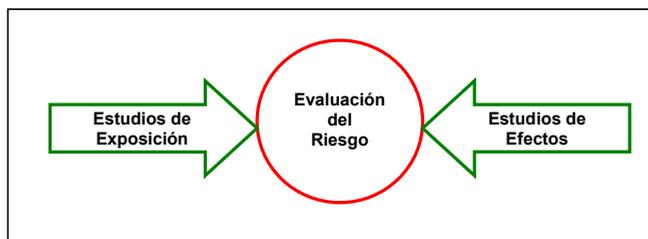


Figura I.3. Enfoque general para la evaluación de riesgo (Fuente: Encina y Díaz, 2001)

La evaluación del riesgo, por lo tanto, se basa en la integración de dos elementos: la caracterización de la exposición y la caracterización de los efectos que derivan de esa exposición. La caracterización de la exposición se entiende como el contacto o concurrencia entre los factores estresantes y el componente ambiental receptor o entidad ecológica (EPA, 1998; Encina and Diaz, 2001; Moraes, 2002). Esta información puede obtenerse mediante numerosos análisis sistemáticos de las concentraciones ambientales; pero por la poca disponibilidad de datos es más empleado la aplicación de modelos.

Los más desarrollados son los modelos que describen el transporte y la transformación de contaminantes específicos liberados al ambiente (PNUMA/IPCS, 1999). El modelo de fugacidad ha sido aplicado en varias situaciones relativas a contaminación por plaguicidas y también para evaluar el riesgo de contaminación del ambiente acuático. Ellos permiten estimar la concentración ambiental, lo que da un índice de la evaluación de la exposición a una sustancia al contrastar este valor con otro que de una indicación de los efectos como, por ejemplo, el nivel de efecto no observado (NOEL) o cualquier índice toxicológico expresado como la concentración letal media (LC₅₀). Se obtendrá una visión de los probables efectos que se producirían en un ambiente determinado (Encina y Díaz, 2001).

La caracterización de los efectos corresponde a una identificación de los efectos ecológicos adversos causados por la capacidad inherente de una sustancia, seguido por la estimación de la Concentración Sin Efecto (CSE), derivada de datos ecotoxicológicos y la aplicación de un factor de valoración o seguridad encargado de predecir un nivel por encima del cual es probable que ocurra un efecto ambiental adverso (PNUMA/IPCS, 1999). La estimación de los efectos se puede realizar por observaciones de campo o mediante ensayos eco toxicológicos, los cuales permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre las poblaciones y, eventualmente, extrapolar estos resultados hasta el nivel de Comunidad y Ecosistema (Encina y Díaz, 2001). En áreas de agricultura intensiva el agua es el recurso que presenta un alto riesgo de contaminación por plaguicidas donde su evaluación y corrección requiere de su detección; es decir, la definición aproximada del tipo y destino ambiental de dichas sustancias. Una herramienta útil para la definición del comportamiento teórico de plaguicidas en el ambiente, es el modelo de fugacidad propuesto por Mackay y Paterson (1981).

1.4.1. Utilización de ensayos de toxicidad en evaluaciones de riesgo ambiental

La situación ideal para la valoración de los efectos de un plaguicida, consistiría en someter a las especies representativas, en cada caso, a los efectos del producto fitosanitario bajo condiciones reales (periodo de exposición, concentración, etc). Sin embargo, esto no es sencillo ya que controlar a los individuos en condiciones reales y determinar continuamente el grado de exposición

en cada planta o animal es muy difícil. En su lugar se han desarrollado ensayos estandarizados que, si bien no son realistas, simplifican mucho la valoración de los efectos.

En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo considerable para desarrollar procedimientos estándar y protocolos para la realización de bioensayos o tests de toxicidad con distintas especies de organismos pertenecientes a diferentes niveles en la escala de organización biológica. El objetivo de estos tests es la obtención de datos para su utilización en posteriores evaluaciones del riesgo ambiental. Los procesos de evaluación de riesgos ambientales constan de dos componentes básicos: la evaluación de la exposición y la evaluación de efectos. La metodología utilizada en la evaluación de efectos se basa, precisamente, en el manejo de datos procedentes de estos ensayos ecotoxicológicos.

Los bioensayos de toxicidad son pruebas en las que se utiliza un tejido vivo, organismo o grupo de organismos para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida, permitiendo comparar la toxicidad de diferentes compuestos y conocer la sensibilidad de las diversas especies (Reish y Oshida, 1987).

En función de la información toxicológica que van a proporcionar, los bioensayos de toxicidad se clasifican en ensayos de toxicidad aguda y en ensayos de toxicidad crónica. Los primeros se llevan a cabo mediante la exposición de un grupo de individuos de una especie a una serie de concentraciones crecientes de un xenobiótico, en el laboratorio, durante un breve periodo de tiempo (generalmente, entre 24 y 96 horas); el efecto buscado es la mortalidad y el parámetro ecotoxicológico es la concentración letal 50 (CL_{50}). En cambio, los ensayos de toxicidad crónica evalúan los efectos que se producen en los organismos como resultado de una exposición prolongada. Los efectos más importantes son aquellos relacionados con la reproducción y el desarrollo de los individuos expuestos y los parámetros más relevantes son NOEC/NOAEL (*No Observed Effect Concentration/No Observed Adverse Effect Level*) o la LOEC/LOAEL (*Lowest Observed Effect Concentration/Lowest Observed Adverse Effect Level*).

I.4.2. Metodología para la evaluación del riesgo ambiental (ERA)

Uno de los problemas clave de la ecotoxicología es el de definir cuales son los efectos tóxicos de un contaminante o de una mezcla de contaminantes en una comunidad ecológica. En muchos casos, por ejemplo, tras una emisión accidental de un compuesto químico en el medio ambiente los daños ecológicos son claramente visibles; pero en otras situaciones, los efectos a largo plazo provocados por la presencia prolongada de niveles bajos de contaminante son más difíciles de identificar.

Actualmente, las estrategias comunes para minimizar el impacto ambiental de los contaminantes se podrían esquematizar de la siguiente forma:

1. Evaluación de la toxicidad potencial de los compuestos químicos basada en el conocimiento de las propiedades físico-químicas de la molécula y en su similitud con otros compuestos químicos (QSAR).
2. Modelos que estiman la concentración potencial de un compuesto contaminante en varios compartimentos ambientales y predicen la concentración que puede causar efectos relevantes en un organismo.
3. Evaluación de la toxicidad de un compuesto basada en ensayos de laboratorio realizados con un número limitado de especies.
4. Evaluación de la concentración de los contaminantes en los componentes bióticos y abióticos de un ecosistema, con particular atención a la evaluación de los fenómenos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación.
5. Evaluación de las alteraciones de los ecosistemas estudiando diversos parámetros como la biodiversidad, la presencia o ausencia de organismos bioindicadores.

II. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA

El principal objetivo de este trabajo es realizar una “Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo del arroz en el Parque Natural de La Albufera de Valencia” que permita disponer de criterios adecuados para la selección de los compuestos que, siendo eficaces para el control de *Pyricularia oryzae* en los cultivos de arroz, supongan menos riesgos para los ecosistemas y las poblaciones de dichas zonas.

Para alcanzar este objetivo, se han seleccionado los fungicidas utilizados contra *Pyricularia*, en las aplicaciones generales, aéreas o terrestres, realizadas en los arrozales del Parque Natural de La Albufera de Valencia, que son: carbendazima, flusilazol, procloraz, propiconazol, tebuconazol y triciclazol.

El estudio comparativo de los riesgos correspondientes a estos compuestos permite establecer una metodología y unos criterios básicos aplicables a la evaluación de los riesgos ambientales, derivados del uso de otros fungicidas ya comercializados, en proceso de comercialización o en fase de desarrollo o diseño.

La estrategia metodológica aplicada para alcanzar los objetivos planteados ha sido la siguiente.

1. Revisión de los antecedentes bibliográficos referentes al tema estudiado.
2. Recopilación de los datos correspondientes a las propiedades físico-químicas y toxicológicas de los fungicidas contra *Pyricularia oryzae* que al inicio del trabajo estaban autorizados por el Ministerio de Agricultura y Pesca
3. Estudio de la velocidad de hidrólisis y disipación del tebuconazol y procloraz, en condiciones abióticas, con disoluciones acuosas tamponadas, a diferentes pH y sometidas a diferentes condiciones de temperatura, aireación e iluminación, para completar la escasa información encontrada en la bibliografía referente a la estabilidad de estos fungicidas. Estudio de las cinéticas del conjunto degradación y disipación en condiciones bióticas, empleando cultivos monoalgales puros y agua procedente del lago de La Albufera de Valencia
4. Determinación de las “Concentraciones Ambientales Predecibles” (PECs) en parcelas experimentales inundadas y en una red de control de 6 puntos en el lago

de La Albufera y en la red de drenaje que alimenta dicho Lago, durante tres años, a fin de evaluar los niveles de exposición a los fungicidas que pueden sufrir los diversos organismos que habitan las zonas húmedas mediterráneas.

5. Valoración ecotoxicológica de las materias activas y las formulaciones comerciales empleadas para el control de la piriculariosis, en dos microcrustáceos de medios acuáticos diferentes, *Artemia francisca* de medio salino/salobre y *Thamnocephalus platyurus* de medio dulce.
6. Estudio de la bioconcentración del tebuconazol en pez cebra (*Danio rerio*), como modelo de estudio de fungicidas azólicos, y validación del “Modelo de Bioacumulación” propuesto por Mackay (1991) por comparación con los resultados obtenidos en el estudio *in vivo*.
7. Evaluación del riesgo ambiental según la Directiva Europea publicada en 1994 (DOCE N° L 161/9, 1994), y cálculo del riesgo a escala local, según el modelo propuesto por Vighi y Calamari (1996), para realizar la evaluación de los riesgos ambientales de carbendazima, flusilazol, procloraz propiconazol, tebuconazol y triciclazol.

**III. DEGRADACIÓN Y DISIPACIÓN DE LOS
FUNGICIDAS AZÓLICOS EN MEDIOS ACUÁTICOS**

III.1. INTRODUCCIÓN

Entre los parámetros que deben determinarse, para conocer el comportamiento de los plaguicidas en medios acuáticos se encuentran la velocidad de hidrólisis y de fotólisis de los compuestos, en agua destilada y en presencia de sales o de otros factores que puedan modificarlas. Además, para evaluar la biodegradabilidad de los plaguicidas debe conocerse el comportamiento de los mismos tanto en medios abióticos como en presencia de organismos vivos.

III.2. HIDRÓLISIS EN MEDIO ACUOSO

III.2.1. Influencia del pH y la temperatura en la velocidad de hidrólisis del procloraz y tebuconazol

Los datos disponibles sobre la velocidad de hidrólisis de los fungicidas azólicos, en diferentes condiciones de pH y temperatura son escasos, excepto en el caso de la carbendazima. En la bibliografía consultada se han encontrado datos sobre el comportamiento de triazoles, como el triciclazol (Saunders, 1976; Krieger *et al.*, 2000; Tomlin, 2000) y el hexaconazol (Santoro *et al.*, 2000), oxazoles como el vinclozolin y procimidona (Schwack *et al.*, 1995a; Schwack *et al.*, 1995b) y bencimidazoles como la carbendazima (Ibarz *et al.*, 1996; Mallat *et al.*, 1997; Cuppen *et al.*, 2000; Panadés *et al.*, 2000; Boudina *et al.*, 2003).

Respecto al procloraz, Tomlin (2001) indica que es estable a pH=7 y 20° C, y se descompone en ácidos y álcalis concentrados y en presencia de luz solar y de elevadas temperaturas (>200°C).

Los datos encontrados referentes al tebuconazol (Tomlin, 2001), indican que el tebuconazol es estable a altas temperaturas, y frente a la fotólisis e hidrólisis en agua pura estéril, siendo la vida media (DT₅₀) en condiciones de hidrólisis mayor de 1 año, entre pH= 4 y 9, y a 22° C. Además, en las aguas naturales hay hidrólisis y fotólisis indirecta, siendo la vida media, en condiciones de campo, de 1 a 4 semanas. Finalmente, es poco degradable en suelo, en condiciones de laboratorio.

Dada la escasa, o imprecisa, información disponible sobre la influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis del procloraz y del tebuconazol, se ha considerado necesario realizar un estudio de la influencia de ambos factores abióticos, sobre la

hidrólisis de estos dos compuestos y establecer sus cinéticas de hidrólisis, degradación o disipación, en el medio acuático, en diferentes condiciones de temperatura y pH, condiciones que suelen cambiar a lo largo del año debido, respectivamente, a la estacionalidad climatológica y a los efectos de la biomasa presente.

III.2.2. Material y métodos

III.2.2.1. Fungicidas estudiados

Los tratamientos antifúngicos, en precosecha, representan una pequeña parte del total de plaguicidas empleados durante el cultivo del arroz. Los fungicidas aplicados actualmente, en esta fase final del cultivo (durante los meses de verano), suelen ser compuestos activos derivados de azoles. En la Tabla III.1 se muestran los principales productos formulados usados en los arrozales próximos al lago de La Albufera de Valencia, para prevenir y reducir o detener el desarrollo de *Pyricularia oryzae*.

Tabla III.1. Características de las formulaciones fungicidas empleadas en el Parque Natural de la Albufera de Valencia, contra el hongo *Pyricularia oryzae*, y correspondientes a las materias activas que se han estudiado.

Formulación Comercial	Materias activas	Dosis de Aplicación	Toxicología	Ecotoxicología	Plazo de Seguridad
Punch CS (DuPont)	Carbendazima 12.5% Flusilazol 25% p/v	400-500 cc/ha	Tóxico reproducción Cat 2 Mutagénico Cat 3 carcinogénico	A B	35 días
Folicur 25 EW (Bayer)	Tebuconazol 25%	1 L/ha	Nocivo, Xn	A, A, B	35 días
Octagon E (Aventis)	Procloraz 45%	0.5-1 L/ha	Nocivo, Xn	A, B	15 días

Elaborado a partir de los datos de la etiqueta de cada producto y de los recopilados por Tomlin (2000) y de Liñan (2002).

Los fungicidas empleados en los estudios de hidrólisis, degradación o disipación en el laboratorio, tenían una pureza elevada. En los ensayos con procloraz y tebuconazol se empleó el producto puro, utilizado para la preparación de los patrones cromatográficos, mientras que en los ensayos con carbendazima se empleó el producto técnico con una riqueza del 98%.

En la Tabla III.2 se muestran los datos referentes al suministrador de la materia activa así como de la riqueza y número de clasificación según el *Chemical Abstract Service* (CAS) de la Sociedad Americana de Química, de cada fungicida:

Tabla III.2. Características de las materias activas empleadas en este estudio

Nombre	Nº C.A.S*	Suministrador	Pureza
Carbendazima	10605-21-7	Bayer AG	98%
Prochloraz	67747-09-5	Riedel-de-Haën	99.5 %
Tebuconazol	107534-96-3	Riedel-de-Haën	98.5%

*Chemical Abstract Service (CAS) de la Sociedad Americana de Química

III.2.2.2. Reactivos y Disolventes

Los disolventes empleados en los procesos de análisis por HPLC fueron suministrados por la empresa Scharlab, S.L. (Barcelona, España) con grado analítico Multisolvant® específico para uso en HPLC-UV/VIS isocrática. El agua empleada para la preparación de la fase móvil fue de calidad Tipo III y se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q Plus® (Waters®) con una resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. Los reactivos, con grado de pureza ACS, para la preparación de los diferentes tampones de pH fueron suministrados por Scharlab, S.L y Merck. El material de análisis y de vidrio fue lavado antes de cada ensayo con agua y jabón alcalino y enjuagado con mezcla crómica para evitar contaminación y esterilizado posteriormente en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El material de vidrio volumétrico empleado para la realización de los patrones fue de Clase A.

III.2.2.3. Condiciones de los ensayos de hidrólisis

Para el estudio de la influencia del pH y la temperatura en la velocidad de hidrólisis, se han seguido el procedimientos descritos por Carrasco *et al.* (1992) y Hemmamma *et al.* (1994).

Se determinó la vida media de tebuconazol y procloraz, en soluciones acuosas, a tres valores de pH y tres temperaturas diferentes. Concretamente se ha determinado la velocidad de hidrólisis a pH = 2; 7.5 y 12 y a temperaturas de 12, 22 y 37° C.

El intervalo de pH elegido es más amplio que el normal en condiciones ambientales, con el fin de poder considerar también la posibilidad de depurar las aguas contaminadas mediante variaciones del pH.

Las disoluciones tampón empleadas, se prepararon según el protocolo de Robinson y Stockes (1959)⁴, tal como se muestra en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Soluciones tampón utilizadas para conseguir los distintos valores de pH

		Tª		
		10-12 °C	20-22 °C	35-37 °C
pH	2	Tetraoxalato 0.05 M ajustando* con Solución de Ca(OH) ₂ saturada		
	7.5	Tampón fosfato: KH ₂ PO ₄ 0.008695 M ajustando* con Na ₂ HPO ₄ 0.03043 M		
	12	Solución de Ca(OH) ₂ saturada a 25°C ajustando* con Tetraoxalato 0.05 M		

*El ajuste final del pH se realizó con el tampón a las temperaturas indicadas

El análisis de los residuos de plaguicidas se realizó siguiendo el protocolo descrito posteriormente, en los apartados III.2.4 a III.2.6.

Las concentraciones iniciales, de cada producto, fueron de 5 mg/L.

⁴ Handbook of Chemistry and Physics. 67TH edition. (1986-87). CRC Press

Para facilitar la interpretación de los datos relativos a la degradación, los resultados se han expresado como porcentaje de degradación respecto a la concentración inicial.

Para la realización del estudio de la hidrólisis, se llenaron frascos de vidrio Pyrex[®], tipo ISO, de 1 L de capacidad, con agua Milli-Q ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). Para evitar la posible acción degradadora asociada a microorganismos todo el material de vidrio y el agua empleada fueron esterilizados en autoclave, a 121°C , durante 15 minutos. Posteriormente se añadió el plaguicida correspondiente (de la calidad indicada en la Tabla III.2), en la cantidad necesaria para obtener una disolución con una concentración de 5 mg/L, y se cerraron herméticamente. Las disoluciones se agitaron fuertemente y se llevaron a una cámara isotérmica, en condiciones de oscuridad. Dada la baja solubilidad de los compuestos, para prevenir la formación de suspensiones que pudieran afectar la homogeneidad de la disolución, se decidió disolver previamente cada uno de los plaguicidas en un pequeño volumen acetona (calidad HPLC) que en ningún caso superó los 5 mL/L de disolución acuosa final (Durand, 1992).

Para evitar la degradación por el efecto de la luz, las botellas se recubrieron con papel de aluminio y se llevaron a las diferentes cámaras acondicionadas a la temperatura correspondiente de ensayo. Las botellas destinadas al estudio con temperaturas de 12 o 22°C se guardaron en sendas cámaras refrigeradas y termostalizadas, de la marca Matek[®], y las botellas destinadas al estudio 37°C se guardaron en una estufa microbiológica, de la marca J.P. Selecta[®].

Para la determinación del contenido residual de carbendazima, procloraz, o tebuconazol, se tomó de cada botella una alícuota de 50 mL, tras la adición del compuesto correspondiente y agitación (tiempo 0), y a los 30, 60, 120 y 180 días. Los tiempos fueron seleccionados de acuerdo con los datos de la bibliografía disponible y de los estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Carrasco, *et al.*, 1992; Carrasco, 1999 y Mendoza, 2002).

Posteriormente, se determinó de forma periódica la concentración residual de cada plaguicida en las disoluciones, mediante HPLC. La única preparación que requirió

la muestra, antes de su inyección en el equipo de HPLC, fue una filtración a través de filtros Millex®HV (Waters), de 2 µm de poro, para medio acuoso, a fin de eliminar las pequeñas partículas que pudieran haber en la muestra y que podrían afectar al proceso analítico.

Para cada plaguicida se practicaron dos ensayos independientes, ambos por duplicado, y se realizaron tres análisis de la concentración de fungicida en cada una de las disoluciones ensayadas de cada compuesto. Finalmente, se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos.

III.2.2.4. Análisis de los residuos de fungicidas

Los estudios de degradación de plaguicidas, en medio acuático, se realizan frecuentemente mediante determinaciones por GC, acoplada a detectores específicos o GC/MS, y suelen requerir la extracción de los plaguicidas de la fase acuosa, mediante técnicas de extracción líquido-líquido (LLE), SPE o SPME (Durand, 1992). Además, si el estudio incluye el análisis de los productos de fotólisis que, en muchos casos, son más polares que el compuesto de partida, suele ser necesario realizar una derivatización previa a la detección por GC (Wolfe *et al.*, 1987; Samanidou *et al.*, 1988; Chuckwudebe *et al.*, 1989).

Como alternativa a la cromatografía de gases, algunos autores han propuesto el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que permite determinar directamente los compuestos más polares y la determinación directa de los fungicidas en medio acuoso, sin necesidad de realizar un cambio del disolvente (Durand, 1992).

Por ello, para simplificar la metodología analítica y reducir el tiempo de realización de los análisis, en este estudio de disipación de los fungicidas, se ha optado por la cromatografía líquida de alta resolución, en fase reversa (RP-HPLC).

III.2.2.5. Instrumental analítico

Para el análisis de los residuos de los fungicidas, en los diferentes ensayos de este estudio, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), Waters® (Milford, UK), equipado con una bomba cuaternaria, con unidad de control independiente modelo 600E, acoplada a un detector de absorbancia VIS-UV, Waters®, modelo 484, con la longitud de onda seleccionada a 254 nm. La adquisición de datos cromatográficos se realizó con un integrador analógico, Hewlett Packard, modelo 3395A.

Las muestras se inyectaron manualmente, mediante un inyector Rheodyne 7725i, con un bucle de 20 μL , empleando para ello una jeringa Hamilton® de 100 μL de capacidad. La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa Waters™ Symetr® (150mm x 4.6 μm x 5mm), rellena de polímero octadecil (C-18). Para preservar la columna se intercaló una precolumna, Waters™, de 20 mm, de las mismas características que la columna. Antes de la inyección, cada muestra fue filtrada a través de un filtro de jeringa, Millipore™ Millex® HV13, de 0,45 μm , a fin de eliminar impurezas.

La fase móvil, constituida por un 30% de agua Milli-Q (18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) y un 70% de metanol (calidad HPLC), se desgasificó previamente, mediante un baño de ultrasonidos Branson™, a fin de eliminar el aire disuelto en las mismas y la formación de burbujas de aire durante el proceso de análisis. A fin de asegurar la total eliminación de aire en la fase móvil, se intercaló un desgasificador de membranas automático, Waters®, antes de la entrada a la bomba. El registro de datos cromatográficos se realizó con un integrador analógico, Hewlett-Packard™, modelo 3395A de papel continuo.

En la Tabla III.4 se muestra un resumen de las características de los accesorios instrumentales y fase cromatográfica empleados en el análisis de las muestras.

Tabla III.4. Accesorios y condiciones, empleados para el análisis por HPLC de los residuos de plaguicidas, en los ensayos de degradación/disipación

Accesorio	Modelo o fase
Bomba	Waters™ 600E de cuatro canales y control independiente
Detector	Absorbancia UV-VIS Waters™ 484
Integrador-registrador	HP 3395A
Columna	Waters RP-Symetry C18 150mm x 4,6 mm x 5 µm
Precolumna	Waters Symetry® C18 (20 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Fase Móvil	30% A:70%B A: H ₂ O Milli-Q (18.2 MΩ·cm ⁻¹) B: MeOH (Calidad HPLC)
Flujo	0.75 mL·min ⁻¹
Detección	Por absorbancia en el ultravioleta a una λ = 256 nm
Temperatura columna	Ambiente (22-25°C)
Sistema Inyección	Inyector manual Rheodyne™ 7725i con "loop" de 20 µL

III.2.2.6. Cálculo de las concentraciones residuales

Para calcular la concentración de plaguicida, en cada una de las muestras, y el porcentaje de degradación del fungicida, respecto a la concentración inicial, las áreas cromatográficas obtenidas en los cromatogramas se pasaron a una plantilla de MS-Excel®, donde las áreas eran convertidas en valores de concentración, tras interpolar en la curva de calibrado obtenida con estándar externo, e introducida en la plantilla Excel. Este procedimiento se utilizó para cada uno de los compuestos ensayados.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, se realizó mediante el paquete estadístico SigmaStat v.3.5 (Systat Inc.). Para el ajuste de los datos obtenidos a cinéticas de primer orden y las representaciones gráficas de las mismas se empleó el paquete SigmaPlot v.9 (Systat Inc.).

III.2.2.7. Cálculo de la vida media de los plaguicidas

Para el cálculo de la vida media de los plaguicidas, generalmente se considera que el proceso de degradación, o disipación, puede describirse por una cinética de primer orden (Ioannis *et al.*, 2000) y se puede expresar matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

$$C=C_0 e^{-Kt} \quad (1)$$

Donde C es la concentración de plaguicida, medida en el tiempo t , C_0 es la concentración inicial de plaguicida y k es la constante de disipación o degradación.

Además, la vida media ($t_{1/2}$ o DT_{50}) de un plaguicida, se define como el tiempo que debe transcurrir para reducir la concentración inicial del compuesto a la mitad.

La ecuación (1) también puede expresarse mediante la ecuación siguiente:

$$\ln C = -k t \ln C_0 \quad (2)$$

De esta forma, a partir de la ecuación (2), podemos calcular la vida media de un plaguicida mediante el siguiente cociente:

$$t_{1/2}, \text{ ó } DT_{50} = \ln 2/k \quad (3)$$

En este trabajo los datos de degradación se ajustaron gráficamente mediante la función de ajuste “*Curve fit*” del programa SigmaPlot 9 (Systat Inc.). Esta función permite ajustar los datos de concentración de plaguicida, obtenidos en función del tiempo, a una cinética de primer orden (ecuación 1), y no es necesario trabajar con la ecuación en forma lineal (2). Para facilitar la interpretación los valores de concentración se transformaron en % de degradación respecto a la concentración inicial ($C_0= 100\%$). El programa estima la bondad del ajuste (R^2) y la constante (k) de degradación, a partir de la concentración inicial de compuesto, con su intervalo de confianza (I.C. al 95%).

III.3. PROCESOS DE FOTÓLISIS EN MEDIO ACUOSO

III.3.1. Efecto de la luz día y de la aireación en la pauta de evolución de la concentración de los plaguicidas en agua ultrapura estéril.

El estudio de la influencia de la luz tipo día y de la aireación sobre la evolución de la concentración de los plaguicidas disueltos en agua destilada, se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), en cámara termostatzada.

Para ello, se utilizó la metodología descrita por Sabater (1994) y Carrasco (1999) con pequeñas modificaciones. Se llenaron 4 frascos de cristal transparente a la luz, tipo ISO, con una solución tampón, $\text{pH}=7.5$, preparada a partir de Milli-Q ($18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Esta solución se esterilizó en autoclave para evitar la posible degradación asociada a microorganismos. Posteriormente, se añadió el plaguicida correspondiente (con la riqueza indicada en la Tabla I.2) a una concentración de 5 mg/L y se cerraron con tapones de rosca, tipo GL45 perforados; estas disoluciones se agitaron fuertemente y se llevaron a una cámara bioclimática, Sanyo MLR-351, equipada con 9 tubos de luz día con una capacidad lumínica máxima de 20.000 lux, con iluminación continua, 24 horas al día. Para evaluar simultáneamente el efecto de la luz y de la aireación, en otros frascos, se instaló un tubo de teflón con un difusor en un extremo, a través del orificio del tapón, y en el otro extremo se conectó a un aireador de acuarios (Rena Air 50[®] de 2 W de potencia con un caudal máximo de aire de 70 L/h) con un flujo constante de 5 burbujas/segundo, que se regulaba mediante llaves de corte. Otros frascos se recubrieron con papel de aluminio, de forma que quedaran aisladas de la luz, para determinar el efecto de la aireación en la disipación del plaguicida, y se instaló un aireador similar al descrito anteriormente.

La concentración de los plaguicidas en las disoluciones ensayadas se determinó periódicamente (a los 0, 30, 60, 120 y 180 días), tomando alícuotas de 50 mL de dichas disoluciones. Las muestras tomadas se analizaron por RP-HPLC-UV/VIS, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Posteriormente, se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos, y una representación de los porcentajes de degradación con el programa de ajuste gráfico SigmaStat 9.0 (Systat Inc.).

III.3.2. Efecto de la luz ultravioleta en la pauta de evolución de la concentración de los plaguicidas en agua destilada

El estudio de la influencia de la luz ultravioleta, en la degradación de los plaguicidas disueltos en agua destilada, se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$).

Para ello, se llenaron 2 acuarios, de cristal, de 39.5 x 19.0 x 24.5 cm, con 10 L de agua destilada, cada uno de ellos, y se añadió el plaguicida en estudio (estándar analítico) a una concentración de 5 mg/L; estas disoluciones se agitaron fuertemente y se llevaron a una cámara isotérmica. Sobre cada acuario, a 12 cm de la disolución, se instaló una lámpara UV-C germicida (Silvania™ Germicidal Lamp G15T8, 15W) con emisión máxima a una $\lambda = 253.7 \text{ nm}$ (ver Figura III.1), que se mantuvo encendida a lo largo de todo el ensayo; en la Tabla III.5 se muestran los datos técnicos de las lámparas empleadas.

Posteriormente, se determinó periódicamente la concentración de fungicida, en cada disolución, mediante análisis cromatográfico. Este ensayo se realizó por duplicado; se tomaron muestras por duplicado a diferentes tiempos, y se realizaron tres análisis de cada muestra. Finalmente, se efectuó un estudio estadístico de los resultados obtenidos.

El análisis de las concentraciones de residuo de cada uno de los plaguicidas se determinó siguiendo el método descrito en el apartado anterior.

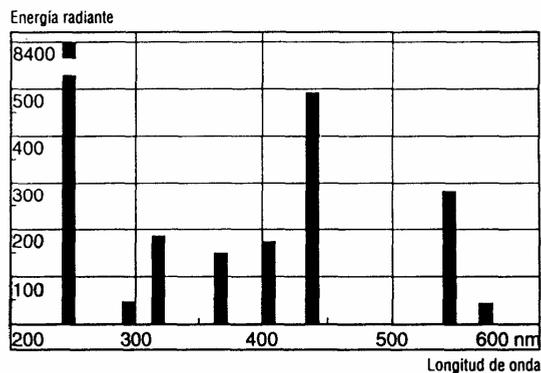


Figura III.1. Distribución energética de las lámparas Sylvania G15T8 utilizadas en los ensayos de fotodescomposición.

Tabla III.5. Características técnicas de las lámparas germicidas utilizadas.

Marca	Sylvania
Referencia	G15T8
Potencia nominal (vatios)	15
Tipo de bulbo	T8
Casquillo	Biespiga normal
Longitud	450 mm
Longitud del arco	355 mm
Vida media	7500 horas
Emisión a 253.7 nm	3.3 W *
Amperios	0.30 A
Voltios	55 V
Lúmenes	100

*La máxima potencia de esta lámpara se alcanza a una longitud de onda entre 250 y 255 nm, aproximadamente, encontrándose un máximo de emisión a 253.7 nm.

III.4. HIDRÓLISIS DE LOS FUNGICIDAS AZÓLICOS A 148°C EN AGUA ULTRAPURA

III.4.1. Introducción

Algunos estudios recopilados por Tomlin (2000) indican que estos fungicidas son estables a elevadas temperaturas, señalando que el procloraz es estable a temperaturas próximas a 200° C, y que tebuconazol lo es a elevadas temperaturas. Para comprobar si la hidrólisis a temperaturas relativamente elevadas, podrá emplearse para la depuración de las aguas contaminadas con fungicidas azólicos, se ha realizado un estudio de la hidrólisis de los fungicidas carbendazima, procloraz y tebuconazol, en disoluciones en agua ultrapura a 148° C.

III.4.2. Condiciones de los ensayos

Se seleccionó la temperatura de 148° C por ser la establecida en los ensayos de determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) (APHA-AWWA-WPCF, 1992) y por disponer en nuestro laboratorio del equipamiento necesario para realizar los ensayos. Para estos ensayos, se utilizaron 5 tubos de vidrio, de 16 mm. de diámetro, marca Merck® para análisis de DQO. Cada uno de ellos, se llenó con 10 mL de una disolución de 10 mg/L, para cada fungicida (ver riqueza en Tabla III.2.2), preparada a partir de una disolución madre de 50 mg/L con un 1% de acetona, para favorecer la disolución de los fungicidas. Los tubos se cerraron herméticamente con un obturador de silicona y tapón de rosca de Teflón. Los tubos se agitaron en un agitador *vortex* durante 30 segundos, para asegurarnos de la completa disolución del compuesto y se colocaron en un termostato, Merck™ modelo TR620, para tubos de 16 mm, con la temperatura fijada a 148° C. A los tiempos prefijados (0, 50, 100, 200, 300 y 500 minutos) se sacó un tubo de cada compuesto y se sumergieron en agua con hielo picado, a fin de rebajar la temperatura de la disolución y condensar el vapor generado en el interior del tubo. Posteriormente, se analizaron cada uno de las disoluciones para determinar la concentración de los distintos fungicidas por RP-HPLC-UV, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.2.4 a III.2.2.7. Estos ensayos se realizaron en dos ocasiones diferentes, analizando por duplicado cada tubo y efectuándose un estudio estadístico de los resultados obtenidos.

III.5. ESTUDIO DE LOS PROCESOS BIÓTICOS QUE INFLUYEN LA DEGRADACIÓN Y DISIPACIÓN DE TEBUCONAZOL, PROCLORAZ Y CARBENDAZIMA

III.5.1. Introducción

La degradabilidad de un compuesto en el medio ambiente no depende únicamente de su comportamiento en medios abióticos, semejantes a las condiciones de laboratorio, ya que en el medioambiente existen multitud de microorganismos que intervienen activamente en procesos de degradación biológica (biodegradación). Entre los microorganismos con actividad biodegradadora destacan las bacterias, levaduras, hongos y algas.

Concretamente, las poblaciones de algas presentes en el Lago de la Albufera de Valencia, juegan un papel importante en los procesos de biodegradación. Por ello, se han realizado una serie de ensayos con el fin de estudiar la actividad degradadora de las poblaciones de microorganismos presentes en las aguas naturales y de ciertos microorganismos en cultivos puros.

En un estudio realizado anteriormente (Carrasco *et al.*, 1992) se determinó la eficacia de diversos procesos que podrían utilizarse para la depuración de aguas contaminadas con el herbicida molinato y en otro estudio (Jonson *et al.*, 2001) se determinó el Factor de Bioconcentración del insecticida piridafention. En ambos estudios se comprobó la capacidad de biodegradación de las algas. Por ello, se han realizado varios ensayos para estudiar la actividad descontaminadora de las poblaciones de algas y microorganismos presentes en las aguas naturales y en cultivos puros.

En estos ensayos se ha estudiado la evolución de la concentración residual de los fungicidas azólicos, en 4 cultivos puros de algas verdes unicelulares presentes, en el lago de la Albufera, según se establece en el "Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce, con *Scenedesmus subspicatus* y *Selenastrum capricornutum*", publicado en el Diario Oficial 201 de la OCDE (OCDE, 1998) o de la norma ISO 8692: (ISO, 1989) con pequeñas modificaciones.

También se ha estudiado la evolución de los compuestos en agua procedente del Lago. La capacidad descontaminadora de los microorganismos presentes en el medio puede ser determinante para la evaluación del riesgo que los compuestos químicos tienen sobre su supervivencia o desarrollo.

III.5.2. Evolución de la concentración de procloraz, tebuconazol y carbendazima, en cultivos monoalgales y en aguas de la Albufera de Valencia. Condiciones del ensayo con cultivos monoalgales

Se ha estudiado la evolución de los fungicidas procloraz, tebuconazol, y carbendazima (estándar analítico), en 4 cultivos diferentes de algas disponibles en nuestro Laboratorio, bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminación. Las especies de algas utilizadas fueron *Chlorella saccharophila*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus subspicatus*.

Los ensayos se realizaron en frascos de vidrio de 3 L de capacidad; en cada uno de ellos se colocaron 2 L de medio cultivo "*Bold's Bassal Medium*" (BBM) (ver Tabla III.6), que es un medio nutritivo empleado en cultivo algas clorofíceas.

Se realizaron dos réplicas de cada compuesto empleando una concentración equivalente a 1/10 de la $\text{EbC}_{50-96\text{h}}$ obtenida según ensayos de toxicidad estandarizados según norma OCDE 201 (OECD, 1998), en ambos casos se emplearon concentraciones de 0.1 mg/L, con esta concentración es posible asegurar que las poblaciones no se verán afectadas por la toxicidad del compuesto. Los frascos se taparon con Parafilm® y se colocó un tubo de silicona conectado a un aireador para asegurar el correcto oxigenado del medio. Se practicaron dos orificios de ventilación para el intercambio de gases con el exterior del frasco. Los frascos se colocaron en una cámara climatizada a $22 \pm 1^\circ \text{C}$. La iluminación que llegaba a los cuatro matraces procedía de seis lámparas de luz día (Silvana™ GRO-LUX F30W/T8/GRO) que proporcionaban una intensidad lumínica de 1200 lux, durante 12 horas diarias. De forma paralela, se colocaron frascos control, en los que se utilizó la misma cantidad de medio de cultivo BBM y tóxico pero sin inóculo de alga.

Posteriormente, se determinó periódicamente la concentración residual de fungicida mediante RP-HPLC-UV/VIS. Para ello, se tomaron muestras de 50 mL de cada frasco a 0, 3 y 5 días. Las muestras se filtraron a través de discos de microfibras de vidrio Whatman GF/F® y el filtrado se pinchó directamente en el HPLC con las condiciones cromatográficas descritas en el apartado III.2.4. La cuantificación se realizó mediante la interpolación en una recta de calibración con patrones externos suministrados por la empresa Riedel-de-Haën.

Tabla III.6. Composición del medio nutritivo “*Bold’s Basal Medium*” (BBM), empleado en los ensayos con algas

Solución	Compuesto	Cantidad (gr)
Bristol (para 2L de solución)	NaNO ₃	5.0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
	K ₂ HPO ₄	1.5
	KH ₂ PO ₄	3.5
B (Metales traza) (para 1L de solución)	NaCl	0.5
	NaFe EDTA	5.0
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022
C (Vitaminas) (para 1L de solución)	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0064
	Tiamina	0.20
	Biotina	0.01
	B ₁₂	0.01

Para reconstituir un litro de medio BBM, se toman 100 mL de la solución Bristol, 2 mL de la solución B y 2 mL de la solución C, ajustando el volumen final con agua ultrapura (18.2 MΩ·cm⁻¹) en matraz aforado clase A de 1L.

También se ha determinado, en el laboratorio, la evolución de los fungicidas carbendazima, procloraz y tebuconazol, en sistemas acuáticos estáticos, con agua procedente del lago de La Albufera; comprobándose la reducción de la concentración de los fungicidas considerados atribuible a las poblaciones naturales de microorganismos que viven en las aguas del Lago, bajo condiciones controladas de temperatura (22±1 °C).

Para ello, se llenaron 2 frascos de 3 L, de capacidad, con 2.5 L de agua del Lago, tomada en el embarcadero de la gola de Pujol, se añadió el fungicida en estudio (5 mg/L, estándar analítico). Los frascos se agitaron fuertemente, se taparon con Parafilm® y se llevaron a una cámara climatizada a $22\pm 1^\circ$ C, e iluminada con un fotoperiodo de luz:oscuridad, de 12:12 h, mediante dos tubos de luz tipo día (Silvania™ GRO-LUX® F30W/T8/GRO), con una intensidad lumínica de 1200 lux. Los frascos se airearon mediante tubos de silicona conectados a un aireador, con un flujo aproximado de 20 mL/min. A lo largo de la experiencia se controló el pH del medio en los cultivos algales para comprobar el efecto del mismo sobre la evolución de la concentración. Estos ensayos se realizaron por duplicado, en dos ocasiones diferentes.

Finalmente, se tomaron 2 muestras de 50 mL de cada uno de los frascos a los 0, 3 y 5 días, para determinar la cantidad residual de cada plaguicida por RP-HPLC-UV, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior.

De forma paralela, se estudió la evolución de los fungicidas en agua destilada (controles), bajo las mismas condiciones descritas para el ensayo con agua de La Albufera.

III.6. RESULTADOS

III.6.1. Estudio de la hidrólisis de los fungicidas procloraz y tebuconazol en función del pH y de la Temperatura

Como ya se ha indicado al exponer las condiciones de este ensayo, la velocidad de hidrólisis del procloraz y tebuconazol se ha determinado a pH= 2, 7.5 y 12 y a temperaturas de 12, 22 y 37° C, siguiendo los procedimientos descritos por Sabater (1994) y Carrasco (1999), con ligeras modificaciones.

En la Tabla III.7 y III.8 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la hidrólisis (% concentración residual), del tebuconazol y procloraz, respectivamente, a los 180 días de ensayo.

Tabla III.7. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de tebuconazol en función del pH y Temperatura

pH	Temperatura (°C)	% concentración residual* de Tebuconazol ± desv. estándar	Cte. de degradación k (días ⁻¹) ± (error std.)	DT50** (días) (I.C. 95%)
2	12	61.2±3.2	0.0027 ± 0.0001	256 (248-267)
	22	60.4±4.1	0.0027 ± 0.0002	254 (239-277)
	37	58.7±3.7	0.0032 ± 0.0002	216 (204-231)
7.5	12	85.3±4.6	0.001 ± 0.0001	693 (630-770)
	22	86.8±4.6	0.00081 ± 0.00008	855 (788-922)
	37	77.3±4.3	0.0012 ± 0.00008	577 541-613
12	12	51.2±3.1	0.0037 ± 0.0002	187 (177-198)
	22	50.5±3.8	0.0039 ± 0.0002	177 (169-187)
	37	45.9±4.7	0.0043 ± 0.0002	161 (154-169)

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 180 días de exposición.

**DT₅₀: Vida media del plaguicida en las condiciones descritas

Asimismo, se muestra la constante de degradación k , obtenida mediante ajuste de los valores a una cinética de primer orden ($C = C_0 \cdot e^{-kt}$), con su error estándar asociado, indicando la vida media del compuesto en las condiciones de temperatura y pH correspondientes, así como el intervalo de confianza al 95%.

Como puede observarse en la Tabla III.7, la vida media del tebuconazol a pH=7.5 es mayor de un año, de acuerdo con lo expuesto por Tomlin, (2000); sin embargo, es menor de un año a pH=2 y a pH=12.

Tabla III.8. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de Procloraz en función del pH y de la Temperatura

pH	Temperatura (°C)	% Concentración residual* de Procloraz ± desv. estándar	Cte. de degradación k (días ⁻¹) ± (error std.)	DT50** (días) (I.C. 95%)
2	2	82.1±1.6	0.0012 ± 0.0001	578 (533-630)
	12	83.1±2.1	0.0011 ± 0.0001	630 (578-693)
	22	82.7±1.9	0.0013 ± 0.0002	533 (462-630)
7.5	2	97.9±2.3	$4.9 \cdot 10^{-5} \pm 1.6 \cdot 10^{-5}$	>5años
	12	98.2±3.1	$8.5 \cdot 10^{-5} \pm 2.9 \cdot 10^{-5}$	>5 años
	22	98.1±3.4	$7.6 \cdot 10^{-5} \pm 3.56 \cdot 10^{-5}$	>5 años
12	2	24.3±1.5	0.0078 ± 0.0002	889 (707-1195)
	12	82.1±1.6	0.0012 ± 0.0001	578 (533-630)
	22	83.1±2.1	0.0011 ± 0.0001	630 (578-693)

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 180 días de exposición.

**DT₅₀: Vida media en las condiciones descritas

En este mismo sentido, los resultados obtenidos en el estudio de la hidrólisis del procloraz (Tabla III.8) indican que su hidrólisis es mucho más lenta, con una vida media estimada, a pH=7, mayor de 5 años; la vida media ha sido calculada de forma aproximada, ya que como se muestra en la Tabla III.8, la degradación en 180 días apenas fue de un 2%, lo cual imposibilita la aplicación una cinética de primer orden fiable.

Estos datos concuerdan con lo indicado por Tomlin (2000), en el sentido de que el procloraz es estable en soluciones acuosas a pH=7 y 20° C, sufriendo descomposición en ácidos y álcalis concentrados tal y como se indican en los estudios llevados a cabo por el Joint Meeting on Pesticide Residues de la FAO (JMPR-IPCS, 1983).

En las Figuras III.2. y III.3 (páginas siguientes) se muestra la evolución de la hidrólisis del tebuconazol y procloraz, respectivamente, en disoluciones acuosas tamponadas a pH = 2; 7.5 y 12 y a tres temperaturas= 12; 22 y 37°C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

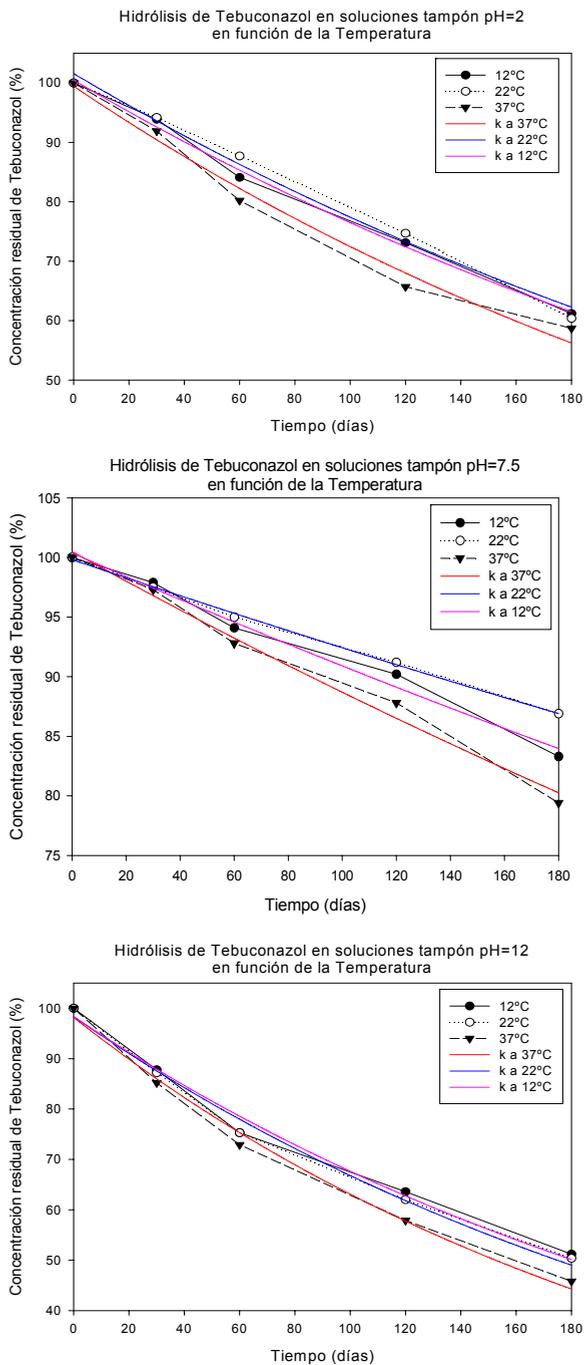


Figura III.2. Hidrólisis del tebuconazol en disoluciones acuosas tamponadas a pH = 2; 7.5 y 12 y a 12, 22 y 37° C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

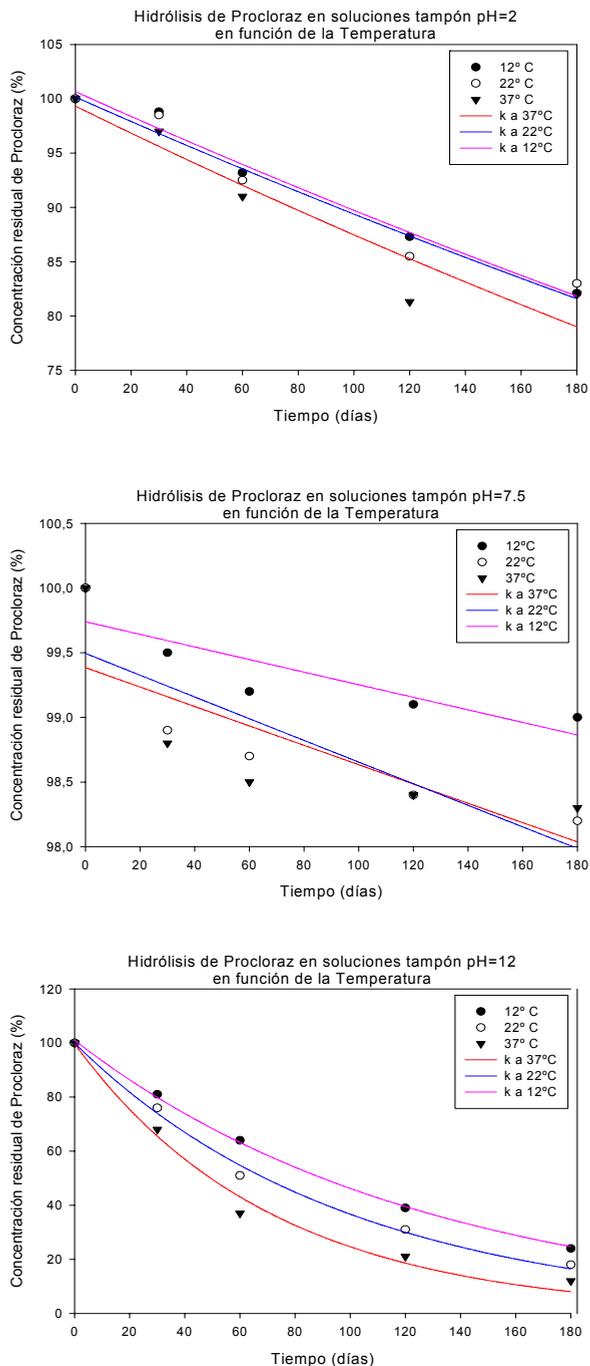


Figura III.3. Hidrólisis del procloraz en disoluciones acuosas tamponadas a pH = 2; 7.5 y 12 y a 12, 22 y 37° C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Las Figuras III.4 y III.5 muestran la vida media de tebuconazol y procloraz, respectivamente, en disoluciones acuosas tamponadas a pH: 2, 7.5 y 12 y a tres temperaturas diferentes: 12, 22 y 37° C. con una concentración inicial de 5 mg/L.

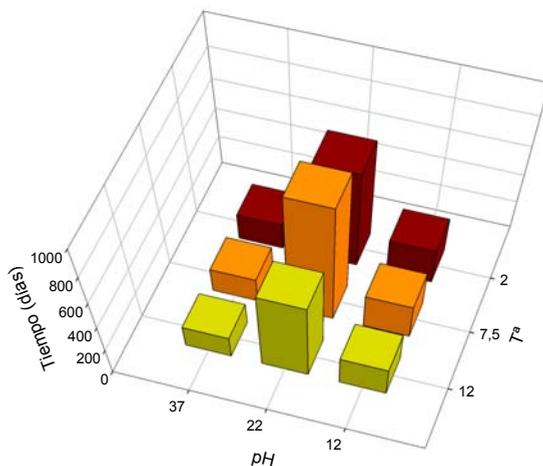


Figura III.4. Vida media del tebuconazol en función del pH y Tª de las disoluciones acuosas tamponadas a pH: 2, 7.5 y 12 y a tres temperaturas diferentes: 12, 22 y 37° C. con una concentración inicial de 5 mg/L

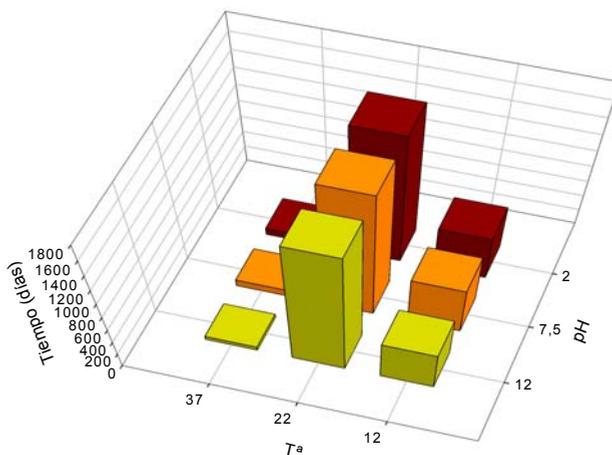


Figura III.5. Vida media del procloraz en función del pH y Tª de las disoluciones acuosas tamponadas a pH: 2, 7.5 y 12 y a tres temperaturas diferentes: 12, 22 y 37° C. con una concentración inicial de 5 mg/L

III.6.2. Estudio de la hidrólisis del procloraz y tebuconazol bajo diferentes condiciones de iluminación y aireación

En la Tabla III.9 se exponen los resultados obtenidos al estudiar la evolución de la concentración residual de tebuconazol en disoluciones acuosas expuestas a lámparas de luz tipo día, en frascos de vidrio, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Tabla III.9. Evolución de la concentración de tebuconazol en disoluciones acuosas, aireadas y expuestas a una lámpara de luz día, concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Condiciones de ensayo	% concentración residual de tebuconazol* ± s.d.	Cte. Degradación k (días ⁻¹) ± (error std.)	DT50** (días) (I.C. 95%)
Luz día + aireación	62±3.5	0.0027±0.0002	257 (239-277)
Luz día	70.2±4.1	0.0023±0.00001	301 (289-314)
Oscuridad + aireación	86±3.9	0.00080±0.00009	866 (782-971)
Oscuridad	86.8±4.6	0.00081±0.00008	855 (788-922)

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 180 minutos de exposición.

**DT₅₀: Vida media en las condiciones descritas

Como puede observarse, la vida media del tebuconazol es aproximadamente de 257 días cuando la disolución tamponada es iluminada y aireada constantemente; en cambio, cuando la solución tamponada es iluminada, sin aireación, la vida media es de 301 días; lo cual indicaría una débil disipación por efecto de la aireación. Además, al comparar los valores de vida media obtenidos en la oscuridad no se observan diferencias estadísticamente significativas, debido a las menores diferencias existentes entre las muestras aireadas y las no aireadas, lo que confirmaría que la disipación por aireación es pequeña. Esta pequeña disipación, debida a la aireación, se corresponde con la baja volatilidad del tebuconazol.

Por otro lado, al comparar la vida media de tebuconazol obtenida en las disoluciones acuosas, tamponada a pH: 7.5, en ausencia de luz y aireación (855 días), con la vida media del tebuconazol sometido a aireación, en ausencia de luz (866 días), puede observarse que la vida media es menor en soluciones iluminadas con luz tipo día, con respecto a las mismas soluciones en oscuridad. Este hecho nos indica que el tebuconazol puede sufrir reacciones de fotólisis que degradan el compuesto. Además, puede observarse que el efecto de la aireación es mayor cuando la solución es iluminada, produciéndose un efecto aditivo que favorece la degradación del compuesto.

En la Figura III.6 se muestra la evolución de la concentración de los residuos de tebuconazol en cada uno de los diferentes ensayos, con iluminación y aireación, de soluciones de tebuconazol tamponadas a pH: 7.5 con concentraciones iniciales de 5 mg/L.

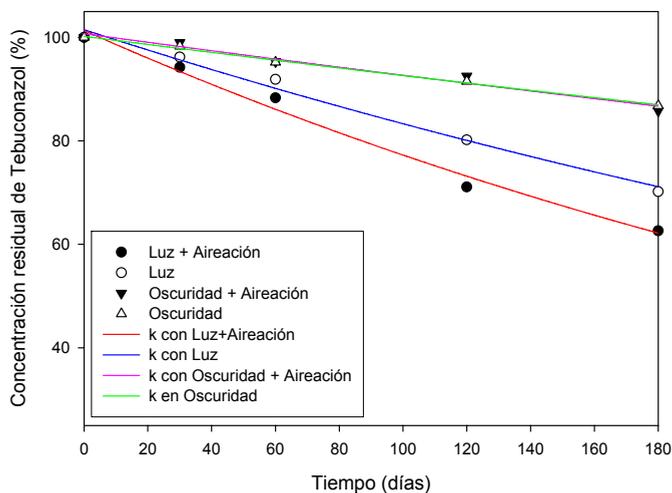


Figura III.6. Fotólisis del tebuconazol en disoluciones acuosas, iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5mg/L.

En la Tabla III.10 se exponen los resultados obtenidos al estudiar la evolución de la concentración residual de procloraz, en disoluciones acuosas, expuestas a lámparas de luz tipo día, en frascos de vidrio, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L. La Figura I.7 muestra la evolución de la fotólisis del procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Tabla III.10. Resultados obtenidos en el estudio de hidrólisis de procloraz en diferentes condiciones de iluminación y aireación.

Condiciones de ensayo	% concentración residual de Procloraz* \pm s.d.	Cte. Degradación k (días ⁻¹)** \pm (error std.)	DT50 (días)*** (I.C. 95%)
Luz día + aireación	62.3 \pm 4.5	0.0023 \pm 0.0001	301 (288-315)
Luz día	70.2 \pm 5.1	0.002 \pm 0.00001	347 (330-364)
Oscuridad + aireación	93.1 \pm 3.7	0.0004 \pm 0.00006	1730 (1507-2039)
Oscuridad	84 \pm 5,1	0.0003 \pm 0.000025	2310 (2133-2521)

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) \pm Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 180 minutos de exposición.

**Ajuste según una cinética de primer orden ($C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$)

***DT₅₀: Vida media en las condiciones descritas ($\ln 2/k$)

Como puede observarse en la Tabla III.10, la vida media del procloraz, en las disoluciones tamponadas, mantenidas en la oscuridad y sin aireación (2310 días) es significativamente mayor que cuando se iluminan estas disoluciones con lámparas de luz día (vida media: 347 días), lo que indica este compuesto sufre reacciones de fotodescomposición mayor medida que el tebuconazol

Por otra parte, la vida media del procloraz, en la disolución tamponada a pH: 7.5, sometida a iluminación y aireación constante es de 301 días y cuando la disolución tamponada es sometida sólo a iluminación la vida media es de 347 días. Lo cual indica que la aireación provoca una pequeña disipación del procloraz, lo que se confirma, si comparamos, la vida media del procloraz, en la disolución acuosa tamponada a pH: 7.5, en ausencia de luz y de aireación (2310 días), con la vida media del sometido a aireación en ausencia de luz (1730 días).

En general, se observa que el procloraz es más estable que el tebuconazol.

En la Figura III.7 muestra la evolución de la fotólisis del Procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

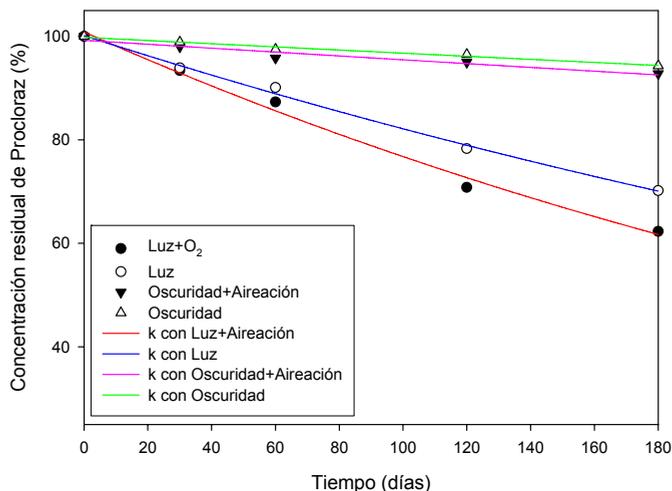


Figura III.7. Fotólisis del procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con lámparas tipo luz día, con concentraciones iniciales del orden de 5mg/L.

El efecto de la aireación sobre soluciones de plaguicidas iluminadas ha sido estudiado por diferentes autores que han llegado a resultados similares a los encontrados en este estudio. Sabater (1994) estudió la vida media de la atrazina, benticarb, clorsulfuron, fenitrotion y molinato en soluciones acuosas sometidas a iluminación con luz día y aireación llegando a las mismas conclusiones: el efecto de la aireación reduce hasta en tres veces la vida de estos compuestos cuando las soluciones se expusieron a luz día.

III.6.3. Estudio de la fotólisis de los fungicidas tebuconazol y procloraz por luz ultravioleta

En la Tabla III.11 se exponen los resultados obtenidos al estudiar la evolución de la concentración de carbendazima, procloraz y tebuconazol, en disoluciones acuosas expuestas a la luz de lámparas germicidas de $\lambda_{\max} = 254$ nm, con concentraciones iniciales de 5 mg/L. En la Figura III.8 se muestra la evolución de las concentraciones residuales de los tres plaguicidas ensayados así como el ajuste de los mismos a una cinética de primer orden.

Tabla III.11. Evolución de la concentración de los fungicidas carbendazima, procloraz y tebuconazol, en disoluciones acuosas, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L, expuestas a una lámpara de luz ultravioleta ($\lambda_{\max} = 254$ nm), con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Materia activa	% concentración residual ± s.d.	Cte. Degradación k (minutos ⁻¹) ± (error std.)	DT50** (minutos) (I.C. 95%)
Carbendazima (Estándar analítico 98%)	42±3.5	0.014±0.0006	158 (136-187)
Procloraz (Estándar analítico 99.5%)	16±2.2	0.0101±0.0009	50 (47-52)
Tebuconazol (Estándar analítico 99.5%)	12±1.6	0.0044±0.0007	69 (63-75)

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 180 minutos de exposición.

**DT₅₀: Vida media en las condiciones descritas

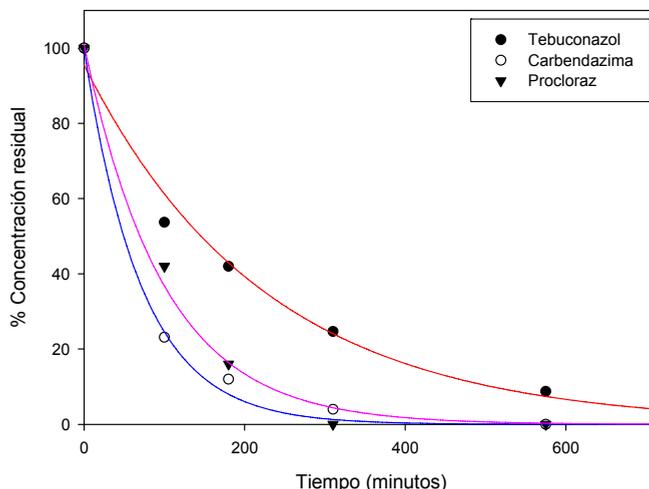


Figura III.8. Fotólisis del tebuconazol, carbendazima y procloraz en disoluciones acuosas iluminadas con luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), con concentraciones iniciales de 5 mg/L.

Como puede observarse en Tabla III.11, la vida media de la carbendazima, en estas condiciones, es de 158 minutos (I.C. al 95%= 136-187 minutos), el tebuconazol presentó una vida media de 69 minutos (I.C. al 95%= 63-75 minutos); finalmente la solución acuosa de procloraz iluminada con lámparas UV-C presentó una vida media de 50 minutos (I.C. al 95%= 47-52 minutos).

Si comparamos estos últimos datos con los obtenidos en los estudios de fotólisis con luz día, la degradación con la luz UV-C es mucho más eficiente; ya que, en estas condiciones, la vida media es de minutos mientras con iluminación con luz tipo día es de meses.

Como conclusión a los ensayos de evolución de la concentración de carbendazima, procloraz y tebuconazol en disoluciones acuosas tamponadas a pH: 7.5 y mantenidas en diferentes condiciones de aireación, oscuridad e iluminación visible y ultravioleta, podemos señalar la rapidez de la fotodescomposición de los tres compuestos cuando son expuestos a luz UV-C con una $\lambda=254 \text{ nm}$.; lo que permite proponer la fotodescomposición por luz UV como un hipotético método para la eliminación de los residuos de estos fungicidas en medios acuáticos

contaminados. Este hecho también permite afirmar que una elevada insolación de aguas naturales con concentraciones residuales de estos fungicidas puede reducir sensiblemente la concentración de los mismos.

III.6.4. Estudio de la estabilidad térmica a 148°C

Según los datos expuestos por Tomlin (2000), tanto el procloraz como el tebuconazol son compuestos estables a altas temperaturas. Concretamente, este autor indica que el Procloraz es estable a temperaturas de hasta 200° C y del tebuconazol únicamente se indica su estabilidad a elevada temperatura sin aportar más información. Por otra parte, estos datos concuerdan con los expuestos por la JMPR (1983) para el procloraz.

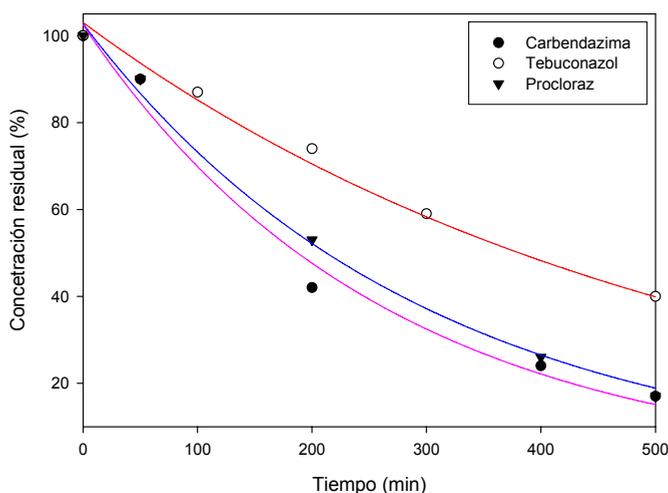
Como se ha indicado anteriormente, la escasez en la bibliografía consultada de estudios referentes a la estabilidad del procloraz y el tebuconazol, a distintas temperaturas, nos ha conducido a considerar necesario realizar un estudio sobre la estabilidad de estos compuestos en disoluciones acuosas a 148° C. En la Tabla III.12 se exponen los resultados de este estudio, en el que también se ha incluido la carbendazima, para disponer de datos referentes a estos tres fungicidas (carbendazima, procloraz y tebuconazol) obtenidos en las mismas condiciones.

Tabla III.12. Vida media de la carbendazima, procloraz y tebuconazol en disoluciones acuosas del orden de 5 mg/L sometidas a 148° C.

Compuesto	DT ₅₀ * (minutos) (I.C. al 95%)	Cte. Degradación** k (min ⁻¹) ± s.d.
Carbendazima (Estándar analítico 98%)	182 (165-204)	0.0038±0.0004
Procloraz (Estándar analítico 99.5%)	204 (192-216)	0.0034±0.0002
Tebuconazol (Estándar analítico 99.5%)	365 (347-385)	0.0019±0.0001

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar. Tiempo expresado en minutos.
**Ajuste según una cinética de primer orden ($C_t = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$)

Como puede observarse, el tebuconazol es el fungicida más estable y la carbendazima es el fungicida más inestable, de los tres compuestos considerados; sin embargo, entre la carbendazima y el procloraz la diferencia no es estadísticamente significativa. En la Figura III.9 se muestra la evolución de los residuos de carbendazima, tebuconazol y procloraz en disoluciones acuosas calentadas a 148° C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.


Figura III.9. Degradación de carbendazima, tebuconazol y procloraz en disoluciones acuosas calentadas a 148 °C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

La vida media de la carbendazima en las condiciones de ensayo descritas fue de 182 minutos (I.C. al 95%= 165-204 minutos), para el tebuconazol y procloraz la vida media calculada según el ajuste realizado de los datos de residuos fueron 365 (I.C. al 95%= 287-345 minutos) y 204 minutos (I.C. al 95%= 192-216 minutos), respectivamente.

III.6.5. Evolución de la concentración de carbendazima y procloraz en cultivos monoalgales

Teniendo en cuenta los trabajos realizados por Carrasco *et al.* (1992) y por Jonsson *et al.* (2001) y con el fin de evaluar la contribución relativa de las algas a la degradación o disipación de la carbendazima y el procloraz en los ecosistemas acuáticos, se ha estudiado la evolución de la concentración de dicho herbicida en cultivos monoalgales de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus subspicatus*, durante 8 días. Las condiciones que se han utilizado para la realización de estos ensayos se han expuesto en apartado III.2.3.1.

En la Tabla III.13, se muestran los porcentajes de concentración residual, respecto a la concentración inicial, en los cultivos monoalgales puros de las 4 especies de algas, en soluciones acuosas de carbendazima y procloraz, con concentraciones iniciales de 0.1 mg/L, a lo largo de un periodo de 8 días.

Tabla III.13. Concentración residual, a los 8 días, en disoluciones de 0.1 mg/L de carbendazima o procloraz, en cultivos monoalgales puros.

Especie estudiada	Compuesto	
	Carbendazima* (Estándar analítico 98%)	Procloraz* (Estándar analítico 99,5%)
<i>Chorella vulgaris</i>	82.9 ± 7.3	92.1 ± 6.2
<i>Chlorella saccharophila</i>	83.3 ± 4.0	84.1 ± 5.1
<i>Scenedesmus acutus</i>	50.1 ± 5.1	65.1 ± 2.9
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	42.2 ± 3.6	48.6 ± 4.9

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) ± Desviación estándar.

Los valores obtenidos indican que *Chlorella vulgaris* y *Chlorella saccharophila* son menos eficientes en la reducción de la concentración de ambos compuestos, habiéndose eliminado un 17.1% de la carbendazima, respecto a la concentración inicial, y un 7.9% del procloraz, en los cultivos de *C. vulgaris*, y un 16.7% y 15.9%, respectivamente, en los cultivos de *C. saccharophila*.

Scenedesmus subspicatus y *acutus* son, por el contrario, los organismos más eficientes de los cuatro estudiados, eliminando un 57.8% de la carbendazima y un 51.4% del procloraz, presente en el medio de cultivo, en el caso de *S. subspicatus* y un 49.9% y 34.9%, respectivamente, en los cultivos de la especie *S. acutus*.

La evolución de la concentración de carbendazima y procloraz, observada en los cultivos algales, podría atribuirse a procesos de disipación por volatilización, degradación metabólica, a una degradación provocada por la variación del pH que se observa en el medio de cultivo, durante el desarrollo de la población de algas, a la adsorción de los fungicidas sobre la superficie de las algas o a la absorción y acumulación de estos compuestos en las células de las algas. Sin embargo, la volatilización de estos compuestos es muy difícil debido a su baja presión de vapor, y puede descartarse que alcance niveles significativos a la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de aireación de sus soluciones. La absorción y acumulación de estos fungicidas, en las células de las algas, debe ser muy limitada, si se considera los resultados obtenidos en el estudio de la bioconcentración del tebuconazol, que se exponen en esta memoria, y los resultados obtenidos en el estudio de la bioconcentración del piridafention (Jonsson *et al.* 2001), en el que se comprueba que la concentración máxima del insecticida en la masa de algas es del orden de microgramos, por gramo de algas (materia seca), en soluciones del insecticida de 10 mg/L, siendo la masa seca de algas del orden de 0.1 g/L. Para determinar el nivel de degradación metabólica, sería necesario determinar la evolución de los metabolitos y de los productos de hidrólisis de los fungicidas estudiados en el medio de cultivo; cuestión que no se planteó como objetivo de esta tesis, aunque podría plantearse su estudio en otro proyecto de investigación.

La Figura III.10 muestra los valores de disipación del procloraz y carbendazima en cultivos puros de las 4 especies de algas citadas anteriormente, el porcentaje se refiere a la degradación en tanto por ciento respecto a la concentración inicial de 0.12 mg/L indicando la desviación estándar calculada para un periodo de exposición de 8 días.

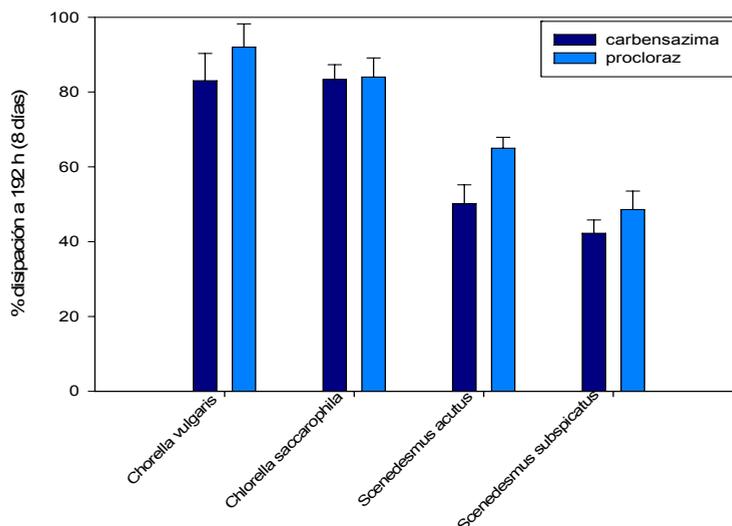


Figura III.10. Disipación de carbendazima y procloraz en cultivos puros de 4 especies de algas características de la Albufera de Valencia. Se indica el porcentaje de degradación tras 8 días

III.6.6. Evolución de las concentraciones de carbendazima y tebuconazol en disoluciones en agua de la Albufera de Valencia

En la Tabla III.14 se exponen los resultados obtenidos al estudiar la evolución de la concentración de carbendazima, procloraz y tebuconazol en disoluciones acuosas en agua de La Albufera de Valencia, con concentraciones iniciales de 0.1 mg/L.

Tabla III.14. Evolución de la concentración de carbendazima, procloraz, y tebuconazol en agua procedente de la Albufera de Valencia.

Compuesto	% concentración residual* \pm s.d.	DT ₅₀ * (días) (I.C. 95%)	Cte. Degradación** k (días ⁻¹) \pm s.d.
Procloraz	27.1 \pm 1.4	4.7 (3.7-5.7)	0.141 \pm 0.0381
Tebuconazol	24.7 \pm 2.1	4.9 (3.7-6.0)	0.1421 \pm 0.0443
Carbendazima	12.1 \pm 2.5	3.1 (2.8-3.4)	0.2211 \pm 0.0201

*Cada porcentaje se ha calculado a partir de la media de 4 determinaciones (dos determinaciones en cada muestra, en dos ensayos diferentes) \pm Desviación estándar. El porcentaje corresponde a los 8 días de exposición.

**DT₅₀: Vida media en las condiciones descritas

En la Figura III.11 se expone la evolución de carbendazima, procloraz y tebuconazol y en disoluciones en agua de La Albufera de Valencia, con concentraciones iniciales de 0.1 mg/L.

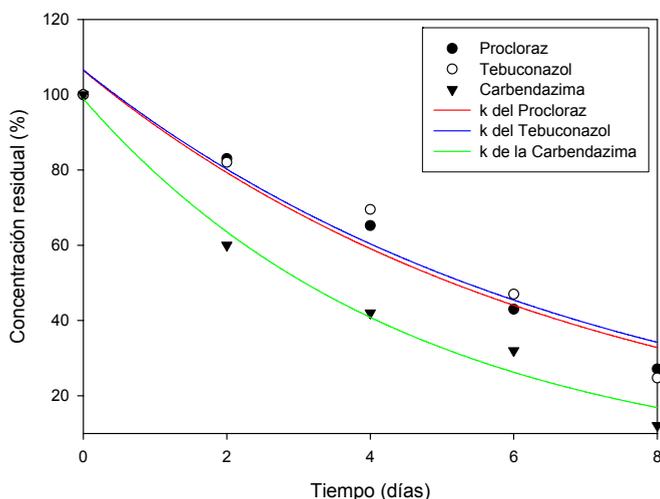


Figura III.11. Evolución de carbendazima, tebuconazol y procloraz en disoluciones acuosas calentadas a 148 °C, con concentraciones iniciales del orden de 5 mg/L.

Como puede verse desprende de la Tabla III.14, la vida media de los tres compuestos ensayados se encuentra entre 3 y 5 días. El compuesto que mayor degradación presenta en las condiciones ensayadas es la carbendazima, con una vida media de 3.1 días. La vida media de los otros dos fungicidas es muy similar, siendo de 4.9 días para el tebuconazol y de 4.7 días, para el procloraz.

Por tanto, puede afirmarse que la combinación de diversos microorganismos (y sales presentes) en las aguas de La Albufera resulta más eficaz, para la biodegradación de estos tres fungicidas, que los cultivos monoalgales puros.

IV. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES AMBIENTALES PREDECIBLES

IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. Justificación

Como se ha indicado anteriormente, una de las fases fundamentales de la Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA) es la evaluación de los niveles de exposición a que pueden estar sometidos algunos organismos indicadores por el uso de fungicidas para en el control de *Pyricularia oryzae*, en arrozales situados en zonas húmedas mediterráneas, utilizando como modelo el ecosistema del Parque Natural de la Albufera de Valencia.. Esto supone la valoración de las concentraciones ambientales predecibles (PEC), que puede realizarse mediante la modelización de la distribución ambiental de los compuestos considerados, o hallado las concentraciones resultantes de tratamientos experimentales, determinando las concentraciones resultantes de tratamientos agrícolas habituales, o a partir de datos extraídos de la bibliografía. En este estudio se han aplicado las tres primeras vías, los datos encontrados en la revisión bibliográfica realizada, referentes a los fungicidas estudiados, han servido para comparar los resultados experimentales obtenidos en nuestros estudios con los publicados por otros investigadores y para validar los resultados obtenidos en nuestra modelización matemática de la distribución ambiental de los fungicidas azólicos incluidos en este trabajo.

Para ello, en primer lugar, se han determinado los niveles de contaminación por plaguicidas, en las aguas del Lago de la Albufera, procedentes de 6 puntos de muestreo, durante 3 años. Los puntos de muestro seleccionados, se encontraban repartidos a lo largo de la superficie del Lago y canales afluentes.

También se han cuantificado los niveles de fungicidas en las aguas de los arrozales, tras su aplicación en campos experimentales, con el fin de establecer las concentraciones reales de fungicidas alcanzadas en las aguas de las parcelas. En este caso, es necesario señalar que las aguas de las parcelas no están estancadas, teniendo un periodo de residencia muy corto dentro del campo, y que las aguas contaminadas con los plaguicidas pasan al circuito de acequias y finalmente llegan al Lago. Los niveles de plaguicidas alcanzados en las aguas de los arrozales son importantes, no sólo para conocer la carga real de plaguicidas en condiciones reales y siguiendo las recomendaciones del fabricante, sino también para establecer si

esas concentraciones son tóxicas para las especies animales (artrópodos y otros invertebrados) que habitan en los campos.

IV.1.2. Antecedentes

A lo largo de los últimos cuarenta años se han realizado varios trabajos destinados a establecer los niveles de contaminación por plaguicidas, en las aguas del Lago de la Albufera de Valencia, así como en la red de acequias y canales que circundan el Lago (Carrasco *et al.*, 1972; Primo *et al.*, 1975; Blanco, 1977; Serra *et al.*, 1984; Soria, 1987, Gómez de Barreda *et al.*, 2002; Boluda *et al.*, 2002; Tarazona *et al.*, 2003; Andreu *et al.*, 2005).

Estos trabajos se han desarrollado en diferentes niveles ambientales. En la mayoría de las publicaciones se ha considerado la contaminación de las aguas y, en algunos casos, se han estudiado los niveles de contaminantes en la fauna piscícola del Lago, a fin de obtener los niveles de bioconcentración y el potencial riesgo para los consumidores; otros estudios han contemplado los niveles de contaminación por plaguicidas en los sedimentos del lago (Peris *et al.*, 2004) y, finalmente algunos estudios han establecido los niveles de contaminación en el aire tras aplicaciones con avioneta (Mendoza, 2002). Un factor común a todos estos estudios es el grupo de plaguicidas estudiados que, frecuentemente, son insecticidas organoclorados de elevada persistencia (POCs), o algunos herbicidas. En cambio, la presencia de fungicidas ha sido poco estudiada posiblemente debido a su escaso uso en cultivos de cereales en secano, empleándose únicamente en el cultivo del arroz por inundación y aplicándose, además, en épocas muy concretas y en un periodo corto de tiempo, por lo que su interés medioambiental ha sido muy limitado en la Comunidad Valenciana. Sin embargo hay estudios en otras regiones arroceras del mundo como Italia (Capri y Cabaña, 1999; Miao *et al.*, 2003; Padovani *et al.* 2006)), Francia (Comoretto, *et al.*, 2007) Japón (Sudo *et al.*, 2002), España (Porte *et al.*, 1992) o USA (Mize *et al.*, 2007) donde si se dispone de datos sobre las concentraciones de algunos de los compuestos fungicidas incluidos en este estudio.

Por otra parte, en algunos casos, el impacto de plaguicidas empleados en sistemas típicos de arrozal ha sido evaluado mediante el uso de modelos matemáticos como RICEW y la confirmación del modelo se ha realizado mediante datos procedentes de estudios de previos de monitorización (Miao *et al.*, 2004).

IV.1.3. Plan de trabajo

El plan de trabajo elaborado para la Evaluación de las Concentraciones Ambientales Predecibles (PEC), fue el siguiente:

- Se seleccionó una red de puntos de muestreo distribuida a lo largo del lago de La Albufera y de la red de canales y acequias que drenan al Lago los sobrantes de riego de los arrozales que lo circundan. Una vez establecida la red de control se estableció un plan de muestro en diferentes épocas a lo largo de tres años.
- Paralelamente al estudio de niveles residuales de los plaguicidas en el lago de La Albufera se realizó un programa de muestreos en parcelas experimentales tratadas con formulaciones comerciales. Tomándose agua de inundación del campo antes y después de los tratamientos y de las entradas de agua del campo para conocer los niveles residuales reales. Las parcelas se trataron con las dosis de aplicación recomendadas por cada fabricante.
- Con los resultados de las concentraciones tanto del Lago de La Albufera como de los arrozales se realizó un estudio estadístico mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones halladas y el punto y fecha de muestro.

IV.1.4. Material y Métodos

IV.1.4.1. Época de muestreos de aguas en el Lago de la Albufera

Para determinar analíticamente los niveles de concentración, alcanzados en las aguas del Lago, de los residuos de fungicidas resultantes de los tratamientos aplicados en los arrozales circundantes, se realizaron 19 campañas de muestreo durante el periodo 2003-2005, tomándose las muestras de agua en las fechas que se indican en la Tabla IV.1. En el año 2003 se realizaron 9 campañas de muestreo, empezando en el mes de julio y realizando la última campaña en el mes de diciembre; durante todo este tiempo se tomaron muestras en los 6 puntos de muestro de nuestra red de control, comprobando que a partir del mes de septiembre ya no se detectaban residuos de los fungicidas en las muestras de agua procedentes del Lago; por lo que en el año 2004 solamente se tomaron muestras entre julio y septiembre y en 2005 entre mayo y agosto.

Tabla IV.1. Fechas de muestreo de aguas del Lago realizadas durante el periodo de estudio.

	Año 2003	Año 2004	Año 2005
Campañas de muestreo	15/07/2003	08/07/2004	23/05/2005
	23/07/2003	20/07/2004	13/06/2005
	30/07/2003	30/07/2004	03/08/2005
	07/08/2003	09/08/2004	23/08/2005
	13/08/2003	20/08/2004	
	10/09/2003	10/09/2004	
	30/09/2003		
	27/10/2003		
	03/12/2003		

Para seleccionar las fechas de muestreo, se ha tenido en cuenta que los fungicidas, utilizados para el control de la piriculariosis en el arroz, se aplican en estado avanzado de cultivo, cuando la panícula está formada y los granos están en estado “lechoso”, aproximadamente a partir del mes de julio, siempre que las condiciones de temperatura (22-29° C) y humedad (90% HR), que favorecen el desarrollo del hongo, así lo aconsejen; además, para la correcta eliminación del hongo, el código de buenas prácticas agrícolas, aconseja realizar, al menos, 2 tratamientos con diferentes materias activas de diferente mecanismo de acción y con

una semana entre cada tratamiento, a fin de prevenir posibles resistencias futuras de aquellas cepas que no hayan sido eliminadas en el primer tratamiento.

IV.1.4.2. Selección de los puntos de muestreo.

Tras la revisión de los estudios previos llevados a cabo en el Parque Natural de La Albufera (Carrasco *et al.*, 1987; Mendoza, 2002; Gómez de Barreda *et al.*, 2002), se seleccionaron 6 puntos de muestreo repartidos por el Lago de L'Albufera de Valencia (ver Figura IV.1), dos de los puntos corresponden a barrancos que recogen el agua de drenaje de los arrozales y de la red de acequias que irrigan a éstos. Estos puntos son: El Canal de Obera (pto.1) y Barranco de Massanassa (pto.4). El resto de puntos corresponden a zonas del interior del lago, abarcando las cuatro áreas geográficas más importantes: Norte, Sur, Este y Oeste del Lago.

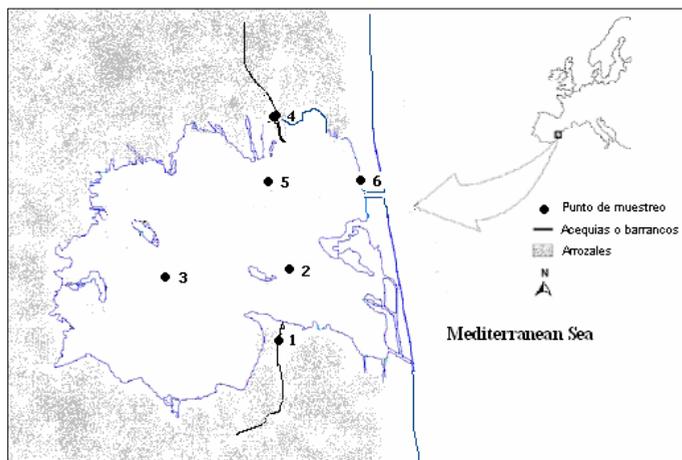


Figura IV.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo de las aguas del Lago de La Albufera de Valencia

IV.1.4.2.1. Descripción y características de los puntos de muestreo

A continuación se describen las características de los seis puntos de muestreo y, en la Tabla IV.2, se indica la profundidad y anchura (si procede), y las coordenadas GPS de localización de cada punto de muestreo. Además, en la Figura IV.2 se muestran fotografías de los 6 puntos donde se realizaron los muestreos.

PUNTO 1: Situado dentro del canal de Obera, frente al motor del “Tancat de Abadejo”. Es uno de los canales que más agua aporta, con profundidades cercanas a los dos metros y con corrientes más o menos intensas. Es de tipo agrícola y recorre gran parte de la Ribera Baja, desde su origen en la Acequia Real del Júcar, cerca de Alginet, pasando por Sollana y atravesando el marjal hasta su desembocadura.

PUNTO 2: Situado frente a la desembocadura del canal de Obera, en la zona de dilución, 20 m aguas adentro del Lago, aproximadamente.

PUNTO 3: Situado dentro del Lago de la Albufera, en la parte central, entre la Mata de la Barra y la Mata de la Antina.

PUNTO 4: Situado en el interior del Barranco de Massanassa, a la altura del motor del Noi. Canal de considerable profundidad, cercana a los dos metros. Sus aguas provienen de los vertidos de numerosas poblaciones (Torrent, Alaquás, Aldaia, Picanya, Paiporta y Massanassa) y de los campos situados al norte del Lago.

PUNTO 5: Situado frente al Barranco de Massanassa, en la zona de dilución, dentro de La Albufera.

PUNTO 6: Situado en el embarcadero de la Gola de Pujol, junto a la carretera CV-500 que discurre paralela al Lago

Tabla IV.2. Características de los puntos de muestreo

Ref. Punto	Situación	Coordenadas de localización G.P.S	Anchura media (m)	Profundidad media* (cm)
1	Canal Obera	39°19'16.25" N 0°20'14.40" W	15	110
2	Albufera Sur	39°19'29.63" N 0°20'09.94" W	-	95
3	Albufera Oeste	39°19'58.33" N 0°21'42.89" W	-	130
4	Barranco de Massanassa	39°21'44.78" N 0°21'42.89" W	61	170
5	Albufera Norte	39°21'08.20" N 0°20'31.50" W	-	75
6	Albufera Este	39°20'56.53" N 0°19'25.51" W	-	140

*Valor medio obtenido a lo largo del periodo de estudio. (2003-2005)

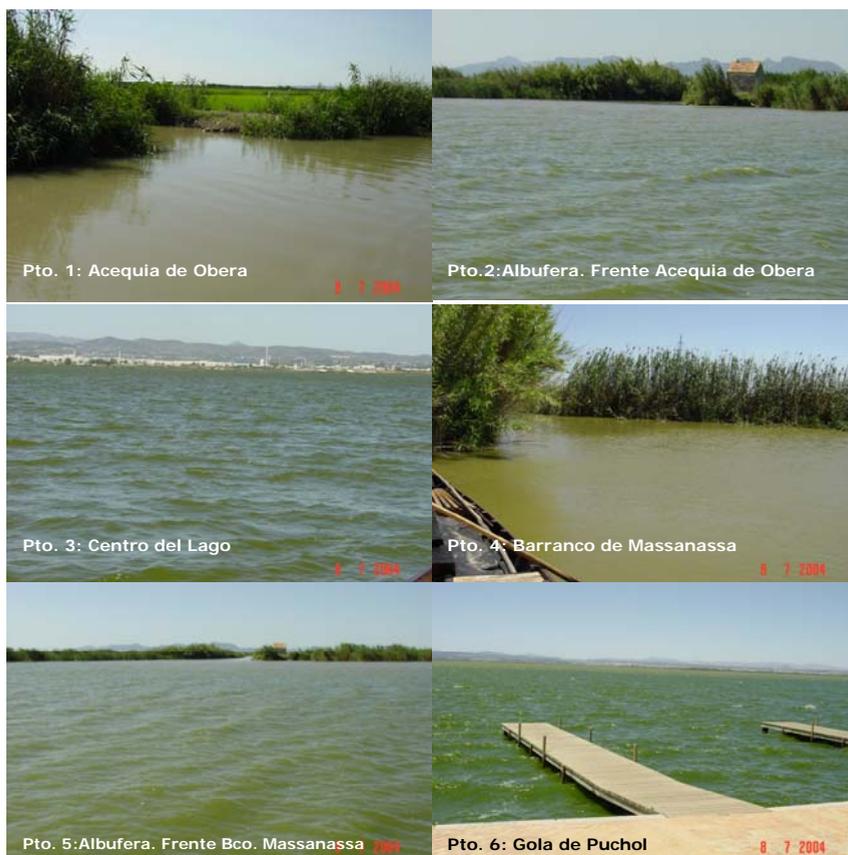


Figura IV.2: Fotografías realizadas en los puntos de muestreo.

IV.1.4.3. Muestreo en parcelas experimentales

Paralelamente a la determinación de los niveles de concentración de los residuos de plaguicidas en las aguas del Lago de la Albufera de Valencia, se llevó a cabo la determinación de los niveles de concentración de los residuos de plaguicidas en las aguas de las parcelas experimentales tratadas con los fungicidas estudiados, aplicando en ellas diversas formulaciones, siguiendo las instrucciones incluidas en las correspondientes etiquetas de los productos comerciales empleados y de acuerdo con buenas prácticas agrícolas.

Estos tratamientos también sirvieron para evaluar el impacto que las aplicaciones fungicidas pueden tener sobre las comunidades animales que allí habitan y, simultáneamente, el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia estudió la eficacia de los tratamientos en el control de *Pyricularia oryzae* en diferentes variedades de arroz.

Algunos minutos antes, y después, de realizar las aplicaciones, se tomaron muestras de las aguas de las parcelas tratadas y en los canales de entrada y salida del agua de los campos, para determinar analíticamente los niveles de concentración de fungicidas azólicos en dichas aguas.

En las Figuras IV.3 y IV.4 se muestra la parcela de estudio, situada en el término municipal de Sueca, localidad situada a 30 Km. al Sur de Valencia (coordenadas GPS: 39°15'14.81" N y 0°17'15.40" W), tiene una superficie de 65 m x 40 m (A x L), y se distribuyó en bandas de cultivo de 3 m de ancho por 10 m. de largo. Los 5 primeros metros de cada banda se sembraron con la variedad de arroz Senia y los siguientes 5 metros de la banda con la variedad Fonsa, ambas variedades se plantaron con una dosis de siembra de 180 kg semilla/ha.

En la Tabla IV.3 se muestran las fechas de muestreo en la parcela experimental a lo largo de los años 2004 y 2005.

Tabla IV.3. Fechas de muestreo en la parcela experimental de Sueca.

Año 2004	Año 2005
28/07/2004	27/07/2005
11/08/2004	11/08/2005
25/08/2004	24/08/2005



Figura IV.3: Parcela experimental en la que se aprecian las diferentes bandas de aplicación con las variedades de arroz cultivadas

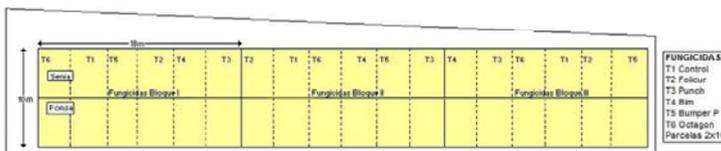


Figura IV.4: Imagen satélite de la parcela experimental a 95 msnm. Apreciamos las bandas de tratamiento, las 3 entradas de agua desde el campo contiguo y el canal de drenaje. Al pie de imagen, se muestra el esquema de distribución de las bandas de tratamiento. (Tomada de Google Earth®; Mayo de 2007).

IV.1.4.4. Toma de muestras de las aguas de La Albufera y de las parcelas experimentales

La toma de muestras se realizó cuidadosamente, procurando que fuera homogénea y representativa, sin modificar las características físico-químicas del agua (Rodier, 1978).

La metodología aplicada para la toma de muestras a lo largo de las 3 campañas de muestreo siguió el protocolo recogido en el manual de *Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar* (Andreu y Camacho, 2002).

Los recipientes utilizados para la toma de muestras en cada punto fueron:

- 1 botella de vidrio ámbar de 1.5 L de capacidad para análisis de plaguicidas, previamente enjuagada con acetona en el laboratorio.
- 1 botella de PET de 150 mL para análisis de pigmentos fotosintéticos

Los envases para la toma de muestra fueron previamente lavados, en el laboratorio, con detergente alcalino, enjuagadas con agua destilada y acetona a fin de eliminar posibles trazas de plaguicidas.

En el momento de la toma de muestras, los recipientes se enjuagaron dos veces con agua del punto de muestro y se introdujo el recipiente con la boca hacia abajo, de forma que al girarlo dentro del agua se llenara. La profundidad de toma fue de 0.1 m. en todos los puntos. (APHA-AWWA-WPCF, 1992)

La toma de muestras de agua en los puntos interiores del Lago (puntos 1 a 5), se realizó desde una embarcación con motor. La toma de muestras del punto 6, se realizó desde tierra.

Para conservar las muestras, se mantuvieron refrigeradas en neveras portátiles, con acumuladores de frío, hasta su llegada al laboratorio, donde fueron inmediatamente filtradas y congeladas hasta su análisis. Las muestras destinadas al análisis cromatográfico, se guardaron en congelador, a -20°C , para evitar la degradación de los plaguicidas. Las muestras destinadas al análisis físico-químico y de pigmentos fotosintéticos, se filtraron a su llegada al laboratorio con filtros de membrana AP40 de Millipore™ de microfibras de vidrio, de $2\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro y $47\ \text{mm}$ de diámetro, empleando una rampa de filtración microbiológica de tres canales y una bomba de vacío, ambas de la marca Millipore™, conservándose a $3-4^{\circ}\ \text{C}$ hasta su análisis un máximo de 48 horas después de la toma.

IV.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO DE LA ALBUFERA

Los plaguicidas se extrajeron de la fase acuosa por medio de la técnica de Extracción en Fase Sólida (*SPE*), para ello se utilizaron diferentes sistemas basados en este método, en función de la naturaleza del analito. Para la extracción de los fungicidas excepto carbendazima y otros plaguicidas que pudieran estar presentes en las muestras se empleó el sistema *SPE* basado en discos Empore® de la casa comercial 3M™, este es un sistema ampliamente utilizado en estudio de monitorización ambiental (Gamón *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 1996). Por otro lado, debido a las condiciones especiales de la carbendazima y la imposibilidad de su cuantificación por medio de GC y los problemas de extracción que presentan otras técnicas como la Extracción Líquido-Líquido (*LLE*) por su baja recuperación debido a la pérdida de analito en el proceso de evaporación (Parrilla y Martínez Vidal, 1997; Queiroz *et al.*, 2004) se emplearon columnas *SPE* de polipropileno marca Waters™, rellenas de fase Oasis® MCX (modo mixto intercambio catiónico-fase inversa) de $6\ \text{mL}$ de capacidad, rellenas con $150\ \text{mg}$ de la fase MCX (ref. 186000716), este tipo de cartuchos de intercambio catiónico son especialmente útiles, para la extracción de compuestos ligeramente básicos, como la carbendazima.

IV.2.1. Acondicionamiento de la muestra

Se tomaron alícuotas de 500 a 1000 mL de la muestra de agua a analizar y se filtraron a través de papel de filtro, en un embudo *Büchner*, de porcelana, de 70 mm de diámetro, acoplado a un matraz *Kitasatos*, utilizando una bomba de vacío. Tras esta primera filtración, que elimina los sólidos de mayor diámetro y la materia flotante, las muestras de agua se filtraron, de nuevo, en una rampa de microfiltración Millipore™, donde el agua se pasó por un filtro de membrana de microfibras de vidrio, Whatman™ GF/C, de 1.2 µm de poro, a fin de eliminar cualquier resto de materia en suspensión. Una vez filtrada la muestra, se añadieron 5 mL de MeOH/L, para reducir su polaridad y favorecer la adsorción de los plaguicidas en el copolímero C-18 del cartucho de extracción en fase sólida (SPE).

IV.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*) es una técnica alternativa más cómoda, barata, ecológica y rápida que la extracción líquido-líquido (LLE) tradicional. Se basa en pasar la muestra líquida por un disco o columna que contiene material adsorbente donde quedan retenidos las especies interferentes o los analitos, según convenga (Moors *et al.*, 1994). Cuando son retenidos estos últimos, se precisa una segunda etapa de elución con otro disolvente, normalmente de diferente polaridad, para proceder a su determinación. Cada etapa está caracterizada por la naturaleza y el tipo de disolvente utilizado, que depende de las características del adsorbente y de la muestra (Font, *et al.*, 1993; Barceló y Hennion, 1997).

IV.2.2.1. Extracción con discos 3M™ Empore® para el análisis de compuestos fungicidas en aguas Naturales del P.N. de La Albufera de Valencia

Para la extracción de los residuos de los fungicidas azólicos (excepto la carbendazima) y la de otros plaguicidas (herbicidas e insecticidas) se utilizaron discos de extracción 3M™ Empore™ de fase C-18 de 47 mm. de diámetro y 12 µm. de diámetro de partícula (ref: 2215). A continuación se describe este proceso de extracción.

Como en el caso de las columnas de extracción, los discos de Octadecil (C-18) también deben ser acondicionados antes de su uso; para ello, en el sistema de extracción, que se muestra en la Figura IV.6, se coloca el disco de extracción y el depósito que contendrá la muestra, se ajustan el portadiscos y el depósito mediante una pinza, para evitar fugas de muestra durante el proceso de extracción.



Figura IV.6. Mesa de extracción a vacío Alltech™ para cartuchos de SPE (izquierda). Sistema de extracción para discos 3M™ Empore® (derecha).

Antes de iniciar el proceso de extracción debe acondicionarse el copolímero C-18 de los discos en dos fases:

- a) Los discos se prelaván con 10mL de acetato de etilo, dejándolos impregnar durante 3 min, se aplica el vacío y se secan para quitar cualquier impureza que pudiera tener retenida y que pudiera interferir en el análisis cromatográfico.
- b) Se cierra el vacío, se añaden 10 mL de MeOH (grado analítico para Análisis de Residuos de Plaguicidas, AR) se deja que los discos se impregnen con este disolvente y después que gotee a través del disco aplicando un suave vacío. Durante este paso es importante que los discos no se sequen. Se deja 1 mL de MeOH (calidad AR) sobre el disco, se cierra el vacío y se deja que el disco se termine de empapar durante 30-60 segundos, dejando siempre unos 2-3 mm de lámina de MeOH (AR) sobre el disco.

Una vez activada la fase, se añade la muestra previamente filtrada y acondicionada con metanol y se aplica el vacío necesario para obtener un flujo de paso de muestra, a través del disco, de 1L/h. Cuando finaliza el paso de la muestra se arrastra cualquier resto de agua del disco aplicando vacío durante 20-30 minutos y una corriente de nitrógeno seco. A continuación, se eluye la muestra 2 veces con 10 mL de acetato de etilo, procurando que los primeros 10 ml de disolvente lave bien las paredes del depósito que contenía la muestra y dejando que se impregne bien el disco de extracción. Se aplica un suave vacío y se deja que pase el acetato de etilo hasta que quede 1-2 mL por encima del disco. Se cierra el vacío y se deja que el disco se impregne bien durante 30-60 segundos antes de volver a aplicar vacío y dejar secar el disco, este proceso se repite con la segunda porción de 10 mL de acetato de etilo. El volumen eluido se pasa a un matraz esférico, se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio a vacío, con baño termostatzado a 40° C y, una vez seco el residuo, se redisuelve con 1 mL de ciclohexano conteniendo 0.2 mg/L de trifenilfosfato (TPP) como estándar interno (IS), y se pasa a un vial, de vidrio color ámbar, para cromatografía de 1.8 mL con septum de silicona.

IV.2.2.2. Extracción de carbendazima en muestras de agua del P.N. de La Albufera de Valencia

El acondicionamiento de las muestras de agua, destinadas al análisis de carbendazima, se realizó de la forma ya descrita para todos los otros fungicidas estudiados (apartado IV.2.2.2); pero la extracción de este fungicida y su determinación cuantitativa requirió de un método específico.

Las muestras de carbendazima fueron analizadas por HPLC, utilizando un detector espectrofotométrico con fotodiodos en cadena (*Diode array*) acoplado a un espectrómetro de masas-masas. Dada la baja concentración de este fungicida en las muestras, se decidió utilizar un método que incluyera la concentración y purificación de la carbendazima; para ello se aplicó un método de *SPE*, empleando cartuchos de extracción con fase sólida del tipo Oasis® MCX específicos para compuestos ligeramente básicos.

Para facilitar el trabajo de extracción con los cartuchos se empleó una mesa de *SPE* a vacío de 10 puestos de la marca Alltech™ (ver Figura IV.6) acoplada a una bomba.

En la Figura IV.7 (que puede verse en página siguiente) se muestra el protocolo seguido para la extracción de carbendazima en muestras de agua.

Finalmente, una vez resolubilizada la muestra con metanol o ciclohexano, se pasa por un filtro de jeringa HPLC “Acrodisc GHP” (Waters®), de 0.45 μm , hacia un vial de vidrio y se cierra el vial con un tapón con septum de teflón.

Simultáneamente, con cada serie de muestras, se analizó una muestra control de 5 $\mu\text{g/L}$ de carbendazima, preparada con 5 mL de agua Milli-Q fortificada con 25 μL de una solución con 1 $\mu\text{g/mL}$ de carbendazima en MeOH.

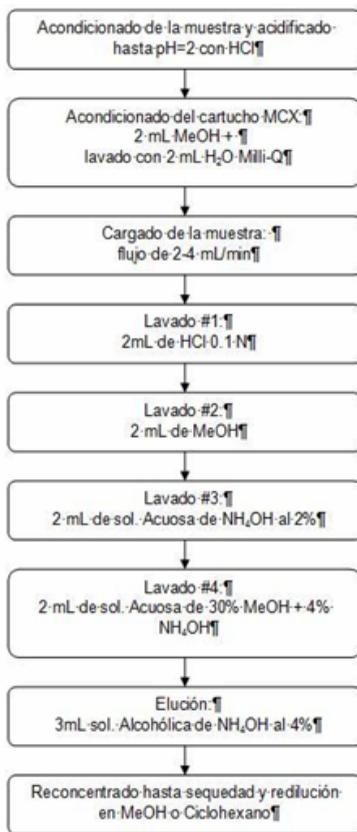


Figura IV.7 se muestra el protocolo seguido para la extracción de carbendazima en muestras de agua con cartuchos Oasis® MCX.

IV.2.4. Determinación de los niveles de plaguicidas en muestras de agua de La Albufera de Valencia

Para la separación y cuantificación de los plaguicidas se ha utilizado la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a detectores de espectrometría de masas (GC/MSⁿ y HPLC-MS², respectivamente). La técnica de HPLC-MS² se empleó para la separación, identificación y determinación cuantitativa de la carbendazima, compuesto que, por su inestabilidad térmica, no puede ser analizado por cromatografía de gases, sin derivatizar. Para la separación, identificación y determinación de los otros plaguicidas estudiados, se utilizó la técnica de GC/MSⁿ.

IV.2.5. Separación, identificación y determinación cuantitativa de la carbendazima

Para el análisis de la carbendazima se ha empleado un cromatógrafo HPLC Waters®, modelo 2979, equipado con una bomba ternaria para trabajar en gradiente y un sistema de inyección automatizado. Este equipo estaba acoplado un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo QuattroMicromass™, las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Condiciones comatográficas para el análisis de la carbendazima, en muestras de aguas de la Albufera

Cromatógrafo	HPLC-MS ² Waters®, modelo 2979		
Columna	Waters™ Atlantis® C18: 3µm 2.1x100mm		
Temperatura columna (°C)	35		
Fase Móvil	A: H ₂ O/AcNH ₄ 5mM/MeOH (4:1) B: H ₂ O/AcNH ₄ 5mM/MeOH (1:9)		
Gradiente de Fase Móvil:	Tiempo	%A	%B
	0.00	100	0
	15	0	100
	15.20	100	0
	20	100	0
Flujo fase móvil (mL/min)	0.3		
Temperatura de la trampa de iones (°C)	200		
Presion trabajo (p.s.i)	2700		
Volumen de inyección (µL)	20		

IV.2.6. Separación, identificación y determinación cuantitativa de los fungicidas azólicos y algunos insecticidas y herbicidas.

El método multiresiduos, empleado para la separación, identificación y determinación cuantitativa de los fungicidas azólicos, nos permitió también detectar, identificar y cuantificar algunos insecticidas, como el malation, y herbicidas como el molinato, en las muestras de aguas de La Albufera de Valencia. El procedimiento analítico empleado es el descrito por Gamón *et al.* (2001, 2002) con ligeras modificaciones introducidas dada las características de los compuestos a analizar. Los fungicidas estudiados fueron: flusilazol, procloraz, tebuconazol y tricliclazolazol.

IV.2.6.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases “Varian Chromapack”, modelo 3800GC, con inyector automático, modelo CP-8200, acoplado a un detector de espectrometría de masas-masas con trampa de iones marca Varian, modelo Saturn 2000® GC/MSⁿ. En la Tabla IV.5 se indican las condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases empleado en el análisis de las muestras de agua.

Tabla IV.5. Condiciones cromatográficas para el análisis por cromatografía de gases de los fungicidas azólicos y otros plaguicidas.

Columna	De tipo capilar DB-5MS (5% metil fenil silicona) 30 m· 0.25 mm· 0.25 mm
Temperatura del Horno	<ul style="list-style-type: none"> • T^a inicial a 70°C→3.5min. • 1^a rampa de T^a hasta 180°C (Δ25°C/min) →10 min. • 2^a rampa de T^a hasta 300°C (Δ4°C/min) → 10min
Temperatura Inyector	<ul style="list-style-type: none"> • Inicial a 70°C durante 0.5 min. • Rampa de T^a hasta 310°C (Δ100°C/min) →10min
Detector	Espectrometría de masas-masas con trampa iónica. Tiempo de adquisición 1s/scan corriente de emisión 80 μamps de forma no-resonante. La adquisición se realizó en 4 segmentos
Flujo He (mL/min)	1
Temperatura de la trampa de iones (°C)	200
Temperatura de la bomba (°C)	70
Volumen de Inyección	Inserto de inyector con carbofrit para volúmenes de 10 μL

II.2.6.2. Adquisición de datos

En la Tabla IV.6 se indica el modo de adquisición de datos, para cada compuesto analizado, y el modo de ionización seleccionado para cada fungicida. En la Figura IV.8 se muestra un espectro de Masas de un patrón con una mezcla de triazoles; en él se pueden observar los tiempos de retención de cada compuesto, para las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla IV.4 así como la abundancia de cada pico.

Tabla IV.6. Condiciones para la espectrometría de masas

Compuesto	Ión Precursor	Storage Level (m/z)	Amplitud (v)	Modo Ionización
Triciclazol	190	83.6	90	*CI-MS ⁿ
Procloraz	310	140	100	EI-MS ⁿ
Propiconazol	259	100	191	EI-MS ⁿ
Tebuconazol	250	110.2	30	EI-MS ⁿ
Flusilazol	234	103.1	100	EI-MS ⁿ

CI: Ionización química

EI: Impacto electrónico

*Debido a las características espectrales del triciclazol se ha operado en modo de ionización química positiva empleando MeOH como sustancia reactante.

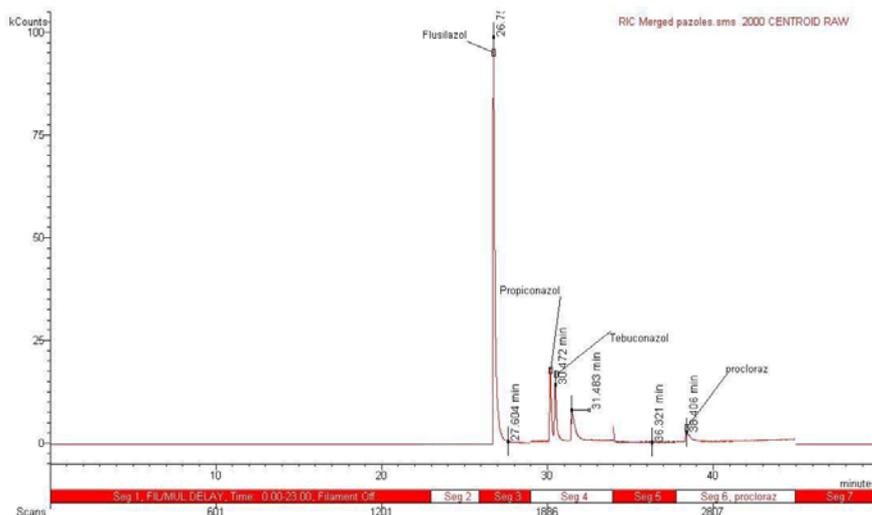


Figura IV.8. Cromatograma de un patrón de fungicidas azólicos

IV.2.7. Validación de los métodos analíticos

IV.2.7.1. Ensayos de recuperación del método analítico

Como puede verse en la Tabla IV.7, al estudiar la recuperación del método analítico, se observaron recuperaciones aceptables, comprendidas entre 77 y 98 %, excepto en el caso del procloraz, que se situaba por debajo del 50%. Los resultados obtenidos tras el análisis fueron corregidos según el porcentaje de recuperación de cada compuesto.

Tabla IV.7. Resultados del estudio de recuperación* del método analítico

Compuesto	Linealidad (µg/L)	ecuación	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	R ²	RSD** (%)	% Rec. Media ± s.d.
Triciclazol ¹	250-1000	Y=2.5e ⁵ x-3.244	0.15	0.5	0.9988	5.6	87% ± 4.9
Flusilazol ¹	50-500	Y=2.3108e ⁵ x	0.03	0.1	0.9994	6.44	77% ± 6.1
Propiconazol ¹	100-1000	Y=1.033885e ⁵ x	0.03	0.1	0.9965	5.7	90% ± 5.2
Procloraz ¹	100-1000	Y=3636.08x	0.03	0.1	0.9961	9.28	42% ± 3.9
Tebuconazol ¹	100-1000	Y=2.085e ³ x	0.03	0.1	0.9921	4.32	88% ± 3.8
Carbendazima ²	10-200	Y=3307x+26377	0.15	0.5	0.9992	2.95	98% ± 2.9

*Recuperación media de 5 ensayos

**RSD: Desviación típica relativa

s.d.: Desviación estándar

% de recuperación para un nivel de fortificación de 500 µg/L

¹Analizado por GC/MSⁿ

²Analizado por RP-HPLC-MS/MS

Las recuperaciones se calcularon por comparación con inyecciones directas de patrones (recta patrón). Los bajos valores de la RSD indican una buena repetibilidad del método empleado. El equipo mostró una buena linealidad en el rango de trabajo mostrado de las curvas patrón, con coeficientes de ajuste $R^2 > 0.99$. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se calcularon según el ratio señal/ruido (s/n), siendo este ratio de 3 para el LOD y de 10 para LOQ.

Para el cálculo de la reproducibilidad del método y del límite de detección y cuantificación se eligieron dos puntos de la recta de calibrado dentro del tramo de linealidad. Uno de esos puntos ha de estar cerca del límite inferior de linealidad, otro cerca del límite superior y el otro en un punto medio. Los valores seleccionados en este caso fueron 50 y 500 µg/L. Los elevados porcentajes de recuperación obtenidos no mostraron diferencias significativas entre ambos niveles de fortificación, ni se detectaron problemas de saturación de las fases los discos de extracción ni de los cartuchos con la consiguiente pérdida de analito, en el nivel de fortificación de 0.5 µg/L.

IV.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE FUNGICIDAS EN LAS AGUAS TRAS LOS TRATAMIENTOS EN PARCELAS EXPERIMENTALES

IV.3.1. Aplicación de plaguicidas en parcelas experimentales

La parcela experimental se dividió en tres bloques con 6 bandas en cada bloque. Las bandas tenían una anchura de 3 m y una longitud de 10 m (30 m²/banda); pero, para evitar problemas de contaminación cruzada, únicamente se aplicó cada tratamiento en los 2 primeros metros de cada banda, dejando un metro de separación sin tratar, para evitar que la aplicación pudiera llegar por arrastre a la banda contigua. Por tanto, cada banda de tratamiento tenía una superficie útil de tratamiento de 20 m². En cada banda se aplicó una formulación fungicida diferente. La distribución de las bandas se hizo de forma aleatoria, de esta forma se consiguieron 3 réplicas de cada formulado (1 banda/bloque/formulado).

La aplicación de la suspensión fungicida (caldo) se realizó mediante pulverización con una mochila neumática Maruyama®, modelo MS073D. En la Figura IV.9 se muestra la mochila de pulverización empleada en estos tratamientos fungicidas. El motor bombeaba la suspensión a una presión de 2 bares a través de una lanza de pulverización con 4 boquillas, el rendimiento óptimo de la mochila, según el fabricante, es de 400 L caldo /ha.

De cada formulación, se prepararon 3.5 L de caldo, dispersando la formulación comercial en agua potable, transportada en bidones desde el laboratorio, y midiendo con una probeta la cantidad necesaria de cada formulado según la dosis indicada en la etiqueta, por cada fabricante (ver Tabla IV.8).

Tras cada aplicación se vació el contenido del depósito y de la lanza de la mochila en un vaso graduado, apuntando la cantidad sobrante de en cada aplicación, de esa forma se puede cuantificar la cantidad real de fungicida aplicado en cada tratamiento. Seguidamente se lavó la mochila y la lanza con agua limpia para eliminar restos del formulado anterior, recogiendo el lavado en bidones, antes de realizar un nuevo tratamiento con otro formulado.



Figura IV.9: Mochila Maruyama empleada en los trabajos de aplicación de los formulados comerciales en las parcelas experimentales (Izquierda). Vista general de la parcela durante las aplicaciones (derecha)

Tabla IV.8. Dosis de aplicación recomendadas por el fabricante

Formulado comercial	Materia activa	Mezcla (agua + formulado)	Dosis aplicación
BIM (Dow AgroScience)	triciclazol 75% (WP)	3.5 L de agua + 5 g	300 g/ha
OCTAGON E (Aventis)	prochloraz 45%	3.5 L de agua + 12 mL	0.5-1 L/ha
FOLICUR 25 EW (Bayer)	tebuconazol 25%	3.5 L de agua + 16 mL	1 L/ha
BUMPER P (Makhteshim-Agan (UK) Ltd)	prochloraz 38% + propiconazole 7.8%	3.5 L de agua + 22 mL	1-1.25 L/ha
PUNCH CS (Du Pont)	carbendazima 12.5% + flusilazol 25%	3.5 L de agua + 7.5 mL	0.4-0.5 L/ha

En todo momento se siguieron los códigos de buenas prácticas agrícolas (BPAs), tanto en la a aplicación de los productos formulados como en los sistemas de protección personal utilizados por el aplicador. Una vez terminados los tratamientos, los residuos generados en la limpieza de los equipos y de las aplicaciones se recogieron en garrafas para su posterior eliminación por una empresa de gestión residuos.

IV.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LAS AGUAS DE LA ALBUFERA DE VALENCIA, DURANTE LA ÉPOCA DE LOS TRATAMIENTOS CON FUNGICIDAS REALIZADOS EN LOS AÑOS 2003 A 2005

IV.4.1. Introducción

La evaluación de las concentraciones ambientales predecibles, tras la contaminación de los ecosistemas producida por la aplicación agrícola de plaguicidas, puede realizarse mediante distintos procedimientos:

- a) Mediante modelos matemáticos de simulación de los procesos de dispersión, degradación, acumulación, distribución espacial y evolución temporal, que permitan evaluar los niveles de concentración de los plaguicidas que podrían alcanzarse tras los tratamientos de los cultivos.
- b) Considerando los datos bibliográficos correspondientes a los niveles alcanzados en distintos ecosistemas, en diversas condiciones, tras episodios de contaminación accidental.
- c) Experimentalmente, realizando tratamientos en ecosistemas modelo, como puede ser el tratamiento de arrozales próximos a la Albufera de Valencia y la determinación de los niveles de las concentraciones alcanzadas tras los tratamientos agrícolas experimentales, realizados en condiciones de buena práctica agrícola.
- d) Determinando los niveles de contaminación alcanzados en algún ecosistema en la época de tratamiento de los cultivos.

En nuestro trabajo hemos considerado estos cuatro procedimientos; pero, dada la escasez de datos bibliográficos correspondientes a la contaminación de los ecosistemas, tras tratamientos agrícolas de los arrozales con fungicidas, los pocos datos disponibles sólo nos han servido para compararlos con los que hemos obtenido en nuestros tratamientos en campos experimentales, en el estudio de la contaminación de las aguas de la Albufera durante la época de los tratamientos de los arrozales con fungicidas y con los resultados obtenidos mediante simulación informática.

IV.4.2. Resultados y discusión

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el estudio de la evolución temporal y distribución espacial de los niveles de concentración de fungicidas alcanzados en las aguas de la Albufera de Valencia durante la época de los tratamientos con carbendazima, flusilazol, procloraz, propiconazol, tebuconazol y triciclazol, realizados en los años 2003 a 2005.

En las Tablas IV.9 a IV.13 y las Figuras IV.10 a IV.4.15 se muestran los resultados analíticos referentes a los fungicidas estudiados y correspondientes a las muestras de aguas de La Albufera de Valencia, tomadas durante la época de los tratamientos realizados en los años 2003 a 2005 y en la Tabla IV.14 se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a dichos resultados.

Los datos se presentan por materias activas, punto de muestreo y fecha de toma de muestra. En las tablas se indica el valor de concentración, en $\mu\text{g/L}$ y, además, se indica el límite de cuantificación para cada compuesto. En las Tablas IV.9 a IV.13, se han destacado con sombreado amarillo aquellas celdas que contienen valores por encima del límite de cuantificación.

IV.4.2.1. Carbendazima

La carbendazima es uno de los fungicidas utilizados, en combinación con flusilazol, en el control de *Pyricularia oryzae*, en arrozales, mediante aplicaciones terrestres. La formulación empleada, con mayor frecuencia, es PUNCH® CS, de la empresa Du Pont. En los últimos años, la carbendazima está siendo sustituida por otros fungicidas, debido a su peligrosidad y efectos para el medio ambiente (Tóxico; Carcinogénico, categoría 3; Peligroso para el medio ambiente; Mutagénico, categoría. 2; Tóxico para la reproducción, categoría 2).

Como puede observarse en la Tabla IV.9 y en la Figura IV.10, el rango de concentraciones encontradas en las aguas del lago de La Albufera, comprende desde el límite de detección (0.5 µg/L) hasta los 5 µg/L, encontrados en las muestras tomadas en el punto de muestreo nº 3 (centro del Lago), el 13 de agosto del 2003; en esta fecha se encontraron también 2.2 µg/L, en las muestras tomadas en el punto nº 1 (Acequia de Obera).

Tabla IV.9. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de carbendazima (µg/L)

Fecha de muestreo	Punto de muestreo					
	1	2	3	4	5	6
15/07/2003	0.8	0.9	0.5	<0.5	1.3	0.5
23/07/2003	0.8	0.9	<0.5	1.1	0.5	0.7
30/07/2003	0.9	<0.5	<0.5	0.7	0.7	1.3
07/08/2003	1.9	<0.5	0.55	<0.5	0.6	0.8
13/08/2003	2.2	0.8	5	<0.5	0.5	1.2
10/09/2003	1.7	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	2.2
30/09/2003	<0.5	<0.5	1.1	<0.5	<0.5	0.9
27/10/2003	<0.5	<0.5	0.6	0.9	<0.5	<0.5
03/12/2003	<0.5	0.6	0.6	<0.5	0.7	0.8
08/07/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
20/07/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30/07/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
09/08/2004	1.0	1.0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
20/08/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
10/09/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
23/05/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
13/06/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
03/08/2005	2.0	1.0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
23/08/2005	<0.5	<0.5	0.8	<0.5	0.5	<0.5

El límite de cuantificación (LOQ), para este compuesto, fue 0.5 µg/L

En sombreado amarillo se indican las muestras con contenido igual o superior al LOQ

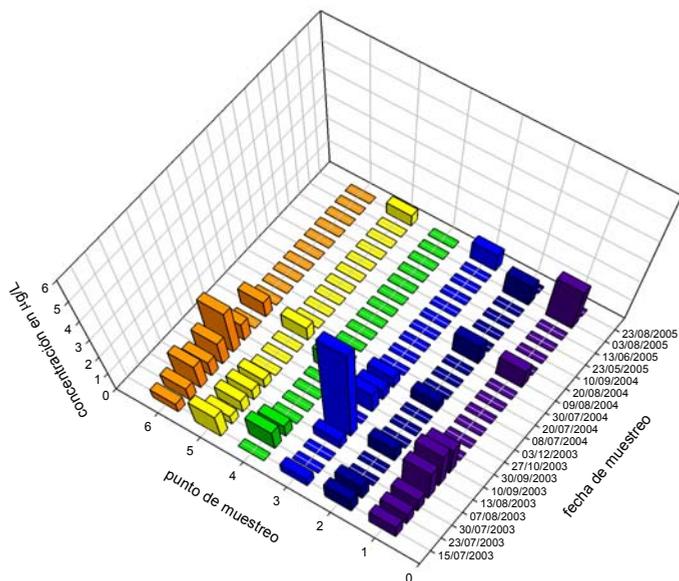


Figura IV.10. Niveles de concentración de carbendazima ($\mu\text{g/L}$) en las muestras de aguas de La Albufera, según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.

Las mayores concentraciones de carbendazima se encontraron en las muestras de aguas tomadas en el mes de agosto; época en la que coinciden las mejores condiciones para el desarrollo de *Pyricularia oryzae*, por sus elevadas temperaturas y valores de humedad relativa. Lo cual abre la posibilidad de atribuir las máximas concentraciones de carbendazima a las aplicaciones locales preventivas, realizadas por los agricultores de esta zona arrocera. Los niveles detectados a finales de año, en meses en los que no hay cultivos de arroz, pueden deberse a las labores de volteo y subsolado posteriores al vaciado del agua de los arrozales. Además, en estos meses se dan episodios de lluvias, localmente fuertes, que pueden provocar el arrastre del fungicida hacia los canales de drenaje y hasta el Lago.

Como puede verse en la Tabla IV.9 y en la Figura IV.10, entre las 114 muestras de aguas analizadas procedentes de La Albufera, se han encontrado concentraciones de carbendazima superiores al límite de cuantificación, en 39 muestras, 36 en año 2003, 2 en 2004 y 1 en el año 2005.

IV.4.2.2. Flusilazol

En la Figura IV.11 se muestran los niveles de la concentración de flusilazol encontrados en las muestras de aguas de La Albufera, analizadas durante los tres años de muestreo (2002-2005). Sólo en 1 de las 114 muestras de aguas del Lago analizadas, se encontraron concentraciones de flusilazol superiores al límite de cuantificación. Concretamente, en el análisis de la muestra tomada en el punto de muestreo n° 6, correspondiente al embarcadero de la Gola de Puchol, el 13 de junio de 2005, se encontraron 0.5 µg/L de flusilazol.

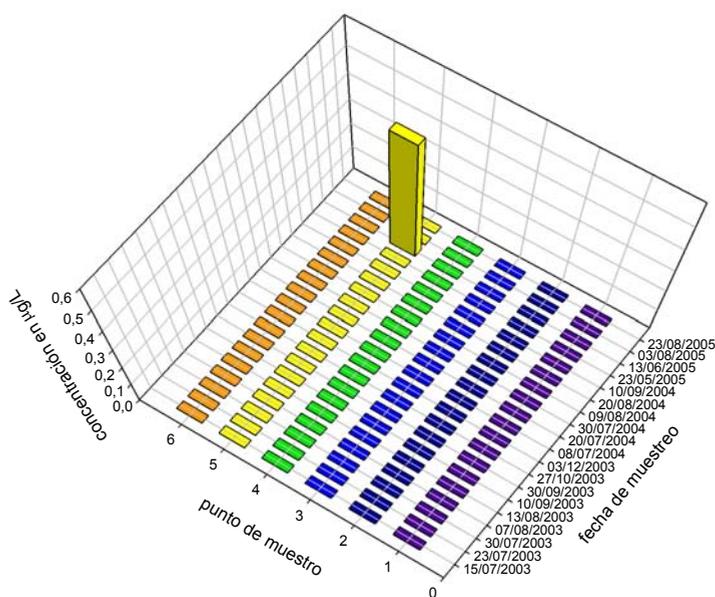


Figura IV.11. Niveles de concentración de flusilazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005

La baja frecuencia de la detección de este compuesto, indica un escaso uso del flusilazol y de su formulación comercial “Punch®”, en esta zona arrocera, en comparación con otras formulaciones basadas en tebuconazol o triciclazol como es el caso del Folicur 25EW® o BIM®, respectivamente.

IV.4.2.3. Procloraz

En la Tabla IV.10 y en la Figura IV.12, se representan los niveles de la concentración del procloraz encontrados en los análisis de las muestras de aguas de La Albufera, procedentes de los diferentes puntos de muestreo seleccionados y durante la época de aplicación de los fungicidas, en los años 2003 a 2005. En ellas, se puede observar que no se detectaron residuos de procloraz en los puntos de muestreo 5 y 6, durante los tres años de estudio. En los otros puntos de muestreo, los niveles residuales de procloraz se encontraban entre 0.1 y 0.6 µg/L, siendo esta última la concentración encontrada en el punto n° 4, en el mes de julio de 2003. Puede destacarse que todas las muestras, con contenidos superiores al límite de cuantificación, fueron tomadas en el mes de julio de 2003 o agosto de 2005, meses en los que se produce un mayor desarrollo y proliferación de *Pyricularia oryzae*; fuera de estas fechas no se detectaron residuos del fungicida en cuestión. Como era de esperar los puntos con un mayor nivel de muestras positivas han sido los puntos 1 y 4 correspondientes a la acequia de Obera y al barranco de Massanassa, canales que recogen las aguas de drenaje procedentes de los arrozales. De las 114 muestras analizadas sólo se han detectado 7 muestras con contenidos superiores al límite de cuantificación; de ellas, 3 corresponden al año 2003 y 4 al año 2004. En el año 2005 no se entraron muestras con residuos de procloraz superiores al límite de cuantificación.

Tabla IV.10. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de procloraz ($\mu\text{g/L}$)

Fecha de Muestreo	Punto de muestreo					
	1	2	3	4	5	6
15/07/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
23/07/2003	0.3	<0.1	<0.1	0.6	<0.1	<0.1
30/07/2003	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
07/08/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
13/08/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
10/09/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
30/09/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
27/10/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
03/12/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
08/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
20/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
30/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
09/08/2004	0.2	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
20/08/2004	<0.1	0.1	0.3	<0.1	<0.1	<0.1
10/09/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
23/05/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
13/06/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
03/08/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
23/08/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

El límite de cuantificación (LOQ), para este compuesto, fue 0.1 $\mu\text{g/L}$

En sombreado amarillo se indican las muestras con contenido igual o superior al LOQ

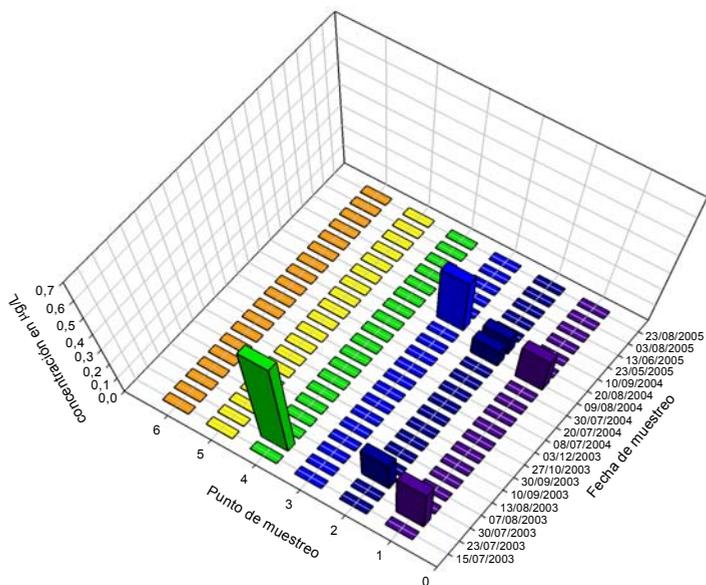


Figura IV.12. Niveles de concentración de procloraz en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.

IV.4.2.4. Propiconazol

En la Tabla IV.11 y en la Figura IV.13, se representan los niveles de concentración de residuos de propiconazol encontrados en las muestras de aguas del lago de La Albufera de Valencia, en el periodo de estudio 2003-2005.

El fungicida propiconazol se encontró, en concentraciones superiores al límite de cuantificación, únicamente en dos muestreos; el 20 de agosto de 2004, en los puntos de muestreo n° 1, 2, 4, 5 y 6, y el 3 de agosto de 2005, únicamente en el punto de muestreo 1. Concentraciones del orden del límite de cuantificación (0.1 µg/L), se encontraron en los puntos 1 y 2, en las muestras de aguas tomadas el 9 de agosto de 2004, y en el punto de muestreo 3, el 10 de septiembre de 2004. Debe señalarse que el estudio de los residuos de propiconazol se llevó a cabo únicamente en los años 2004 y 2005. El rango de concentraciones encontradas para propiconazol varía entre <0.1 y 0.4 µg/L.

Tabla IV.11. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración propiconazol (µg/L)

Fecha de Muestreo	Punto de muestreo					
	1	2	3	4	5	6
08/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
20/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
30/07/2004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
09/08/2004	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
20/08/2004	0.2	0.2	<0.1	0.4	0.2	0.2
10/09/2004	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	0.1	<0.1
23/05/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
13/06/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
03/08/2005	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
23/08/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

N.A.: No Analizado

El límite de cuantificación (LOQ), para este compuesto, fue 0.1 µg/L

En sombreado amarillo se indican las muestras con contenido igual o superior al LOQ

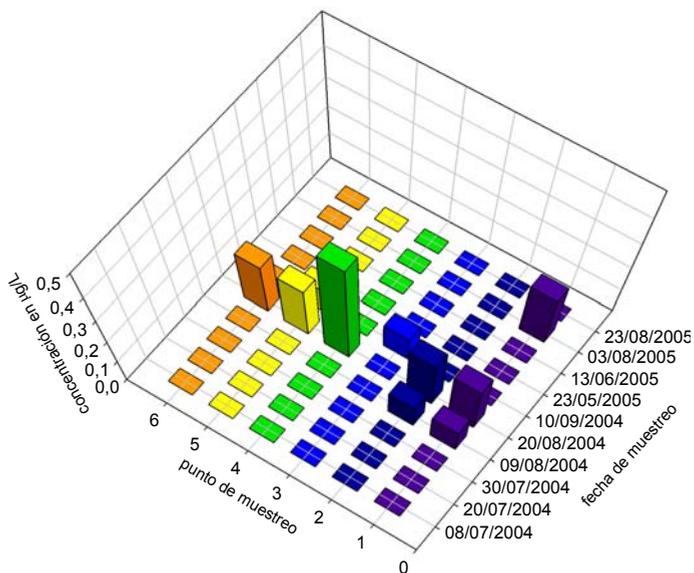


Figura IV.13. Niveles de concentración de propiconazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005

Como ocurrió con las otras materias activas, los mayores niveles de residuos de propiconazol se encontraron en los meses de agosto, concretamente en los puntos de muestreo nº 1 y 4 (Acequia de Obera y Barranco de Massanassa, respectivamente) así como en la zona de dilución dentro del Lago (puntos nº 2 y 5).

A lo largo del estudio, se han detectado 10 muestras con concentraciones iguales o superiores al límite de cuantificación, de las cuales 9 corresponden al año 2004 y únicamente 1 al año 2005. Como se ha indicado, en el año 2003 no se analizó el contenido en propiconazol de las muestras de agua tomadas en el Lago.

IV.4.2.5. Tebuconazol

En la Tabla IV.12 y en la Figura IV.14, se representan los niveles de concentración de residuos de tebuconazol encontrados en las muestras de aguas del Lago, en el periodo de estudio 2003-2005.

El tebuconazol es el fungicida que más frecuentemente y en mayores concentraciones se encontró en las muestras de aguas de La Albufera tomadas durante los años 2003 a 2005. Se detectó en todos los puntos de muestreo, y prácticamente en la misma proporción en los 3 años de estudio, excepto en las muestras tomadas el 3 de diciembre de 2003, en las que no se detectó.

A lo largo del estudio se han encontrado un total de 54 muestras con concentraciones superiores al límite de cuantificación del tebuconazol, de las que 28 corresponden al año 2003, 21 al año 2004 y 5 a las muestras tomadas en 2005.

Tabla IV.12. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración tebuconazol ($\mu\text{g/L}$)

Fecha de Muestreo	Punto de muestreo					
	1	2	3	4	5	6
15/07/2003	0.3	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
23/07/2003	2.6	1.7	0.1	2.7	1.6	<0.1
30/07/2003	0.2	0.6	0.7	0.8	0.3	0.2
07/08/2003	<0.1	0.4	<0.1	0.6	<0.1	0.7
13/08/2003	<0.1	0.7	<0.1	<0.1	<0.1	0.9
10/09/2003	<0.1	<0.1	0.6	1.9	0.6	0.7
30/09/2003	<0.1	<0.1	0.2	0.3	0.2	0.2
27/10/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1
03/12/2003	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
08/07/2004	1.3	1.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
20/07/2004	0.4	0.2	<0.1	0.3	<0.1	<0.1
30/07/2004	0.4	0.5	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
09/08/2004	0.4	0.3	0.3	1.0	0.2	0.3
20/08/2004	0.3	0.3	0.2	1.6	0.2	0.2
10/09/2004	<0.1	<0.1	0.2	0.2	<0.1	<0.1
23/05/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
13/06/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
03/08/2005	0.3	0.2	<0.1	0.7	0.9	<0.1
23/08/2005	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

El límite de cuantificación (LOQ), para este compuesto, fue 0.1 $\mu\text{g/L}$

En sombreado amarillo se indican las muestras con contenido igual o superior al LOQ

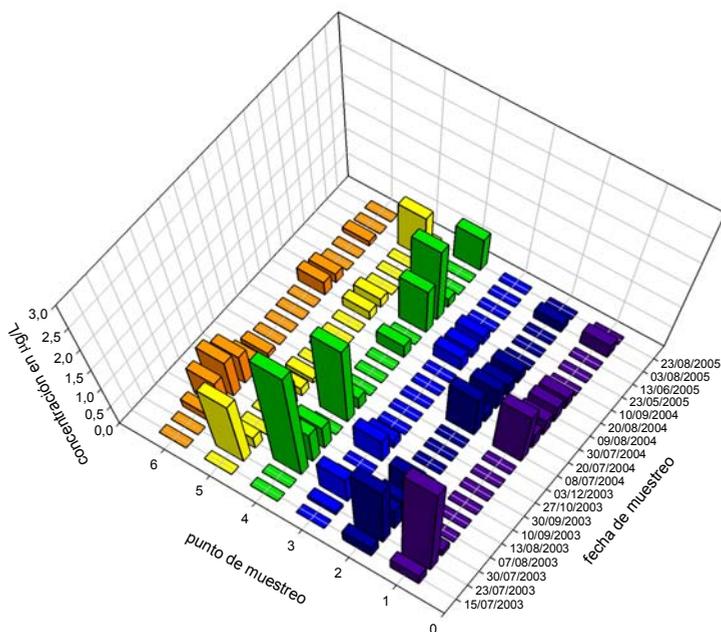


Figura IV.14. Niveles de concentración de tebuconazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005

Como podemos observar, la mayor parte de las muestras con mayor contenido en residuos de tebuconazol corresponden a las tomadas a finales de julio y agosto; época en la que, como hemos dicho, se realizan los tratamientos preventivos o curativos contra el fallado del arroz. Al igual que con otras materias activas, los puntos de muestreo con mayor porcentaje de muestras con contenidos superiores al límite de cuantificación son los puntos 1 y 4, y sus respectivas zonas de dilución en el lago (puntos 2 y 5). El rango de concentraciones encontradas para tebuconazol varía entre < 0.1 y $2.7 \mu\text{g/L}$.

IV.4.2.6. Triciclazol

En la Tabla IV.13 y en la Figura IV.15, se representan los niveles de concentración de residuos de triciclazol encontrados en las muestras de aguas del Lago, en el periodo de estudio 2003-2005. Como puede observarse, no se detectaron residuos de triciclazol en ninguna de las muestras analizadas en 2005. En el punto de muestreo n° 1, se detectaron residuos de triciclazol en una sólo ocasión, en el año 2003 y en tres ocasiones en 2004. En el punto 2 se detectó triciclazol también en los años 2003 y 2004. Las mayores concentraciones se dan en los puntos de muestreo situados en acequias o barrancos (puntos 1 y 4, respectivamente), así como en su zona de dilución, dentro del Lago (puntos 2 y 5).

Como puede observarse, se detectaron residuos de triciclazol en 16 muestras de aguas de La Albufera, 6 de ellas en 2003 y 10 en el año 2004. No se detectó triciclazol en las muestras tomadas en el año 2005.

Tabla IV.13. Evolución temporal, por puntos de muestreo, de la concentración de triciclazol ($\mu\text{g/L}$)

Fecha de muestreo	Punto de muestreo					
	1	2	3	4	5	6
15/07/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
23/07/2003	1.6	6.0	1.1	<0.5	0.7	<0.5
30/07/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
07/08/2003	<0.5	0.6	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
13/08/2003	<0.5	0.8	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
10/09/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30/09/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
27/10/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
03/12/2003	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
08/07/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
20/07/2004	0.5	0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30/07/2004	0.6	<0.5	<0.5	3.0	<0.5	<0.5
09/08/2004	0.9	0.7	0.5	2.5	0.6	<0.5
20/08/2004	<0.5	<0.5	<0.5	0.5	<0.5	<0.5
10/09/2004	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
23/05/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
13/06/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
03/08/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
23/08/2005	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

El límite de cuantificación (LOQ), para este compuesto, fue 0.5 $\mu\text{g/L}$.

En sombreado amarillo se indican las muestras con contenido igual o superior al LOQ

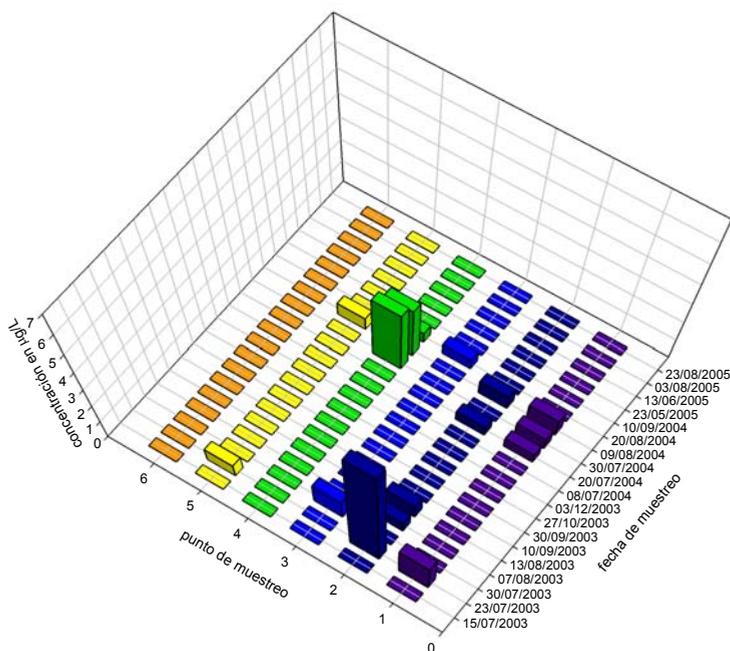


Figura IV.15. Niveles de concentración de triciclazol en las muestras de aguas de La Albufera según el punto y fecha de muestreo en el periodo 2003-2005.

El triciclazol es la materia activa seleccionada por los agricultores a la hora de realizar tratamientos preventivos, de forma generalizada, mediante aplicaciones aéreas con helicópteros. Las formulaciones empleadas para estas aplicaciones son BIM® (Dow Agrosience) y Auriga® (SAPEC AGRO S.A.U), siendo ambos formulados análogos en su composición (Triciclazol 75% WP). El hecho de hallar pequeñas concentraciones en los canales y barrancos, puede deberse a que estas aplicaciones se realizan en forma de pulverización aérea, a baja altura, con los cultivos en estado muy avanzado de crecimiento y alta densidad de hojas, provocando que el producto pulverizado quede depositado en las hojas e impidiendo que el triciclazol llegue al agua de inundación del campo y, de allí por escorrentía, a la red de drenaje y finalmente al Lago. Además, este tipo de aplicaciones aéreas evita daños en el cultivo a diferencia de las aplicaciones terrestres, tanto de forma manual (mochila neumática) o mecánicas (tractor con cuba).

A modo de resumen en la Figura IV.16 se muestra la evolución de las concentraciones residuales de los compuestos ensayados a lo largo del periodo 2003-2005 en cada uno de los puntos de muestreo

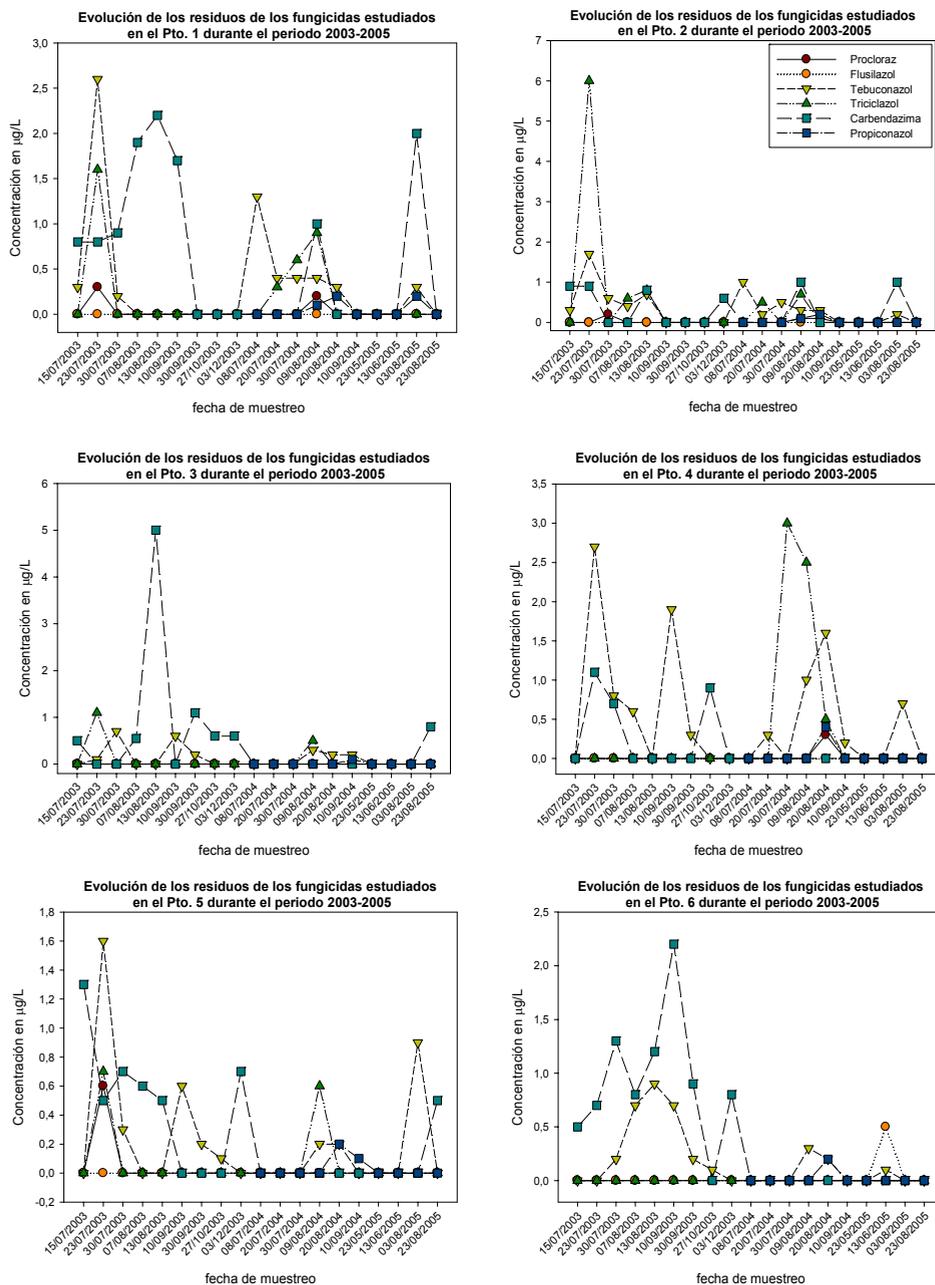


Figura IV.16. Distribución de los niveles de residuos de fungicidas en el periodo de estudio 2003-2005

IV.4.2.7. Otros plaguicidas detectados

También debe señalarse que en nuestro estudio se han detectado esporádicamente los herbicidas propanil, simazina y molinato y el insecticida malation, en los niveles de concentración que se indican en la tabla la Tabla IV.14.

Tabla IV. 14. Concentraciones residuales de malation, propanil, molinato y simazina encontrados a lo largo de los años 2003 a 2005.

Malation (µg/L)	Fecha	Pto.
0.2	20/07/2004	1
0.3	30/07/2004	1
0.1	10/09/2004	1
Propanil (µg/L)	Fecha	Pto.
1.50	08/07/2004	1
0.30	08/07/2004	2
0.35	13/06/2005	1
0.22	13/06/2005	2
Molinato (µg/L)	Fecha	Pto.
0.40	08/07/2004	5
0.10	09/08/2004	5
0.15	23/05/2005	1
0.15	23/05/2005	2
0.17	23/05/2005	3
2.20	23/05/2005	4
0.20	23/05/2005	5
0.14	23/05/2005	6
0.10	13/06/2005	3
Simazina (µg/L)	Fecha	Pto.
0.20	23/05/2005	3

Límite de cuantificación para: malatión: 0.1 µg/L, propanil: 0.05 µg/L, molinato: 0.1 µg/L, simazina: 0.01 µg/L

La materia activa simazina ha sido prohibida en España para su uso en arroz desde septiembre de 2004⁵, por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación por lo que es llamativa su detección en el año 2005. Molinato y propanil son materias activas incluidas en la lista en la lista única europea de productos fitosanitarios (anexo 1 de la directiva 91/414), y actualmente su uso en arroz esta autorizado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación⁶.

El insecticida malation se emplea contra *Chilo supresalis* y *pudenta* en arroz en dosis de 1-2 L/ha en aplicaciones ULV. También es un compuesto muy empleado en citricultura, presentando actividad insecticida y acaricida,

⁵ Orden del MAPA 1610/2003, de 17 de junio, y la Resolución de 30 de junio de 2003 de la Dirección General de Agricultura del MAPA.

empleándose contra araña roja, mosca blanca y cochinilla, entre otras plagas. Malation presenta una toxicidad clase B para peces. Según el MAPA⁶, la autorización de esta materia activa finaliza en junio de 2008, a partir de dicha fecha quedará prohibida la venta de productos formulados con esta materia activa.

IV.4.2.8. Parámetros estadísticos descriptivos correspondientes al análisis de fungicidas

En las Tablas IV.15. 6 a IV.20 se representan los principales parámetros estadísticos descriptivos correspondientes a los datos expuestos en las Tablas IV.9 a IV.13.

Tabla IV.15. Parámetros estadísticos correspondientes a los análisis de fungicidas realizados durante los años 2003 a 2005

Parámetros descriptivos	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Trícliazol	Propiconazol	Carbendazima
Media*	0.26	0.50	0.60	1.32	0.18	1.07
Mediana*	0.20	0.50	0.30	0.70	0.20	0.80
Desv. Típica	0.17	-	0.59	1.45	0.09	0.79
Moda*	0.30	-	0.20	0.50	0.20	0.80
Total muestras	114	114	114	114	60	114
Valor máximo	0.60	0.50	2.7	6.0	0.40	5.0
Valor mínimo	0.10	0.50	0.1	0.5	0.10	0.50
Varianza	0.03	-	0.35	2.11	0.01	0.63
SEM	0.02	0.05	0.06	0.12	0.02	0.10
Muestras Positivas [>LOQ]	7	1	54	16	10	39
Muestras Negativas [<LOQ]	107	113	60	98	50	75
Muestras positivas (%)	6.15	0.9	47.37	14	16.6	34.2
Muestras negativa (%)	93.85	99.1	52.63	86	83.4	65.8

LOQ: Límite de cuantificación instrumental

SEM: Error estándar de la media

*Valores de concentración expresados en µg/L

⁶ <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/sustancias>

Tabla IV.16. Número de muestras con contenidos iguales o superiores al límite de cuantificación, por compuesto y por año de muestreo.

	2003		2004		2005		Total periodo 2003-2005	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%
Procloraz	3	42.85	4	57.15	0	0	7	5.5
Flusilazol	0	0	0	0	1	100	1	0.8
Tebuconazol	28	51.85	21	38.9	5	9.25	54	42.5
Triciclazol	6	37.5	10	62.5	0	0	16	12.6
Propiconazol	N.A.	N.A.	9	90	1	10	10	7.9
Carbendazima	36	92.3	2	5.1	1	2.6	39	30.7
Total campaña	73	57.5	46	36.2	8	6.3	127	100

n: Indica el número de muestras positivas para el año y compuesto indicado

N: Indica el número de muestras positivas en el periodo 2003-2005

N.A.: No Analizado

%: Indica el porcentaje de muestras positivas respecto al número total de muestras, para cada fungicida estudiado.

Total periodo: Indica el número total de muestras positivas en el periodo 2003-2005 para cada compuesto y el porcentaje respecto al total de positivos

Total campaña: Indica el número de muestras positivas para el año y el % respecto al periodo 2003-2005

Tabla IV.17. Niveles de fungicidas en las aguas del Lago de La Albufera, en la época de aplicación de los compuestos indicados, durante el periodo 2003-2005*

Fungicidas	LOQ (µg/L)	% muestras cuantificables (≥ LOQ)	Rango concentraciones encontradas** (µg/L)	Media (µg/L)	Intervalo de confianza 95% (µg/L)
Carbendazima	0.5	28.9	0.5 – 5.0	0.69	0.59 – 0.79
Procloraz	0.1	4.5	0.1 – 0.6	0.11	0.05 – 0.16
Tebuconazol	0.1	48.2	0.1 – 2.7	0.34	0.00 – 0.82
Triciclazol	0.5	14.0	0.5 – 6.0	0.61	0.01 – 1.21

LOQ: Límite de cuantificación

*Número total de muestras: 114 (19 muestreos x 6 puntos de muestreo)

**Desde una posición proteccionista del medio ambiente, se considera que las aguas podrían contener, como mínimo, niveles de concentración equivalentes al límite de cuantificación.

En la Tabla IV.4.18 se muestra la distribución de muestras con contenido en fungicida igual o superior al límite de cuantificación (LOQ), para cada fungicida en cada punto de muestreo. En esta tabla sólo se han considerado el número total de positivos (muestras con concentraciones superiores al LOQ) a lo largo del estudio.

Tabla IV.18. Distribución de muestras con contenido en fungicidas igual o superior al límite de cuantificación por compuesto y punto de muestreo

Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Triciclazol	Propiconazol	Carbendazim	Total*
1	2	0	9	4	3	8	26
2	3	0	11	5	2	6	27
3	0	0	7	2	1	7	17
4	1	0	10	3	1	3	18
5	1	0	8	2	2	7	20
6	0	1	9	0	1	8	19
Total C**	7 5.5%	1 0.78%	54 42.5%	16 12.6%	10 7.9%	39 30.7%	N=127

*Total: Indica el número total de análisis positivos (Σ de todos los análisis positivos de las diferentes materias activas estudiadas) en el punto indicado a lo largo del estudio (2003-2005)

**Total C: Indica el número total de análisis positivos, para cada fungicida en los 6 puntos de muestreo estudiados.

N: Número total de análisis positivos

El valor máximo de N para este estudio es 684 (6 pts muestreo x 19 tomas de muestra x 6 compuestos)

Tabla IV.19. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de los residuos de los fungicidas analizados en las aguas de la Albufera, distribuidos por años de estudio y por punto de muestreo.

En el punto 1:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.7-2.3	0.2-2.5	0.2	n.d.	N.A.	n.d.
2004	1	0.3-1.3	0.2	0.6-1	0.2	n.d.
2005	2	0.3	n.d.	n.d.	0.2	n.d.
En el punto 2:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.6-0.8	0.2-1.8	0.1	0.5-6.0	N.A.	n.d.
2004	1.0	0.2-1.0	n.d.	0.7	0.2	n.d.
2005	1.5	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
En el punto3:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.5-5.0	0.2-0.7	n.d.	1.0	N.A.	n.d.
2004	n.d.	0.2-0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2005	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
En el punto 4:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.6-1.2	0.2-2.6	n.d.	n.d.	N.A.	n.d.
2004	0.5	0.3-1.5	0.3	2.5-3.0	n.d.	n.d.
2005	n.d.	0.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
En el punto5:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.6-1.3	0.2-1.6	0.6	0.7	N.A.	n.d.
2004	0.2-0.6	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2005	n.d.	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
En el punto 6:						
Año	Carbendazima	Tebuconazol	Procloraz	Triciclazol	Propiconazol	Flusilazol
2003	0.6-2.4	0.1-0.5	n.d.	n.d.	N.A.	n.d.
2004	0.2	0.2-0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5

N.A.: No analizado

n.d.: No detectado

Tabla IV.20. Niveles de fungicidas en las aguas del Lago de la Albufera, en la época de aplicación de los compuestos indicados, durante el periodo 2003-2005*

Fungicidas	LOQ (µg/L)	% muestras cuantificables (≥ LOQ)	Rango concentraciones encontradas** (µg/L)	Media (µg/L)	Intervalo de confianza 95% (µg/L)
Carbendazima	0.5	28.9	0.5 – 5.0	0.69	0.59 – 0.79
Procloraz	0.1	4.5	0.1 – 0.6	0.11	0.05 – 0.16
Tebuconazol	0.1	48.2	0.1 – 2.7	0.34	0.00 – 0.82
Triciclazol	0.5	14.0	0.5 – 6.0	0.61	0.01 – 1.21

*Número total de muestras: 114 (19 muestreos x 6 puntos de muestreo)

**Desde una posición proteccionista del medio ambiente, se considera que las aguas podrían contener, como mínimo, niveles de concentración equivalentes al límite de cuantificación.

Sólo en una de las 114 muestras de aguas de la Albufera analizadas, se detectó la presencia de flusilazol; concretamente en el análisis de la muestra tomada en el punto 6, el 13 de junio de 2005, se encontraron 0.5 µg/L de flusilazol.

Cantidades residuales de propiconazol se encontraron en las muestras de agua de la Albufera tomadas el 20 de agosto de 2004; los niveles encontrados eran del orden de 0.2 µg/L, en los puntos de muestreo 1, 2, 5 y 6, y del orden de 0.4 µg/L en las muestras procedentes del punto 4. Además, se encontraron concentraciones de 0.2 µg/L de propiconazol en las muestras de agua tomadas en el punto 1, el 3 de agosto de 2005 en La Albufera. En el año 2003 no se estudió la presencia de propiconazol en las aguas del lago del P.N. de La Albufera.

IV.4.2.9. Frecuencia de la contaminación por los fungicidas estudiados en las aguas del lago de la Albufera de Valencia

Los fungicidas más frecuentemente detectados, en este estudio, en las aguas del Lago de la Albufera de Valencia son la carbendazima y el tebuconazol. Estos fungicidas se encuentran en un 30.7 y un 42.5 % de las muestras analizadas, respectivamente.

Además, estos dos fungicidas se encontraron en las aguas de los seis puntos de muestreo seleccionados. Únicamente en 2005, no fueron detectados en el punto 6. En cambio, en 2005 se encontró flusilazol en el punto 6.

El propiconazol no se analizó en 2003, y se detectó en el punto 1 en 2004 y en 2005 y en el punto 2 en 2004.

El procloraz se detectó en los puntos 1, 2 y 5 en 2003 y en los puntos 1 y 4 en 2004.

En 2005 se encontraron cantidades residuales de carbendazima en los puntos 1 y 2, el 3 de agosto, y en el punto 3, el 23 de agosto; tebuconazol el 3 de agosto, en los puntos 1, 2, 4, 5; y propiconazol, el 3 de agosto, en el punto 1, y flusilazol, en el punto 6, el 13 de junio.

IV.4.3. Conclusiones del estudio de concentraciones ambientales predecibles en las aguas del Lago de La Albufera de Valencia

Los niveles de concentración de los fungicidas alcanzados en las aguas del lago de La Albufera de Valencia se encuentran en todos los casos entre no detectables y unos valores máximos de unidades de $\mu\text{g/L}$ (5 $\mu\text{g/L}$ de carbendazima, 0.6 $\mu\text{g/L}$ de procloraz, 7 $\mu\text{g/L}$ de tebuconazol y 6 $\mu\text{g/L}$ de triciclazol).

El nivel de detección de los compuestos estudiados es relativamente bajo, habiéndose realizado un total de 684 determinaciones analíticas (6 ptos muestreo x 19 tomas de muestra x 6 compuestos), de los que únicamente 127 (18.6%) dieron

una concentración por encima del límite de cuantificación establecido para el método de análisis.

Por tanto, del estudio realizado puede deducirse que las Concentraciones Ambientales Predecibles, en las aguas de la Albufera de Valencia, para los fungicidas estudiados, pueden situarse en el intervalo de concentración comprendido entre no detectables y unidades de $\mu\text{g/L}$, siempre que los tratamientos fungicidas se realicen en condiciones de buenas prácticas agrícolas.

IV.5. EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LAS AGUAS DE LAS PARCELAS EXPERIMENTALES TRATADAS CON FORMULADOS COMERCIALES

IV.5.1. Presentación de los resultados

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el estudio de la evolución temporal y distribución espacial de los niveles de concentración alcanzados en las aguas las parcelas experimentales, antes y después de ser tratadas con diferentes formulaciones comerciales, para el control de *Pyricularia oryzae*. Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras tomadas durante los años 2004 y 2005, se presentan por compuestos y al final de cada tabla se muestran los diferentes indicadores descriptivos para cada conjunto de valores obtenidos. A continuación de las tablas, se muestran las gráficas de barras de la evolución de la concentración residual de cada compuesto, tanto en las bandas de tratamiento como en las entradas a la parcela.

IV.5.2. Diseño experimental

Se tomaron muestras de aguas de las parcelas experimentales, inundadas para el cultivo del arroz, en 6 fechas distintas, durante la época de los tratamientos fungicidas (julio y agosto de 2004 y 2005; 3 fechas en 2004 y tres fechas en 2005). En cada parcela, se tomaron muestras en 3 puntos en 2004 y 2 puntos en 2005; antes y después de cada tratamiento.

Las muestras tomadas en cada punto fueron: 2 antes y 2 después de cada tratamiento y los valores analíticos expuestos en las tablas son los valores medios de cada pareja de muestras tomadas antes o después del tratamiento; por lo que tenemos 6 valores en cada muestreo de 2004 y 4 valores en cada muestreo de 2005).

IV.5.3. Resultados y discusión

IV.5.3.1. Concentración residual de los fungicidas en parcelas experimentales

En las Tablas IV.21 a IV.26 se muestran los resultados analíticos correspondientes a las muestras de aguas de las parcelas experimentales, tomadas durante la época de los tratamientos realizados en los años 2003 a 2005. Los datos se presentan por materias activas, punto de muestreo y fecha de toma de muestra. En las tablas se indica el valor de concentración, en $\mu\text{g/L}$ además del límite de cuantificación para cada compuesto. Para facilitar la visualización de los datos se han destacado con sombreado amarillo aquellas celdas que contienen valores superiores al límite de cuantificación.

En las Tablas IV.21 y IV.22 se muestran de forma respectiva, los resultados de las concentraciones residuales de los las muestras analizadas en el año 2004, en las parcelas después de realizar el tratamiento fitosanitario y la concentración residual de las aguas a la entrada de la parcela sin haber realizado los tratamientos.

En las Figuras IV.17 y IV.18 de forma respectiva, las gráficas de barras con los valores correspondientes a las concentraciones residuales de los compuestos analizados en las bandas de tratamiento de la parcela experimental tras su tratamiento con los formulados en el año 2004 y los niveles de los compuestos en las aguas de entrada a la parcela antes de realizar los tratamiento.

Tabla IV.21. Niveles concentración ($\mu\text{g/L}$) de los fungicidas encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, en el año 2004, y sus parámetros estadísticos.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Triciclazol	Propiconazol	Carbendazima	Procloraz*
28/07/2004	b1	224	5.63	2.8	260.7	1.6	1	39.2
28/07/2004	b2	235.8	12.9	3	319.7	1.2	1	194.8
28/07/2004	b3	80	11.1	2.9	316.9	1.5	1	129.5
11/08/2004	b1	71.1	1.5	5	97	1.3	2	4.5
11/08/2004	b2	47.2	1.6	3.7	27.2	1.3	2	13.4
11/08/2004	b3	20	2	4.8	21.8	1.6	1	8.4
25/08/2004	b1	135.4	0.6	1.4	282.4	1	37	57.9
25/08/2004	b2	66.1	1.8	0.9	370.8	0.9	21	31.6
25/08/2004	b3	4.67	1.6	0.8	264	1.5	14	54.9
Media		98.25	4.30	2.81	217.83	1.32	8.88	59.35
Mediana		71.10	1.80	2.90	264.00	1.30	2.00	39.20
Valor Mínimo		4.67	0.60	0.80	21.80	0.90	1.00	4.50
Valor Máximo		235.80	12.90	5.00	370.80	1.60	37.00	194.80
Desviación estándar		83.44	4.60	1.55	132.80	0.25	12.78	63.42
n>0		9	9	9	9	9	9	9
I.C.-95%		±54.51	±3.00	±1.01	±86.76	±0.16	±8.35	±41.43

b: Banda de tratamiento

* Materia activa aplicada con la formulación comercial "Octagon™".

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.-95%: Intervalo de confianza al 95%

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 $\mu\text{g/L}$: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol.

0.5 $\mu\text{g/L}$: triciclazol y carbendazima.

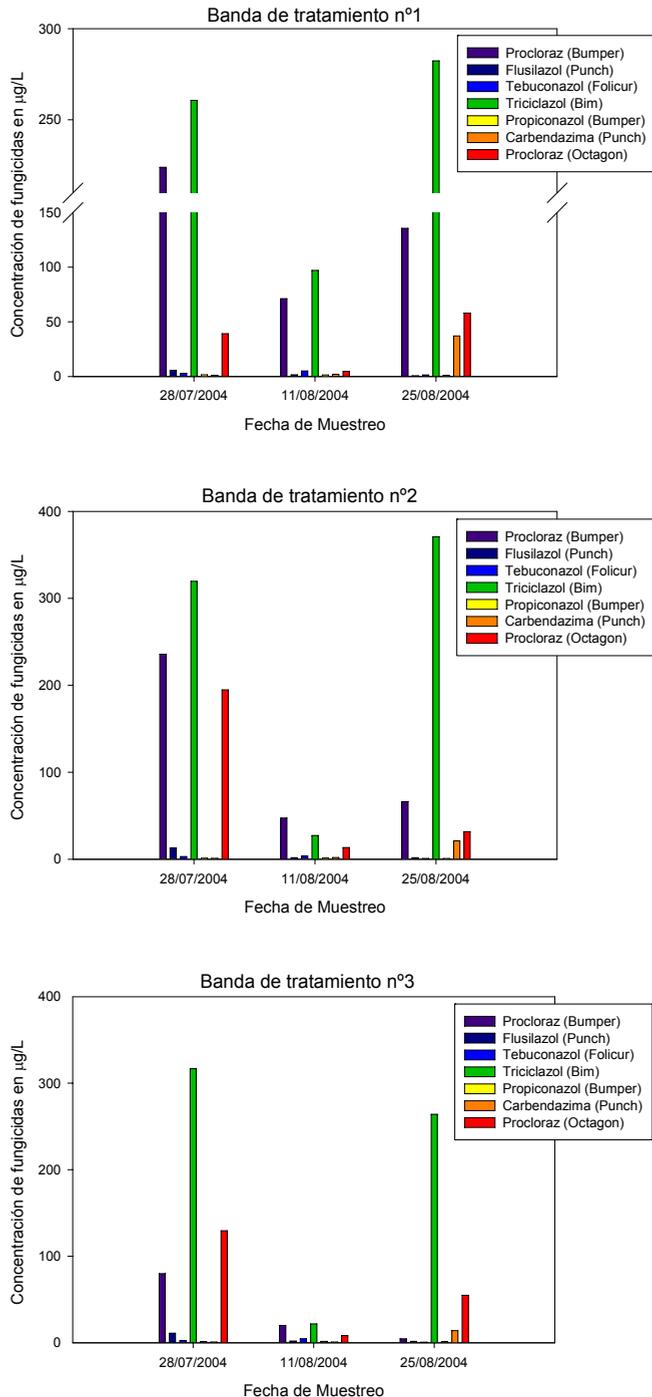


Figura IV.17. Gráfica de barras de las concentraciones de fungidas en las bandas de tratamiento tras la aplicación de las formulaciones comerciales en el año 2004

Tabla IV.22. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las entradas de agua a las parcelas experimentales, antes de los tratamientos, en el año 2004 y sus parámetros estadísticos.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Tricliclazol	Propiconazol	Carbendazima
28/07/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
28/07/2004	e2	<0.1	0.4	0.3	2.8	<0.1	<0.5
28/07/2004	e3	<0.1	0.4	0.2	1.8	<0.1	<0.5
11/08/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
11/08/2004	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
11/08/2004	e3	5.3	0.4	1	0.5	<0.1	<0.5
25/08/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	0.6	<0.1	<0.5
25/08/2004	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
25/08/2004	e3	<0.1	<0.1	<0.1	0.6	<0.1	<0.5
Media		5.30	0.40	0.50	1.26	-	-
Mediana		5.30	0.40	0.30	0.60	-	-
Valor Mínimo		5.30	0.40	0.20	0.50	0	0
Valor Máximo		5.30	0.40	1.00	2.80	0	0
Desviación estándar		-	-	0.44	1.02	-	-
n>0		1	3	3	5	0	0
I.C.-95%		-	-	± 0.49	± 0.89	-	-

e: Banda de tratamiento

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.-95%: Intervalo de Confianza al 95%

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 $\mu\text{g/L}$: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol.

0.5 $\mu\text{g/L}$: tricliclazol y carbendazima.

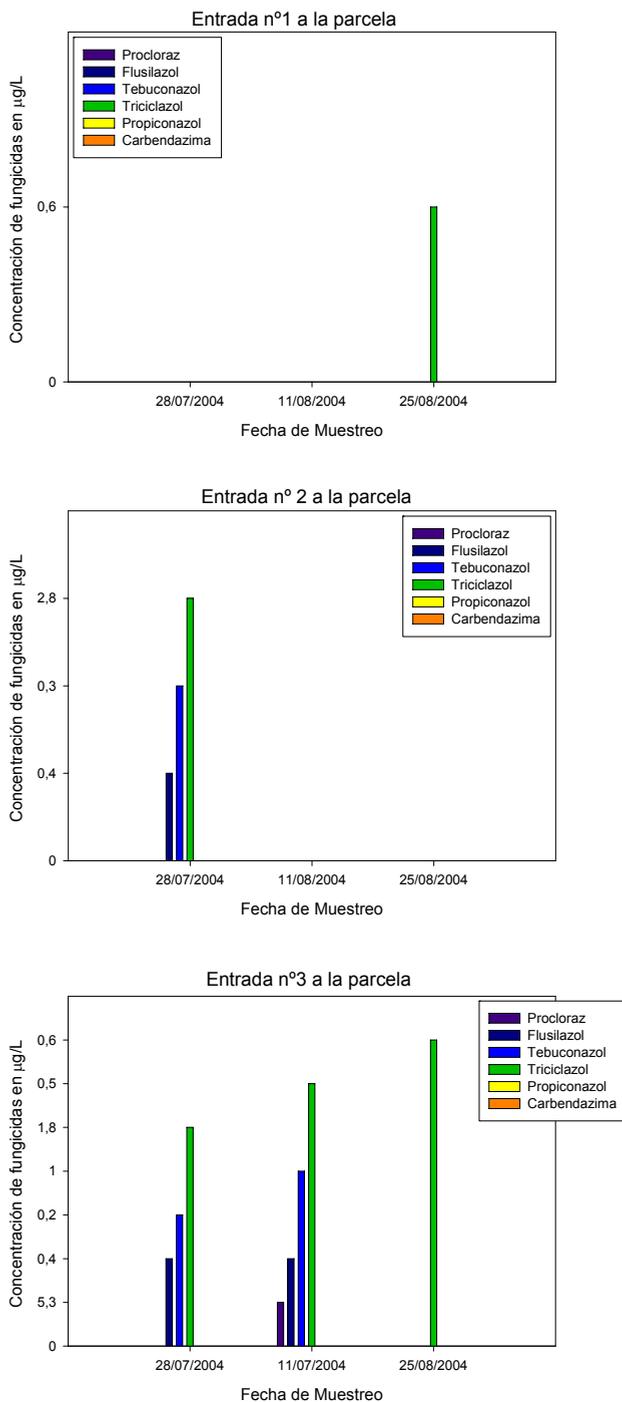


Figura IV.18. Gráficas de barras correspondientes a las concentraciones de fungicidas en las aguas de las entradas a la parcela experimental antes de la aplicación de los formulados comerciales, en el año 2004

Las Tablas IV.23 y IV.24 muestran, respectivamente, los resultados de las concentraciones residuales de los las muestras analizadas en el año 2005, en las parcelas, después de realizar el tratamiento fitosanitario y la concentración residual de las aguas a la entrada de la parcela sin haber realizado los tratamientos.

En las Figuras IV.19 y IV.20 se muestran respectivamente, las gráficas con los valores correspondientes a las concentraciones residuales de los compuestos analizados en las bandas de tratamiento de la parcela experimental tras su tratamiento con los formulados en el año 2005 y los niveles de los compuestos en las aguas de entrada a la parcela antes de realizar los tratamiento.

Tabla IV.23. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, en la campaña 2005 y sus parámetros estadísticos.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Triciclazol	Propiconazol	Carbendazima	Procloraz*
27/07/2005	b1	<0.1	0.3	2.2	2.1	1.7	1	1.9
27/07/2005	b2	<0.1	1.5	2.6	<0.5	0.5	1	n.a.
11/08/2005	b1	0.82	1.08	1.53	2.35	0.24	5	0.48
11/08/2005	b2	5.35	1.51	2.45	6.56	0.64	17	3.85
24/08/2005	b1	4.83	1.21	0.81	1.44	1.7	21	2.97
24/08/2005	b2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Media		3.67	1.12	1.92	3.11	0.96	9.00	2.30
Mediana		4.83	1.21	2.20	2.23	0.64	5.00	2.44
Valor Mínimo		0.82	0.30	0.81	1.44	0.24	1.00	0.48
Valor Máximo		5.35	1.51	2.60	6.56	1.70	21.00	3.85
Desviación estándar		2.73	0.636	1.03	2.45	0.73	9.16	1.62
n>0		3	5	5	4	5	5	4
I.C.-95%		± 3.09	± 0.55	± 0.90	± 2.40	± 0.64	± 8.03	± 1.59

b: Banda de tratamiento.

* Materia activa aplicada con la formulación comercial "Octagon™".

n.a.: No Analizado.

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.-95%: Intervalo de Confianza al 95%.

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 $\mu\text{g/L}$: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol.

0.5 $\mu\text{g/L}$: triciclazol y carbendazima.

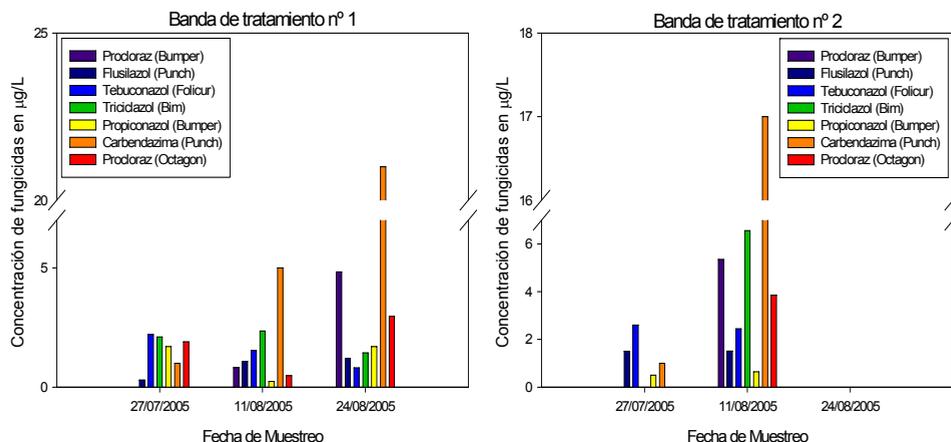


Figura IV.19. Gráfica de barras de las concentraciones de fungicidas en las bandas de tratamiento tras la aplicación de las formulaciones comerciales en el año 2005

Tabla IV.24. Niveles de concentración (µg/L) encontrados en las aguas de los canales de entrada a las parcelas experimentales, antes de los tratamientos, en la campaña 2005 y sus parámetros estadísticos.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Triciclazol	Propiconazol	Carbendazima
27/07/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	1
27/07/2005	e2	<0.1	<0.1	<0.1	0.4	<0.1	0.5
11/08/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	0.6
11/08/2005	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
24/08/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
24/08/2005	e2	0.35	0.16	0.11	0.14	0.39	<0.5
Media		0.35	0.16	0.11	0.25	0.39	0.7
Mediana		0.35	0.16	0.11	0.20	0.39	0.60
Valor Mínimo		0.35	0.16	0.11	0.14	0.39	0.50
Valor Máximo		0.35	0.16	0.11	0.40	0.39	1.00
Desviación estándar		-	-	-	0.14	-	0.26
n>0		1	1	1	3	1	3
I.C. 95%		-	-	-	±0.15	-	±0.30

b: Banda de tratamiento.

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.-95%: Intervalo de Confianza al 95%.

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 µg/L: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol.

0.5 µg/L: triciclazol y carbendazima.

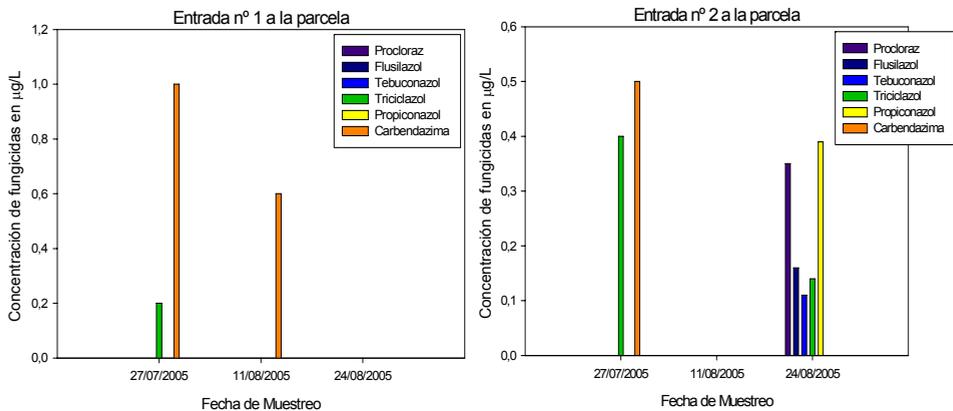


Figura IV.20. Gráficas de barras correspondientes a las concentraciones de fungicidas en las aguas de las entradas a la parcela experimental antes de la aplicación de los formulados comerciales, en el año 2005

En las dos tablas siguientes (IV.25 y IV.26) se muestran los resultados y el estudio estadístico de forma global a lo largo de los 2 años, 2004 y 2005, de las concentraciones analizadas en las aguas de la parcela experimental después de hacer los tratamientos y en las entradas al campo previos a la aplicación de los fungicidas.

Tabla IV.25. Niveles de concentración (µg/L) encontrados en las aguas de las parcelas experimentales, después de los tratamientos, durante el periodo de estudio y su estudio estadístico.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Tricliclazol	Propiconazol	Carbendazima	Procloraz*
27/07/2005	b1	<0.1	0.30	2.20	2.10	1.70	1.00	1.90
27/07/2005	b2	<0.1	1.50	2.60	<0.5	0.50	1.00	n.a.
11/08/2005	b1	0.82	1.08	1.53	2.35	0.24	5.00	0.48
11/08/2005	b2	5.35	1.51	2.45	6.56	0.64	17.00	3.85
24/08/2005	b1	4.83	1.21	0.81	1.44	1.70	21.00	2.97
24/08/2005	b2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
28/07/2004	b1	224.00	5.63	2.80	260.70	1.60	1.00	39.20
28/07/2004	b2	235.80	12.90	3.00	319.70	1.20	1.00	194.80
28/07/2004	b3	80.00	11.10	2.90	316.90	1.50	1.00	129.50
11/08/2004	b1	71.10	1.50	5.00	97.00	1.30	2.00	4.50
11/08/2004	b2	47.20	1.60	3.70	27.20	1.30	2.00	13.40
11/08/2004	b3	20.00	2.00	4.80	21.80	1.60	1.00	8.40
25/08/2004	b1	135.40	0.60	1.40	282.40	1.00	37.00	57.90
25/08/2004	b2	66.10	1.80	0.90	370.80	0.90	21.00	31.60
25/08/2004	b3	4.67	1.60	0.80	264.00	1.50	14.00	54.90
Media		74.61	3.17	2.49	151.77	1.19	8.93	41.80
Mediana		56.65	1.56	2.53	97.00	1.30	2.00	13.40
Valor Mínimo		0.82	0.30	0.80	1.44	0.24	1.00	0.48
Valor Máximo		235.80	12.90	5.00	370.80	1.70	37.00	194.80
Desviación estándar		83.04	3.95	1.36	149.66	0.47	11.30	58.60
n>0		12.00	14.00	14.00	13.00	14.00	14.00	13.00
I.C.95%		±46.98	±2.07	±0.71	±81.36	±0.25	±5.92	±31.85

b: Banda de tratamiento

* Materia activa aplicada con la formulación comercial "Octagon™".

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.95%: Intervalo de Confianza al 95%.

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 µg/L: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol.

0.5 µg/L: tricliclazol y carbendazima.

n.a.: No analizado

Tabla IV.26. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) encontrados en las aguas de las entradas de agua a parcelas experimentales, antes de los tratamientos, durante el periodo de estudio y sus parámetros estadísticos.

Campaña	Punto	Procloraz	Flusilazol	Tebuconazol	Triciclazol	Propiconazol	Carbendazima
27/07/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	0.20	<0.1	1.00
27/07/2005	e2	<0.1	<0.1	<0.1	0.40	<0.1	0.50
11/08/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	0.60
11/08/2005	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
24/08/2005	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
24/08/2005	e2	0.35	0.16	0.11	0.14	0.39	<0.5
28/07/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
28/07/2004	e2	<0.1	0.40	0.30	2.80	<0.1	<0.5
28/07/2004	e3	<0.1	0.40	0.20	1.80	<0.1	<0.5
11/08/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
11/08/2004	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
11/08/2004	e3	5.30	0.40	1.00	0.50	<0.1	<0.5
25/08/2004	e1	<0.1	<0.1	<0.1	0.60	<0.1	<0.5
25/08/2004	e2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.1	<0.5
25/08/2004	e3	<0.1	<0.1	<0.1	0.60	<0.1	<0.5
Media		2.83	0.34	0.40	0.88	0.39	0.70
Mediana		2.83	0.40	0.25	0.55	0.39	0.60
Valor Mínimo		0.35	0.16	0.11	0.14	0.39	0.50
Valor Máximo		5.30	0.40	1.00	2.80	0.39	1.00
Desviación estándar		3.50	0.12	0.41	0.93	-	0.26
n>0		2.00	4.00	4.00	8.00	1.00	3.00
I.C.95%		±4.85	±0.12	±0.40	±0.65	-	±0.30

b: Banda de tratamiento

** Materia activa aplicada con la formulación comercial "Octagon™".

n>0: Número de muestras con concentración superior al límite de cuantificación.

I.C.-95%: Intervalo de Confianza al 95%

Límites de Cuantificación (LOQ)

0.1 $\mu\text{g/L}$: procloraz, flusilazol, tebuconazol, propiconazol

0.5 $\mu\text{g/L}$: triciclazol y carbendazima

IV.5.3.2. Análisis de la Varianza (ANOVA) correspondiente a los análisis de residuos de fungicidas analizados en la aguas de los arrozales (parcelas experimentales)

Según el estudio estadístico basado en el Análisis de la Varianza (ANOVA) para comprobar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones halladas de cada plaguicida en función del punto de muestreo y la fecha de análisis podemos adelantar que en ningún caso existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de residuos de plaguicidas encontrados y el punto de muestreo. Los resultados se muestran en la Tabla IV.27.

Tabla IV.27. ANOVA de los residuos de plaguicida en función del punto de muestreo

Plaguicida	Estadístico	Resultado
Triciclazol	F=1.14; 5 g.l.; $p=0.343$	No hay diferencias estadísticamente significativas
Propiconazol	F=0.32; 5 g.l.; $p=0.898$	“
Tebuconazol	F=1.64; 5 g.l.; $p=0.155$	“
Procloraz	F=0.61; 5 g.l.; $p=0.691$	“
Carbendazima	F=1.16; 5 g.l.; $p=0.332$	“

El ANOVA realizado para comprobar diferencias estadísticamente significativa entre los niveles de residuos en las diferentes materias activas analizadas en función de la fecha de muestreo ha mostrado que existen diferencias entre los niveles de residuos y la época del año en la que se toma la muestra.

En la Tabla IV.28 podemos ver los resultados del ANOVA realizado tomando como variable dependiente la concentración de cada plaguicida y como factor de análisis la fecha de muestreo.

Tabla IV.28. ANOVA de los residuos de plaguicida en función de la fecha de muestreo

Plaguicida	Estadístico	Resultado
Triciclazol	$F=2.51$; 18 g.l.; $p=0.0022$	Hay diferencias estadísticamente significativas
Propiconazol	$F=8.17$; 18 g.l.; $p<0.001$	“
Tebuconazol	$F=4.08$; 18 g.l.; $p<0.001$	“
Procloraz	$F=1.79$; 18 g.l.; $p=0.037$	“
Carbendazima	$F=2.65$; 18 g.l.; $p=0.0012$	“

Se realizó un estudio de Análisis de la Varianza (ANOVA), de 2 vías para detectar diferencias entre los diferentes factores (fecha y punto) en función de las concentración de plaguicida encontrado (Variable Dependiente), también se analizó las posibles diferencias en la interacción de ambos factores

IV.5.3.2.1. Procloraz

El ANOVA indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($F=11.208$, con 1 g.l.; $p<0.05$) entre las concentraciones de procloraz halladas en las muestras procedentes de los puntos de entrada al campo (e) y las muestras tomadas en las bandas de tratamiento después de efectuarse el mismo (b). Igualmente, el ANOVA denota que también hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración de procloraz en las bandas de tratamiento, en función de la fecha en la que se realizó el tratamiento ($F=4.186$ con 5 g.l.; $p=0.012$). Las diferencias, según el ANOVA, también se dan para la interacción de ambos factores (fecha x punto) con una $F=4.213$, con 5 g.l.; $p=0.011$, al detectarse diferencias se realizó un procedimiento de comparación múltiple (PCM) empleando el Test-t de Bonferroni con un nivel de significación del 95%.

En la Tabla IV.29 podemos ver las diferencias encontradas y entre qué niveles de los factores se dan las mismas.

Tabla IV.29. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de procloraz en las parcelas experimentales

Factores de análisis	g.l.	F	P
fecha	5	4.186	0.012*
punto	1	11.208	0.004*
fecha x punto	5	4.213	0.011*
Residual	17		
Total	28		

g.l.: Grados de Libertad

* Indica Diferencias Estadísticamente Significativas (Nivel de significación al 95%)

IV.5.3.2.2. Flusilazol

El análisis de la varianza para el fungicida flusilazol mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los 3 factores sometidos a estudio, por lo tanto se concluye que los residuos de este plaguicida están en función de la época en la que se realizan los tratamientos y en la zona donde se toman las muestras, además de existir diferencias en la interacción de estos dos factores.

La Tabla IV.30 muestra para qué niveles de los factores se dan las diferencias estadísticamente significativas

Tabla IV.30. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de flusilazol en las parcelas experimentales

Factores de análisis	g.l.	F	P
fecha	5	10,163	<0,001*
punto	1	25,265	<0,001*
fecha x punto	5	9,136	<0,001*
Residual	17		
Total	28		

g.l.: Grados de Libertad

* Indica Diferencias Estadísticamente Significativas (Nivel de significación al 95%)

IV.5.3.2.3. Triciclazol

De nuevo, el estudio estadístico realizado basado en el análisis de la varianza (ANOVA) para el fungicida triciclazol mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los 3 factores sometidos a estudio, por lo tanto se concluye, que los residuos triciclazol están en función de la época en la que se realizan los tratamiento y en la zona donde se toman las muestras, además de existir diferencias en la interacción de estos dos factores. Cabe destacar que la $p < 0.001$, da idea de la significación de los datos estudiados. La Tabla IV.31 siguiente muestra para qué niveles de los factores se dan las diferencias estadísticamente significativas.

Tabla IV.31. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de triciclazol en las parcelas experimentales

Factores de análisis	g.l.	F	P
fecha	5	39,606	<0,001*
punto	1	109,060	<0,001*
fecha x punto	5	39,160	<0,001*
Residual	17		
Total	28		

g.l.: Grados de Libertad

* Indica Diferencias Estadísticamente Significativas (Nivel de significación al 95%)

IV.5.3.2.4. Propiconazol

Para el propiconazol, el estudio estadístico indica que hay diferencias significativas (95%) en función del punto y de la fecha en que fueron tomadas las fechas. La Tabla IV.32 indica las diferencias encontradas así como los parámetros estadísticos obtenidos en el estudio.

Tabla IV.32. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de propiconazol en las parcelas experimentales

Factores de análisis	g.l.	F	P
fecha	5	2,917	0,044*
punto	1	123,607	<0,001*
fecha x punto	5	2,202	0,102
Residual	17		
Total	28		

g.l.: Grados de Libertad

* Indica Diferencias Estadísticamente Significativas (Nivel de significación al 95%)

IV.5.3.2.5. Carbendazima

Finalmente, de forma similar a lo ocurrido otras materias activas, el estudio estadístico realizado basado en el análisis de la varianza (ANOVA) para carbendazima mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los 3 factores sometidos a estudio, por lo tanto se concluye, que los residuos de carbendazima presentes en las muestras analizadas presentan diferencias en su concentración según la época en la que se realizan los tratamiento y en la zona donde se toman las muestras, además de existir diferencias en la interacción de estos dos factores. Como en los casos anteriores la $p < 0.001$, da idea de la significación de los datos estudiados. La Tabla IV.33 siguiente muestra para qué niveles de los factores se dan las diferencias estadísticamente significativas.

Tabla IV.33. ANOVA correspondiente a las muestras con concentraciones residuales de carbendazima en las parcelas experimentales

Factores de análisis	g.l.	F	P
fecha	5	6,463	0,002*
punto	1	30,259	<0,001*
fecha x punto	5	6,680	0,001*
Residual	17		
Total	28		

g.l.: Grados de Libertad

* Indica Diferencias Estadísticamente Significativas (Nivel de significación al 95%)

El análisis de la varianza (ANOVA) llevado a cabo para cada compuesto está disponible en el Anexo I; en él se muestran las tablas de resultados obtenidos con en el programa SigmaStat 3.5 (Systat Inc) para cada factor de estudio.

IV.5.4. Conclusiones y comentarios al estudio estadístico

Como se ha visto en el apartado anterior, se han detectados diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los residuos de plaguicidas en las aguas de las parcelas analizadas, en función de tres factores, como son el lugar de muestreo y la fecha de toma de muestra y aplicación o no del plaguicida.

Las diferencias entre las fechas se pueden explicar por las condiciones de crecimiento del cultivo. La mayoría de los tratamientos se realizan con 2 semanas de diferencia entre ellos, en el maes transcurrido entre la primera y última aplicación, el cultivo experimenta un crecimiento vegetativo muy alto; en estas condiciones, el producto aplicado queda principalmente en las hojas, vía de entrada a la planta. La alta densidad del follaje y el marco de plantación favorecen que la mayor parte de los productos fungicidas aplicados quede retenida en los cultivos y que sólo una pequeña cantidad de fungicida caiga al agua del arrozal. Otro factor a tener en cuenta es la diferencia de desarrollo de las 2 variedades sembradas en las bandas, Fonsa y Senia presentan diferencias en cuanto al crecimiento de masa foliar.

Además, el tipo de aplicación influye notablemente en la cantidad de plaguicida que llega al agua de la parcela; los tratamientos terrestres, manuales o mecanizados, dejarán mayor cantidad de plaguicida en el agua del arrozal, al aplicar el producto muy próximo a la planta (30-50 cm. sobre ésta), en cambio los tratamientos realizados desde el aire realizan el tratamiento muy por encima de la planta, 7-10 m sobre el campo. Los procesos de deriva y de volatilización también serán mayores con estas condiciones de aplicación.

Las diferencias entre los puntos de entrada y las bandas de aplicación son evidentes, las zonas de entrada permiten la distribución del agua por la parcela, el agua pasa de una campo al contiguo por gravedad, inundandolos, de tal modo que

la última parcela ha ido recogiendo los sobrantes de agua de los demás campos y con ellas los residuos de plaguicidas empleados en las diferentes parcelas devolviendo el sobrante a la acequia; pese a esto, no se han detectado concentraciones elevadas de plaguicidas en las aguas de entrada. Por otro lado, los niveles de plaguicidas en las aguas de la parcela después de los tratamientos, son mayores que los de las aguas de entrada.

Otra diferencia importante a tener en cuenta es la diferencia en las concentraciones de los plaguicidas entre las diferentes campañas de tratamiento y recogida de muestras (2004 y 2005); esto podría deberse a las diferencias de crecimiento del cultivo y del estado vegetativo del mismo, aunque la época de siembra en ambos años fue similar y las fechas de tratamiento también. También puede deberse a las diferencias entre aplicadores, ya que la persona encargada de los tratamientos no fue la misma en ambos años, por lo que factores como la diferente velocidad de desplazamiento del aplicador o la diferente altura de aplicación, pueden incidir en la concentración de plaguicida encontrada en las aguas de la parcela tras el tratamiento. Otro factor a tener en cuenta es el de las diferentes variedades de arroz sembradas en las bandas, cada tipo de variedad presenta un porte, con una masa y densidad foliar diferenciada, lo que puede favorecer o no el paso de la pulverización hacia la lámina de agua de la parcela.

Hemos comparado los resultados obtenidos en los análisis de las aguas de la parcela en los dos años (ver Tabla IV.25) con los valores teóricos que cabría esperar una vez realizado el tratamiento según la materia activa aplicada en cada banda, para ello hemos calculado la cantidad de caldo que se aplicó realmente en campo, en función del sobrante en la mochila de aplicación tras el tratamiento con cada formulado, esto se ha realizado para los años 2004 y 2005, en ambos casos hemos tomado el valor medio de las diferentes aplicaciones realizadas en cada año, los valores se muestran en las Tablas IV.34 y 35.

Tabla IV.34. Datos empleados para el cálculo de las concentraciones teóricas máximas en la parcela experimental tras el tratamiento con los formulados comerciales en el año 2004.

Formulado	Materia activa	Riqueza (%)	Cantidad media real de formulado aplicado*	Cantidad media real m.a. aplicada**	Concentración teórica (µg/L) ¹			% de la concentración teórica ³	
					0.2 m.p.	0.15 m.p.	concentración Media real ²	0.15m	0.2m
					BIM™	tricliclazol	75	2.9 g	2.16
Octagon™	procloraz	45	6.9 mL	3.11	194	259	4.30	1.7%	2.2%
Folicur™	tebuconazol	25	8.8 mL	2.19	137	183	2.81	1.5%	2.0%
Punch™	carbendazima	12.5	3.9 mL	1.53	33	43	217.83	502.2%	669.6%
	flusilazol	25		3.05	65	87	1.32	1.5%	2.0%
Bumper™	propiconazol	7.8	12.2 mL	0.31	57	76	8.89	11.8%	15.7%
	procloraz	38		1.51	276	368	59.36	16.1%	21.5%

*Cantidad de formulado aplicado realmente al campo tras el tratamiento

**Cantidad de materia activa (m.a.) aplicada en campo (calculado a partir de la riqueza en m.a. del formulado)

¹Concentración teórica alcanzada en el campo según la materia activa aplicada en función de la profundidad (m.p.) supuesta de 0.15 m o 0.20 m

²Concentración real media obtenida en los análisis de las muestras tomadas en 2004, valores obtenidos de la Tabla IV.25

³Indica el % que representa la concentración real analizada en las muestras, sobre la concentración teórica calculada para cada una de las 2 profundidades consideradas.

Tabla IV.35. Datos empleados para el cálculo de las concentraciones teóricas máximas en la parcela experimental tras el tratamiento con los formulados comerciales en el año 2005.

Formulado	Materia activa	Riqueza (%)	Cantidad media real de formulado aplicado*	Cantidad media real m.a. aplicada**	Concentración teórica (µg/L) ¹			% de la concentración teórica ³	
					0.20 m.p.	0.15 m.p.	concentración Media real ²	0.15m	0.2m
					BIM™	tricliclazol	75	2.4 g	1.812
Octagon™	procloraz	45	5.5 mL	2.5	156	208	1.12	0.5%	0.7%
Folicur™	tebuconazol	25	7.9 mL	19.7	134	179	1.92	1.1%	1.4%
Punch™	carbendazima	12.5	3.4 mL	0.43	26	35	2.59	7.3%	9.8%
	flusilazol	25		0.86	53	71	0.96	1.4%	1.8%
Bumper™	propiconazol	7.8	10.9 mL	0.85	53	71	9.00	12.7%	17 %
	procloraz	38		4.15	259	346	2.30	0.7%	0.9%

*Cantidad de formulado aplicado realmente al campo tras el tratamiento

**Cantidad de materia activa (m.a.) aplicada en campo (calculado a partir de la riqueza en m.a. del formulado)

¹Concentración teórica alcanzada en el campo según la materia activa aplicada en función de la profundidad (m.p.) supuesta de 0.15 m o 0.20 m

²Concentración real media obtenida en los análisis de las muestras tomadas en 2005, valores obtenidos de la Tabla IV.25

³Indica el % que representa la concentración real analizada en las muestras, sobre la concentración teórica calculada para cada una de las 2 profundidades consideradas.

Los datos de la Tabla IV.35 muestran que las concentraciones detectadas en las aguas de la parcela se encuentran entre un 0.5 y un 17% de la concertación teórica esperada según, la altura de la lámina de agua sea 15 o 20 cm. Por el contrario, en el año 2004 (Tabla IV.34) los valores son mucho más altos, incluso para el caso de la carbendazima, los valores detectados estarían 5 veces por encima de las concentraciones teóricas calculadas, suponiendo una profundidad de la parcela de 15 cm.

Podemos observar que los valores de concentración residual en el año 2004 disminuyen a lo largo de las 3 fechas en que se realizaron las aplicaciones. En la primera fecha el cultivo estaba en una fase temprana por lo que masa vegetativa era muy inferior que al final del cultivo (un mes después en el último tratamiento), esto podría justificar que durante el primer tratamiento gran parte del caldo aplicado fuera directamente sobre la lámina de agua del arrozal y que durante el mes siguiente el crecimiento de la planta y de las panículas tapasen las zonas libres, interceptando la mayoría del caldo aplicado.

Esta diversidad de valores es difícil de achacar a un único factor, realmente existen toda una serie de condicionamientos, técnicos, climatológicos y humanos que influyen en la aplicación del plaguicida y consecuentemente en la cantidad del mismo que puede quedar disuelto en el agua de la parcela:

Posibles explicaciones a las diferencias encontradas.

En primer lugar, como ya se comentó anteriormente, el personal que realizó las aplicaciones no fue el mismo en 2004 y 2005, aunque sí se empleó la misma mochila. Aunque diferentes aplicadores pueden introducir variabilidad en los tratamientos debido a la velocidad del pase, la calibración de la presión de trabajo de la mochila, la altura a la que se realiza la aplicación y la propia experiencia del aplicador, estas diferencias no es achacable íntegramente a este factor.

En segundo lugar, las bandas están formadas por diferentes variedades de arroz, cada variedad tiene un porte diferenciado y un estado vegetativo diferente del resto de variedades (las variedades cultivadas Fonsa y Senia, pueden tener

desfases importantes en el estado vegetativo) lo que implica que la masa vegetal en el momento de la aplicación no sea homogénea en toda la banda, siendo la incidencia de la aplicación mayor cuanto mayor es la masa vegetal, este hecho es aplicable no sólo a las 2 variedades presentes en cada banda, si no también a la época de tratamiento ya que entre la primera y la última aplicación transcurre un mes, tiempo en el que la planta incrementa sensiblemente el tamaño de las panículas y de la masa foliar.

En tercer lugar, un factor importante son las condiciones ambientales en las que se realiza la aplicación, el viento introduce factores de deriva de la aplicación produciendo una pérdida de la aplicación y una reducción del rendimiento de la misma. Asimismo, una fuerte insolación con una baja humedad ambiental y elevada temperatura ambiental favorecen la evaporación del caldo.

En cuarto lugar, la altura de la lámina de agua en la parcela; en los cálculos teóricos hemos considerado dos alturas: 15 y 20 cm. Las parcelas no son regulares, se crea una pequeña pendiente para facilitar que el agua discurra a través de ellas desde la entrada del campo hasta la salida en la parte opuesta, esto implica, no sólo un volumen de dilución diferente por las variaciones de la altura de la lámina de agua, si no también por el arrastre de una banda a otra del fungicida retenido en el agua, con la consiguiente pérdida de analito. Además, debemos recordar que la toma de muestra se practica al finalizar el pase con la mochila, con la consiguiente remoción del fondo y movimiento del agua de la parcela favoreciendo que el agua de la parcela se disperse aún más. Otro factor importante es el factor de dilución en el agua de la parcela, asumimos que tras la aplicación, la dilución debe ser completa y uniforme en toda la lámina de agua, aunque en la realidad los formulados tienen a quedar flotando en la superficie de la lámina de agua, debido a su tipo de formulación de base aceitosa o emulsionable, esto implica que las concentraciones de plaguicida sean variables en función de la profundidad a la que se toma el agua dentro de la parcela.

Los condicionamientos técnicos como el tamaño de la gota y la uniformidad de la pulverización influyen a la hora de la aplicación. En primer lugar, una mala calibración de la presión de la mochila y de las boquillas puede variar el tamaño de

la gota, a mayor tamaño de gota la capacidad de cubrición de la pulverización disminuye y el caldo tenderá a caer por gravedad al suelo de la parcela. El tamaño de la partícula influye decisivamente, a mayor tamaño menor capacidad de cubrición y mayor tendencia a escurrir y caer al suelo; por el contrario a menor diámetro de partícula existen un mayor número de partículas por unidad de superficie, la penetración es mayor y la deriva y la evaporación aumenta.

Según algunos autores, las pérdidas de producto en aplicaciones a cultivos de porte bajo, se sitúan en torno al 10% (Planas de Martí, 2004)

Vemos que es difícil establecer un valor medio para las concentraciones ambientales predecibles en los arrozales, los datos al respecto en bibliografía son casi inexistentes, a ello se une los condicionamientos anteriormente descritos que introducen una variabilidad importante en los valores; sin embargo, las concentraciones detectadas, aún presentando variaciones importantes de una año a otro, son de utilidad a la hora de establecer umbrales de referencia para la posterior ERA.

IV.5.5. Discusión de los resultados obtenidos en el análisis de fungicidas en las aguas de las parcelas experimentales

En la revisión bibliográfica realizada se han encontrado muy pocos datos referentes a los niveles de inmisión de los fungicidas azólicos considerados en este estudio y que, como la mayoría de los compuestos empleados actualmente, se caracterizan por ser altamente selectivos, poco tóxicos, de baja persistencia y poco bioacumulables.

Entre los trabajos que contemplan el estudio de los niveles de residuos de los fungicidas flusilazol, procloraz, tebuconazol o triciclazol, pueden destacarse los siguientes:

En la Tabla IV.36 se resumen los resultados correspondientes al estudio espacial de concentraciones residuales de plaguicidas realizado por Belmonte *et al.* (2005) en

diferentes zonas de Andalucía, que puede ser tomados como niveles guía para nuestro trabajo,

Tabla IV.36. Resumen de los resultados del estudio llevado a cabo por Belmonte *et al.* (2005). Valores en µg/L.

	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Metomilo	-	0.53	0.78	-
Carbendazima	0.16	5.50	3.13	0.30
Imidacloprid	-	0.30	-	0.17
Spinosad	-	-	0.54	1.20
Piridaben	-	-	0.61	-
Simazina	0.94	0.35	1.98	0.40
Atrazina	-	0.54	0.08	0.10

Área 1: Provincia de Huelva (campos próximos a los ríos Tinto y Odiel).

Área 2: Provincias de Sevilla y Córdoba (zonas próximas al río Guadalquivir).

Área 3: Provincias de Córdoba y Jaén (olivares).

Área 4: Provincias de Granada, Málaga y Almería (cultivos en invernaderos).

Laabs *et al.* (2002) encontraron niveles de tebuconazol entre 0.017 y 0.044 µg/L en el 5.3% de las muestras de aguas de la cuencas de Pantanal (Brasil).

Estudios realizados en el lago de L'Albufera de Valencia, muestran niveles de contaminación de algunos plaguicidas asociados al cultivo del arroz en concentraciones de µg/L, tal es el caso del molinato y el tiobencarb en el punto de la Gola de Puchol (punto nº 6 de nuestro estudio), en esta estación se detectaron niveles de 1.6 y 4.5 µg/L para el molinato y de 1.1 µg/L para thiobencarb (Carrasco *et al.*, 1985).

Los valores máximos encontrados por, Jiménez *et al.* (1999) fueron 1383 µg/L para molinato y 505 µg/L para tiobencarb, ambos en la Gola del Perelló (Jiménez *et al.* (1999); estos últimos valores están muy por encima de los detectados en nuestro estudio y en el estudio realizado en 1985.

Un estudio anterior realizado por Picó *et al.* (1994), donde se analizaron los niveles de ciertos plaguicidas en aguas naturales (ríos, lagos y canales) de la Comunidad Valenciana, muestran valores para algunos fungicidas estudiados muy superiores a los encontrados en nuestro estudio, citaremos por ejemplo las concentraciones halladas del fungicida folpet con una concertación de 6.52 µg/L; el piridafention también fue estudiado arrojando valores de 0.036 a 0.065 µg/mL y carbamatos como carbaryl, carbofuran y pirimicarb dieron rangos de

concentraciones de 1.23-6.48 µg/mL, 0.54-1.63 µg/mL y 0.067-0.094 µg/mL, respectivamente. Como puede observarse todos estos valores están muy por encima de los detectados en nuestro estudio.

Padovani *et al.* (2006), estudiaron los niveles de concentración del triciclazol en la cuenca del río Po, a su paso por diferentes zonas arroceras italianas (Milano, Pavia, Vercelli y Mantova), determinando los niveles de contaminación en el propio río, así como en canales de riego, canales de drenaje y barrancos. El formulado comercial empleado para el control de *Pyricularia oryzae* era el BIM 75WP®, aplicado desde avionetas a 5-10 m de altura, a la dosis recomendada por el fabricante. Los niveles de residuos de triciclazol variaban según la zona de muestreo, siendo mayor en los barrancos (media de 1.57 µg/L) y en menor medida en los canales y en el río Po (media de 0.19 y 0.15 µg/L, respectivamente). Como puede observarse los resultados de este estudio son similares a los hallados en nuestro estudio en las aguas del lago de la Albufera.

También se encontraron diferencias significativas en cuanto al nivel de residuos de triciclazol, en función de la época del año en la que se tomaron las muestras, encintrando valores medios de triciclazol en verano de 1.89 µg/L en verano del año 1999 y 0.13 µg/L en el del año 2000; mientras que para otoño en esos mismos años, los resultados medios de triciclazol fueron <0.01 µg/L y 0.02 µg/L, respectivamente.

Las diferencias en cuanto a concentración de los niveles de los diferentes fungicidas obtenidas en nuestro estudio entre los puntos de muestreo situados en barrancos y acequias, (puntos 1 y 4 respectivamente) pueden explicarse precisamente por este hecho, ambos puntos son zonas de paso de aguas de drenaje provenientes de dos amplias zonas de arrozales, por ello es de esperar que esas aguas de drenaje contengan una mayor cantidad de residuos que las muestras tomadas en el propio Lago donde, además, no debemos olvidar la alta biomasa con concentraciones de clorofila *a* superior a 500 mg/m³ en el punto central del Lago junto a la elevada materia orgánica en forma de DBO₅ y DQO con valores cercanos a 125 mg/L de O₂ en este mismo punto (Santander y Andreu, 2007), ambos factores pueden ser importantes al poder eliminar parte de los plaguicidas del medio por

adsorción a la materia orgánica particulada o por bioacumulación de la biomasa algal presente; esta biomasa es mucho menor en los canales de riego. Este hecho ocurre en trabajos llevados a cabo por otros autores (Jonson, 2001; Gamón, 2002; Mendoza, 2002) que estudiaron la concentración de piridafention en diferentes puntos del Lago de la Albufera de Valencia.

En la Tabla IV.37 podemos ver los resultados del estudio realizado por Padovani et al (2006) en el que se analizaron aguas y sedimentos procedentes de diferentes puntos de canales y diques próximos a la zona arrocera de la cuenca del Po, en busca de triciclazol.

Tabla IV.37. Resumen de los resultados del estudio llevado a cabo por Padovani et al. (2006)

		Water					Sediment				
		N	Mean	Std. Dev.	95th percentile	% > LOD	N	Mean	Std. Dev.	95th percentile	% > LOD
All data		175	0.53	2.07	2.30	28.57	176	0.01	0.12	0.03	6.82
Year	**						ns				
1999		87	1.00 a	2.86	9.20	40.23	87	0.02 a	0.17	0.02	5.68
2000		88	0.08 b	0.25	0.48	17.06	89	0.01 a	0.03	0.04	7.87
Season	**						ns				
Summer		92	1.01 a	2.78	9.20	46.74	92	0.02 a	0.17	0.03	7.61
Autumn		83	0.01 b	0.04	0.10	8.43	84	0.00 a	0.03	0.02	5.95
Year * season	***						ns				
Summer 1999		46	1.89 a	3.74	9.80	73.91	46	0.04 a	0.24	0.04	10.87
Autumn 1999		41	0.00 b	0.02	0.00	2.44	41	0.00 a	0.00	0.00	0.00
Summer 2000		46	0.13 b	0.34	0.65	19.57	46	0.00 a	0.01	0.00	4.35
Autumn 2000		42	0.02 b	0.06	0.10	23.81	43	0.01 a	0.04	0.04	6.98

Otros estudios realizados en diferentes regiones del planeta, como la Isla de Martinica (DIREN, 2001) confirman la presencia de los fungicidas tebuconazol, propiconazol y tiabendazole en concentración máximas de 1 µg/L en aguas naturales, siendo habitual, niveles inferiores a los límites de detección. En la red de control de contaminación por fitosanitarios, los niveles de estos plaguicidas en las costas de la isla han dado valores inferiores a los límites de detección (Bocquené y Franco, 2005). Estos resultados respaldan nuestros resultados, indicando que los residuos en aguas naturales son habitualmente bajos, debido principalmente a la baja dosis de aplicación de los mismos y la selectividad de la materia activa específica para determinadas enfermedades de cultivos concretos. Trabajos previos (GRAP, 2002. CORPEP, 2000, 2001) indicaron niveles de contaminación cercanos a 0.2 y 0.25 µg/L para los compuestos carbaril y carbofuran respectivamente,

compuestos que son del mismo grupo (carbamatos) que carbendazima, plaguicida estudiado en este capítulo.

Los niveles de carbendazima encontrados por Readman *et al.* (1997) en diferentes zonas húmedas europeas fueron: Inferiores a 3 ng/L, en Grecia, en el Golfo de Thermaikos, en los ríos Louros, Axios y Loudias y en las lagunas costeras de Amvrakikos, e inferiores a 1 ng/L, en los ríos Rodano (Francia) y Po (Italia). En cambio, en el Delta del Ebro los niveles de carbendazima rondaban los 200 µg/L en los arrozales y los 6.5 µg/L en los canales de drenaje y menores a 200 ng/L en sus lagunas costeras; valores equivalentes a los niveles encontrados en nuestro estudio. Este mismo autor indica que la vida media de la carbendazima en los arrozales del Delta del Ebro es de 65 horas, si atendemos a los estudios de disipación presentados en el Capítulo III de esta memoria de tesis, la carbendazima figuraba como el fungicida más persistente frente a factores abióticos bajo condiciones de laboratorio; es de esperar que en condiciones de campo, (con factores bióticos presentes) el resto de fungicidas estudiados presenten un vida media igual o inferior a las 65 horas por lo que es de esperar que las concentraciones de estos compuestos se reduzcan sensiblemente días después de su aplicación.

Los valores detectados de molinato, simazina y propanil están en el orden de µg/L, valores similares a los hallados por otros autores como Boluda *et al.* (2002) quienes encontraron niveles de 0.1 µg/L para simazina y de 0.1-77.1 µg/L en muestras de agua tomadas en la red de canales próximos a la Albufera. Gómez de Barreda *et al.* (2002) encontraron niveles de propanil en las acequias de drenaje de los arrozales próximos al Lago de 28 µg/L, valor superior a los encontrados en este estudio y que puede estar motivado por la mayor proximidad de las acequias a los campos de cultivo y por la proximidad de las fechas de muestreo a la época de tratamiento con herbicidas (mayo-junio) por lo que es de esperar una mayor concentración de residuos.

Otros autores (Johnson *et al.* 2000; Padovani *et al.* 2006) sugieren que los fungicidas azólicos, como el flusilazol, prochloraz, propiconazol o triciclazol son persistentes en el suelo (K_{oc} entre 1000 y 8000 mL·L⁻¹), con vidas medias entre 4 y 17 meses (Tomlin, 2000), quedando firmemente inmovilizados en el complejo suelo-

agua, esto unido a las bajas dosis de aplicación hacen que su efecto en el medio ambiente acuático o en los ecosistemas marinos sea potencialmente bajo.

Kreuger *et al.* (1999) encontraron niveles de propiconazol entre 0.15 y 0.46 µg/L, en muestreos realizados durante la primavera y verano de 1990 y 1991, y niveles de procloraz por debajo del límite de detección (0.1 µg/L), en aguas naturales de charcas de riego próximas a zonas agrícolas, al sur de Suecia. En las muestras de sedimentos encontraron 34 µg de propiconazol y 60 µg de procloraz, ambos por Kg de peso seco.

Los niveles de contaminación de las aguas de drenaje de los arrozales, tras la aplicación de plaguicidas, puede reducirse aumentando el tiempo de retención o de residencia, debido al efecto de degradación ejercida por los microorganismos presentes en el medio (Santos *et al.*, 1998; Byard, 1999).

**V. ENSAYOS DE TOXICIDAD EN COMPUESTOS
FUNGICIDAS AZÓLICOS**

V.1. INTRODUCCIÓN

V.1.1. Toxicidad de los plaguicidas

Según Repetto (1997), *“un tóxico es una sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo”*.

Dado que los plaguicidas son compuestos químicos utilizados para causar la muerte, o evitar el desarrollo o la reproducción de determinados organismos⁷, estos compuestos son tóxicos y pueden ser peligrosos para el hombre, los animales, las plantas y los ecosistemas e, incluso, a bajas concentraciones, pueden ser especialmente peligrosos para los ecosistemas húmedos. Por esto, tanto España como diversos estados europeos, y no europeos, así como la Unión Europea (UE) y organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO), han establecido extensas reglamentaciones sobre el uso de los plaguicidas.

Concretamente, la UE tiene una extensa reglamentación referente al uso correcto de los plaguicidas y medidas agroambientales que facilitan el cumplimiento de compromisos como el mantenimiento de registros de plaguicidas autorizados para su uso agrícola, la reducción del uso de plaguicidas para proteger el suelo, el agua, la atmósfera y la biodiversidad, la utilización de técnicas integradas de gestión de plagas y la transformación de la agricultura convencional hacia la agricultura ecológica.

Además, en diciembre de 2001, el Parlamento Europeo y el Consejo Europeo tomaron la decisión⁸ de publicar una lista de 33 sustancias prioritarias, para su evaluación ambiental, de las cuales 13 se utilizan en productos fitosanitarios.

Por otra parte, en la bibliografía científica, referente a los plaguicidas agrícolas, se pueden encontrar diversos datos sobre la toxicidad de estos compuestos. Por ejemplo, en Tomlin (2001), pueden encontrarse datos sobre la toxicidad aguda, para ratas, de casi todos los plaguicidas utilizados actualmente. Sin embargo, suelen ser escasos los datos referentes a la toxicidad de los

⁷ Insectos, hongos u otros organismos que causan pérdidas de cosechas o son parásitos de animales.

fungicidas azólicos, para organismos acuáticos; por lo que, para la realización de la evaluación de riesgos ambientales de estos compuestos, ha sido necesario realizar algunos bioensayos que nos aportaran información adecuada sobre su toxicidad en organismos representativos de la fauna que se desarrolla en el ecosistema de la Albufera de Valencia.

V.1.2. Utilización de bioensayos en la valoración de los efectos toxicológicos de los plaguicidas

Para estudiar los efectos de los plaguicidas agrícolas sobre los organismos vivos, podrían someterse algunas especies representativas a diversas concentraciones del producto fitosanitario, bajo condiciones de campo reales; sin embargo, esto no es sencillo ya que controlar todos los factores que pueden influir sobre los organismos, en condiciones reales, es muy difícil. Por eso, se han desarrollado ensayos estandarizados que, si bien son menos realistas, simplifican mucho la valoración de los efectos.

Generalmente, se asume que, por debajo de un cierto nivel, una sustancia tóxica no produce algún efecto nocivo; pero, por encima de este nivel, se entra en una fase en la que el organismo activa sus mecanismos de defensa y detoxificación. Mientras estos mecanismos sean suficientes para contrarrestar la acción de la sustancia, los efectos negativos no se manifestarán, aunque el organismo presente un mayor gasto energético. En el momento en que los mecanismos de defensa y detoxificación no sean suficientes como para compensar la acción tóxica se produce el efecto nocivo que da lugar a manifestaciones crónicas y en caso de una mayor dosis, manifestaciones de tipo agudo (Gaggi, 1998). Esta asunción es una de las bases de la toxicología experimental y ya fue planteada por Paracelso (Teofrasto von Hohenheim, 1491-1541) con la frase “la dosis hace el veneno”⁹

⁸ Decisión nº 2455/2001/CE (Diario Oficial de Consejo Europeo (DOCE) 15.12.2001) por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE

⁹Paracelso (1564). SiebenVerteidigungs. Edición de Theodor Byrckmann.

Un ejemplo representativo al que puede aplicarse claramente esta asunción es el caso de algunos metales pesados que son micronutrientes esenciales para los organismos vivos.

En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo considerable para desarrollar diversos procedimientos estandarizados y protocolos bien definidos, para la realización de bioensayos, o tests de toxicidad, con distintas especies de organismos, pertenecientes a diferentes niveles de la escala de organización biológica. El objetivo principal de estos bioensayos es la obtención de datos experimentales contrastables sobre la toxicidad de los diversos compuestos químicos, de forma que puedan compararse adecuadamente. Además, estos datos pueden ser utilizados en las evaluaciones del riesgo ambiental.

Los procesos de evaluación de riesgos ambientales constan de dos fases básicas: la evaluación de los niveles y duración de la exposición a que están sometidos los organismos estudiados y la evaluación de efectos producidos en los mismos. La metodología utilizada en la evaluación de efectos, se basa, precisamente, en el manejo de datos procedentes de los ensayos toxicológicos.

V.1.3. Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad son pruebas en las que se utiliza un tejido vivo, organismo o grupo de organismos para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida, permitiendo comparar la toxicidad de diferentes compuestos y conocer la sensibilidad de las diversas especies (Reish and Oxida, 1987).

Entre los métodos desarrollados, para evaluar el efecto potencial de las sustancias tóxicas, se encuentran los ensayos de toxicidad aguda, en los que se estiman los efectos perjudiciales de dichas sustancias, a través de la respuesta de los organismos, expuestos a un rango determinado de concentraciones de la sustancia estudiada, durante cortos periodos de exposición (en relación con la duración del ciclo vital del organismo considerado). Los ensayos estandarizados de toxicidad son útiles porque informan de la toxicidad relativa de las sustancias y de la

sensibilidad de las especies, pueden ser comparados o calibrados con observaciones en el medio real y son reproducibles, rápidos y fácilmente interpretables. Asimismo, la mortalidad es uno de los parámetros más utilizados, en los estudios de toxicidad aguda, a pesar de presentar algunas limitaciones, porque ha demostrado ser un parámetro de sencilla observación y fácilmente interpretable (Giesy and Graney, 1989).

También existen métodos para determinar la toxicidad crónica, correspondiente a periodos de exposición de mayor duración.

Tabla V.1. Criterios para la selección de especies en los tests de toxicidad según Rand, 1995.

Características Destacables
Diferentes especies con un amplio rango de sensibilidades
Abundancia y disponibilidad
Ecológicamente relevante
Repercusión económica y comercial
Fácil mantenimiento
Información disponible

Los dos parámetros más frecuentemente utilizados, para estimar la toxicidad de los compuestos, productos o materiales, para los seres vivos, y la sensibilidad de los seres vivos a los tóxicos, son: la concentración letal para el 50% de individuos expuestos (CL_{50}) y la menor concentración con efectos observables, estadísticamente significativos (LOEC). Los valores de CL_{50} indican la concentración a la que mueren el 50% de los individuos, expuestos a una sustancia tóxica, en un tiempo de exposición determinado. Los valores de LOEC indican la menor concentración a la que se observan efectos estadísticamente significativos, con respecto al grupo control.

Además, toxicológicamente, la pendiente de la curva de mortalidad, frente a concentración, es un indicador del mecanismo de toxicidad y un índice de la variabilidad de respuesta desde un punto de vista poblacional. Por todo ello ha sido utilizada para comparar la respuesta letal en diferentes poblaciones de distintos grupos de organismos (Rand, 1995).

Estos ensayos, básicamente, consisten en la exposición de grupos de organismos a determinadas concentraciones del tóxico durante un tiempo determinado. Los organismos deben estar en condiciones adecuadas de desarrollo, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo y mantenerse en condiciones ambientales constantes. Además, en estos ensayos se incluyen grupos de control, que no se exponen al tóxico. Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

La evaluación de *la toxicidad aguda* se lleva a cabo mediante la exposición de un grupo de individuos de una especie a una serie de dosis crecientes de un xenobiótico, durante un breve periodo de tiempo (generalmente entre 24 y 96 horas). El efecto buscado es la mortalidad y el parámetro ecotoxicológico es la dosis a la concentración letal para el 50% de organismos (DL_{50} o CL_{50}). Los parámetros más importantes, referentes a la *toxicidad crónica*, como resultado de una exposición prolongada y cuyos efectos más importantes son los relacionados con la reproducción y el desarrollo de los individuos expuestos, son NOEC/NOAEL (*No Observed Effect Concentration/ No Observed Adverse Effect Level*) o la LOEC/LOAEL (*Lowest Observed Effect Concentration/ Lowest Adverse Effect Level*), (Henry, 1988).

Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico.

Los ensayos pueden ser de laboratorio (con un número reducido de especies, y en condiciones estandarizadas que reproducen sólo en forma muy parcial las condiciones naturales en el ambiente), o de campo (en “cercas” o “corrales” sometidos a las condiciones del medio) (Barata *et al.*, 2007; Damásio *et al.*, 2008).

Mediante los ensayos de toxicidad se estudian las relaciones entre la dosis o concentración y el efecto producido, o entre la dosis o concentración y la respuesta (efecto o cambio biológico evaluable por una escala de intensidad o severidad; o proporción de la población expuesta que manifiesta un efecto definido).

El fitoplancton o las algas suelen seleccionarse por constituir la base trófica de los ecosistemas acuáticos.

Los ensayos algales son en general sensibles, rápidos y su coste no es muy elevado (Walsh, 1988; Nalewajko and Olaveson, 1998). Por estas razones han sido utilizados en muchos estudios ambientales y fueron aplicados, en diferentes contextos, en tests de material de investigación para observar la presencia de toxicidad (Nyholm y Källqvist, 1989; Peterson y Nyholm, 1993; Halling-Sorensen *et al.*, 1996). Los test de toxicidad de algas son también test obligatorios para la notificación y calificación de los compuestos químicos en los países de la Unión Europea, tal es el caso del nuevo registro de sustancias químicas conocido como REACH¹⁰ o el registro europeo de productos fitosanitarios¹¹

Los test de ecotoxicidad basados en organismos consumidores se han difundido ampliamente, existiendo en la actualidad un gran número de tests (Rotíferos, Daphnidos; Ceriodaphia, Thamnocephalos, Artemia, etc), basados en especies de invertebrados, tanto de agua dulce como salina (Persoone y Janssen, 1993).

Los ensayos de toxicidad son un complemento a los tradicionales análisis químicos que dan información sobre los niveles de contaminantes que pueden ser la causa de la toxicidad de la muestra; pero, los análisis químicos suelen resultar más caros, ya que es necesario realizar una serie de análisis y únicamente dan información referente al momento y lugar donde se realizó la muestra, mientras los ensayos de ecotoxicidad dan idea general de la toxicidad de la muestra en su conjunto, reflejando efectos de magnificación y sinergismo entre diferentes tóxicos presentes en ellas. Cooman *et al.* (2005) afirman que, en determinados casos, el uso de ensayos de toxicidad puede ser una alternativa más atractiva y económica que los ensayos fisicoquímicos, a la hora de evaluar la calidad de las aguas.

En cualquier caso, ninguna especie aislada podría representar adecuadamente un ecosistema entero en sensibilidad toxicológica, por lo que hay organizaciones que recomiendan una serie de ensayos crónicos incluyendo, por ej: bacterias, algas, dáfidos y peces (Blaise et al, 1985; Levin *et al.*, 1989)

¹⁰ REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), adoptado en diciembre de 2006 por los países miembros. (EC 1907/2006, Directiva 2006/121/EC, 67/548/EEC),

¹¹ Directiva Europea 91/414/CEE

No existe un organismo único y universal para ser usado en laboratorio a la hora de establecer la toxicidad, cada organismo tiene su utilidad, por ello es esencial entender las limitaciones de estas pruebas de toxicidad (Del Valls y Conradi, 2000). Henry (1988) ha realizado una clasificación de los diferentes grupos de organismos empleados en ensayos de toxicidad en la forma que se expone en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Relación de organismos utilizados en bioensayos de toxicidad.

Organismo	Adaptabilidad del organismo		Empleado habitualmente como organismo en bioensayos
	Cultivo en laboratorio	Recolección en campo	
1. Algas	Excelente	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Si
2. Protozoos	Excelente	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Muy Limitado
3. Invertebrados			
a. Planctónicos			
1. Rotíferos	Bueno	Muy difícil de recolectar el cultivo puro	Limitado
2. Cladóceros	Excelente	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Si
3. Copépodos	Medio	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Limitado
4. Camarones	Bueno	Bueno	Si
b. Bénticos			
1. Anélidos	Medio	Medio	Limitado
2. Insectos	Bajo	Medio	Si
3. Moluscos	Bueno	Medio	Si
4. Crustáceos	Bajo	Medio	
4. Peces	Excelente	Alta tasa de mortalidad tras la recolección	Si

Mientras en la decadas de mediados del siglo XX, los bioensayos con peces fueron cruciales para evaluar las fuentes puntuales de contaminación por determinados xenobióticos, con efectos sobre la biota que habitaba las aguas receptoras de esta contaminación, a finales de dicho siglo han sido los ensayos biológicos a microescala, conocidos como microbiotests, los que se han impuesto debido a su gran sensibilidad, fácil y rápido manejo, además de su economía, respecto a los ensayos clásicos con peces. Además, estos últimos se mostraron insuficientes, para asegurar la adecuada protección de los ambientes acuáticos y

frente a la necesidad de analizar el impacto de los contaminantes en diferentes niveles tróficos y de realizar un mayor control del medio ambiente con el consecuente aumento del número de muestras a analizar (Blaise *et al.*, 1988).

La evaluación de los riesgos de los plaguicidas en ambientes acuáticos requiere información sobre su toxicidad, comportamiento ambiental, degradación y destino. Los efectos ecológicos dependen de su actividad biológica y de su estabilidad, que varían en las diferentes condiciones ambientales.

En ecosistemas naturales, las complejas interacciones entre los plaguicidas y los componentes abióticos y bióticos del ambiente pueden favorecer o suavizar su toxicidad sobre los organismos acuáticos. Para la evaluación de los riesgos ambientales, frecuentemente, se llevan a cabo tests de toxicidad con organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos (algas, gusanos, crustáceos, peces...).

La contaminación de las aguas por fitosanitarios es un problema de actual relevancia, que pone de manifiesto la necesidad de controlar el uso de estos compuestos, en especial en las zonas húmedas.

El uso de microbioensayos ha sido ampliamente utilizado para la evaluación ecotoxicológica de materias activas de carácter plaguicida y de los formulados comerciales elaborados a partir de ellos. Tradicionalmente el uso de bioensayos se ha centrado en el uso de *Daphnia magna* (crustáceo), *Vibrio fischeri* (bacteria bioluminiscente), *Selenastrum capricornutum* (alga verde unicelular) o peces como *Danio rerio* (pez cebra); sin embargo en la última década el uso de organismos diferentes a los citados y, más concretamente, microcrustáceos se ha implantado en este tipo de trabajos de caracterización ecotoxicológica debido posiblemente a la mayor sensibilidad frente a los fitosanitarios y por representar a escalones tróficos en diferentes ambientes acuáticos como los estuarios o medio marino, tal es el caso de *Thamnocephalus platyurus*, *Artemia franciscana*, *Brahionus calyciflorus* y *plicatilis* (Cerejeira *et al.*, 1999; Vaal y Folkerts, 2000; Kungolos *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000).

Artemia sp. está ampliamente distribuida por todo el mundo y su presencia natural en diferentes ambientes acuáticos de carácter litorales y continentales, como organismo eurihalino, evidencia una gran capacidad de adaptación y tolerancia a

muy diversas condiciones y a un amplio rango de características medioambientales facultándole para habitar aguas de salinidades extremas, tanto aguas salobres como salinas saturadas de cloruro sódico con rangos que pueden oscilar desde 10-20 g/L a más de 300 g/L (Sarabia, 2002).

El impacto tóxico sobre la fauna acuática del uso de plaguicidas asociados al cultivo del arroz, también ha sido estudiado por varios investigadores (Fochtman, 2000; Pereira *et al.*, 2004; Davoren y Fogarty, 2004), que coinciden en la necesidad de utilizar bioensayos alternativos a los tradicionalmente empleados y citados anteriormente. Las peculiares características del cultivo del arroz por inundación de los campos y la potencial contaminación de acuíferos y masas de agua receptoras por el drenaje de los mismos, hace necesario estudiar la toxicidad de los plaguicidas empleados, en una amplia variedad de organismos, ya que la evaluación de la toxicidad de un compuesto químico con una única especie solo refleja la sensibilidad del ensayo empleado y el uso de una única especie de organismo puede desestimar la toxicidad potencial de una determinada sustancia química en otros organismo; por esto se plantea la necesidad de usar una batería de ensayos (Muna *et al.*, 1995; Rojíčková-Padrtoová *et al.*, 1998; Fochtman *et al.*, 2000).

V.1.4. Efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos.

Generalmente, en los ecosistemas acuáticos existe una amplia variedad de contaminantes químicos y físicos que proceden de descargas industriales y domésticas, así como de mezclas de plaguicidas y otros compuestos que se utilizan en la zona agrícola circundante (Tarazona, 2001).

Se consideran contaminantes las sustancias que pueden producir una respuesta adversa (efecto) en un sistema biológico, dañando seriamente su estructura o función, o produciendo su muerte (Rand, 1995).

Los contaminantes se pueden clasificar de diferentes formas según su efecto (ejemplo: sistema inmune, sistema hormonal, mutación, cáncer), uso (ejemplo: plaguicidas), estado físico (ejemplo: líquido), química (ejemplo: hidrocarburos),

toxicidad potencial (ejemplo: extremadamente tóxico, muy tóxico) o impacto sobre los ecosistemas acuáticos (ejemplo: polución) (Tarazona, 2001).

Los ecosistemas acuáticos se adaptan mediante una gran variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos a situaciones de estrés como supone la presencia de sustancias tóxicas, sin implicaciones serias para la biota endémica; pero, cuando los contaminantes llegan a niveles superiores a la capacidad de asimilación de los ecosistemas aparecen importantes efectos en la supervivencia, desarrollo, reproducción o conducta (p.e. movilidad) de los organismos (Anderson y De Apollonia, 1988).

Podemos distinguir entre contaminantes naturales y contaminantes antrópicos. Los contaminantes naturales no son particularmente tóxicos, pero pueden causar problemas ambientales cuando se utilizan en grandes cantidades. Estos incluirían una variedad de elementos fertilizantes, como el nitrógeno, fósforo, etc., así como compuestos, o iones, como amoníaco, nitratos, nitritos, sulfatos, cloruros, etc.

Las propiedades químicas y toxicológicas de estos compuestos son muy diferentes y pueden variar según las especies acuáticas y las condiciones, como el pH y la temperatura (Alabaster y LLoyd, 1980; Hellawell, 1986; Furness y Rainbow, 1990; Newman y Mc.Intosh, 1991; Rand, 1995).

Independiente la propia toxicidad que pueden presentar los plaguicidas para la fauna acuática tanto en dosis subletales como crónicas, recientemente se han llevado a cabo estudios que demuestran que ciertos fungicidas azólicos pueden actuar como **disruptores del sistema endocrino e inmunitario** (Taxvig *et al.*, 2008) modulando y actuando de forma exógena sobre determinados receptores celulares. Recientemente algunos autores han puesto de manifiesto que algunos de los compuestos estudiados en este trabajo actúan como estrógenos una vez entran en el organismo provocando en último término la reversión sexual o la esterilidad de los machos de determinadas especies piscícolas. (Stahlschmidetallner *et al.*, 1997; Babín *et al.*, 2005; Laier *et al.*, 2006; Trösken *et al.*, 2006; Kinnenberg *et al.*, 2007)

En los sistemas acuáticos naturales, próximos a zonas agrícolas, es probable que ciertos plaguicidas estén presentes en concentraciones bajas pero persistentes; estos plaguicidas normalmente resisten la degradación biótica y abiótica, y causan efectos subletales (reproducción, desarrollo,...) en un gran número de especies del ecosistema. Existe una enorme variabilidad en la evolución, la biodisponibilidad y las características tóxicas entre y dentro de los diferentes grupos de contaminantes. Por eso, es importante conocer las características físicas y químicas, como solubilidad, estabilidad, vida media del compuesto, presión de vapor, etc. Ya que estos factores afectan la persistencia, la transformación, la biodisponibilidad y la evolución del compuesto químico en el agua (Rand, 1995).

V.2. JUSTIFICACIÓN

La superficie dedicada al cultivo de arroz en Europa (alrededor de 412.000 Ha; Ferrero, 1999), se encuentra situada en países mediterráneos, siendo España el segundo país productor de arroz en Europa con aproximadamente 100.000 Ha de arrozales (Cano *et al.*, 1999; Gómez de Barreda, 1999; Ramos *et al.*, 2000). La mayoría de estos arrozales forman parte del entorno de áreas de interés turístico, económico y ecológico como son La Albufera, El Delta del Ebro y El Parque Nacional de Doñana. La aplicación de plaguicidas, a lo largo del ciclo de cultivo del arroz ha contribuido a la contaminación de los canales que drenan hacia La Albufera (Carrasco *et al.*, 1987) y hacia el Ebro (Santos *et al.*, 1998). El uso de plaguicidas en estas áreas sensibles pueden provocar efectos muy adversos sobre la fauna que allí habita, como el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) o la anguila europea (*Anguilla anguilla*), ambas de gran importancia comercial (Pérez *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 1999). Todo ello explica la necesidad de evaluar el riesgo ecológico asociado al empleo de productos fitosanitarios que, en el caso del arroz, es de particular importancia por desarrollarse en zonas húmedas, zonas más vulnerables a la contaminación acuática.

Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar la toxicidad aguda, en exposición durante 24 horas, de los fungicidas azólicos empleados en el cultivo del arroz, tanto en forma de formulado comercial como de materia activa pura, sobre dos especies de invertebrados acuáticos, *Artemia franciscana*, de ambientes estuarinos y *Thamocephalus platyurus* de ambientes dulceacuícolas. Los datos de toxicidad para plaguicidas en organismos acuáticos son abundantes, sobre todo en aquellas especies de uso más difundido en los laboratorios, como *Daphnia magna*, *Danio rerio*, etc pero hay una escasez de datos sobre la toxicidad de plaguicidas sobre *Artemia franciscana* y *Thamocephalus platyurus*. La difusión de bioensayos basados en el uso de quistes de resistencia (efipias o cysts) ha popularizado el empleo de bioensayos de ecotoxicidad debido a su relativo bajo coste, la sencillez de manejo y la ventaja añadida de disponer del material biológico cuando se necesita sin la necesidad de mantener una colonia estable de organismos, además los animales obtenidos a partir de quistes de resistencia tienen la misma edad y estadio de desarrollo, genotipo y condición fisiológica. (Persoone *et al.*, 2000)

La Evaluación del Riesgo (ERA) constituye, en la actualidad, la mejor herramienta para el control de efectos adversos de compuestos potencialmente tóxicos medio ambiente. La UE ha incorporado dicha herramienta en las directivas que regulan la comercialización y autorización de sustancias químicas, productos fitosanitarios, medicamentos veterinarios y biocidas. En este sentido, la incorporación de bioensayos en estudios de campo permite de una forma efectiva el seguimiento de efectos ecotoxicológicos tal y como ponen de manifiesto la comparación de resultados de laboratorio y los obtenidos por una valoración *ex situ* de la toxicidad de muestras de arrozal (Sánchez, 2002).

Está claro que un balance entre análisis químicos, biológicos, toxicológicos y microbiológicos es siempre la mejor estrategia para generar la base de información más amplia sobre peligros ambientales.

El uso de *Artemia sp.* en ensayos de ecotoxicidad y análisis ambientales se desarrollo durante la década de 1970 a 1979, debido a su amplia distribución ambiental y sus buenas características de cría, tamaño aceptable para su manipulación y el amplio rango de salinidades que soporta han popularizado el uso de este organismo (Sam, 1993)

Artemia sp. es uno los organismos más usados en estudios de toxicidad. Hay muchas razones para su empleo, incluyendo la posibilidad de disponer de forma continuada de organismos en forma de *cysts* o quistes de resistencia, el bajo coste de adquisición de los organismos y su mantenimiento en laboratorio, necesidades de espacio mínimas y la facilidad de manejo y desarrollo de los ensayos (Zorrueles *et al.*, 1978). Sin embargo, estas buenas cualidades no se han visto reflejadas en un gran número de trabajos que estudien el efecto de sustancias toxicas en este organismo, como es el caso de los plaguicidas a diferencia de otros tóxicos como compuestos orgánicos (Sánchez-Fortún *et al.* 1996), metales pesados (MacRae y Pandey, 1991) o compuestos inorgánicos (Lee *et al.*, 1995).

Por otro lado, algunos estudios demuestran que *Thamnocephalus sp.* es un organismo mas sensible que *Daphnia magna*, el gran organismo de referencia en ecotoxicología, esta característica es muy importante ya que desde un punto de vista eminentemente proteccionista es necesario emplear organismos sensibles que den una señal de alerta temprana del efecto de los contaminantes sobre la microfauna (Sánchez-Fortún y Barahona, 2005; Brausch y Smith, 2007).

V.3. OBJETIVOS

Uno de los objetivos perseguidos en este trabajo es la caracterización ecotoxicológica de los fungicidas azólicos, aplicados en los arrozales lindantes con el Parque Natural de La Albufera de Valencia, para el control del hongo de la *P. oryzae*, como fase previa a la evaluación de los riesgos ambientales correspondientes al uso de dichos productos en esta zona.

Además, se ha caracterizado, ecotoxicológicamente, tanto la materia activa fungicida como sus formulaciones, con dos especies de microorganismos acuáticos habituales en diferentes ambientes, como son *Artemia franciscana*, propia de

ambientes salobres y salinos y *Thamnocephalus platyurus*, característica de ambientes dulceacuícolas. Estos ensayos permitirán aportar algunos datos útiles a la escasa bibliografía disponible sobre la toxicidad de estos compuestos, y realizar la Evaluación de los Riesgos Ambientales que puede tener la aplicación, en los arrozales, de fungicidas azólicos, sobre las comunidades de invertebrados acuáticos que se desarrollan en el lago de La Albufera de Valencia y en su zona de influencia marina.

V.4. MATERIAL Y MÉTODOS

Como se comentó anteriormente, para este estudio se han seleccionados dos organismos de referencia, diferenciados por su hábitat; porque, en el lago de La Albufera de Valencia, hay zonas donde la conductividad es elevada, debido a la influencia marina, y otras en que la salinidad es menor; siendo necesario evaluar el riesgo en ambas condiciones de salinidad y conductividad eléctrica. Las condiciones concretas del ensayo se exponen a continuación.

V.4.1. Compuestos químicos ensayados

La Tabla V.3 muestra las características de las formulaciones fungicidas comerciales empleadas en los ensayos de ecotoxicidad. Se indica la materia activa fungicida, presente en cada formulación, así como su riqueza en materia activa, y la dosis de aplicación, según establece la etiqueta del producto comercial.

Tabla V.3. Características de las formulaciones comerciales empleadas en los ensayos de toxicidad.

Formulación comercial	Materia activa	Dosis aplicación*
BIM	Triciclazol 75%	300 g/ha
OCTAGON	Procloraz 45%	0.5-1 L/ha
FOLICUR	Tebuconazol 25%	1 L/ha
BUMPER P	Procloraz 38% + Propiconazol 7.8%	1-1.25 L/ha
PUNCH	Carbendazima 12.5% + Flusilazol 25%	0.4-0.5 L/ha

*Dosis de aplicación recomendada en la etiqueta del producto comercial

En la Tabla V.4 se muestran las características de las materias activas de alta pureza, empleadas en los ensayos de ecotoxicidad.

Tabla V.4. Características de las materias activas empleadas en los ensayos de toxicidad

Compuesto	Tipo compuesto	Suministrador/ fabricante	Riqueza en Materia activa
Carbendazima	MA-PP	Riedel-de Haën (Germany)	99.1%
Procloraz	MA-PP	Riedel-de Haën (Germany)	99.5%
Tebuconazol	MA-PP	Riedel-de Haën (Germany)	99.4%
Flusilazol	MA-P	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.5%
Triciclazol	MA-PT	Dow Agro Sciences	85%

MA: Materia Activa

PP: Producto Puro

PT: Producto Técnico

V.4.2. Material biológico empleado para los ensayos de toxicidad

El material biológico empleado en este trabajo se obtuvo a partir de quistes de resistencia de *Artemia franciscana* y *Thamnocephalus platyurus*, suministrados por la empresa Microbiotests Inc. (Ghent, Bélgica). El empleo de este tipo de material, en forma de huevos de resistencia, permitió obtener organismos según las necesidades del estudio, optimizando los recursos del laboratorio, ya que no es necesario tener

una colonia estable de organismos desarrollados. Los quistes de resistencia se almacenaron a 4° C y en oscuridad hasta su uso.

V.4.3. Condiciones de ensayo

V.4.3.1. Ensayo de toxicidad con *Thamnocephalus platyurus*

La incubación los de quistes de tamnocéfalos se inició en las 24 horas previas a la realización de los ensayos, sumergiendo los quistes en el medio de cultivo descrito por APHA-AWWA-WPCF (1992) (cuya composición se expone en la Tabla V.5) diluido, para favorecer la correcta hidratación por reducción de la presión osmótica incubándose a 25±1° C durante 20-22 horas, bajo iluminación constante a 4000 lux, en una cámara bioclimática Sanyo MLR-310. Tras esta primera incubación, los neonatos fueron traspasados a una segunda placa con medio de cultivo estándar atemperado y oxigenado, incubándose durante 4 horas más.

Tabla V.5. Composición del medio de cultivo para el ensayo con *Thamnocephalus platyurus*.

Reactivo	Peso (g) (para 2L de medio)
MgSO ₄	0.24 MgSO ₄
NaHCO ₃	0.384 NaHCO ₃
KCl	0.016 KCl
CaSO ₄ ·2H ₂ O	2.4 CaSO ₄ ·2H ₂ O

V.4.3.2. Ensayo de toxicidad con *Artemia franciscana*

Los quistes o nauplios de *Artemia franciscana* fueron suministrados por la empresa Microbiotets, Inc. (Ghent, Bélgica). Para la eclosión de los quistes se siguió el procedimiento descrito por Persoone *et al.* (1989). Los quistes fueron hidratados durante dos horas en medio marino diluido al 10% y, a continuación, se enjuagaron vigorosamente en medio de cultivo marino estándar obtenido a partir de agua de mar sintética (Instant Ocean™) y se depositaron en vasos de precipitado de 200 mL de capacidad, el medio marino fue atemperado y oxigenado, durante las 24h previas a la experiencia. Los quistes se incubaron a una temperatura de 22±1° C con iluminación de 4000 lux, suministrada por tubos de luz tipo día, de forma constante, en una cámara bioclimática Sanyo MLR-310, hasta su eclosión tras 48 horas de incubación. Los nauplios empleados en los ensayos deben pertenecer al segundo y

tercer estadio de crecimiento, lo que se corresponde con las larvas de 48h, estos estadios permiten todavía que el test de toxicidad se realice sin necesidad de alimentar a los individuos (Sleet y Brendel, 1985).

Para la realización de este ensayo se ha seguido el procedimiento descrito por Vanhaecke y Persoone (1981) con ligeras modificaciones.

V.4.4. Preparación de las diluciones de tóxico y desarrollo del ensayo

Se prepararon la serie de diluciones de los diferentes fungicidas y sus formulaciones, de acuerdo con la metodología establecida por la U.S.E.P.A. (1985).

Para la preparación de las distintas diluciones, se partió de una disolución madre con 300 mg/L de materia activa, preparada con medio marino estándar o medio continental estándar, según el organismo ensayado. Debido a la baja solubilidad de los compuestos, se predisolvieron en un volumen de 1 mL de acetona/L de solución madre y, para asegurar la disolución completa de los plaguicidas, las muestras se sonicaron, durante 5 minutos, en un baño de ultrasonidos, a 45° C.

Debido a la baja solubilidad de algunos fungicidas, en ocasiones fue necesario utilizar un disolvente, para favorecer la solubilidad del tóxico, al preparar la solución madre, desde la cual se prepararon las soluciones de trabajo. El disolvente empleado fue acetona en una proporción de 2 mL acetona/L de solución, cuando fue necesario el uso de acetona también se realizó un control con el disolvente, para comprobar su influencia sobre la mortalidad. En ningún caso se apreciaron diferencias entre el control con disolvente y el medio control. Para determinar el rango de concentraciones se realizaron pruebas previas con las siguientes concentraciones nominales de fungicida: 0, 25, 50, 100, 200 y 300 mg/L.

Una vez realizadas las pruebas para establecer el rango adecuado de concentraciones, se realizaron los ensayos con las concentraciones adecuadas definitivas. Cada pocillo contenía un volumen total de 2 mL, de medio marino

estándar, en el caso de los grupos control, y una solución de agua marina más la cantidad correspondiente del fungicida a ensayar.

Ambos ensayos se realizaron en placas desechables de poliestireno, con 24 pocillos, suministradas por Nunc (Ref: 142485). En los ensayos previos se utilizaron 5 concentraciones distintas y 3 réplicas de cada tóxico, preparadas a partir de una solución madre de 300 mg/L, más un control exento de tóxico, y un control con disolvente, para comprobar la no existencia de efectos, por el empleo de la acetona en la preparación de la disolución madre. En total, se realizaron 10 réplicas para cada fungicida.

En resumen, se realizaron un total de 10 ensayos completos e independientes por cada compuesto a ensayar a lo largo de 4 meses; para reducir los efectos derivados de la manipulación y evitar errores sistemáticos, la solución madre de cada compuesto a partir de la que se realizaron las diluciones de trabajo, se prepararon de nuevo cada 3 ensayos completos e independientes

V.4.5. Sembrado y llenado de la placa

Utilizando una lupa binocular, de bajo aumento, con magnificación de 10-12x, se transfirieron, con una micropipeta *Pasteur*, unas 50 larvas, desde la placa de *Petri* de cultivo a cada uno de los pocillos de cada concentración (fila 4) y de éste, 10 larvas a los otros tres Pocillos de la columna control (1) y columnas de dilución del tóxico (2 a 6). Se debe prestar atención, durante esta operación, en minimizar la transferencia de medio a los pocillos test provocando una sobredilución de la muestra.

Tras sumergir los nauplios en el medio, en cada pocillo se colocaron unas pequeñas lentejas de alcohol cetílico (1-Hexadecanol), a fin de romper la tensión superficial en las paredes y superficie del pocillo, de esta forma se evita que los nauplios queden atrapados en la superficie y no puedan quedar completamente sumergidos en el medio, hecho este que interferiría en los resultados, al tiempo que podría, incluso, ocasionarles la muerte; el alcohol cetílico no es tóxico para los nauplios y es usado comúnmente en este tipo de bioensayos (Cotou, 1993).

V.4.6. Incubación de la placa y lectura de resultados

Se colocó una banda de Parafilm[®] sobre los pocillos, para evitar la evaporación del medio, se tapó la placa y envolvió con papel de aluminio, para mantener las condiciones de oscuridad, incubándose en la cámara bioclimática, a 22° C.

V.4.7. Lectura de placas y cálculo de la CE₅₀

Se consideró válido el test, cuando la mortalidad en ambos controles, blanco y solvente, no excedió al 10% (OECD, 2000).

A las 24 del inicio del ensayo, se registró la proporción de organismos inmóviles, en cada dilución y controles. Se consideró, como criterio de muerte, la ausencia de movimiento (inmovilidad), al observar los individuos durante 15 segundos, exponiendo los frascos a la luz, o al hacerlos girar (Buikema *et al.*, 1980)

El cálculo de la CE₅₀ se realizó tras la lectura de mortalidades, a las 24 horas de exposición; para ello se empleó el método descrito por Wilcoxon y Liechfield (1949), implementado por el software de análisis ecotoxicológico Toxcalc 5.3 (TideSoft, California. USA).

V.4.8. Test de referencia

La hoja de características suministradas con los viales de material biológico, recomienda realizar, cada 5 o 10 bioensayos, un control positivo para comprobar la respuesta homogénea y la sensibilidad de los nauplios. El tests de referencia se realizó con una sustancia química de referencia (dicromato potásico, K₂Cr₂O₇). Tras realizar el ensayo se comprobó que la LC_{50-24h} calculada, se encontraba dentro del rango fijado por el fabricante.

V.4.9. Análisis estadístico de los ensayos de toxicidad

Para el cálculo de la LC₅₀ se empleó el programa Toxcalc 5.0 (Tidepool). Posteriormente se analizaron las diferencias significativas, entre cada grupo expuesto, por medio de un análisis de la varianza (ANOVA), seguido de una análisis *post hoc*, mediante un contraste con el test de Dun's, considerando las diferencias significativas, con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. Para este estudio se utilizó el paquete estadístico SigmaStat 3.5 (SYSTAT Inc.).

V.5. RESULTADOS

V.5.1. Ensayos con *Artemia franciscana* y los compuestos fungicidas y las formulaciones comerciales utilizadas

En la Tabla V.6 se muestran los resultados obtenidos tras la realización de los bioensayos de toxicidad con *Artemia franciscana*. Se indica la Concentración Efectiva 50 (EC₅₀), a las 24 horas, incluyendo los Intervalos de Confianza al 95%.

Tabla V.6. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*.

Tóxico ensayado		EC _{50-24h} (mg/L)	I.C. 95% _{024h} (mg/L)
Formulaciones	Folicur®	11.7	11.1-12.3
	Octagon®	34.4	32.3-36.4
	Punch®	92.2	88.1-96.3
	Bim®	210	193.9-213.2
Materias Activas Puras	Carbendazima	109.3	99.1-119.5
	Flusilazol	46.4	41.4-51.4
	Procloraz	40.7	36.4-45.1
	Tebuconazol	36.5	31.8-41.1
	Triciclazol	24.1	21.7-26.6

EC₅₀: Concentración Efectiva 50 en el tiempo indicado

I.C. 95%: Intervalo de Confianza con una probabilidad del 95%

Al considerar los resultados expuestos en la Tabla V.6, generalmente se observa que la toxicidad de las formulaciones comerciales es mayor que la toxicidad

de la materia activa pura correspondiente al producto formulado. El único formulado que muestra una toxicidad menor que la materia activa pura es el Bim®, con una EC_{50-24h} de 210 mg/L, frente a una $EC_{50-24h} = 24.1$ mg/L del triciclazol. El formulado Folicur® fue 3.1 veces más tóxico que tebuconazol, su materia activa. El formulado Octagon® fue ligeramente más tóxico que procloraz (x1.2 veces). El caso del formulado comercial Punch® es especial ya que está constituido por dos materias activas, carbendazima y flusilazol, Si comparamos las EC_{50} vemos que el formulado es ligeramente más tóxico que carbendazima (x1.2 veces), en cambio es menos tóxico si comparamos su EC_{50} con la obtenida con la otra materia activa presente en el formulado, flusilazol, siendo ésta más tóxica que el formulado, concretamente flusilazol resultó ser 2 veces más tóxico. Es este uno de los problemas a la hora de establecer umbrales de seguridad, la interacción de las diferentes materias activas

Si atendemos a la riqueza en materia activa de cada formulado observamos que el Bim® presenta un 75% de triciclazol, por lo que cabría esperar una toxicidad similar, sin embargo la toxicidad del formulado, como ya se ha comentado es 8.75 veces menor que el triciclazol. Esto podría ser debido a una menor biodisponibilidad del plaguicida a causa de los componentes del formulado en un medio salino.

Las formulaciones fungicidas Octagon® y Punch® presentan una toxicidad similar a la de la materia activa que contienen. La formulación Octagon® contiene un 45% de Procloraz, por lo que cabría esperar que su toxicidad fuera menor que la de la materia activa, y así se ha comprobado; aunque al obtener una EC_{50-24h} similar, también puede indicar que alguno de los coadyuvantes presentes puede ser altamente tóxico para la fauna acuática.

Cabe señalar que, generalmente, los agentes tensoactivos (emulgentes, mojantes o dispersantes) suelen tener una toxicidad semejante o superior a algunos plaguicidas.

Sin embargo, el caso más llamativo se presentó con la formulación fungicida Punch®, cuya toxicidad esperada a partir de su composición (12.5% de carbendazima y 25% de flusilazol) debería ser mucho menor debido a la menor presencia de materia activa, y la toxicidad encontrada es mayor que la de

carbendazima; esto puede deberse a un efecto sinérgico de ambas materias activas o a la propia toxicidad de los dispersantes presentes, ya que Punch® es un aceite dispersable en agua.

Como resumen, podemos establecer un orden decreciente de toxicidad de los compuestos ensayados con *Artemia franciscana*, tal como se expone en la Tabla V.7

Tabla V.7. EC_{50-24h} de las sustancias analizadas ordenadas por orden decreciente en su toxicidad para *A. franciscana*

Materias activas	EC _{50-24h} (mg/L)	Formulaciones	EC _{50-24h} (mg/L)
Triciclazol	24.1	Folicur	11.7
Tebuconazol	36.5	Octagon	34.4
Procloraz	40.7	Punch	92.2
Flusilazol	46.4	Bim	210
Carbendazima	109		

En la Figura V.1, se muestran los resultados del ANOVA y del análisis “*pos hoc*” con el test de “Dun’s”, llevado a cabo con los resultados de las EC₅₀ de los diferentes compuestos ensayados con *A. franciscana*. Los asteriscos en la intersección de cada columna indican diferencias significativas en la toxicidad entre los dos compuestos comparados.

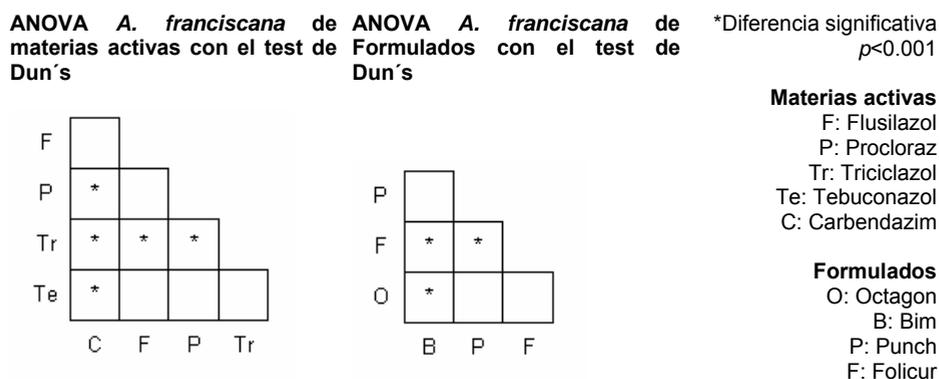


Figura V.1. Estudio estadístico de la toxicidad de los fungicidas en *A. franciscana*. Los asteriscos (*) incluidos en la intersección de cada columna indican diferencias significativas en la toxicidad entre los dos compuestos comparados.

Aunque la toxicidad con *A. franciscana* fue diferente, la toxicidad, tanto de materias activas como formulados fue menor, si la comparamos con los datos obtenidos de las EC₅₀ con *T. platyurus*.

Finalmente la Figura V.3 muestra la toxicidad de obtenida en los estudios realizados, indicando la EC_{50-24h}, de forma comparativa entre los 2 organismos empleados. Las barras muestran los intervalos de confianza al 95%.

V.5.2. Ensayos con *Thamnocephalus platyurus* en los compuestos plaguicidas y formulados comerciales

En la Tabla V.8 se muestran los resultados obtenidos tras la realización de los bioensayos de toxicidad con *Thamnocephalus platyurus* se indica la Concentración Efectiva 50 (EC₅₀) a las 24 horas, incluyendo los Intervalos de Confianza al 95%.

Tabla V.8. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Thamnocephalus platyurus*

Tóxico ensayado		EC _{50-24h} (mg/L)	I.C. 95% _{0-24h} (mg/L)
Formulado	Folicur®	6.8	6.1-7.5
	Octagon®	16.7	15.1-18.3
	Punch®	31.3	27.1-35.5
	Bim®	125	119.6-130.4
Materia Activa Pura	Carbendazima	1.5	1.1-2.1
	Flusilazol	8.6	7.9-9.3
	Procloraz	12.9	11.5-14.3
	Tebuconazol	9.5	8.3-10.7
	Triciclazol	84.8	79.2-90.3

EC₅₀: Concentración Efectiva 50 en el tiempo indicado

I.C. 95%: Intervalo de Confianza con una probabilidad del 95%

Podemos comprobar al comparar las EC₅₀ a las 24 horas que, a excepción de Tebuconazol, las materias activas ensayadas con *T. platyurus* resultaron ser más tóxicas que sus respectivos formulados. Carbendazima fue 20.8 veces más toxico que el formulado Punch®, el resto de formulados obtuvieron una EC50 similar a la de las materias activas, triciclazol fue 1.5 veces mas tóxica que Bim® mientras

Procloraz fue 1.3 veces que su formulado Octagon®. Como se ha comentado anteriormente la excepción fue el formulado Folicur® fue más tóxico (x1.4 veces) que el compuesto tebuconazol.

En la Tabla V.9 se exponen los valores de EC_{50-24h}, ordenados de forma decreciente en cuanto a la toxicidad, para ambos organismos ensayados.

Tabla V.9. EC_{50-24h} de las sustancias analizadas ordenadas por orden decreciente en su toxicidad para *T. platyurus*

Materias activas	EC _{50-24h} (p.p.m)	Formulados	EC _{50-24h} (p.p.m)
Carbendazima	1.5	Folicur	6.8
Flusilazol	8.6	Octagon	16.7
Tebuconazol	9.5	Punch	31.3
Procloraz	12.9	Bim	125
Triciclazol	84.8		

En la Figura V.2, se muestran los resultados del ANOVA y del análisis “*pos hoc*” con el test de “Dun’s”, llevado a cabo con los resultados de las EC₅₀ de los diferentes compuestos ensayados, con *T. platyurus*. Los asteriscos (*) incluidos en la intersección de cada columna indica una diferencia significativa en la toxicidad de los dos compuestos comparados.

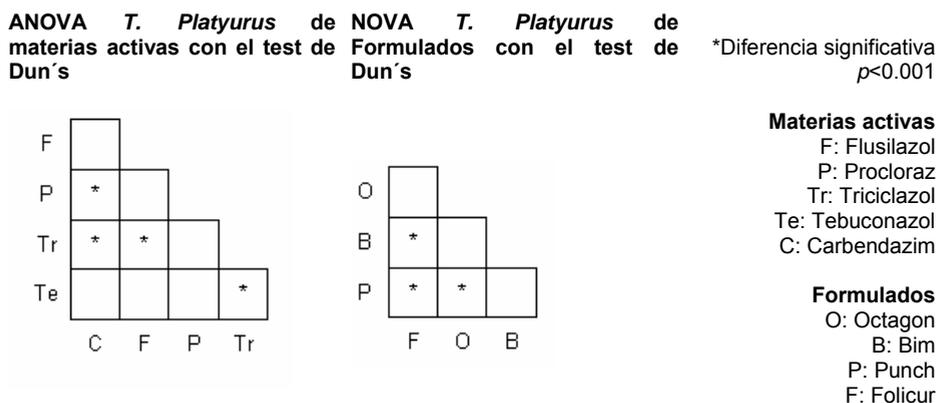


Figura V.2. ANOVA de las EC₅₀ de los ensayos realizados con *T. platyurus*

Los astediscos (*) incluidos en la intersección de cada columna indican diferencias significativas en la toxicidad entre los dos compuestos comparados

Los valores de EC_{50} obtenidos en los ensayos con *T. platyurus* muestran, que, tanto las materias activas fungicidas, como sus formulaciones presentan una mayor toxicidad que *Artemia franciscana* a excepción del triciclazol. La Tabla V.10 muestra de manera resumida los valores de LC_{50-24h} y sus límites de confianza al 95%, de cada compuesto en los dos organismos ensayados.

Tabla V.10. Valores de LC_{50-24h} para materias activas y sus formulados en *A.franciscana* y *T. platyurus*

	<i>T. platyurus</i>	<i>A. franciscana</i>
	EC_{50-24h} (mg/L) I.C. 95%	EC_{50-24h} (mg/L) I.C. 95%
Folicur®	6.8 6.1-7.5	11.7 11.1-12.3
Octagon®	16.7 15.1-18.3	34.4 32.3-36.4
Punch®	31.3 27.1-35.5	92.2 88.1-96.3
Bim®	125 119.6-130.4	210 193.9-213.2
Carbendazima	1.5 1.1-2.1	109.3 99.1-119.5
Flusilazol	8.6 7.9-9.3	46.4 41.4-51.4
Procloraz	12.9 11.5-14.3	40.7 36.4-45.1
Tebuconazol	9.5 8.3-10.7	36.5 31.8-41.1
Triciclazol	84.8 79.2-90.3	24.1 21.7-26.6

Como resumen y a fin de facilitar la interpretación de los resultados obtenidos, la Figura V.3 muestra los valores de EC_{50-24h} (los bigotes de las barras indican el I.C. al 95%) de los compuestos estudiados para ambos organismos.

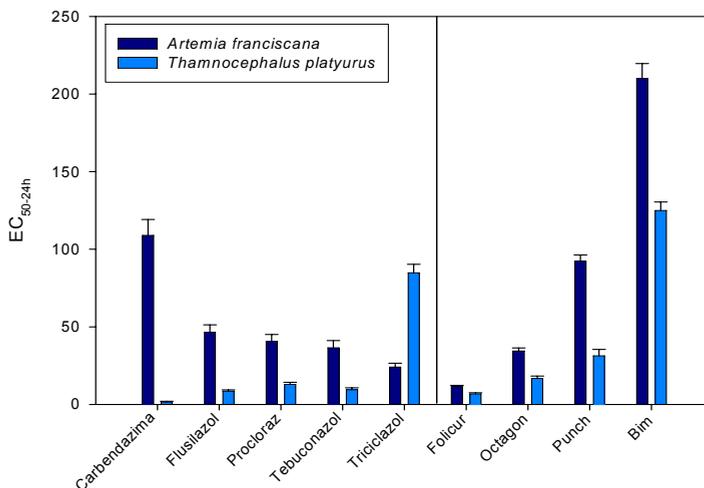


Figura V.3. Comparación de EC_{50-24h} para *Artemia franciscana* y *Thamnocephalus platyurus* de las materias activas y formulados estudiados.

La Figura V.4 muestra la relación entre las toxicidades halladas para ambos organismos, como podemos comprobar la regresión realizada presenta un ajuste aceptable ($R^2=0.75$) mostrando que hay una relación directa y proporcional entre las LC_{50-24h} (pendiente de la recta de regresión positiva). La toxicidad es mayor en *T. platyurus* que en *A. franciscana*, además de mantener una proporcionalidad en los valores.

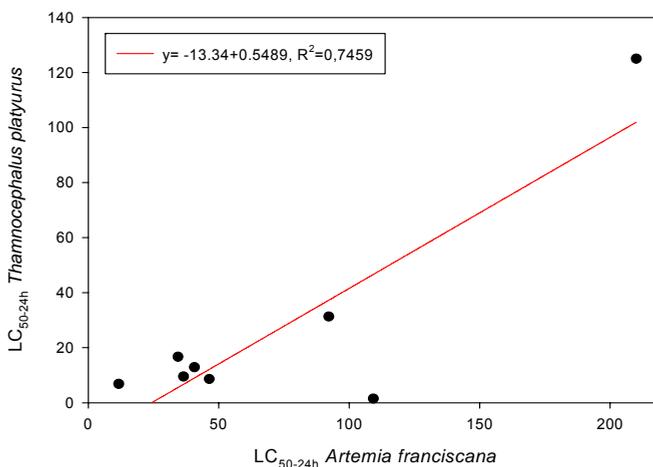


Figura V.4. Relación entre la toxicidad hallada para *T. platyurus* y *A. franciscana*

La Figura V.5 muestra la relación entre las toxicidades de los formulados comerciales y sus materias activas constituyentes. Vemos en el caso de *A. franciscana* la relación es inversa, la toxicidad es mayor en el formulado que en la materia activa, mientras que en el caso de *T. platyurus* es al contrario, la toxicidad es mayor en la materia activa que en el formulado comercial.

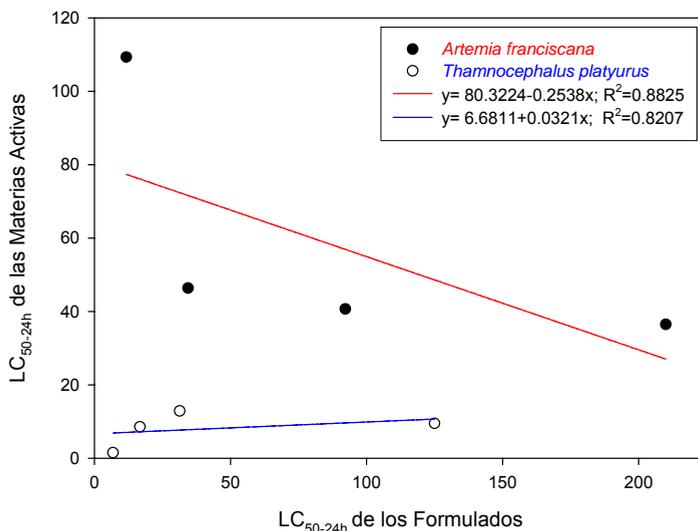


Figura V.5. Relaciones de toxicidad entre los 2 grupos de compuestos: Materias activas y formulados comerciales

V.6. DISCUSIÓN

La comparación de los resultados de los ensayos, realizados con ambos organismos, indican una mayor sensibilidad de *Thamnocephalus platyurus* con respecto a *Artemia franciscana*. Este hecho ya ha sido constatado por varios autores; así, los trabajos llevados a cabo por Sánchez-Fortún y Barahona (2005), que estudiaron el efecto de 3 piretroides sobre *T. platyurus*, *Brachionus calyciflorus*, *A. franciscana* y *Brachionus plicatilis*, mostraron que la toxicidad aguda de la permetrina, resmetrina y cypermetrina, depende del tipo de organismo empleado para evaluar su toxicidad y que los organismos de medio continental son más sensibles, a estos insecticidas piretroides, que los organismos de medio salobre o

salino ensayados. Este estudio mostró la mayor resistencia de los organismos de medio marino frente a los de medio continental.

Ferrando y Andreu-Moliner (1991) llevaron a cabo un estudio de toxicidad con dos insecticidas, empleados en las proximidades de la Albufera de Valencia, sobre 2 especies de rotíferos, *Brachionus plicatilis* y *Brachionus calyciflorus*. En este estudio se comprobó que la toxicidad de triclofon y Fenitrotion fue 5.29 y 1.29 veces mayor para *B. Calyciflorus*, que para *B. plicatilis*, respectivamente, confirmando la menor acción tóxica en medio marino que en medio continental.

Esta mayor sensibilidad, de los organismos de medio continental respecto a los de medio estuarino o marino, puede estar influenciada por las características físico-químicas del medio, como el pH, la conductividad o la salinidad, (Inman y Lockwood, 1977). Por otro lado, esta menor sensibilidad a los plaguicidas, que presentan ciertos organismos marinos o estuarinos, puede deberse a las características fisiológicas propias de estas especies, que como en el caso de la *Artemia* sp. y *B. Plicatilis*, al ser organismos eurihalinos, poseen una mayor capacidad osmoreguladora que contribuye a una mayor resistencia a contaminantes (Sánchez-Fortún y Barahona, 2005).

El uso de *Thamncepahlus platyurus*, como organismo de referencia en bioensayos de ecotoxicidad, está cada vez mas difundido y aceptado, entre la comunidad científica; en poco tiempo su uso se ha popularizado y son cada vez más los trabajos que se publican empleando este organismo en ensayos de rutina o en monitorización ambiental (Persoone *et al.*, 2000).

Como podemos observar en la Tabla V.11, la sensibilidad de *Thmanocephalus platyurus* es mucho mayor que la de *D. magna*; en esta misma Tabla se muestran los valores de LC₅₀ encontrados en este trabajo para tamnocéfalos, con los indicados por Tomlin (2000) para *D. magna* y otros organismos.

Tabla V.11. Resumen de valores de toxicidad calculados para diferentes organismos acuáticos, para cada uno de las materias activas estudiadas

Compuesto	Microcústáceos		Algas		Peces		
	<i>T.p.</i>	<i>D.m.</i>	<i>S.s.</i>	<i>S.c.</i>	<i>C.c.</i>	<i>S.t.</i>	Bf
	LC _{50-24h}	LC _{50-48h}	LC _{50-72h}	LC _{50-72h}	LC ₅₀₋₉₆	LC _{50-96h}	LC _{50-96h}
Carbendazima	0.9	0.13-0.22	419	1.3	0.61	0.83	-
Flusilazol	1.67	3.4	-	-	-	1.2	1.7
Procloraz	11,2	4.3	-	0.1	-	1.5	2.2
Tebuconazol	4.5	4.2	-	4.01	-	4.4	5.7
Triciclazol	55.6	>20	-	-	-	7.3	16

*Tabla elaborada a partir de datos obtenidos en este trabajo y los recopilados por Tomlin, 2002

T.p.: *Thamnocephalus platyurus*

S.c.: *Selenastrum capricornutum*

D.m.: *Daphnia magna*

C.c.: *Ciprinius Carpio*

S.s.: *Scenedesmus subspicatus*

S.t.: *Salmo Trutta*

Bf.: Bluegill fish

De los datos expuestos en la Tabla V.11, puede deducirse que la sensibilidad de *T. platyurus* es mayor que la de los peces y similar a *D. magna*. Los datos EC₅₀ hallados en la bibliografía indican que *T. platyurus* y el resto de organismos superiores. La Figura V.6 muestra la regresión entre los datos de *T. platyurus* y las EC₅₀ de *Daphnia magna*, *Salmo trutta* y Bluegill fish.

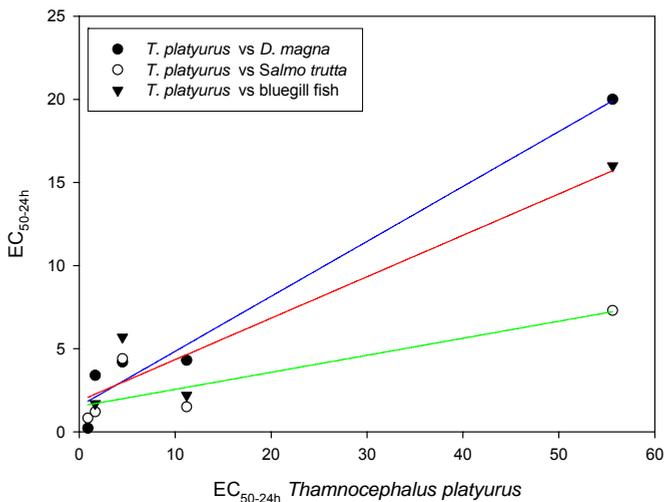


Figura V.6. Regresión entre las EC₅₀ de *Thamnocephalus platyurus* y las EC₅₀ de *Daphnia magna*, *Salmo trutta* y Bluegill fish.

Como puede observarse en la Figura V.7, existe una correlación suficiente, en todos los casos, para establecer un modelo predictivo de toxicidad para otros organismos, a partir de los datos obtenidos para *T. Platyurus*. Esto permitiría, *a priori*, estimar la toxicidad de forma rápida, con el consiguiente ahorro en el coste del desarrollo de los ensayos en trabajos rutinarios o a la hora de valorar estudios previos.

V.7. CONCLUSIONES

1. En los ensayos de toxicidad realizados se ha comprobado que *Thamnocephalus platyurus* es más sensible a los fungicidas ensayados que *Artemia franciscana*. No es posible establecer, de antemano, un patrón de toxicidad entre los formulados y las materias activas ya que el efecto es diferente según el organismo ensayado.

2. La diferencia de sensibilidad entre los distintos organismos estudiados, frente a los tóxicos, justifica la necesidad de emplear siempre, al menos, dos especies de organismos y preferentemente de diferentes niveles tróficos (Pereira *et al.*, 2000). En nuestro estudio, aunque artemia y tamnocéfalos son microcrustáceos y pertenecen al mismo escalón trófico (consumidores), ambos tienen ambiente de distribución diferenciados; mientras *Artemia* se encuentra en entornos salino-salobres, *D. magna* se desarrolla en aguas dulces.

3. Los valores de las EC_{50} calculadas son del mismo orden de magnitud que los indicados en la bibliografía, para otros organismos; sin embargo la mayor sensibilidad que presenta *T. platyurus* y la buena correlación con *A. franciscana*, lo convierte en un ensayo ecotoxicológico alternativo a los tradicionales tests realizados con *D. magna*, permitiendo establecer condiciones más restrictivas y seguras para el uso de estas materias activas y sus formulaciones aplicadas en el campo.

**VI. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL FACTOR DE
BIOCONCENTRACIÓN (BCF) EN PECES Y MODELIZACIÓN DEL
PROCESO CON EL MODELO DE FUGACIDAD DE MACKAY (1991)**

VI.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se indicó anteriormente (capítulo I, Introducción), el Parque Natural de La Albufera de Valencia está considerado como “Zona de Especial Protección para las Aves” (ZEPA) y está inscrita en la lista de humedales de la Convención Ramsar y en la Red “Natura 2000” del Ministerio de Medio Ambiente. Además, esta zona húmeda está rodeada por 21000 ha de arrozales, en los que se produjo un gran desarrollo del hongo *Pyricularia oryzae*, en los años 2001 a 2003.

Para controlar dicha plaga, se han utilizado diversos fungicidas azólicos, cuyos riesgos ambientales, para zonas húmedas, no están totalmente definidos; por lo que, es necesario determinar algunos parámetros, utilizados en la evaluación de riesgos ambientales de estos plaguicidas, como son el Factor de Bioconcentración (BCF) y los tiempos medios de degradación, disipación o eliminación de estos compuestos químicos.

Además, el estudio de los riesgos ambientales permitirá establecer estrategias para el manejo seguro de la pesca, cuyo destino final es el consumo humano en zonas próximas a las áreas de cultivo del arroz que utilizan los fungicidas azólicos, como es el caso del Parque Natural de la Albufera de Valencia, donde se pesca y consume una amplia variedad de peces como la lisa-múgil (*Mugil cephalus*) o la anguila europea (*Anguilla anguilla*), cuyo descenso en las poblaciones salvajes de toda Europa ha llevado a la aplicación de un programa de preservación de esta especie en el ámbito de la UE (COM(2003) 573 final).

La Bioconcentración se define como el aumento de la concentración de un compuesto o elemento químico, en un organismo, respecto a la concentración del mismo en el medio. El Factor de Bioconcentración (BCF) de un compuesto, en un organismo dado, es un valor numérico que expresa el reparto o partición del compuesto entre el organismo expuesto y el medio. En estado de equilibrio químico, este coeficiente es el cociente entre la concentración de plaguicida en el organismo y la concentración de plaguicida en el medio.

Cuando los organismos ensayados son peces, el valor del BCF permite estimar la ingesta diaria de plaguicida mediante el consumo diario del pescado y

también permite establecer límites de seguridad para la concentración de plaguicida en el agua. Teóricamente, el BCF en estado de equilibrio químico puede determinarse por el límite del cociente entre la concentración de la sustancia de estudio en el organismo y la concentración de la misma en el medio. Un procedimiento experimental clásico, empleado para calcular el BCF de un plaguicida en peces, consiste en exponer un grupo de peces a una concentración constante del plaguicida que se quiere estudiar, en el medio que alberga a los peces, hasta que se produzca el estado de equilibrio de concentraciones de plaguicida entre el pez y el agua. A esta primera parte de este procedimiento se le considera la fase de acumulación. Una vez conseguida la fase de equilibrio, los peces se pasan a otro sistema con agua libre del tóxico, determinando la concentración de plaguicida, tanto en los peces como en el agua, durante esta fase de eliminación del compuesto tóxico.

Los valores observados en ambas fases, permiten calcular el valor de BCF mediante el cociente entre la tasa de acumulación y la tasa de eliminación. Una dificultad de este procedimiento, es mantener constante la concentración de plaguicida en el agua a lo largo de la fase de acumulación (OECD, 1996). Además, en la naturaleza, las concentraciones de plaguicida no son constantes, a lo largo del tiempo; por lo que, los experimentos y modelos desarrollados en sistemas en los que hay una degradación del contaminante en el medio acuático son más realistas.

Según Konwick *et al.* (2006) los plaguicidas de uso actual (CUP, *Current-use pesticides*), como los fungicidas azólicos, se pueden definir como los plaguicidas modernos, desarrollados por síntesis química, y que están autorizados para su uso en agricultura y jardinería. Estos compuestos son, generalmente, menos persistentes, con una vida media y una bioacumulación menor que los plaguicidas organoclorados, a los cuales han reemplazado.

Los resultados obtenidos en la determinación analítica de las concentraciones de fungicidas azólicos, realizada en las aguas procedentes del Lago de la Albufera y de los canales afluyentes, que se han expuesto en el capítulo IV, de la presente memoria de tesis doctoral, demuestran que el tebuconazol está presente en casi un 50% las muestras analizadas. Esta reiteración, de la presencia

del tebuconazol en las aguas del lago y de los canales, y los niveles alcanzados en estas aguas, indican un uso frecuente de este fungicida, por los agricultores arroceros de la zona, y la necesidad de conocer los procesos de bioacumulación que pueden producirse en las especies piscícolas, con el fin de establecer el riesgo que el uso de este compuesto y de otros fungicidas azólicos, puede tener para estos organismos.

Además, se ha comprobado que la actividad plaguicida de los fungicidas azólicos, se debe principalmente a su acción sobre el citocromo P-450, inhibiendo la ruta de biosíntesis del ergosterol, en este caso en *Pyricularia oryzae* (Roberts y Hutson, 1999); sin embargo, la actividad biológica, de estos compuestos, no se centra única y exclusivamente en la inhibición de determinadas rutas metabólicas en hongos; ya que otros estudios llevados a cabo por Levine *et al.* (1999) y Hegelund *et al.* (2004), demuestran que los compuestos azólicos pueden interferir en las rutas metabólicas, mediadas por esteroides, de otros xenobióticos; esta alteración en el metabolismo de xenobióticos puede conllevar una mayor sensibilidad a los tóxicos y favorecer la bioacumulación de los mismos al no poder metabolizar y eliminar los xenobióticos de una forma correcta (Levine *et al.*, 1997). Este mismo autor concluye que es importante comprender el comportamiento ambiental y la toxicocinética de estos fungicidas en peces, dada su capacidad para potenciar la acumulación y toxicidad de otros contaminantes.

Por otro parte, dado que otros fungicidas azólicos, también empleados en los arrozales próximos al Lago, tienen propiedades químico-físicas similares a las del tebuconazol, se ha planteado un estudio de la bioconcentración de estos compuestos, mediante la aplicación del modelo de fugacidad de Mackay (1991). De esta forma, la coincidencia del valor del BCF del tebuconazol en peces, obtenido en el estudio experimental, con el valor obtenido con el modelo de simulación de Macakay (1991), nos indicaría la validez de este modelo y de su aplicación a otros fungicidas con propiedades similares.

VI.2. OBJETIVOS

El objetivo principal, de esta parte del trabajo, fue determinar el Factor de Bioconcentración (BCF) del tebuconazol en el Pez cebra (*Danio rerio*); así como la vida media del tebuconazol en agua, el tiempo en el cual la concentración del tóxico en el organismo alcanza un valor máximo, el tiempo de eliminación del 50% de la concentración máxima y el tiempo de eliminación del 95% de la concentración máxima del tebuconazol, en un organismo modelo en estudios ecotoxicológicos, como es el pez cebra (*Danio rerio*) (Kari *et al.*, 2007).

Ademas, tambien nos hemos planteado comprobar, mediante el modelo de fugacidad desarrollado por Mackay (1991), la posibilidad de realizar una extrapolación de los datos de bioacumulación, obtenidos con el tebuconazol, a otros compuestos de características similares, también empleados en el control de *Pyricularia oryzae*, en los arrozales próximos al lago de La Albufera de Valencia.

VI.3. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.3.1. Compuestos químicos y reactivos empleados

El tebuconazol (riqueza 95%), empleado en el ensayo de bioacumulación, fue suministrado por la empresa DowAgro Chemicals, y es el “producto técnico” utilizado en la elaboración de sus formulaciones comerciales. El patrón analítico de tebuconazol, con una riqueza del 99.5%, fue suministrado por la empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania), como material de referencia. Los disolventes (acetona, acetonitrilo, metanol, diclorometano, *n*-hexano) y el sulfato sódico anhidro, eran de calidad “para análisis de residuos de plaguicidas” y fueron suministrados por Scharlau, S.A. (Barcelona, Spain). El agua, empleada en las extracciones para el análisis de los fungicidas, fue purificada en un sistema Milli-Q Plus® (18.2 MΩ·cm⁻¹). Los cartuchos de polipropileno SPE de 6 mL de capacidad, rellenos de 500 mg de fase C-18, fueron suministrados por J.T. Baker. (Barcelona, España).

VI.3.2. Diseño experimental

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie ornamental propuesta como organismo de referencia por diferentes agencias internacionales (IBAMA, 1988; OCDE, 1992) y ha sido ampliamente usada en ensayos de bioconcentración con plaguicidas (Toledo y Jonsson, 1992; Min y Cha, 2000; Orvos *et al*, 2002).

El estudio de exposición se realizó en un tanque de cristal, de 250L de capacidad, con sistema de aireación continua mediante difusores ceramicos conectados a sendos compresores RenaAir 50 asegurando la oxigenación del medio en todo momento, y un segundo acuario de 50L de capacidad como acuario control. Los acuarios se llenaron con 150L y 30L de agua, respectivamente. El agua procedente de la red de agua potable, de la ciudad de Valencia, previamente desclorada, por aireación forzada, durante una semana. Se realizaron los pertinentes análisis fisicoquímicos de varias muestras de esta agua, según establece el protocolo OCDE (1996), los resultados de los análisis se muestran en la Tabla VI.1.

Tabla VI.1. Características fisicoquímicas del agua empleada en el ensayo de Bioacumulación

Parámetro	Concentración
Dureza (mg/L de CaCO ₃)	71.3
Cloro libre (mg/L de Cl ₂)	<0.01
pH (u.d. pH)	7.80
Temperatura (°C)	22.1
Conductividad (µS·cm ⁻¹)	315
Oxígeno disuelto	mg/L de O ₂ 8.2
	% Saturación 88
Amonio (mg/L de NH ₄ ⁺)	<0.5

La exposición se realizó de forma estática, sin reposición del medio, a lo largo de la duración del ensayo, la elevada vida media de este compuesto (ver capítulo III de la presente memoria de tesis doctoral) permitió la realización del ensayo en estas condiciones.

Se emplearon peces cebra de ambos sexos y de talla similar, suministrados por un importador local (Fauna acuática, S.L., Burjassot); los animales estuvieron,

tanto en la fase de aclimatación como en la de análisis, en una cámara termostatazada a $22 \pm 1^\circ \text{C}$, con un Fotoperiodo 12:12 (horas luz: horas oscuridad). Los peces fueron alimentados *ad libitum* durante la fase de aclimatación, que duró 7 días y durante la cual no se observaron problemas en la aclimatación, ni síntomas de enfermedad. Durante la fase de estudio de la bioacumulación, los animales se alimentaron 3 veces a la semana y el alimento empleado fue pienso en escamas de la marca Tetra® (Alemania).

VI.3.3. Ensayo de toxicidad del tebuconazol en *Danio rerio*.

Como paso previo, al estudio del BCF, se realizó un ensayo de toxicidad con el fungicida tebuconazol en Pez cebra (*Danio rerio*), para establecer la EC_{50-96h} de este compuesto, ya que no fue posible encontrar datos fiables en la bibliografía. Con este dato de toxicidad, fue posible seleccionar una concentración inicial de tebuconazol que no produjera mortalidad alguna. La LC_{50-96h} se calculó mediante una regresión próbit, implementado por el software Toxcalc 5.0 (Tidepool), la EC_{50-96h} calculada fue de 26.84 mg/L (I.C. 95%=22.1-36.3 mg/L). Una vez establecida la LC_{50-96h} se seleccionó la concentración para el estudio del BCF, algunos autores establecen un factor mínimo respecto a la LC_{50-96h} de 1/10 (Sancho *et al.*, 1998) en este estudio se he seleccionado un factor de 1/100 (0.25 mg/L) tomando como referencia su $\log K_{ow}$ y el rango de las concentraciones ambientalmente predecibles que se han encontrado en La Albufera de Valencia que estan entorno a unos pocos $\mu\text{g/L}$.

VI.3.4. Preparación y toma de muestras de agua y tejido

Una vez establecida la concentración final de ensayo, a partir de la EC_{50-96h} , se pesó la cantidad necesaria de tebuconazol (producto técnico, con 98% pureza), haciendo la correspondiente corrección por riqueza, para conseguir una concentración nominal de 0.25 mg/L (1/100 de la EC_{50-96h}).

Para favorecer la disolución del tebuconazol, en el agua del acuario, se preparó una disolución previa del tebuconazol, en 5 mL de acetona, calidad para

análisis. Posteriormente, se diluyó este volumen en un frasco, tipo ISO, con 2 L de agua destilada, sonicando durante 5 minutos. Una vez añadida la disolución del tóxico al tanque, se agitó el medio con una varilla de vidrio para facilitar la dilución y correcto reparto por la masa de agua, tras esto se colocaron los peces en el tanque. Este momento es el considerado como tiempo $t = 0$ y los tiempos de toma de muestra se referirán a este tiempo inicial.

En el tanque control se añadió la cantidad proporcional de acetona, a fin de estandarizar las condiciones de ensayo y comprobar el posible efecto del disolvente sobre la acumulación del tóxico.

Las muestras de peces se tomaron por triplicado, a tiempos regulares, sacandolos del acuario con una red, y depositandolos en botes de vidrio con 2 L de una disolución de 100 mg/L de MS222¹² (Sigma-Aldrich, USA) durante 10 minutos para anestésarlos antes de su sacrificio (Ross and Ross, 1999), tras esto, fueron embolsados y congelandolos a -20°C hasta su procesado y análisis. Las muestras de agua se tomaron del centro del tanque y se conservaron en botellas de vidrio, de color ámbar, de 250 mL de capacidad. Las muestras se filtraron en una rampa de filtración, a través de membranas de microfibras de vidrio Whatman® GF/F, para eliminar la materia orgánica, detritus de los peces y microorganismos que pudieran favorecer los procesos de degradación la muestra. Una vez filtradas las muestras se congelaron hasta su análisis cromatográfico.

VI.3.5. Extracción y purificación de tebuconazol en muestras de agua y de tejido de pez

VI.3.5.1. Muestras de Agua

Para la extracción de los residuos de tebuconazol de las muestras de agua del acuario, se empleó la técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE) mediante el empleo de cartuchos rellenos con 500 mg de fase C18. Previamente, los cartuchos se acondicionaron con 3x3mL de MeOH para análisis de residuos, seguidamente se pasaron por la fase 3x3mL agua Milli-Q, y sin dejar secar la fase se pasó la muestra (entre 10 y 50 mL, según el caso) a un flujo de 1 mL/min. Para una mayor eficiencia

¹² Metanosulfonato de tricaina ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N} + \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$)

en el desarrollo de la extracción, la parte inferior de los cartuchos se introdujo una mesa de extracción, de 12 canales, marca Alltech™, acoplada a una bomba de vacío y, para aumentar el volumen de muestra, se acoplaron reservorios de 50 mL en la parte superior de los cartuchos de extracción (Ver figura IV.6, pág. 98). Una vez pasada la muestra por los cartuchos, estos se secaron durante 15 minutos, con en corriente de nitrógeno seco, y se procedió a su elución con 3X1 mL de acetona. Una vez recogido todo el eluido, se evaporó el disolvente con una corriente de N₂ seco, hasta un volumen de 1 mL. Los extractos obtenidos se encapsularon en viales de cromatografía y se guardaron a -20° C hasta su análisis por GC/MS.

VI.3.5.2. Muestras de tejido de pez

El procesado y análisis de las muestras de peces, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Maciel (2005), con algunas modificaciones.

Las bolsas con los ejemplares de *Danio rerio* se descongelaron, se tomaron los peces necesarios para tener un peso fresco de unos 2.5-3 gr y, una vez pesados en balanza de precisión, los ejemplares se trocearon con un bisturí, se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, con una mezcla 1:1 de acetona y diclorometano, procediéndose a su trituración con un dispersor Ika™ Ultraturrax® T-25 Basic a 18000 r.p.m durante 1 minuto en todas las muestras, para favorecer la extracción se dejó macerar el homogenado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron los tubos, a 2500 r.p.m, durante 5 minutos, tomando el sobrenadante, el pellet se resuspendió de nuevo y se realizó otra vez el proceso descrito anteriormente. Seguidamente se realizó la extracción de los residuos de tebuconazol, mediante la técnica de la extracción líquido-líquido (LLE). El sobrenadante se colocó en un embudo de decantación de 500 mL con llave de teflón, se añadieron 2x50 mL de *n*-hexano, se agitó suavemente durante 2 minutos y se dejaron separar las fases, este paso se realizó dos veces. Una vez separadas las dos fases, se desechó la fracción acuosa, y la fase orgánica se pasó a un matraz esférico, de 250 mL, a través de un embudo, con 10 gr. de sulfato sódico anhidro, para eliminar cualquier resto de humedad de la fase orgánica.

El matraz esférico se acopló a un evaporador rotatorio a vacío, Heidolph Laborota 4001, con baño termostatzado a 40° C, hasta sequedad, se dejó enfriar

atemperar el matraz y posteriormente el extracto se redisolvió en 1 mL de acetona, se encapsuló en un vial de cromatografía y se conservó a -20°C , hasta su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

VI.3.6. Análisis de Plaguicidas en muestras de agua y tejido de pez

La determinación de la concentración de tebuconazol, en agua y tejido de pez cebra, se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Se empleó un cromatógrafo de gases modelo 6890N acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5973, ambos de la marca Agilent Technologies™. La inyección de las muestras se realizó mediante un inyector automático Agilent Technologies™ modelo 7683, el equipo se controló mediante una estación de trabajo ChemStation® de Hewlett-Packard, equipada con un programa informático adecuado para procesar los datos cromatográficos y una librería de espectros de masas NIST 2005. Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de concentraciones residuales de tebuconazol en muestras de agua y pez

Columna	De tipo capilar HP-5MS (5% metil fenil silicona) 30 m x 250 μm x 0.25 μm , de Agilent Technologies
Temperatura de la columna	T ^a inicial a 100°C → 1 min. Rampa de T ^a hasta 280°C ($\Delta 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) → 10 min.
Temperatura Inyector	280° C
Detector	Espectrómetro de masas con detector por quadropolo con ionización por impacto electrónico.
Gas portador	Helio, pureza del 99.9999
Flujo del gas portador	1 mL/min
Temperatura del detector(°C)	180
Vol. Inyección	1 μL

Tras la extracción de los residuos de tebuconazol en las muestras de peces y agua, siguiendo el proceso descrito en el apartado VI.3.3, una alícuota de 1 μL del extracto obtenido fue analizada por GC/MS, en las condiciones cromatográficas descritas en el apartado V.3.6. Los valores de concentración se obtuvieron por interpolación en la recta de patrón externo, pinchado diariamente en el cromatógrafo de gases.

La cuantificación de tebuconazol se realizó mediante la técnica de estándar externo por recta de calibración empleando un patrón de 99.5% de riqueza suministrado por Dr. Erenthorfer GmbH (Augsburg, Germany).

El tiempo de retención (T_r) con las condiciones de trabajo descritas anteriormente fue de 11.1 minutos. La detección del tebuconazol mediante la espectrometría de masas se realizó en modo SIM (*selected ion monitoring*) se seleccionaron 2 picos característicos para el tebuconazol: 250 m/z como ion cuantificador y 281 m/z como ion de confirmación. En la Figura V.1 se muestra un cromatograma en modo SIM correspondiente a una muestra de pez fortificada con 0.25 ng/mg de tebuconazol.

Se empleó el software SigmaStat™ 3.5 (SYSTAT Inc.), para el tratamiento de los datos cromatográficos, el estudio estadístico de los resultados y la representación gráfica de los datos.

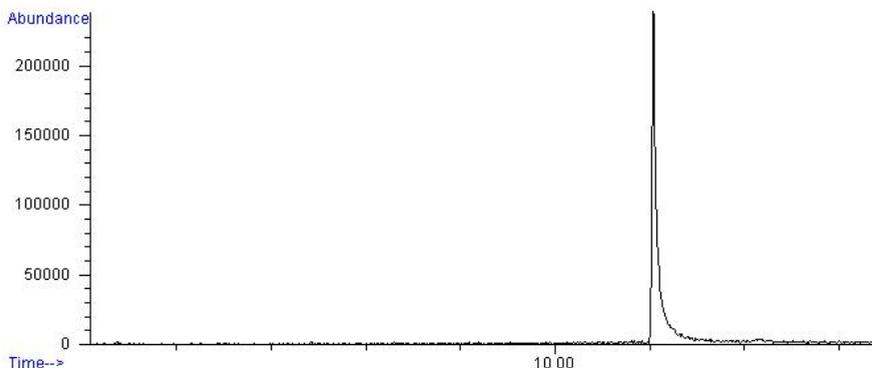


Figura VI.1. Cromatograma de una muestra de pez fortificada con 0.25 $\mu\text{g/g}$ de tebuconazol.

En la Figura VI.2 se muestra un espectro de iones, correspondiente a una muestra de agua del tanque donde se realizó la exposición con tebuconazol.

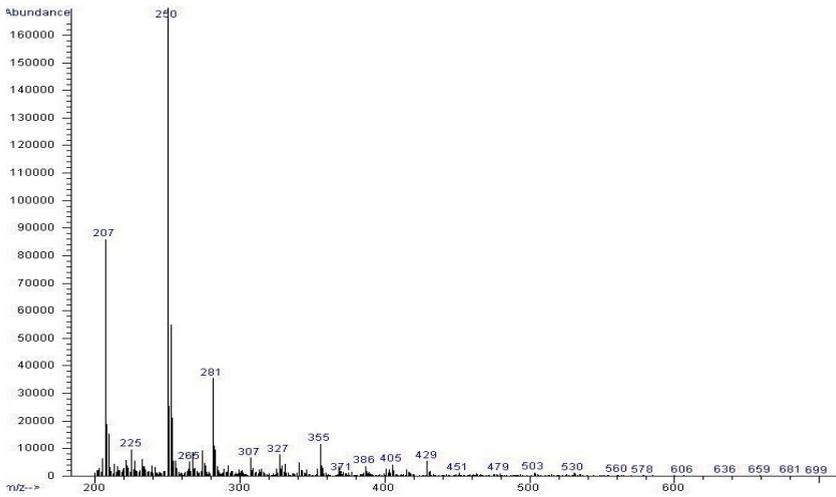


Figura VI.2. Espectro de iones del tebuconazol correspondiente a una muestra de agua del tanque de exposición, con 0.25 mg/L de tebuconazol, tomada antes de añadir los peces

En la Figura VI.3 se muestra el cromatograma TIC (*Total Ion Current*) de una muestra de extracto de pez. En él se representa la corriente iónica total de los compuestos eluidos a cada tiempo de retención.

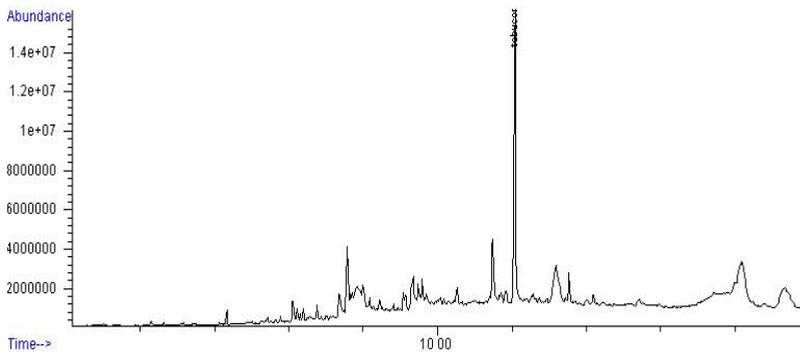


Figura VI.3. Cromatograma TIC de una muestra de un extracto de pez

VI.3.7. Validez del método analítico

A fin de establecer la validez del ensayo, se realizó un estudio de recuperación del tebuconazol, en tejido de pez y en agua de la red potable, ambas reforzadas con tebuconazol, para la recuperación en muestras acuosas se utilizó un nivel de fortificación de 0.25 mg/L a partir de una solución estoc de 10 mg/L preparada en acetona; para el estudio de recuperación en muestras de tejido de pez la concentración fue de 0.25 µg/g. Los resultados mostraron buenas recuperaciones: 93.6% ($n=6$; $CV=3.2\%$) para el método de extracción de tebuconazol en tejido de pez y de 90.2% ($n=5$, $CV=2.8\%$) para la extracción de tebuconazol en muestras acuosas por *SPE* con cartuchos C-18. El método no mostró problemas de saturación en los cartuchos de extracción por exceso de analito.

El método analítico fue lineal en el rango 0.02-20.0 mg/L. El límite de detección calculado (LOD) para el método fue de 5×10^{-10} g (0.5 ng), con un límite de cuantificación (LOQ) de 1.5 ng (en columna). Para fijar el límite de detección (LOD) se estableció como criterio que la señal del detector, al tiempo de retención de tebuconazol fuera de 3 veces superior al ruido de fondo ($s/n > 3$) y para el límite de cuantificación (LOQ), el ratio s/n , fuera mayor de 10.

VI.4. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LA BIOCENSTRUCCIÓN DE TEBUCONAZOLE EN PEZ CEBRA

Las cinéticas de degradación en agua, acumulación y eliminación de tebuconazol en peces se pueden expresar según la ecuación:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad (1)$$

$$\frac{dC_w}{dt} = -k_3 C_w \quad (2)$$

donde t (h), C_w (mg/L) e C_f ($\mu\text{g}/\text{mg}$) son el tiempo, la concentración de tebuconazol en el agua y la concentración de tebuconazol en pez, respectivamente. Los parámetros k_1 ($\mu\text{g}/\text{mg L}/\text{mg}/\text{h}$), k_2 (1/h) y k_3 (1/h) son la tasa de transferencia o acumulación de tebuconazol en agua para los peces, la tasa de eliminación de tebuconazol para los peces y la tasa de degradación de tebuconazol en el agua, respectivamente. La solución de la ecuación (2) viene dada por la expresión:

$$C_w(t) = C_{w0} e^{-k_3 t} \quad (3)$$

donde C_{w0} es la concentración inicial de tebuconazol en agua. La ecuación (3) fue usada para estimar la vida media del tebuconazol en agua haciendo:

$$t_w^{50\%} = \frac{\ln(2)}{k_3} \quad (4)$$

donde $t_w^{1/2}$ (h) es el tiempo de vida media del tebuconazol en el agua. La solución de la ecuación (1) viene dada por:

$$C_f(t) = \frac{k_1}{k_2 - k_3} C_{w0} (e^{-k_3 t} - e^{-k_2 t}) \quad (5)$$

Utilizando la ecuación (5), el tiempo necesario para conseguir la máxima concentración de tebuconazol en el pez fue estimada por:

$$t_{\max} = \frac{\ln(k_2) - \ln(k_3)}{k_2 - k_3} \quad (6)$$

donde t_{\max} (h) es el tiempo para el cual la concentración de tebuconazol en el pez es máxima. A partir de la concentración máxima de tebuconazol en pez, $C_f^{\max} = C_f(t_{\max})$, el tiempo necesario para que el pez elimine el 50% de la concentración máxima o el tiempo de vida media del tebuconazol en pez, $t_f^{50\%}$, fue estimado por:

$$t_f^{50\%} = C_f^{-1} \left(\frac{C_f^{\max}}{2} \right) - t_{\max} \quad (7)$$

donde C_f^{\max} ($\mu\text{g}/\text{mg}$) es la concentración máxima de tebuconazol en pez.

A partir de la aplicación del fungicida al agua de los acuarios, el tiempo necesario para que los peces eliminen el 95% de la concentración máxima de tebuconazol fue estimada por:

$$t_f^{95\%} = C_f^{-1}(0.05C_f^{\max}) \quad (8)$$

El factor de Bioconcentración (BCF) (L/kg) de tebuconazol en pez fue estimado imponiendo la condición de equilibrio al cociente entre la concentración de tebuconazol en pez, C_f , y la concentración de tebuconazol en agua, C_w . Esa condición se obtiene calculando el límite dado por:

$$BCF = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{C_f(t)}{C_w(t)} \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \frac{\text{L}}{\text{mg}} = 1000 \times \frac{k_1}{k_2 - k_3} \frac{\text{L}}{\text{Kg}} \quad (9)$$

Cuando la concentración de plaguicida en agua se mantiene constante ($C_w(t) = C_{w0}$), o el plaguicida es un compuesto que no se degrada en el agua, el valor

del BCF también se puede estimar por la ecuación (9) haciendo $k_3 = 0$. Para la ecuación (9), no habrá Bioconcentración ($BCF = 0$) cuando la tasa de eliminación del plaguicida para el pez fuera mayor que la tasa de degradación del plaguicida en agua ($k_3 > k_2$). Cuando la tasa de degradación del plaguicida en agua fuera igual a la tasa de eliminación del plaguicida para el pez ($k_2 = k_3$) las ecuaciones (1) y (2) la Bioconcentración de plaguicida en el pez será función del tiempo máximo de exposición de los peces al plaguicida y el BCF será estimado por $BCF = k_1 t_{\max}$.

La estimación de los valores de C_{w0} y k_3 de la ecuación (3) y de k_1 y k_2 de la ecuación (5) fueron realizadas con el programa informático “PROC NLIN de *Statistical Analysis System*” (SAS Institute, 1998) utilizando datos experimentales de concentraciones de tebuconazol en agua y en pez. Los valores iniciales de k_1 y k_2 para el método iterativo de “Marquardt” en “PROC NLIN” se calcularon haciendo $k_3 = 0.001$, $k_2 = \frac{1}{\sqrt{K_{ow}}}$ (Kooijman *et al.*, 2004) y $k_1 = k_2 BCF / 1000$, donde o BCF se estimó con el programa BCFWIN (EPIWIN, 2004).

Los procedimientos numéricos y los modelos matemáticos similares a los descritos para las ecuaciones (1)-(9) han sido utilizados por Bessa *et al.* (2006) para el estudio del insecticida trichlorfon en *Piaractus mesopotamicus*; por Jonsson *et al.* (2000) para estimar el BCF de piridafention en *Chlorella saccharophila* y por Montañés y Hattum (1995) para estimar el BCF de chlorpirifos en *Asellus aquaticus*.

VI.5. RESULTADOS Y DISCUSION

VI.5.1. Análisis de las muestras de peces

Los resultados del análisis de las muestras de peces se muestran en la Tabla VI.3. Como puede observarse, durante las 2 primeras horas de exposición no se detectan residuos en el extracto analizado, es a partir de la tercera hora de exposición cuando empieza a detectarse el tebuconazol. La concentración de tebuconazol es ascendente a lo largo del tiempo hasta las 407 horas, a partir de este momento la cantidad de tebuconazol comienza a descender.

Tabla VI.3. Concentración de tebuconazol en muestras de peces

Tiempo de exposición (h)	Cf media ($\mu\text{g/g}$)	s.d. ($\mu\text{g/g}$)
2	0.0	± 0.0000
3	1.6	± 0.0002
9	2.4	± 0.0003
26	4.5	± 0.0005
72	5.5	± 0.0010
131	7.1	± 0.0005
199	7.2	± 0.0010
407	8.4	± 0.0008
584	3.1	± 0.0009
912	3.0	± 0.0005
1091	1.8	± 0.0006
1451	0.6	± 0.0004

Cf: Concentración de tebuconazol en pez
s.d.: Desviación estándar

VI.5.2. Análisis de las muestras de agua

Los resultados de análisis de las muestras de agua procedentes del tanque donde se realizó la exposición al tóxico se muestran en la Tabla VI.4.

Los datos muestran que durante las primeras 24 horas de exposición no hay diferencias significativas en cuanto a la concentración de tóxico.

Tabla VI.4. Concentración de tebuconazol en muestras de agua

Tiempo (h)	Cw media (mg/L)	s.d. (mg/L)
0	0.2424	±0.0005
2	0.2417	±0.0006
26	0.2307	±0.0025
131	0.2207	±0.0065
199	0.2139	±0.0063
314	0.1756	±0.0051
407	0.1247	±0.0031
658	0.1052	±0.0035
912	0.0959	±0.0061
1451	0.0109	±0.0011

Cw: Concentración de tebuconazol en agua
s.d.: Desviación estándar

VI.5.3. Cálculo del Factor de Bioconcentración

Los datos experimentales correspondientes a los niveles de concentración obtenidos en el análisis de las muestras de agua y de peces, se pudieron ajustar a las siguientes ecuaciones:

$$C_w(t) = 0.2482e^{-(1.29E-3)t}, R^2 = 0.97 \text{ y } P < 0.01 \quad (10)$$

$$C_f(t) = 0.0096(e^{-(1.29E-3)t} - e^{-(2.05E-2)t}), R^2 = 0.90 \text{ y } P < 0.01 \quad (11)$$

Las ecuaciones (10) y (11) permitirán estimar los valores de t_{\max} , C_f^{\max} , $t_f^{50\%}$ y $t_f^{95\%}$ en 144 h (6 días), 0.0075 µg/mg, 581 h (24 días), 2447 h (105 días), respectivamente. Utilizando la ecuación (9) con los valores de $k_1 = 7.45E-4$, $k_2 = 2.05E-2$ y $k_3 = 1.29E-3$ determinados por la PROC NLIN con datos experimentales de concentración de tebuconazol en agua y en peces fue estimado un BCF de 38.80 L/kg.

La vida media del tebuconazol estimada por la ecuación (4), fue de 538 h (22 días) y, valores similares obtuvo Tomlin (2000) con valores de disipación del tebuconazol (DT_{50}), en agua, entre una y cuatro semanas.

Como ya se comentó en el Capítulo III, existen pocos datos sobre la absorción, eliminación, vida media y Bioconcentración del fungicida tebuconazol, en peces. Konwick *et al.* (2006) estudiaron experimentalmente, la bioacumulación y la biotransformación de fungicidas de la familia de los triazoles en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) estimando una vida media del tebuconazol en el organismo ensayado de 24h (un día). Potter *et al.* (2005) observaron una media vida de tebuconazol en el suelo entre 5 y 41 días. Según el REG2006-11 del *Pest Management Regulatory Agency* de Canadá la vida media del tebuconazol en agua es de 590 días, según los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el capítulo III de esta memoria de Tesis doctoral (Cap. III.6, Tabla III.7), el tebuconazol presenta una vida media de entre 256 y 855 días según las condiciones de pH y temperatura establecidas.

La cinética de primer orden, descrita por la ecuación (10) del tebuconazol en agua está representada en la Figura V.4. Los valores de la Figura V.1 corresponden a la media ($n=3$) más la desviación típica de la concentración de tebuconazol en muestras de agua tomadas en los tiempos indicados del tanque de exposición.

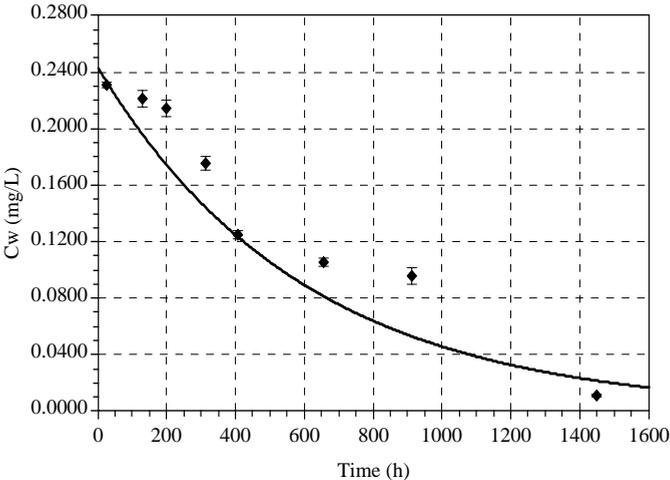


Figura VI.4. Concentración del fungicida tebuconazol en el agua.

La acumulación y eliminación del tebuconazol en los peces, descrita por la ecuación (11), está representada en la Figura VI.5 que corresponden a la media ($n=3$) de la concentración de tebuconazol en pez cebra (*Danio rerio*) recogidos del acuario a los intervalos de tiempo indicados.

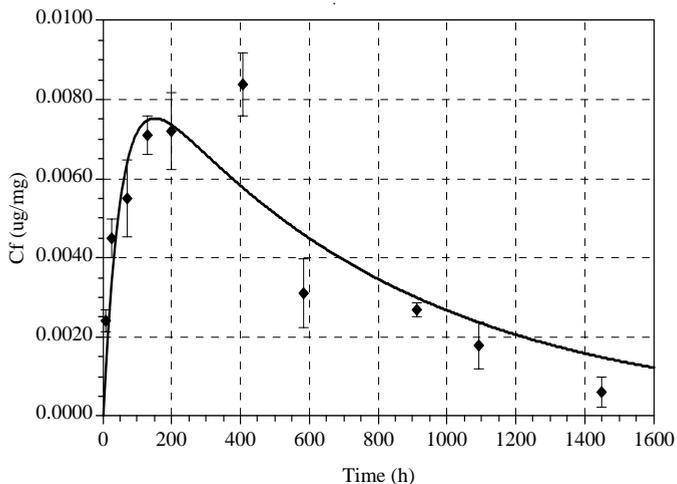


Figura VI.5. Concentración del fungicida tebuconazol en el Pez cebra (*Danio rerio*).

La Figura VI.6 representa el crecimiento y equilibrio de Bioconcentración de tebuconazol en pez cebra (*Danio rerio*), definida por el cociente entre la concentración en pez y la concentración en agua, dada por la ecuación $BCF = 38.80(1 - e^{-(1.92E-2)t})$. Esta Figura también muestra que el estado de equilibrio de ese cociente es alcanzado para un valor límite 38.80 L/kg, lo que viene a ser el valor de BCF del tebuconazol en *Danio rerio*. Este valor también puede ser obtenido directamente de la ecuación (9), usando los valores numéricos de k_1 , k_2 y k_3 . Podemos observar que la cinética de Bioconcentración del tebuconazol en peces es inicialmente nula, aumentando continuamente siguiendo un patrón definido por una ecuación exponencial asociativa ($y = a(1 - e^{-bx})$). Ese patrón de Bioconcentración, alcanzando un plató en el nivel del valor del BCF, es coherente con la definición del BCF como un coeficiente de partición del tebuconazol entre el pez y agua.

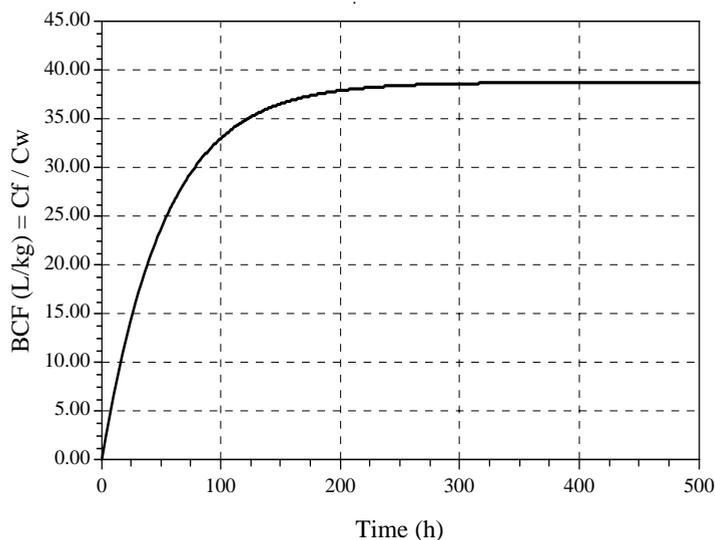


Figura VI.6. Bioconcentración del fungicida tebuconazol en el Pez cebra (*Danio rerio*).

El coeficiente de partición aire-agua es un indicador de la volatilidad potencial de un compuesto orgánico a partir del agua, tal coeficiente puede ser estimado por:

$$K_{AW} = \frac{P_M P_V}{298 \times S_w R} \quad (12)$$

donde P_M (g/mol) es el peso molecular, P_V (Pa) es la presión de vapor, S_w (g/m³ ó mg/L) y la solubilidad en agua y $R = 8.314$ (m³ Pa/mol/T) es la constante de los gases. El valor del coeficiente de partición aire-agua del tebuconazol es $K_{AW} = 5.89 \times 10^{-10} \lll 4 \times 10^{-4}$ el cual nos indica que el tebuconazol no es volátil a temperatura ambiente a partir del agua (Trapp y Harland, 1995).

La eficiencia acumulativa de un compuesto orgánico por las branquias del salmón puede ser prevista por el coeficiente de partición octanol-agua utilizando los datos de la Figura 1 del trabajo de McKim *et al.* (1985) y ajustándolos a una ecuación Gausiana.

La ecuación hallada con los datos publicados por McKim *et al.* (1985) y dada por la expresión:

$$E = 66.5 \exp\left(\frac{-(\log K_{ow} - 4.625)}{8.16}\right) \quad (13)$$

donde E es la eficiencia de absorción de un compuesto orgánico a través de las branquias de salmón. Según la ecuación (13) el valor esperado de E para el fungicida tebuconazol ($\log K_{ow} = 3.7$) es de 60%, para un valor máximo de la ecuación (13) de 66.5%, indicando que el tebuconazol es un compuesto potencialmente acumulativo en peces por branquias.

El bajo potencial de volatilización, el valor del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow} = 3.7$), la solubilidad en agua (36 mg/L), la vida media en agua (22 días) y el porcentaje de absorción ($E=60\%$) indican que el fungicida tebuconazol tiene un alto potencial para bioconcentrarse en peces ($BCF = 38.80$ L/kg). Según Hansen (2004), el BCF de tebuconazol en peces es de 78 L/kg.

Un BCF de 38.80 L/kg para el tebuconazol en peces y un valor de ingesta diaria admisible (IDA) para el tebuconazol de 0.03 mg/kg/b.w./day (0.03 mg/kg/p.c./día), definido en el Codex Alimentarius de la OECD¹³ (Codex Alimentarius, 2001), permiten estimar una concentración máxima de tebuconazol en agua de 0.1082 mg/L, calculado según $C_w = ADI \times 70 / (0.5 \times BCF)$. Esa concentración fue estimada suponiendo un peso corporal medio de 70 kg para un individuo adulto que consuma diariamente 0.5 kg de pescado.

La concentración de 0.1082 mg/L indica que cualquier concentración en agua mayor de 0.1082 mg/L conllevaría una ingestión diaria de tebuconazol en peces superior a 0.03 mg/kg/bw/día.

Una concentración de 0.1082 mg/L de tebuconazol en agua sería 40 veces menor que la LC_{50} para trucha arco iris, 52 veces menor que la LC_{50} para la perca de orejas azules (*Lepomis macrochirus*), 38 veces menor que la LC_{50} para *Daphnia*

magna y 37 veces menor que la LC_{50} de tebuconazol para el alga *Scenedesmus subspicatus* en agua (Tomlin, 2000).

En consecuencia, concentraciones de tebuconazol en agua seguros para la vida acuática ($0.1082 \text{ mg/L} \ll C_w \ll 4.00 \text{ mg/L}$) producirían una ingesta diaria de tebuconazol para el consumo de peces mayor que la IDA de peces para el consumo humano. Asimismo, las concentraciones máximas de tebuconazol en agua deberían ser menores de 0.1082 mg/L . Cualquier actividad pesquera en aguas próximas a zonas cultivadas donde se use este fungicida deberían mantener un periodo de seguridad de 105 días después de la aplicación de tebuconazol, este periodo proporcionaría una eliminación superior al 95% de la concentración de tebuconazol en peces.

VI.6. MODELIZACIÓN DEL BCF CON EL MODELO ESPECÍFICO DE FUGACIDAD DE MACKAY (1991)

VI.6.1. Concepto de fugacidad

El concepto de fugacidad (f) fue introducido por G.N. Lewis, en 1901, con el fin de explicar las desviaciones del comportamiento de los gases reales, respecto al de los gases ideales, en el estudio termodinámico de la energía libre correspondiente a un proceso de expansión, isotérmico, reversible e infinitesimal.

Resumiendo, la fugacidad de un gas real sería equivalente a la presión de un gas ideal, pudiendo plantearse su relación en la siguiente forma:

Dado que al disminuir la presión de un gas real su comportamiento se aproxima al de un gas ideal, a presiones muy bajas, cuando la presión de un gas no ideal tiende a cero, el límite de f/P es igual a 1:

$$\lim_{P \rightarrow 0} f/P = 1, \text{ o sea } f/P \rightarrow 1 \text{ cuando } P \rightarrow 0$$

¹³ <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v94pr10.htm>

Con lo cual podemos asumir que la fugacidad de un gas real es igual a su presión, cuando esta es muy baja. A efectos prácticos, se consideran como bajas las presiones iguales o inferiores a la atmosférica.

Con un planteamiento más intuitivo, la fugacidad es un concepto fisicoquímico, que puede definirse como la tendencia de una sustancia química a escaparse desde una fase hacia otra. Esta propiedad se expresa en unidades de presión (Pa).

VI.6.2. Modelo de fugacidad de Mackay (1991)

El modelo de fugacidad de Mackay (1991), de Nivel I, es un modelo sencillo, que no ofrece la precisión de otros modelos más complejos; pero, en cambio, es un modelo con un planteamiento fisicoquímico riguroso y elegante, en comparación con modelos que son puramente experimentales. Además la Agencia para la Protección Medioambiental de Estados Unidos, ha señalado que existe una relación directa entre los valores del nivel de riesgo obtenidos con los modelos más sofisticados y los modelos más sencillos (Modelo GENEEC2¹⁴. Parker *et al.*, 1995). En los modelos más complejos, se consideran un mayor número de factores y parámetros, que podrían influir en los niveles de riesgos, y obtener así resultados más exactos, o más próximos a los escenarios considerados; pero, el orden de los niveles de riesgo previstos suele ser semejante.

Mackay basó su modelo en una unidad de 1 km² de superficie y 6 km de altura, que considera "unidad Ecosistema" modelado (Figura VI.7), y que se divide en cuatro o seis compartimientos, con cantidades definidas de materiales.

Este modelo introduce el concepto de la "capacidad de fugacidad" (Z), para cada compartimiento.

$$Z = \text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \times \text{Pa}^{-1}$$

A partir de esta ecuación se pueden calcular las concentraciones teóricas (C) presentes en cada compartimiento ambiental, después de una emisión de una determinada cantidad de un compuesto químico en la "unidad de mundo" modelado.

$$C = f \cdot Z$$

El equilibrio entre las distintas concentraciones, del compuesto estudiado, en cada fase o compartimento, se alcanza cuando las fugacidades son iguales en todos los compartimentos: $f_1 = f_2$; de forma que $C_1 / Z_1 = C_2 / Z_2$, y $C_1 / C_2 = Z_1 / Z_2 = K_{12}$

K_{12} es el coeficiente de partición que determina la distribución de la sustancia entre las dos fases, 1 y 2.

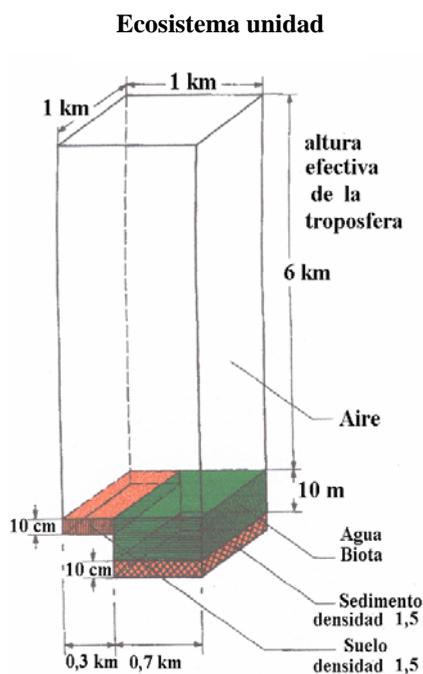


Figura VI.7. Esquema del Modelo de fugacidad propuesto por Mackay (1991)

¹⁴ http://epa.gov/oppefed1/models/water/geneec2_description.htm

VI.6.3. Evaluación de la distribución ambiental, de los fungicidas azólicos, mediante el modelo de fugacidad.

En la Tabla VI.5, se exponen los resultados obtenidos, al calcular la distribución de los fungicidas estudiados, entre cuatro compartimentos ambientales (aire, agua, suelo y sedimentos), con el programa informático correspondiente al modelo de fugacidad, desarrollado por Mackay (1991). Además, en la Tabla VI.6 se exponen las propiedades fisicoquímicas de los fungicidas estudiados, cuyo valor (excepto el punto de fusión y el pK) debe introducirse en el modelo, para el cálculo de las concentraciones ambientales y de su distribución entre las distintas fases o compartimentos. Los datos adicionales introducidos en el modelo han sido: temperatura (25° C) y cantidad de fungicida introducido (200 moles).

Tabla VI.5. Distribución ambiental de los fungicidas estudiados* (% en cada uno de los cuatro compartimentos)

Compartimento Ambiental	Carbendazima %	Flusilazol %	Procloraz %	Tebuconazol %	Triciclazol %
Aire	0.0204	0.00513	0.01883	0.0002845	0.00011
Agua	99.61	54.34	33.15	56.62	99.62
Suelo	0.189	23.61	34.56	22.438	0.198
Sedimento	0.176	22.04	32.26	20.95	0.1846

Como puede observarse en la Tabla VI.5, la distribución ambiental de la carbendazima y del triciclazol, en condiciones de equilibrio entre las fases, es análoga; ya que, la proporción de carbendazima, o de triciclazol, en el agua, respecto a la cantidad total de de estos compuestos en el conjunto de los cuatro compartimentos, es del orden del 99.6 %.

También es semejante, entre sí, la distribución del flusilazol y tebuconazol, con proporciones del orden del 54.34 a 56.6%, en el agua. En cambio, la proporción de procloraz, en cada compartimento, es del 33.16% en el agua, el 32.26 en los sedimentos y el 34.56 en el suelo. La mayor proporción de carbendazima y triciclazol en el agua, corresponde a los valores inferiores del coeficiente de partición octanol/agua ($K_{ow} = 1.5$ y 1.4 , respectivamente), respecto a los valores del K_{ow} de los otros cuatro compuestos, comprendidos entre 3.7 y 4.12. Esta correspondencia, confirma la eficacia del K_{ow} para valorar el balance hidrofóbico/hidrofílico de los compuestos químicos (Mackay, 1991; pag. 78).

Los resultados muestran que hay 2 grandes grupos de compuestos según su reparto en cada compartimiento, vemos que carbendazima y triciclazol tienen una distribución similar, prácticamente todo el compuesto queda retenido en el compartimiento agua, debido a una mayor solubilidad y bajo K_{ow} . El otro gran grupo es el formado por procloraz, tebuconazol, flusilazol donde el reparto es aproximadamente del 30-50% en agua y el resto del compuesto se reparte al 50% entre las fases suelo y sedimento. Observando los datos, vemos que prácticamente no hay reparto con el compartimiento aire, hecho motivado por la baja volatilidad de los compuestos.

Tabla VI.6. Propiedades de los fungicidas utilizados en el cultivo del arroz para el control de *Pyricularia oryzae*

	Carbendazima	Flusilazol	Procloraz	Tebuconazol	Triciclazol
Peso Molecular	191.2	315.4	376.7	307.8	189.2
Punto de Fusión (°C)	302-307	53-55	46-49	102-105	187-188
Presión de Vapor a 20°C (mPa)	0.09	---	0.09	0.0017	---
Presión de Vapor a 25°C (mPa)	0.15	0.039	0.15	---	0.027
Kow (logP)	1.5	3.7	4.12	3.7	1.4
Cte. Henry (H) (Pa·m ³ /mol)	0.0036	0.00027	0.00164	0.00001	3.2·10 ⁻⁶
Solubilidad(mg/L)	8	54	34.4	32	1600
pKa (bases débiles)	4.2	2.5	3.8	---	---

*Factor de equilibrio de la Bioconcentración: Valor obtenido aplicando el modelo de Mackay (1991) para un nivel IV.

Por otra parte, la mayor proporción, en el aire, de la carbendazima y el procloraz, respecto a los otros cuatro fungicidas (Tabla VI.4), se corresponde con los mayores valores de su presión de vapor (Tabla VI.5).

VI.6.4. Verificación de la capacidad Bioacumulativa de los compuestos fungicidas en peces mediante el modelo específico de Mackay (1991)

Las diferencias de distribución ambiental, se observan también mediante el programa informático, correspondiente al modelo de fugacidad desarrollado por Mackay (1991), para la determinación del Factor de Bioconcentración (BCF), en peces.

En la Tabla VI.7 se exponen los resultados obtenidos al calcular el BCF de los seis fungicidas estudiados, en peces, con el modelo específico desarrollado por Mackay (1991). Los datos introducidos en este modelo han sido: Peso molecular del fungicida estudiado; Kow (log P); Constante de Henry (H); Vida media del fungicida debida al metabolismo ($t_{1/2} = 1$ día); Concentración de fungicida en el agua (0.1 g/m^3 y 0.25 g/m^3), y los datos referentes a los peces y condiciones del proceso, suministrados por defecto en el programa informático.

Tabla VI.7. Factor de Bioconcentración de los fungicidas utilizados en el cultivo del arroz, para el control de *Pyricularia oryzae*

Fungicidas	BCF**	
	Concentración (mg/L)*	
	0.10	0.25
Carbendazima	0,19	0.19
Flusilazol	30.13	37.20
Procloraz	72.98	99.25
Propiconazol	31.52	38.93
Tebuconazol	30.13	37.20
Triciclazol	0.15	0.15

* Concentración del fungicida en el agua

**Valores obtenidos con el programa informático específico desarrollado por Mackay (1991)

Como puede observarse, en la Tabla VI.7, los factores de bioconcentración de la carbendazima y del triciclazol son muy pequeños, correspondiendo con los menores valores de K_{ow} . En cambio, procloraz tiene los mayores valores de BCF y K_{ow} , y flusilazol, propiconazol y tebuconazol tienen valores semejantes de BFC y K_{ow} .

Los resultados obtenidos, al calcular la distribución ambiental y el factor de bioconcentración de los fungicidas estudiados, son coherentes con su dependencia del K_{ow} y, por tanto, del balance entre la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de estos fungicidas azólicos.

Además, al calcular el factor de Bioconcentración del tebuconazol con el modelo de fugacidad, se ha obtenido un valor (37.20) semejante, al obtenido en el estudio experimental del proceso de bioconcentración (38.8); correspondiendo ambos valores a una concentración del tebuconazol en el agua de 0.25 mg/L. Esta semejanza justifica la validez del modelo de bioconcentración de Makay (1991) y los valores del Factor de Bioacumulación de los otros compuestos, obtenidos por el modelo de fugacidad; sin necesidad de realizar ensayos de bioacumulación *in vivo*, tal como se propone en las Directivas Europeas que recomiendan la búsqueda de métodos alternativos al uso de animales de experimentación (EC 86/609/EEC del 24 November 1986).

**VII. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DERIVADOS DEL USO
DE FUNGICIDAS EMPLEADOS EN EL CULTIVO DEL ARROZ
EMPLEADOS CONTRA *PYRICULARIA ORYZAE***

VII.1. INTRODUCCIÓN

La Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) de los plaguicidas usados en el cultivo del arroz requiere el estudio de situaciones complejas, que deben ser caracterizadas considerando la información disponible sobre los usos y las propiedades intrínsecas de cada plaguicida (Tarazona and Sánchez, 2006).

Actualmente, la capacidad de predecir y estimar la probabilidad y magnitud de un evento, hace que la ERA sea una herramienta esencial para respaldar científicamente la toma de decisiones en un amplio rango de disciplinas incluyendo la regulación de sustancias químicas (SSC, 2003; Villa *et al.*, 2003).

La aplicación de índices de riesgo ha sido una herramienta de uso común para la estimación del riesgo potencial derivado del uso de plaguicidas en ecosistemas acuáticos. La mayoría de estos índices de riesgo tienen en su estructura el uso de indicadores de exposición, como la dosis de aplicación, el comportamiento ambiental, la bioacumulación, la persistencia en suelo y factores ecotoxicológicos como la EC_{50} o el NOEC y LOEC (Kovach *et al.*, 1992, Levitan, 1997 y Finizio *et al.*, 2001). De forma general, para el desarrollo de estos índices, es necesario valorar las Concentraciones Ambientales Predecibles (PEC), que pueden estimarse de modo directo mediante estudios de los niveles de residuos ambientales de los plaguicidas, o mediante programas de monitorización de los contaminantes, o se puede hacer una estimación a partir de modelos matemáticos, mas o menos complejos, basados en la fugacidad, como los propuestos por Mackay (1991) o por Di Guardo *et al.* (1994), ambos pensados para entradas de contaminantes persistentes en aguas superficiales.

Debido a la dificultad de obtener valores PEC fiables, para todos los contaminantes que se pueden dar en un determinado ecosistema, algunos autores han clasificado el riesgo asociado al uso de plaguicidas en función de los diferentes ecosistemas (Finizio *et al.*, 2001).

Sin embargo aunque el cálculo de la ERA es relativamente fácil, el problema principal en la caracterización del riesgo es interpretar el verdadero significado del PEC/PNEC en términos de daño a un ecosistema (Villa *et al.*, 2002).

VII.1.1. Métodos de Evaluación del Riesgo Ambiental en ecosistemas acuáticos

Normalmente, la evaluación del riesgo en ecosistemas acuáticos se realiza mediante el cálculo de la relación PEC/PNEC, que recibe el nombre de “Cociente de Riesgo” (RQ, *Risk Quotien*; CEE, 1996; USEPA, 2004), y se usa como indicador del grado de riesgo, para el medio ambiente, derivado del uso de los compuestos sometidos a estudio. Como ya se ha comentado anteriormente, las PEC establecen el nivel de exposición al contaminante al que se ve expuesta la población, mientras la PNEC es la concentración de tóxico a la que no es previsible que ocurran efectos adversos para la población. La relación PEC/PNEC, juzga si un compuesto es compatible ambientalmente, en función de que PNEC sea mayor o menor que la PEC.

Desde un punto de vista proteccionista del medio ambiente, se asume que la sensibilidad e integridad del ecosistema depende de las especies más sensibles, y que la protección de la estructura del ecosistema protege las funciones de la comunidad biológica. Aunque esta premisa es ampliamente aceptada, la extrapolación del efecto de un tóxico sobre el ecosistema, a partir de datos obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda, en una única especie, introduce una gran incertidumbre en la valoración (Palma *et al.*, 2004; Crossland, 1992); siendo recomendable la realización una batería de ensayos que abarque toda la biodiversidad presente (Lemly y Richardson, 1997).

A fin de suplir las carencias de información y el grado de incertidumbre, debido a la extrapolación de los resultados, de los estudios de toxicidad, a ecosistemas reales, la EPA y la OCDE han propuesto la inclusión de un “Factor de Evaluación” (AF, *Assessment Factor*), en la PNEC, que debe ser considerado como un “factor de seguridad” (PNUMA/IPCS, 1999; Comber *et al.*, 2003).

VII.2. OBJETIVO FINAL DEL TRABAJO REALIZADO

El objetivo fundamental de este trabajo, se centra en la Evaluación del Riesgo Ambiental derivado del uso de los fungicidas, empleados contra *Piricularia oryzae*, en los arrozales del Parque Natural de La Albufera de Valencia.

Para realizar esta evaluación del riesgo ambiental, se han empleado datos de la persistencia y degradabilidad, de los fungicidas azólicos (Capítulo I), los datos de las Concentraciones Ambientalmente Predecibles (PECs) (Capítulo II) y, como valores de las concentraciones sin efecto (PNEC), se han empleado los resultados de los ensayos de toxicidad en *Artemia franciscana* y *Thamnocephalus platyurus* (Capítulo III). Finalmente, como parámetros de la capacidad bioacumulativa de los diferentes compuestos, se han empleado los resultados del estudio de Bioacumulación en peces expuestos en el capítulo V.

En definitiva, los diferentes capítulos ya expuestos en esta memoria, se utilizaran para establecer si el uso de los compuestos empleados para el control del hongo, que causa el fallado del arroz, representan (o no) algún riesgo ambiental para el P.N de La Albufera de Valencia, estableciendo cuáles son los compuestos más peligrosos y cuáles son más seguros.

VII.3. MATERIAL Y METODOS

VII.3.1. Evaluación del Riesgo Ambiental

Para la evaluación del riesgo ambiental, se ha seguido la directriz de la Union Europea recogida en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE N° L 161/9, 1994) y se han calculado los índices de riesgo ambiental (I_2) propuestos por Vighi y Calamari (1996), a escala local.

VII.3.2. Cálculo del cociente PEC/PNEC

La evaluación del riesgo ambiental, según la directiva DOCE N° L 161/9 (1994), comprende tres fases:

VII.3.2.1. Evaluación de la relación concentración-efecto. (PNEC)

El objetivo es predecir la concentración de la sustancia, por debajo de la cual no deben esperarse efectos adversos, en el compartimiento ambiental que se trate. Esta concentración se conoce como PNEC (*Predicted Non Effect Concentration*); es decir, la concentración prevista sin efecto. El PNEC corresponde normalmente al valor de EC_{50} , LOEC, NOEC, etc., derivados de los resultados de los ensayos de toxicidad. A este parámetro se le aplicará el citado anteriormente “Factor de Evaluación”, o seguridad, que en nuestro caso se ha establecido en 1000 (Richardson, 1995).

VII.3.2.2. Evaluación de la Exposición (PEC)

La Evaluación de la Exposición consiste en predecir la concentración de la sustancia que se encontrará, con gran probabilidad, en el medio. Esta concentración se conoce como PEC (*Predicted Environmental Concentration*), concentración ambiental prevista. Únicamente es necesario determinar el PEC en aquellos compartimientos ambientales en los que se sabe que existen emisiones, vertidos, o donde es razonable preverlos. En el caso estudiado, la contaminación por fungicidas se debe a fuentes difusas y no puntuales; por lo que asumimos como valor PEC las máximas concentraciones halladas en las aguas del lago de La Albufera, y los valores de residuos encontrados en los arrozales.

El factor PEC se determina teniendo en cuenta información sobre:

- Datos de exposición medidos adecuadamente.
- La cantidad de sustancia utilizada.
- La forma en la que se utiliza la sustancia.
- Las categorías de uso y el grado de confinamiento.
- Las propiedades físico-químicas de la sustancia.
- Los productos de degradación y/o los productos de transformación.
- Las vías probables de llegada a los compartimentos ambientales y el potencial de absorción/deserción y degradación.
- La frecuencia y duración de la exposición.

VII.3.2.3. Caracterización del Riesgo (PEC/PNEC)

Para cada compartimento ambiental, la “Caracterización del Riesgo”, se realiza por una comparación de los valores de PEC, con los valores PNEC, calculando la relación PEC/PNEC, también llamada “Cociente de Riesgo” (*CR*, *Risk Quotient*). Aplicado, además, en el cociente PEC/PNEC, un “Factor de Evaluación” de 1000 al PNEC (Palma *et al.*, 2004). Este factor de evaluación es una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo, sobre un número limitado de especies, al medio ambiente real. De esta forma, cuanto más amplios sean los datos de un ensayo, menor será el grado de incertidumbre y la magnitud del factor de evaluación (Richardson, 1995).

Si el Cociente de Riesgo es ≤ 1 , no se requieren más estudios sobre el compuesto, asumiendo que el riesgo para el medio ambiente es bajo. Si, por el contrario, *CR* es > 1 no basta con los datos recogidos hasta el momento y es necesario recabar más información para la correcta valoración del riesgo ambiental de la sustancia; para esto habría que refinar la evaluación mediante la realización de estudios experimentales en el campo, multiespecie y mesocosmos (Crossland, 1992). Algunos ejemplos de este tipo de ensayos, para plaguicidas aplicados en

condiciones de arrozal mediterráneo, han sido planteados por Sánchez (2006) y Tarazona y Sánchez (2006).

La Tabla VII.1 muestra la clasificación del riesgo ambiental según el “Cociente de Riesgo” ($CR = PEC/PNEC$). Para facilitar la interpretación de los resultados, se ha optado por usar distintos colores según el riesgo calculado, representando en color rojo el riesgo Alto ($CR \geq 10$), en color naranja el riesgo Moderado ($CR 1-10$), y en color verde el $CR \leq 1$.

Tabla VII.1. Clasificación del riesgo ambiental según el CR.

Riesgo	CR (PEC/PNEC)
Alto	≥ 10
Moderado	1-10
Bajo	≤ 1

VII.3.3. Cálculo del índice de riesgo a escala local (I_2)

El modelo de Vighi and Calamari (1996) contempla varios niveles de operación, para la valoración del riesgo ambiental, incluyendo diferentes escalas espaciales y temporales: Riesgo inmediato de emisiones directas, riesgo a escala local y riesgo a escala global.

La valoración de índices de Riesgo, según estos autores, se realiza en tres fases de clasificación:

1. Atribución de valores a los diferentes parámetros usados para la valoración, según la importancia de los mismos sobre el valor final.
2. Atribución a una gama de valores, a cada parámetro, según las condiciones que les corresponden.
3. Cálculos de los algoritmos utilizados para obtener el valor final.

Esta valoración se refiere al impacto en un espacio de tiempo relativamente lejano. La extensión del área de estudio deberá ser evaluada en función de las características y dimensiones del estudio que se pretenda realizar.

En este caso es necesario un examen relativamente más complejo y por tanto, basado en un número mayor de parámetros. Estos parámetros son:

1. El cociente PEC/PNEC.
2. El concepto de factor de bioconcentración de la sustancia a estudio (FBC).
3. La persistencia de la sustancia.
4. Presencia e importancia de poblaciones de riesgo en el área de descarga de la sustancia.

En el presente estudio sólo se ha calculado el riesgo a escala local. Esta valoración se refiere al impacto de uno contaminando sobre el medio ambiente en un espacio de tiempo relativamente largo. Los parámetros utilizados se presentan en la Tabla VII.2.

Tabla VII.2. Índice de Riesgo a escala local (I_2)*

PEC/PNEC	A	FBC	B
$>10^2$	4		
$10 - 10^2$	3	$\log K_{ow} > 3.5$	1.0
1 - 10	2	$2.5 < \log K_{ow} < 3.5$	0.75
$10^{-1} - 1$	1	$\log K_{ow} < 2.5$	0.5
$< 10^{-1}$	0		
Persistencia	C	Poblaciones de riesgo	D
Meses	1.0	Muy importante	1.25
Semanas	0.8	Importante	0.75
Días	0.6	Poco importante	0.5

* Vighi y Calamari (1996)

Mediante el cálculo del siguiente algoritmo:

$$I_2 = (A_{\text{agua}} + A_{\text{sedimento}}) \times B \times C \times D$$

Se obtiene un Índice de Riesgo a nivel local, en una escala de 0 a 10.

VII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.4.1. Evaluación del Riesgo Ambiental mediante el Cálculo del cociente PEC/PNEC (según DOCE N° L 161/9, 1994).

Como hemos comentado anteriormente, este estudio de evaluación de los riesgos ambientales, se ha realizado por comparación de los valores PEC y PNEC, en dos organismos acuáticos (*Thamnocephalus platyurus* y *Artemia franciscana*).

El estudio de la ERA se ha realizado con los dos organismos citados anteriormente, en los que hemos determinado las LC_{50} , así como los valores del NOEC y LOEC. Como vimos en el capítulo correspondiente (V), la extrapolación de los datos de organismos continentales, a organismos marinos, es un tema delicado (Robinson, 1999), y ambos organismos presentan diferentes sensibilidades a los fungicidas azólicos siendo más sensible *T. platyurus* que *A. franciscana*; por ello, los valores de riesgo para ambas especies son distintas. Incluso algunos autores apuntan a diferencias significativas en especies de similar ecología, como las marinas y las de estuario, con lo que la incertidumbre introducida es mayor al no poder extrapolar dentro del mismo escenario de exposición (Depledge y Hopkin, 1995).

Como se ha indicado en el capítulo IV de esta memoria de tesis doctoral, la contaminación del agua de La Albufera, producida por los tratamientos fungicidas con las diferentes materias activas empleadas, para el control de *Piricularia oryzae*, es baja; los valores residuales hallados están en un orden de magnitud muy bajo ($\mu\text{g/L}$), además las muestras con residuos de fungicidas azólicos están circunscritas prácticamente a la época de aplicación de los tratamientos, ya que estos compuestos son usados exclusivamente en la fase final de cultivo, desde finales del mes de junio hasta finales de agosto. Fuera de este periodo, las concentraciones residuales son testimoniales y normalmente no se detectan muestras con concentraciones por encima del límite de detección. Por otro lado, la toxicidad de estos compuestos, generalmente, no es elevada, con valores de CL_{50} , para organismos acuáticos (invertebrados y vertebrados), del orden de mg/L (3 órdenes de magnitud mayor que la concentración residual media en las aguas de La Albufera, para cualquiera de las materias activas estudiadas).

En la Tabla VII.3 se muestran los datos aportados por el modelo de fugacidad de Mackay (1991) de Nivel I, que indican la siguiente distribución en los 4 compartimentos ambientales que contempla el modelo.

Tabla VII.3. Porcentaje de reparto de los fungicidas en los 4 compartimentos ambientales según el modelo de Fugacidad de Mackay de Nivel I.

	Carbendazima %	Flusilazol %	Procloraz %	Tebuconazol %	Triciclazol %
Aire	0.0204	0.00513	0.01883	0.000285	0.00011
Agua	99.6	54.34	33.15	56.62	99.62
Suelo	0.189	23.61	34.56	22.438	0.198
Sedimento	0.176	22.04	32.26	20.95	0.1846

De la tabla anterior se desprende que carbendazima y triciclazol apenas quedarán retenidos en el sedimento con un porcentaje de entorno a 0.18% de la cantidad aplicada inicialmente. Por el contrario, flusilazol, procloraz y tebuconazol presentan unos porcentaje de reparto en sedimento mucho mayores, concretamente del 22.04% y 20.95% para flusilazol y tebuconazol respectivamente y de un 32.26% para procloraz.

Según esto es de esperar las concentraciones de carbendazima y triciclazol sean mínimas, hay que tener en cuenta que las concentraciones ambientales esperadas son muy bajas en las aguas del lago y en los arrozales y que además estas cantidades residuales estarían sujetas a procesos de degradación biológica en el propio sedimento, este hecho es apuntado por algunos autores que estiman un vida media de ambos compuestos en suelo de entre 9-12 meses para carbendazima (Torstensson y Wessén, 1984). Otros autores indican que el procloraz tiene una degradación en suelos mucho mayor con una vida media estimada muy superior 12 meses (Bock *et al.*, 1996).

En las Tablas VII.4 y VII.5 se presentan los valores NOEC y LOEC de los fungicidas estudiados obtenidos en los ensayos ecotoxicológicos con *Thamnocephalus platyurus* y *Artemia franciscana*. En las Tablas VII.6 y VII.7 se muestran los valores PNEC calculados a partir del LOEC aplicando el mencionado factor de ensayo de 1000 (Richardson, 1995) así como los valores PEC obtenidos de los estudios de análisis de las concentraciones residuales en la Albufera de Valencia y en las parcelas experimentales (valores tomados del Capítulo IV, Tablas IV.15 y IV.21, respectivamente), finalmente se exponen los resultados de los riesgos ambientales (PEC/PNEC) de los fungicidas estudiados.

Tabla VII.4. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Thamnocephalus platyurus*

Materia Activa Pura	EC_{50-24h} (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
Carbendazima	1.5	0.195	0.39
Flusilazol	8.6	1.56	3.12
Procloraz	12.9	3.31	6.62
Tebuconazol	9.5	0.43	1.71
Triciclazol	84.8	60	80

EC₅₀: Concentración Efectiva 50 de los organismos expuestos para el tiempo indicado

NOEC: Concentración estadísticamente significativa a la cual no se observa efecto

LOEC: Concentración más baja estadísticamente significativa a la cual se observa efecto

Tabla VII.5. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*.

Materia Activa Pura	EC_{50-24h} (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
Carbendazima	109.3	6.25	12.5
Flusilazol	46.4	0.98	1.96
Procloraz	40.7	1.87	3.75
Tebuconazol	36.5	3.2	6.4
Triciclazol	24.1	1.6	3.2

EC₅₀: Concentración Efectiva 50 de los organismos expuestos para el tiempo indicado

NOEC: Concentración estadísticamente significativa a la cual no se observa efecto

LOEC: Concentración más baja estadísticamente significativa a la cual se observa efecto

Tabla VII.6. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Thamnocephalus platyurus*. Cálculo del CR para La Albufera y para arrozal

Tóxico ensayado	PEC ^a Albufera	PEC ^b Arrozal	PNEC*	CR ^{Albufera} PEC ^a /PNEC*	CR ^{Arrozal} PEC ^b /PNEC*
Carbendazima	0.0050	0.0370	0.00039	12.82	94.88
Flusilazol	0.0005	0.0129	0.00312	0.16	4.14
Procloraz	0.0006	0.2358	0.00662	0.09	35.62
Tebuconazol	0.0027	0.0050	0.00171	1.58	2.93
Triciclazol	0.0060	0.3708	0.08000	0.075	4.63

^aPEC: concentración residual máxima del fungicida, en mg/L, en aguas de la Albufera de Valencia. Datos obtenidos del Capítulo IV, Tabla IV.15

^bPEC: concentración residual máxima del fungicida, en mg/L, en aguas de arrozal. Datos obtenidos del Capítulo IV, Tabla IV.21

*PNEC: LOEC/1000 (mg/L)

Tabla VII.7. Resultados de los ensayos de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*. Cálculo del CR para La Albufera y para arrozal

Tóxico ensayado	PEC ^a Albufera	PEC ^b Arrozal	PNEC*	CR ^{Albufera} PEC ^a /PNEC*	CR ^{Arrozal} PEC ^b /PNEC*
Carbendazima	0.0050	0.0370	0.01250	0.40	3
Flusilazol	0.0005	0.0129	0.00196	0.25	6.60
Procloraz	0.0006	0.2358	0.00375	0.16	62.90
Tebuconazol	0.0027	0.0050	0.00640	0.42	0.80
Triciclazol	0.0060	0.3708	0.00320	1.90	115.90

^aPEC: concentración residual máxima del fungicida, en mg/L, en aguas de La Albufera de Valencia. Datos obtenidos del Capítulo IV, Tabla IV.15

^bPEC: concentración residual máxima del fungicida, en mg/L, en aguas de arrozal. Datos obtenidos del Capítulo IV, Tabla IV.21

*PNEC: LOEC/1000 (mg/L)

VII.4.2. Cálculo del índice de riesgo a escala local (I₂)

Complementariamente al estudio de evaluación del riesgo se ha realizado un estudio para establecer el riesgo a escala local derivado del uso de los plaguicidas.

El cálculo se realiza aplicando la ecuación:

$$I_2 = (A_{\text{agua}} + A_{\text{sedimento}}) \times B \times C \times D$$

Los factores de la ecuación se obtienen de la Tabla VII.8, donde: el parámetro A se calculó a partir de los datos mostrados en las Tablas VII.6 y VII.7 del apartado VII.4.1. Para cada uno de los organismos ensayados en ambos escenarios

propuestos. El factor B se ha establecido en función de los datos recopilados en *The Pesticide Manual* (Tomlin, 2000). El parámetro de “Persistencia” ha sido establecido según los datos obtenidos en el capítulo III de esta memoria de Tesis doctoral complementados con datos obtenidos en bibliografía (Tomlin, 2000); finalmente, el parámetro D se ha establecido según la importancia ecológica de de la población estudiada, que en este caso, ambas especies zooplanctónicas juegan un papel importante en la cadena trófica por ser alimento de especies piscícolas se ha seleccionado el valor mas alto.

Tabla VII.8. Índice de Riesgo a escala local (I₂)

PEC/PNEC	A	FBC	B
>10 ²	4		
10 - 10 ²	3	log K _{ow} > 3.5	1.0
1 - 10	2	2.5 < log K _{ow} < 3.5	0.75
10 ⁻¹ - 1	1	log K _{ow} < 2.5	0.5
< 10 ⁻¹	0		
Persistencia	C	Poblaciones de riesgo	D
Meses	1.0	Muy importante	1.25
Semanas	0.8	Importante	0.75
Días	0.6	Poco importante	0.5

Para el calculo del CR en sedimentos únicamente se han encontrado valores PEC para Procloraz, con un valor de 60 µg/kg (Kreuger *et al.*, 1999) y de 50 µg/kg para triciclazol (Padovani *et al.*, 2006) estos valores son similares a las concentraciones halladas para otros fungicidas de la misma familia como el Penconazol con 39 µg/kg (Bermúdez-Couso *et al.*, 2007) y 34 µg/kg del Propiconazol (Kreuger *et al.*, 1999). Con estas concentraciones residuales, el factor A_{sedimento} obtendría un valor de 3, por este motivo y debido a la falta de datos para los otros fungicidas se ha considerado emplear el valor 3 en todos los fungicidas.

Los valores encontrados para residuos de fungicidas de interés en sedimentos son del mismo orden, debido a la inexistencia de datos de algunos plaguicidas como carbendazima, flusilazol y tebuconazol se ha optado por asumir que el RC está entre 10 y 100 con ello, el factor A obtiene un valor de 3, valor obtenido en los fungicidas donde si hay datos disponibles en bibliografía.

En las Tablas VII.9 y VII.10 se muestran los resultados del cálculo del riesgo a escala local para *T. platyurus* y *A. franciscana* a escala local.

Tabla VII.9. I_2 a escala local para *Thamnocephalus platyurus*

	$A_{\text{Agua}}+A_{\text{Sedimento}}$	B	C	D	I_2^*
Carbendazima	3+3	0.5	1	1.25	3.75
Flusilazol	1+3	1	1	1.25	5
Procloraz	0+3	1	1	1.25	3.75
Tebuconazol	2+3	1	1	1.25	6.25
Triciclazol	0+3	0.5	1	1.25	1.875

$$*I_2 = (A_{\text{agua}} + A_{\text{sedimento}}) \times B \times C \times D$$

Tabla VII.10. I_2 a escala local para *Artemia franciscana*

	$A_{\text{Agua}}+A_{\text{Sedimento}}$	B	C	D	I_2^*
Carbendazima	2+3	0.5	1	1.25	3.125
Flusilazol	2+3	1	1	1.25	6.25
Procloraz	3+3	1	1	1.25	7.5
Tebuconazol	1+3	1	1	1.25	5
Triciclazol	4+3	0.5	1	1.25	4.375

$$*I_2 = (A_{\text{agua}} + A_{\text{sedimento}}) \times B \times C \times D$$

De la Tabla VII.9 se concluye que el triciclazol es el compuesto que menor riesgo a escala local presenta para *T. platyurus*, seguido de procloraz, carbendazima, flusilazol y tebuconazol.

Cabe recordar que la aplicación del índice se ha realizado desde un punto de vista proteccionista, donde se han tomado como valores PEC, las concentraciones residuales mayores para compuesto, tanto en La Albufera como en los arrozales. Como valor PNEC, se ha optado por tomar el valor LOEC, obtenido en los ensayos de toxicidad; este parámetro, por definición, depende del rango de concentraciones empleado para calcular la LC_{50} , si el rango de concentraciones es muy amplio el valor LOEC tendrá una mayor diferencia con respecto a la LC_{50} , sin embargo, el valor de LC_{50} no debería ser muy diferente en uno u otro caso, ya que la LC_{50} se calcula estadísticamente siguiendo una regresión probabilística, entre el % de mortalidad y concentración. Sin embargo, en los últimos tiempos algunos autores han cuestionado el empleo de la LC_{50} como un indicador adecuado para predecir el efecto de tóxicos sobre poblaciones (Starck, 2005).

VII.5. CONCLUSIONES

Los niveles de contaminación por fungicidas azólicos encontrados, son inferiores a las concentraciones consideradas tóxicas para los microcrustáceos estudiados, tanto en las aguas de La Albufera como en los arrozales tratados. Los fungicidas estudiados son utilizados en el cultivo del arroz para controlar, prevenir o evitar los efectos del desarrollo del hongo *Pyricularia oryzae*, y los microcrustáceos estudiados, son organismos zooplanctónicos característicos de humedales mediterráneos.

Sin embargo, dada la estabilidad de los fungicidas estudiados, resulta recomendable prestar especial atención a las posibles contaminaciones producidas por vertidos accidentales o por la realización de tratamientos no adecuados, especialmente en los canales que conducen las aguas de los campos tratados hacia el Lago.

El riesgo ambiental obtenido para la carbendazima, indica que este compuesto es potencialmente peligroso para el medio ambiente y para los organismos de zooplancton. Además, cabe recordar que este compuesto es muy tóxico para peces y tóxico en la reproducción¹⁵ (mutagénico y cancerígeno), además de ser un reconocido disruptor endocrino (Earl Gray, *et al.*, 1990; Tomlin, 2000) y, por ello, estar incluido en la lista de sustancias que se sospecha pueden interferir en el sistema endocrino de humanos y animales (COM 706 final, 1999).

Según los resultados obtenidos, tebuconazol y procloraz presentan un menor riesgo ambiental que la carbendazima.

El procloraz es medianamente tóxico para peces según consta en la ficha de registro¹⁶ del formulado Bumper P® (clasificación ecotoxicológica para peces: B), además tiene un potencial efecto cancerígeno para el ser humano, según la clasificación de la Agencia de Protección Medioambiental de los USA¹⁷ (USEPA, 2000).

¹⁵ <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/Carbenda.htm>

¹⁶ <http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/22018.pdf>

¹⁷ www.epa.gov/pesticides/carlist/

Finalmente, el triciclazol no presenta toxicidad para peces, mamíferos o aves, según consta en el registro¹⁸ del Ministerio de Agricultura y Pesca. Tampoco se han encontrado evidencias en las mismas fuentes bibliográficas consultadas, para los otros compuestos, de su posible carácter cancerígeno o alterador del sistema hormonal; además de necesitar una menor dosis de aplicación de formulado (0.3 kg/ha, frente a 1L/ha de tebuconazol o procloraz), y presentar un menor plazo de seguridad (15 días), que el formulado comercial de tebuconazol (Folicur® 25 EW), cuyo plazo de seguridad es de 35 días, según su ficha de registro¹⁹.

A la espera de poder disponer de los resultados, sobre la eficacia de cada fungicida, en el control del hongo, obtenidos tras los tratamientos experimentales realizados en los campos de arroz, con plantas infectadas en forma natural, y empleando los formulados comerciales, a las dosis recomendadas por el fabricante, y suponiendo que todas las materias activas tienen un efecto similar en el control de la plaga, en aplicaciones a las dosis recomendadas por el fabricante; parece recomendable el uso del triciclazol, para el control de *Piricularia oryzae*, por ser el compuesto que menor riesgo ambiental presenta, según los resultados obtenidos referentes a los índices ectotoxicológicos aplicados. Sin embargo, el riesgo ecológico también debe ser evaluado en otros aspectos, como el impacto de estos compuestos a nivel fisiológico (metabólico, hormonal, enzimático, endocrino, molecular, etc) en estas especies del zooplancton y en otras especies superiores como peces, cangrejos o moluscos, también presentes en el Lago de la Albufera.

En este sentido, algunos compuestos, existentes con actividad antifúngica, no están autorizados por el Ministerio de Agricultura y Pesca para su uso en arrozal, por presentar serios problemas para la salud humana y animal, tal es el caso del piroquilon e isoprotilano (MAPA).

¹⁸ <http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/15832.pdf>

¹⁹ <http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/18640.pdf>

VIII. CONCLUSIONES FINALES

VIII.1. Degradación y disipación de los fungicidas azólicos en medios acuáticos

El estudio de la estabilidad de los fungicidas azólicos en disoluciones acuosas tamponadas, a diferentes condiciones de temperatura, pH, aireación e iluminación con lámparas de luz tipo día, demuestra que carbendazima, procloraz y tebuconazol presentan una elevada estabilidad.

Los ensayos de fotólisis con luz ultravioleta tipo C, demuestran que la luz ultravioleta podría utilizarse para la depuración de aguas contaminadas por los fungicidas azólicos estudiados.

En los ensayos de degradación, realizados en cultivos puros de algas o con agua procedente del lago de la Albufera, se han observado periodos de degradación intermedios.

Dada la estabilidad de los fungicidas estudiados, resulta recomendable prestar especial atención a las posibles contaminaciones producidas por vertidos accidentales, o por la realización de tratamientos no adecuados, especialmente en los canales que conducen las aguas de los campos tratados hacia el Lago.

VIII.2. Evaluación de las Concentraciones Ambientales Predecibles

La determinación de los niveles de concentración residual de fungicidas azólicos en el lago de la Albufera de Valencia y en las parcelas experimentales, indican que estas concentraciones son, como máximo, del orden de $\mu\text{g/L}$, encontrándose, en la mayoría de ocasiones, por debajo del límite de detección. El compuesto más frecuentemente detectado, a lo largo de los 3 años de estudio, ha sido el tebuconazol (que se ha encontrado en el 50%, aproximadamente, de las muestras analizadas). Propiconazol y flusilazol fueron los compuestos que se detectaron con menor frecuencia.

VIII.3. Ensayos de toxicidad con fungicidas azólicos

Los ensayos de toxicidad realizados con *Artemia franciscana* y *Daphnia magna*, indican que el carácter tóxico de los fungicidas azólicos estudiados difiere significativamente de una especie a otra. Esta diferencia justifica la necesidad de evaluar la toxicidad en, al menos, dos especies para que la evaluación del riesgo ambiental pueda ser aceptable.

Los valores de EC_{50} calculadas son del mismo orden de magnitud que los indicados en la bibliografía para otros organismos; sin embargo, la mayor sensibilidad que presenta *T. platyurus* y la buena correlación existente con la toxicidad calculada en otros organismos, lo convierte en un ensayo ecotoxicológico complementario a lo tradicionales tests realizados con *D. magna*, permitiendo establecer condiciones más restrictivas y seguras para el uso de estas materias activas y sus formulaciones.

VIII.4. Determinación experimental del Factor de Bioconcentración (BCF) en peces y modelización del proceso con el modelo de fugacidad de Mackay (1991)

En el estudio de la capacidad bioacumulativa de los fungicidas azólicos, realizado con el modelo de Mackay (1991), se ha comprobando que el flusilazol, procloraz, propiconazol y tebuconazol presentaban un comportamiento similar.

El “Factor de Bioacumulación” de tebuconazol en pez cebra (*Danio rerio*), calculado de forma experimental, y el valor calculado mediante el modelo de bioacumulación propuesto por Mackay fueron casi coincidentes para concentraciones iniciales de tebuconazol de 0.25 mg/L. Esta similitud de ambos resultados, indica que el modelo de bioacumulación, propuesto por Mackay, es un buen método para la evaluación de riesgos ambientales, en zonas húmedas mediterráneas, permitiendo realizar estimaciones de la capacidad bioacumulativa de compuestos similares a los estudiados y así minimizar el empleo de ensayos *in vivo*.

VIII.5. Evaluación de Riesgos Ambientales derivados del uso de fungicidas azólicos, aplicados en el cultivo del arroz, para el control de *Piricularia oryzae*

Los niveles de contaminación por fungicidas azólicos encontrados son inferiores a las concentraciones consideradas tóxicas para los microcrustáceos *Artemia francisca* y *Thamnocephalus platyurus*, tanto en las aguas de La Albufera como en los arrozales tratados con los formulados comerciales.

El riesgo ambiental obtenido para la carbendazima, indica que este compuesto es, potencialmente, peligroso para el medio ambiente y para los organismos del zooplancton estudiados. Además, este compuesto es altamente tóxico para peces.

El triciclazol es el fungicida que presenta menor riesgo ambiental a la vista de los resultados derivados de la evaluación de riesgo ambiental.

Dada la escasa volatilidad de estos fungicidas, no se aprecia riesgo ambiental por volatilización tras la aplicación de los productos estudiados.

El modelo de fugacidad de Mackay indica que la fracción de triciclazol y carbendazima que puede quedar retenida en el sedimento es casi nula. En cambio, tebuconazol, procloraz y flusilazol presentan una fracción mayor de compuesto que puede quedar retenido en el sedimento.

Contrastar estos datos teóricos implicaría el cálculo de las isothermas de adsorción para determinar las PEC en el sedimento y evaluar el riesgo derivado para los organismos bentónicos.

Considerando los niveles de concentración de fungicidas encontrados en las aguas de las parcelas experimentales y los niveles de concentración a los que no deben producirse efectos observables (PNEC) en las especies estudiadas, se deduce que los riesgos ambientales debidos a los tratamientos con los fungicidas azólicos son, en general, moderados.

Es importante destacar que, en función de los datos seleccionados, para la realización de un estudio de evaluación del riesgo, los resultados emitidos pueden ser extremadamente variables, llegando a poder emitirse conclusiones muy diferentes.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Alabaster, J.S. and Lloyd, R. (eds). (1980). *Water quality criteria for freshwater fish*. Butterworths for the Food and Agricultura Organization, London.
- Anderson, P.D. and De Apollonia, S. (1988). *Aquatic animals. Principles of ecotoxicology* (Scope 12). Butler G.C. (ed). Toronto: Wiley
- Andreu, O. and Carrasco, J.M. (2007). *Surface water monitoring of the fungicides tebuconazole and triciclazole in the albufera natural park (Valencia, Spain)*. In: Book of abstracts of the 14th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region (MESAEP) congres. Sevilla, Spain, October 10-14th, 2007.
- Andreu, O., Carrasco, J.M., Saez, A., Pelegri, R. and Sabater, C. (2005). *Monitoring of fungicide carbendazim in the surface waters of the lake of Albufera, Valencia, Spain*. In: Book of abstracts of the 4th MGPR International Symposium of Pesticides in Food and The Environment in Mediterranean Countries and MGPR congres. Annual Meeting 2005. Kuşadasi-Aydin. 21-24 september de 2005. Turquia.
- Andreu-Moliner, E. y Camacho-González, A. (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, Spain. 226 pp.
- APHA-AWWA-WPCF. (1992). Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Traducción al castellano de la edición 17. Ed. Diaz de Santos.
- Artoxkit M™. (2001). Crustacean Toxicity Screening Test for Marine/Estuarine water. Standard Operating Procedure. Microbiotest Inc, Ghent, Belgium.
- Babín, M., Casado, S., Chana, A., Herradón, B., Segner, H., Tarazona, J.V. and Navas, J.M. (2005). Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicology in Vitro*, 19(7): 899-902
- Barata, C., Damasio, J.B., López, M.A., Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D., Riva, M.C., Ralduá, D. (2007). Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26:370–379.
- Barberá, C. (1989). *Pesticidas agrícolas*, Ed. Omega S.A., Barcelona.
- Barceló, D. and Hennion, M. C. (1997). *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Elsevier: Amsterdam.
- Barquero, E. (2001). Disseny, construcció i avaluació d'analitzadors per a la monitorització mediambiental. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Belmonte, A., Garrido, A. and Martínez, J.L. (2005). Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*; 538: 117-127.
- Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J.C., López-Periago, E., Soto-

- González, B. and Simal-Gándara, J. (2007) Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Research*. 41, 4515-4525
- Blaise, C. (1988). Canadian application of microbiotests to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. In: Persoone, G., Janssen, C. and De Coen, W. eds. *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA, 495-500.
- Blaise, C., Bermingham, N. and van Coillie, R. (1985). The integrated ecotoxicological approach to assessment of ecotoxicity. *Water Quality Bull.*, 10(1): 3-7.
- Blanco, C. (1977). Estudio de la contaminación de la Albufera de Valencia y de los efectos de dicha contaminación sobre la flora y fauna del lago. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España.
- Bock, C., Kroppenstedt, R.M., Schmidt, U., and Diekman, H. (1996). Degradation of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol by environmental bacterial strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 45, 257-262.
- Bocquené, G. and Franco, A. (2005). Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 612-619.
- Boluda, R, Quintanilla, J.F, Bonilla, J.A., Sáez, E and Gamón, M. (2002). Application of the Microtox[®] test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). *Chemosphere*. 46(2), 355-369.
- Boluda, R., Gamón, M., Gómez De Barreda, D., Sáez, E., Gil, J., García De La Cuadra, J., Ten, A., Lleó De Otal, C., Lorenzo, E., Pelegrí, R., Aliaga, T. and Sáez, A. (2002). Monitoring of pesticide levels in water from irrigation channels of the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). In: UA, IAEAC, GCTA (Eds.), *Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography*. Journal Chromatography
- Borgå, K., Fisk, A.T., Hoekstra, P.F. and Muir, D.C.G. (2004). Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem*. 23, 2367-2385.
- Boudina, A., Emmelin, C., Baaliouamer, A., Grenier-Loustalot, M.F. and Chovelon, J.M. (2003). Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution. *Chemosphere*. 50(5) 649-655
- Brausch, J.M. and Smith, P.N. (2007). Toxicity of three Polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrim, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 52: 217-221
- Buikema, A.L.; Geiger, J.G. and Lee, D.R. (1980). *Daphnia* toxicity tests. In: *Aquatic invertebrate bioassays*. A.L. Buikema Jr., John Cairns Jr. eds., ASTM STP 715, American Society for Testing and Materials, Pennsylvania. pp. 48-69.
- Byard, J.L. (1999). The impact of rice pesticides on the aquatic ecosystems of the

- Sacramento River and Delta (California). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 159: 95-110.
- Cano, E., Jimenez, A., Cabral, J.A. and Ocete, M.E. (1999). Acute Toxicity of Malathion and New Surfactant "Genapol OXD 080" on Species of Rice Basins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*,
- Capri, E., Cavanna, S., (1999). Ground and surface water bodies contamination by pesticide use in paddy field. In: Capri, E. *et al.* (Eds.), Proceedings of the environmental risk parameters for use of plant protection products in rice. Tipolitografia Press, Piacenza, Italy, pp. 48-71.
- Carabias, R., Rodríguez, E., Fernández, E., Calvo, L. and Sánchez, F.J. (2003). Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Research*, 37: 928–938.
- Carrasco, J.M. y Plantá, M. (1985). Contaminación de la Albufera de Valencia por plaguicidas utilizados en el cultivo del arroz. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 25(1): 144-148.
- Carrasco, J.M., Cuñat, P., Martínez, M., Martínez, R.M., Primo, E. (1972). Contaminación de la Albufera de Valencia, I. Niveles de contaminación por insecticidas. *Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 12: 583-896.
- Carrasco, J.M., Plantá, M., Gómez-Casals, V. and Moragués V. (1987). Pesticide residues in lake Albufera, Valencia, Spain. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(4): 752-753.
- Carrasco, J.M., Sabater, C., Alonso, J., González, J., Botella, S., Amorós, I., Ibáñez, M.J., Boira, H. and Ferrer, J. (1992). Molinate decontamination processes in effluent water from rice fields. *Science of the Total Environment*, 123/124: 219-232.
- Carrasco, R. (2000). Biodegradación y fotodescomposición de plaguicidas en sistemas acuáticos. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia.
- Cebrián, M., Carballas, T. and Gil-Sotres, F. (1988). Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an andic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(3): 209-215.
- Cerejeira, M.J., Pereira, T., Brito, F. e Morbey, M. (1999). Toxicidade de pesticidas aplicados em arrozais para o meio aquático. Proceedings of the V Encontro Nacional de Protecção Integrada "A Prática da Protecção e Produção Integrada no Limiar do Milénio", Bragança, 27–29 October, p. 505-513.
- Chuckwudebe, A., March, R.B., Otham, M. and Fukuto, T.R. (1989). Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. *J. Agric. Food Chem.*, 37(2): 539-545
- Claver, A., Peña-Ormad, L.R., and Ovelleiro, J.L. (2006). Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere*, 64(9):1437-1443.
- Codex Alimentarius, (2001). Pesticide residues in food: maximum residue limits, vol.

- 2B. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- COM(2003) 573 final. Elaboración de un plan de actuación comunitario para la gestión de las anguilas europeas. Comisión Europea. UE. Bruselas.
- Comber, M., Walker, J., Watts, C. and Hermens, J. (2003). Quantitative structure–activity relationships for predicting potential ecological hazard of organic chemicals for use in regulatory risk assessments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 1822-1828
- Commission of the European Communities (1996). *Technical Guidance Documents in Support of The Commission Directive 93/67 EEC on risk assessment for new notified substances and the commission regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances*, Italy.
- Commission of the European Communities, Community Strategy for Endocrine Disruptors, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, COM 706 final, 1999.
- Commission of the European Communities. CEE. (1996). *Technical Guidance Documents in Support of The Commission Directive 93/67 EEC on risk assessment for new notified substances and the commission regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances*, Italy.
- Comoretto, L., Arfib, B., Talva, R., Chauvelon, P., Pichaud, M., Chiron, S. and Höhener, P. (2007). Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): Field study and modeling *Environmental Pollution, In Press*.
- Cooman, K., Debels, P., Fajardo, M., Urrutia, R. and Barra, R. (2005). Use of *Daphnia* spp. for the Ecotoxicological Assessment of Water Quality in an Agricultural Watershed in South-Central Chile. *Arch of Environmental Contam Toxicol.*, 48: 191-200.
- CORPEP, 2000. Etude de la contamination des eaux superficielles de Bretagne par les produits phytosanitaires. Rapport annuel 1999, Préfecture de la Région Bretagne. Rennes, France, 25p.
- CORPEP, 2001. Etude de la contamination des eaux superficielles de Bretagne par les produits phytosanitaires. Rapport annuel 2000. Préfecture de la Région Bretagne, Rennes, France, 25p.
- Cotou, E. (1993). The controlled production of dormant eggs of *Daphnia pulex* (Leydig) as biological starting material for toxicity testing. PhD Thesis, University of Ghent, Belgium, 284 pp.
- Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the Protection of Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. Brussels
- Crossland, N. O. (1992). Hazard assessment in freshwater ecosystems. *Toxicology*

Letters. 64-65, 511-517

- Cuppen, J., Van den Brink, P., Camps, E., Uil, K. and Brock, T. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquatic Toxicology*. 48(2-3) 233-250
- Damáso, J., Tauler, R., Teixidó, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva, M.C., Soares, A.M.V. and Barata, C. (2008). Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 8(4): 310-320.
- De Liñan, C (2002). Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ediciones Agrotécnicas, S.L. Madrid. España
- DECISIÓN No 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre de 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
- Decreto 71/1993, de 31 mayo, del Gobierno Valenciano, de régimen jurídico del Parc de la Albufera (DOGV.2057, de 30-06-93).
- Decreto 96/1995, de 16 mayo del Gobierno Valenciano. Plan de ordenación de los Recursos Naturales de la Cuenca Hidrográfica de la Albufera. DOGV.2516, de 26-05-95.
- Del Valls, T. y Conradi, M. (2000). Avances en ecotoxicología marina: comparación entre test de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. *Ciencias Marinas*. 26(1), 39-64.
- Depledge, M.H. and Hopkin, S.P. (1995). *Methods to assess effects on brackish, estuarine and near coastal water organisms*. In Linthurst P, Bourdeau P, Tardiff RG, eds, *Methods to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems*. John Wiley, London, UK, pp 125–149.
- Derby, S.B. and Ruber, E. (1970). Primary production depression of oxygen evolution in algal cultures by organophosphorus insecticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 5(6): 553-558.
- Di Guardo, A., Calamari, D., Zanin, G., Consalter, A. and Mackay, D. (1994). A fugacity model of pesticide runoff to surface water: development and validation. *Chemosphere*, 28: 511-513.
- DIREN, 2001. Le suivi de la contamination des rivières de la Martinique par les produits phytosanitaires. Bilan à l'issue des trois premières campagnes de mesure. DIREN, Fort-de-France, Martinique Island, France, 12p.
- DOCE. (1988). *Ensayo de inhibición del crecimiento de las algas*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (C.E.E). N° L 133, pp. 89-93.

- DOCE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas.(1994). Nº L 161/9
- Dragula, C. (1994). International armonization for the risk assessment of pesticides: Results of an International Program on Chemical Safety (IPCS) Survey. *Regul. Tox. Pharmacol.* 20(3), 337-353
- Draper, W.M. and Crosby, D.G. (1981). Hydrogen peroxide and hydroxyl radical: intermediates in indirect photolysis reactions in water. *J. Agric. Food. Chem.*, 29: 699-702.
- Draper, W.M. and Crosby, D.G. (1983). The photochemical generation of hydrogen peroxide in natural waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 12(1): 121-126.
- Duran, G. (1992). Análisis y degradación de plaguicidas modernos en el medio acuático. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Durand, G., Abad, J.L., Sánchez-Baeza, F., Messeguerand, A. and Barceló, D. (1994). Unequivocal identification of compounds formed in the photodegradation of fenitrothion in water/methanol and proposal of selected transformation pathways. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 814-821
- Earl Gray, L., Ostby, J., Linder, R., Goldman, J., Rehnberg, G. and Cooper, R. (1990). Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. *Fundamental and Applied Toxicology*, 15(2): 281-297
- Encina, F. y Díaz. O. (2001). Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección Asociado de algas bentónicas marinas. En: *Sustentabilidad Ambiental*. K. Alveal & Antezana Editores. Universidad de Concepción. 357-336 pp.
- EPA (1998) Guidelines for risk assement. Washinton, DC. 114 pp.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1984). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh-water and marine organisms, 4th ed. EPA, Whashington, D.C., pp. 44-69
- EPIWIN v3.12 (Syracuse Research Corporation), EPA, 2004
- Felding, M., Barceló, D., Helweg, A., Galassi, S., Tortensson, L., Van Zoonen, P., Wolter, R., Angeletti, G. (1992). *Pesticides in ground water and drinking water*. In: *Water Pollut. Res. Rep. 27*. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium.
- Ferrando, M.D. and Andreu-Moliner, E. (1991). Acute letal toxicity of some pesticidas to *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus plicatilis*. *Bull. Environ. Toxicol. Chem.*, 47: 479-484
- Finizio, A., Calliera, M. and Vighi, M. (2001). Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystems. *Ecotogical. Environ. Saf.* 49, 262-274.
- Fochtman, P., Raska, A. and Nierzedzka, E., 2000. The use of conventional bioassays, microbiotests, and some "rapid" methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environ. Toxicol.*, 15: 376-384

- Font, G., Mañes, J., Moltó, J.C. and Picó, Y. (1993). Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. *Journal of Chromatograph*,. 642: 135-161.
- Fossi, M.C. (1998). Biomarkers as diagnostic and pronostic tools for wildlife risk assessment: integrating endocrine-disrupting chemicals. *Toxicology and Industrial Health*,14: 1-2.
- Furness, R.W. and Rainbow, P.S. (1990). *Heavy metals in the marine environment*. Boca Raton, Florida. CRC Press.
- Gaggi, C. (1998). *Saggi tossicologici di laboratorio*. In: Ecotossicologia; (Vighi M., Bacci E., Eds.), UTET.
- Gaggi, C., Sbrilli, G., Hasab El Naby, A.M., Bucci, M., Duccini, M. and Bacci, E. (1995). Toxicity and hazard ranking of s-triazine herbicides using Microtox, two green algal species and a marine crustacean. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1065-1069.
- Gamón, M., Boluda, R., Gómez de Barreda, D., Sáez, E., Gil, J., García de la Cuadra, J., Ten, A., Lleó de Otal, C., Lorenzo, E., Pelegrí, R., Aliaga, T. and Sáez, A. (2002). Monitoring of pesticide levels in water from irrigation channels of the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). *En: Evaluación y seguimiento de plaguicidas en aguas*. Serie Monografías. Ed. Universidad de Almería. Capítulo II.
- Gamón, M., Lleó, C., Ten, A., and Mocholí, F. (2001). Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetales by Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC Internatonal*, 84(4): 1209-1216.
- Gómez de Barreda, D. (1999). Rice scenario, ecology of the paddy fields and monitoring studies in Spain. *In: Arnold, D. et al.* pp. 23-28
- Gómez de Barreda, D., Gamón, M., Lorenzo, E., Lleó, C., Ten, A., Millán, M^a.R., Pérez, M^a.T. (2002). Contaminación de canales por herbicidas en el Parque Natural de La Albufera. *Actas de la XXI Reunión del Grupo de trabajo de Malas Hierbas y Herbicidas*, pp. 50–58
- Goodman, B.A., Allison, M.J., Oparika, K.J., Hillman, J.R. (1992). Xenobiotics: their activity and mobility in plants and soils. *J. Sci. Food Agric.*, 59: 1-20.
- GRAP, 2002. Réseau régional de suivi de la qualité des eaux vis à vis des produits phytosanitaires. *Années 1999, 2000 et 2001*. DIREN Poitou-Charente, Poitiers, France, 74p.
- Guerrero-García, A. (1999). *Cultivos herbáceos extensivos*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid
- GVA. (1991). *Plan Especial de Protección del Parque Natural de la Albufera*. Generalitat Valenciana. Conselleria de Medi Ambient. 148 pp.
- Halling-Sørensen, B., Nyholm, N. and Baun, A. (1996). Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace, *Chemosphere* 32, 1513-1526.
- Handbook of Chemistry and Physics. 67th.Edition. (1986-87

- Hegelund, T., Ottosson, K., Madeleine, R., Tomberg, P. and Celander, M.C. (2004). Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1326-1334.
- Hellawell, J.M. (1986). *Biological indicators of freshwaters pollution and environmental management*. Elsevier Applied Science, London.
- Hemmamda, S., Calmon, M. and Calmon, J.P. (1994). Kinetics and Hydrolysis Mechanism of Chlorsulfuron and Metsulfuron-Methyl. *Pestic. Sci.*, 40: 71-76.
- Henry, L. (1988). Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. URL: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnanx51.html>
- IBAMA. (1988). *Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos*. Secretaria do Meio Ambiente, Brasília, 351 pp
- Ibarz, A., Panadés, R. and Tejero, J.M. (1996). Fotodescomposición de benomilo en solución acuosa. *Afinidad*, 53:51–53.
- Inman, C.B.E. and Lockwood, A.P.M. (1977). Some effects of methylmercury and lindane on sodium regulation in the amphipod *Gammarus duebeni* during changes in the salinity of its medium. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 58: 67-75
- Ioannis, K., Konstantinou, A., Zarkadis, K. and Albanis, T. (2001). Photodegradation of Selected Herbicides in Various Natural Waters and Soils under Environmental Conditions. *Journal Environ. Qual.*, 30: 121-130
- ISO. (1989). Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*
- Jiménez, B., Moltó, J.C., Font, G. and Soriano, J.M. (1999). Evaluation by HPLC-UV of Polar Pesticides in Rice Fields. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63: 813-820.
- JMPR-IPCS, (1983). JMPR-IPCS. *Joint Meeting on Pesticide Residues*. FAO
- Johnson, A. K. L. and Ebert, S. P.(2000). Quantifying Inputs of Pesticides to the Great Barrier Reef Marine Park – A Case Study in the Herbert River Catchment of North-East Queensland. *Marine Pollution Bulletin*. 41: 302-309.
- Jonsson, C.M., Paraiba, L.C., Mendoza, M.T., Sabater, C. and Carrasco, J.M. (2001). Bioconcentration of the insecticide Pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. *Chemosphere*. 43: 321-325
- Kari, G., Rodeck, U. and Dicker, A.P. (2007). Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther.*, 82(1):70-80.
- Karns, J.S., Muldoon, M.T., Mulbry, W.W., Derbyshire, M.K., Kearney, P.C. (1987). Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticides. ACS Symp. Series 334, *En: Biotechnology in agricultural chemistry* (LeBaron, H.M., Mumma, R.O., Honeycutt, R.C., Duesing, J.H., Phillips, J.F. and Haas, M.J., eds.), American Chemical Society, Washington, D.C.

- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G. and Bjerregaard, P. (2007). Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 145: 165-170
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Avants, J.K. and Fisk, A.T. (2006). Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 80: 372-381
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Black, M.C., Avants, J.K., Fisk, A.T. (2006). Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2930-2936.
- Kovach, J., Petzoldt, C., Degni, J. and Tette, J. (1992). A method to measure the environmental impact of pesticides. *NY. Food Life Sci. Bull.* 139 p.
- Kreuge, J., Peterson, M. and Lungren, E. (1999). Agricultural inputs of pesticide residues to stream and ponds sediments in a small catchment in Southern Sweden. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 55-62
- Krieger, M.S., Cook, W.L. and Kennard, L.M. (2000). Extraction of Tricyclazole from Soil and Sediment with Subcritical Water. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2178 -2183.
- Kungolos, A., Batziaka, V., Samaras, P., Sakellaropoulos, G.P., Kipopoulou, A.M., Zoumboulis, A. and Kouimtzi, Th. (2000). *Using Toxkits for Calculating Interactive Effects of Chemicals*. In : New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring (G. Persoone, C. Janssen and W. De Coen , eds. - Kluwer Academic / Plenum Publishers), chapter 54:487-493
- Kuwatsuka, S. (1983). Fate of herbicides in flooded paddy soils. *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment*. Vol. 2. Miyamoto, J. and Kearney, P.C. (eds.), Pergamon Press.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A., Wantzen, M., da Silva, C. and Zech, W. 2002. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. *Environ. Qual.*, 31: 1636-1648.
- Laier, P., Metzdorff, S., Borch, J., Hagen, M.L., Hass, U., Christiansen, S., Axelstad, M., Kledal, T., Dalgaard, M. and McKinnell, C.(2006). Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 213(2): 160-171
- Lal, R. (1982). Accumulation, metabolism and effects of organophosphorus insecticides on microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 28: 149-200.
- Lee, C.L., Chen, I.M. and Fong, S.C. (1995). The effect of algacide benzalkonium chloride on the eater quality. *J. Fish Soc Taiwan.*, 22: 313-324
- Lemly, A.D. and Richardson, C.J. (1997). Guidelines for Risk Assessment in wetlands. *Environmental Monitoring and Assessment*. 47, 117-134.
- Levin, S. A., Harwell, M.A., Kelly, J.R. and Kimball, K.D. (1989). *Ecotoxicology: problems and approaches*. Springer-Verlag, New York.

- Levine, S.L., Czosnyka, H. and Oris, J.T. (1997). Effect of the fungicide clotrimazole on the bioconcentration of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*): in vivo and in vitro inhibition of cytochrome P4501A activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 306-311.
- Levine, S.L., Oris, J.T. and Denison, M.S. (1999). Modulation of CYP1A expression in rainbow trout by a technical grade formulation of propiconazole. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 2565-2573.
- Levitan, L. (1997). *An overview of pesticide impact assessment systems (Pesticide Risk Indicators) based on indexing or ranking pesticides by environmental impact*. OECD Workshop on Pesticide Risk Indicators, Copenhagen, Denmark. 135 pp.
- Litchfield, P.H. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113.
- Lopes, R.B., Paraiba, L.C., Ceccarelli, P.S. and Tornisielo, V.L. (2006). Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere*. 64, 56-62
- Maciel, E. (2005). *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multirésíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (Mangifera indica) Piracicaba*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros.
- Mackay, D. (1991). *Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach* Lewis Publ, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mackay, D. and Paterson, S. (1981). Fugacity Revisited. *Environment Sci. Technol.*, 16: 654-660.
- MacRae, T. and Pandey, A.S. (1991). Effects of metal ion early life stages of brine shrimp, *Artemia*: A developmental toxicity assay. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 20:247-252
- Mallat, E., Barcelo, D. and Tauler, R., 1997. Degradation study of benomyl and carbendazim in water by liquid chromatography and multivariate curve resolution methods. *Chromatographia*. 46 (7/8), 342-350.
- Maly, M.P. (1980). A study of the effects of pesticides on single and mixed species cultures of algae. Ph.D. Northeastern University, Boston, Massachusetts.
- Marcheterre, L., Choudhry, G.G. and Webster, G.R. (1988). Environmental Photochemistry of herbicides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 61-126
- Mazellier, P., Leroy, E. and Legube, B. (2002) Photochemical behaviour of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 153: 221-227
- McKim, J., Schmieder, P. and Veith, G. (1985). Absorption of organic chemical transport across trout gills as related to octanol-water partition coefficient. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 77: 1-10

- Mendoza, M.T. (2002). Evaluación de los riesgos ambientales y para la salud humana del uso de insecticidas organofosforados en los cultivos de arroz de las zonas húmedas mediterráneas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Miao, Z., Padovani, L., Riparbelli, C., Ritter, A.M., Trevisan, M., Capri, E., (2003). Prediction of the environmental concentration of pesticide in paddy field and surrounding surface water bodies. *Paddy Water Environ.*, 1: 121-132.
- Miao, Z., Trevisan, M., Capri, E., Padovani, L., Del Re, A.M. (2004). An uncertainty assessment of the RICEW model. *J. Environ. Qual.*, 33: 2217-2228.
- Mikami, N., Imanishi, K., Yamada, H. and Miyamoto, J. (1985). Photodegradation of Fenitrothion in water and on soil surface, and its hydrolysis in water. *J. Pesticide Sci.*, 10: 263-272.
- Min, K.J, and Cha, C.G. (2000). Determination of the bioconcentration of phosphamidon and profenofos in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Bull Environ Contam Toxicol.*, 5: 611-617
- Miyamoto, J., Mikami, N. and Takimoto, Y. (1990). The fate of pesticides in aquatic ecosystems. *In: Environmental Fate of Pesticides* (Hutson, D.H. and Roberts, T.R., eds.), 123-147.
- Mize, S.V., Porter, S.D. and Demcheck, D.K. (2007). Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA *Environmental Pollution*. In Press.
- MMA, Red Natura 2000: Zona de Especial Protección para las Aves y LIC, Lugar de Importancia Comunitaria
- Molinari, G.P., Sorlini, C., Daffonchio, D., Baggi, G. and Lorenzo, R. (1992). Activity and evolution of mixed microbial culture degrading molinate. *The Science of the Total Environment*, 123/124: 309-323.
- Montañés, J.F.C., Hattum, B.V. and Denner, J. (1995). Bioconcentration of chlorpyrifos by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) in outdoor experimental ditches. *Environ. Pollut.*, 88: 137-146
- Moors, M., Massart D.L. and McDowall, R.D. (1994). Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases: Classification and recommended practices *Pure Appl. Chem.*, 66: 277-304
- Moraes, R. (2002). A Procedure for ecological tiered Assessment of risks (PETAR). Department of Environmental Systems Analysis. Chalmers University of Technology Göteborg, Sweden.
- Mulla, M.S., Mian, L.S. (1981). Biological and environmental impacts of the insecticides malathion and parathion on nontarget biota in aquatic ecosystems. *Residue Reviews*, 78: 101-135.
- Muna, L., Guido, P., Janssen, C., de Coen, W. and Svardal, K. (1995). Toxicity evaluations of wastewaters in Austria with conventional and cost-effective bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 32: 139-146

- Nalewajko, C. and Olaveson, M.M. (1998). *Ecophysiological considerations in microalgal toxicity tests*. In: P.G. Wells, K. Lee and Ch. Blaise, Editors, *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp. 289-309.
- Newman, M. C. and McIntosh, A.W. (eds.). (1991). *Metal ecotoxicology. Concepts and applications*. Lewis. Chelsea.
- Nyholm, N. and Källqvist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity test with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, 689-703.
- OCDE. (Organization for Economic Co-operation and Development) (1998). "Section 2. Guideline 201. Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* En: *Guidelines for testing chemicals*. OECD. París (Francia).
- OCDE. (Organization for Economic Co-operation and Development) (1996) Bioconcentration: flow-through fish test. *OECD guidelines for the testing chemicals* n 305. Paris, France
- OCDE. (Organization for Economic Co-operation and Development) (1992). OECD guidelines for the testing chemicals. No. 210. Fish, early-life stage toxicity test. *Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 18 pp*
- OCDE. (Organization for Economic Co-operation and Development) (2000). "Section 2. Guideline 202. *Daphnia* sp. Acute immobilisation Test and Reproduction Test". En: *Guidelines for testing chemicals*. OECD. París (Francia).
- OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development) (1996). *OECD guidelines for the testing chemicals. No. 305. Bioconcentration: flow-through fish test*. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 23 pp
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A. and Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environ Toxicol Chem.*, 7: 1338-1349
- Padovani, L., Capri, E., Padovani, C., Puglisi, E., and Trevisan, M. 2006. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. *Chemosphere*, 62: 303-314.
- Palma, G., Sánchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R. and Barra, R. (2004). Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere*.57, 763-770.
- Panadés, R., Ibarz, A., Esplugas, S. (2000). Photodegradation of carbendazim in aqueous solutions. *Water Res.*, 34(11): 2951-2954
- Paraiba, L.C. (2007). Pesticide bioconcentration modelling for fruit trees. *Chemosphere*, 66: 1468-1475
- Paris, D.F., Lewis, D.L. (1973). Chemical and microbial degradation of ten selected pesticides in aquatic ecosystems. *Residue Rev.*, 45: 95-124.
- Parker, R.D., Jones, R.D. and Nelson, H.P (1995). GENECC: A Screening Model for Pesticide Environmental Exposure Assessment. In *Proceedings of the International Exposure Symposium on Water Quality Modeling*; American Society of Agricultural Engineers, pp. 485-490; Orlando, Florida.

- Parrilla, P. and Martínez Vidal, J.L. (1997). Determination of residues in water using LLE or SPE and HPLC/DAD detection. *Analytical Letters*, 30: 1719-1738.
- Peña, C. E., Carter, D.E. and Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Peña, S. (2002). Estudio y modulación del metabolismo del glutatión en la tolerancia al estrés oxidativo generado por plaguicidas en organismos acuáticos de interés comercial. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.
- Pereira, T., Cerejeira, M.J. and Espirito-Santo, J. (2000). Use of Microbiotests to Compare the Toxicity of Water Samples Fortified with Active Ingredients and Formulated Pesticides. *Environmental Toxicology*, 15(5): 401-405
- Pereira, T., Cerejeira, M.J., Brito, M.F and Morbey, M.A. (2000). Laboratory studies with microbiotests to evaluate the acute toxicity to aquatic biota of herbicides used in Portuguese paddy fields. In: Persoone, G., Janssen, C. and De Coen, W. eds. *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA, 495-500.
- Pérez, L, Barrera, R., Asturiano, J.F. y Jover, M. 2004. Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *Aquatic*. 20: 51-78.
- Perfil Ambiental de España 2004.
http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/perfil_ambiental/pdf/PerfilAmbResumen.pdf
- Peris, E., Requena, S., de la Guardia, M., Pastor, A. and Carrasco, J.M. (2005) Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere*, 60: 1542-1549
- Persoone, G. and Janssen, C.R. (1993). *Freshwater Invertebrate Toxicology Tests*. In: Calow P (Eds.) *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 51-65.
- Persoone, G., Janssen, C. and de Coen, W. (eds.). 2000. *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 550 pp.
- Persoone, G., Van de Vell, A., Van Steertegem, M. and Nayer, B. (1989). Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquat. Toxicol.*, 14: 149-166.
- Pest Management Regulatory Agency. Tebuconazole. Ottawa, 2007. 133p. (Regulatory Note - REG2006-11).
- Peterson, H.G. and Nyholm, N. (1993). Algal bioassays for metal toxicity identification. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 28: 53-129.
- Peterson, S.M. and Batley, G.E. (1993). The fate of pesticides in Australian rivers. *Chemistry in Australia*. 395-397 pp.

- Planas de Martí, S. (2004). Un nuevo enfoque en el empleo de los fitosanitarios en Europa. Referencias concretas sobre las técnicas y equipos de aplicación. En: *Producción hortícola y seguridad alimentaria*. Coord: Eduardo Jesús Fernández Rodríguez, 409
- PNUMA/IPCS (1999) Evaluación de riesgos químicos. Producido por el programa de las Naciones Unidas para el Medio ambiente, la Organización Internacional del Trabajo y La Organización Mundial de la Salud, en el marco del Inter-Organización Programme for the Sound Management of Chemical.
- PNUMA/IPCS (1999). *Evaluation of chemical risks*. Produced by the Program of the Nations United for the Ambient, the Organization the International of the Work and the World-wide Organization of the Health, within the framework of the Inter-Organization for Programme the Sound Management of Chemical, 234 p.
- Porte, C., Barceló, D. and Albaigés, J. (1992). Monitoring of organophosphorus and organochlorinated compounds in a rice crop field (Ebro Delta, Spain) using the mosquitofish as indicator organism. *Chemosphere*, 24(6): 735-743
- Potter, T.L., Strickland, T.C., Joo, H. and Culbreath, A.K. (2005). Accelerated soil dissipation of tebuconazole following multiple applications to peanut. *Journal of Environmental Quality*, 34: 1205-1213
- Primo, E., Cuñat, P., Carrasco, J.M., Blanco, C., Martinez, M. (1975). Contaminación de la Albufera de Valencia II. Niveles de contaminación por residuos urbanos durante el trienio 1972-1974. *Agroquim. Tecnol. Alimentos.*, 15: 98-112.
- Queiroz, S., Lazou, K., Sandra, P and Jardim, I. (2004). Determination of pesticides in water by liquid chromatography-(electrospray ionization)-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba.*, 14:53-60
- Rand, G.M. (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment* (2nd ed.). Ed. Taylor y Francis, Washington, D.C. 1125 pp.
- Readman, J.W., Albanis, T.A., Barceló, D., Galassi, S., Tronczynski, J. and Gabrieldes, G. P. (1997). Fungicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin*, 34(4): 259-263
- Reish, D.L. and Oshida, P. (1987). *Manual of methods in aquatic environment research*. Part 10, Short-Term static bioassays. FAO Fisheries Technical Paper 247. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Repetto, M. (1997). *Toxicología fundamental*. Editorial Diaz de Santos. 3^a Edición. Madrid. p 17
- Richardson, M. (1995). "*Environmental Toxicology Assesment*" Taylor and Francis Ltd. Bristol
- Richardson, M. L. (1991). *Chemistry, agriculture and the environment*. The Royal Society of Chemistry.
- Roberts, T.R. and Hutson, D.H. (1999). *Metabolic pathways of agrochemicals, Part 2: Insecticides and fungicides*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

- Robinson, P.W. 1999. The toxicity of pesticides and organics to *Mysid* shrimp can be predicted from *Daphnia* spp. toxicity data. *Water Research*. 33: 1545-1549.
- Robinson, R.A. and Stockes, R.H. (1959). *Electrolyte solutions*, 2nd Edition. Butterworth, London; Academic Press, Inc
- Rodier, J. (1978). *Análisis de las aguas*. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B. and Holoubek, I. (1998). Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 37: 495-507
- Ross, L.G. and Ross, B.R. (1999). *Anaesthetic and Sedative Aquatic Animals*. Blackwell Science. Oxford. 159 pp
- Sabater, C. (1994). Degradación de plaguicidas en aguas contaminadas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sam, T.W. (1993). *Toxicity testing using the brine shrimp: Artemia salina*,. In Colegate, S.M. y R.J. Moluneux (eds.). Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. CRC Press, Boca Raton. p. 441-456
- Samanidou, V., Fytianos, F., Pfister, G. and Bahadir, M. (1988). Photochemical decomposition of carbamate pesticides in natural waters of northern Greece *Sci. Total Environ.*, 76: 85-92
- Sánchez Argüello, P. (2002). Valoración ecotoxicológica de la contaminación de origen agrario. Incorporación de bioensayos en los protocolos de evacuación del riesgo ambiental. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez, P., Kubitzka, J., Domen, G. and Tarazona, J.V. (2006). Aquatic risk assessment of the new rice herbicide profoxydim. *Environmental Pollution*. 142: 181-189.
- Sánchez-Camazano, M., Sanchez Martín, M.J., Jimenez Plaza, S. (1983). Adsorción de molinato (S-Etil, N, N-Hexametileniminocarbamato) por suelos. *Anu. Cent. Biol. Apl.* (Salamanca), 9: 347-359.
- Sánchez-Fortún, S. and Barahona, M.V. (2005). Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere*, 59: 553-559.
- Sánchez-Fortún, S., Sanz, F. and Barahona, M.V., (1996). Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2 PAM on *A. salina* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 391-398
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Lleó, C. and E. Andreu-Moliner. (1998). Pesticide Toxicokinetics in Fish: Accumulation and Elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(3): 245-250
- Santamarina, M.P, Sempere, F., y Roselló, J. (2005). Conocer a *Pyricularia oryzae* Cavara. *Phytoma España*, 172: 108-112

- Santander, K. y Andreu, O. (2007). Evaluación de la calidad fisicoquímica de las aguas del P.N. de L'Albufera de Valencia. Valoración ecotoxicológica. Trabajo final de carrera. ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia
- Santoro, A., Scopa, A., Bufo, S.A., Manssur, M. and Mountacer, H. (2000) Photodegradation of the triazole fungicide hexaconazole. *Environ. Contam. Toxicol.*, 64(4): 475-480
- Santos, T.C.R., Rocha, J.C., Alonso, R.M., Martínez, E., Ibáñez, C. and Barceló, D. (1998). Rapid degradation of Propanil in rice crop fields. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 3479-3484.
- SAS Institute, (1998). SAS/STAT and SAS/OR Guide for Personal Computer, Version Six. Cary, NC.
- Saunders, D.G. (1976). *Tricyclazole Hydrolysis*. Unpublished report. Dow AgroSciences.
- Schwack, W., Bourgeois, B. and Walker, F. (1995a). Fungicides and photochemistry: photodegradation of the dicarboximide fungicide Procymidone. *Chemosphere*, 31: 4033-4040
- Schwack, W., Walker, F. and Bourgeois, B. (1995b). Fungicides and photochemistry: photodegradation of the dicarboximide fungicide vinclozolin. *J. Agr. Food Chemistry*, 43: 3088-3092
- Seiber, J.N., McChesney, M.M. and Woodrow, J.E. (1989). Airborne residues resulting from use of methyl parathion, molinate and thiobencarb on rice in the Sacramento Valley, California. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 577-588.
- Serra, M., Miracle, M.R., Vicente, E. (1984). Interrelaciones entre los principales parámetros limnológicos de la Albufera de Valencia. *Limnética*, 1: 9-19.
- SETAC (1998). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 19th Annual Meeting, USA
- Sinclair, C.J., and Boxall, A.B. (2003). Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4617-4625.
- Soria, J.M. (1987). *La eutrofización de la Albufera de Valencia: mineralización, nutrientes y biomasa*. Ed. Pato colorado. Col. Limnología. 95 pp
- Soria, J.M. (1997). Estudio limnológico de los ecosistemas acuáticos del Parc Natural de l'Albufera de Valencia. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Spain, J.C., Pritchard, P.H. and Bourquin, A.W. (1980). Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(4): 726-734
- SSC (2003) The Second Report on the harmonization of risk assessment procedures. Reports of the Scientific Steering Comité (SSC), EUROPEAN COMMISSION, Brussels, 95 pp plus 7 appendices.
- SSC. Scientific Steering Comité. (2003) The Second Report on the harmonization of risk assessment procedures. Reports of the Scientific Steering Comité (SSC),

- EUROPEAN COMMISSION, Brussels, 95 pp plus 7 appendices.
- Stahlschmidetallner, P., Allner, B., Rombke, J. and Knacker T. (1997). Endocrine disruptors in the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollution Res.*, 4 (3): 155
- Starck, J.D. (2005). How Closely Do Acute Lethal Concentration Estimates Predict Effects of Toxicants on Populations?. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 1(2), 109-113
- Sudo, M., Kunimatsu, T. and Okubo, T. (2002). Concentration and loading of pesticide residues in Lake Biwa basin (Japan). *Water Research*, 36: 315-329
- Tabeada, R., Schmitt, E. and Mansour, M. (1995). Photodegradation of pirimicarb in natural water and different aqueous solutions under simulated sunlight conditions. *Fresenius Environ. Bull.*, 4:649-654
- Takahashi, N., Itho, M., Mikami, N. and Miyamoto, J. (1988). Identification of reactive oxygen species generated by irradiation of aqueous humic acid solution. *J. Pesticide Sci.*, 13: 429-436.
- Tapia, R. (2000). Riesgos por el uso de agroquímicos y medicamentos en la producción de alimentos. *Anales de la Universidad de Chile*. VI serie: N°11.
- Tarazona, C. (2001). Evolución estacional de la contaminación en la Albufera de Valencia y efecto sobre las poblaciones fitoplactónicas. Análisis del riesgo ambiental por el uso de plaguicidas. Trabajo Fin de Carrera Universidad Politécnica de Valencia.
- Tarazona, C., Carrasco, J.M. and C. Sabater, C. (2003). Monitoring of rice pesticides in an aquatic system of natural park of Albufera, Valencia, Spain, *Hazard Evaluation, XII Symposium Pesticide Chemistry*, 727–735 pp.
- Tarazona, J.V. (1999) “*Ecological risk assessment for rice pesticides*” Spanish proposal for the development of a generic exposure scenario. En Arnold, D. pp. 33-43
- Tarazona, J.V. and Sánchez, P. (2006). Development of an innovative conceptual model and a tiered testing strategy for the ecological risk assessment of rice pesticides. *Paddy Water Environ.* 4, 53-59.
- Taxvig, C., Vinggaard, M., Hass, U., Axelstad, M., Metzdorff, S. and Nellemann, C. (2008). Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *International Journal of Andrology*, 31: 170-177
- Thamnotoxkit F, 2001. *Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard Operating Procedure*. Microbiotest Inc, Ghent, Belgium.
- Tinarelli, A. (1989). *El Arroz*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 575 p
- Toledo, M.C.F. and Jonsson, C.M. (1992) Bioaccumulation and elimination of endosulfan in zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Pestic Sci.*, 36:207-211
- Tomlin, C.D.S., (2000). *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Farnham.
- Torstensson, L. and Wessén, B. 1984. Interactions between the fungicides benomyl

- and soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(5), 445-452.
- Trapp, S. and Harland, B., (1995). Field test of volatilization models. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2: 164-169.
- Trösken, E., Fischer, K., Völkel, W. and Lutz, W. (2006). Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology*, 219: 33-40
- Ukeles, R. (1962). Growth of pure cultures of marine phytoplankton in the presence of toxicants. *Applied Microbiol.*, 10: 532.
- US Environmental Protection Agency, (1985). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*". W.H. Peltier and C.I. Weber (eds.), EPA-600/ 4-85-013. 216 pp.
- USEPA (2004). *Overview of the ecological risk assessment process in the office of pesticide programs*. US Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Office of pesticides Programs. Washington, DC, 92 p.
- USEPA. Office of Pesticide Programs List of Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, August 2000. (www.epa.gov/pesticides/carlist/)
- Vaal, M.A. and Folkerts, A.J. (2000). *Suitability of Microscale Ecotoxicity Tests for Environmental Monitoring*. In : *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* (G. Persoone, C. Janssen and W. De Coen , eds. - Kluwer Academic / Plenum Publishers), chapter 28: 253-260
- Vanhaecke, P. and Persoone, G., (1981). Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii (ARC-test). *INSERM*, 106: 359-376.
- Viana, E., Redondo, M.J., Font, G. and Moltó, J.C. (1996). Disks versus columns in the solid-phase extraction of pesticides from water. *Journal of Chromatography A*, 733(1-2): 267-274
- Vighi, M. and Bacci, E. (1998). *La stima del rischio ambientale*. En: *Ecotoxicología*. Vighi, M., Bacci, E., eds. UTET. Torin, pp. 205
- Vighi, M. and Calamari, D. (1996). *Idnici e scale di impatto ecotossicologico*. In: *Indicatori scale di qualità*; Vismara V., Zavatti A. (Eds.), Pitagora editore. Bologna, pp. 353-354.
- Vighi, M., Sandroni, D. and Sbriscia Fioretti, C. 1996. Modeling herbicide fate in paddy fields". In: A.A.M. Del Re, E. Capri, S.P. Evans and M. Trevisan, Editors, *The Environmental Fate of Xenobiotics. X Symposium Pesticide Chemistry-Modelling Systems*, pp. 449-456.
- Villa, S., Vighi, M., Casini, S. and Focardi, S., (2003). Pesticide risk assessment in a

- lagoon ecosystem. Part II: Effect Assessment and Risk Characterization. *Environ Toxicol Chem.* 22(4), 936-942.
- Villa, S., Vighi, M., Casini, S. and Focardi, S., 2003. Pesticide risk assessment in a lagoon ecosystem. Part II: Effect Assessment and Risk Characterization. *Environ Toxicol Chem.*, 22(4): 936-942.
- Walsh, G.E. (1988). Principles of toxicity testing with marine unicellular algae", *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 979-987.
- Ware, G.W., Roan, C.C. (1970). Interaction of pesticides with aquatic microorganisms and plankton. *Residue Rev.*, 20: 15-45.
- Wolfe, N.L., Zepp, R.G. and Paris, D.F. (1978). Carbaryl, propham and chlorpropham: A comparison of the rates of hydrolysis and photolysis with the rate of biolysis. *Water Res.*, 12, 565-571
- Wurster, C.F. (1968). DDT photosynthesis by marine phytoplankton. *Science*, 159, p. 1474.

ANEXO 1

En este anexo se muestra los resultados completos obtenidos con SimaStat3.5 correspondiente al estudio ANOVA de las parcelas experimentales, en el estudio se han comparado los factores punto (entrada o banda) y las fechas de toma de muestra.

Procloraz

Comparisons for factor: fecha				
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
28.7.2004 vs. 27.7.2005	89,967	3,639	0,030	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	88,424	3,576	0,035	Yes
Comparisons for factor: punto				
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	50,122	3,348	0,004	Yes
Comparisons for factor: punto within 28.7.2004				
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	179,933	5,753	<0,001	Yes
Comparisons for factor: punto within 25.8.2004				
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	68,723	2,197	0,042	Yes
Comparisons for factor: fecha within b				
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
28.7.2004 vs. 27.7.2005	179,933	5,146	0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	176,848	5,058	0,001	Yes
28.7.2004 vs. 24.8.2005	175,103	3,959	0,015	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2004	133,833	4,279	0,008	Yes
28.7.2004 vs. 25.8.2004	111,210	3,556	0,036	Yes

FlusilazolComparisons for factor: **fecha**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
28.7.2004 vs. 27.7.2005	4,622	5,330	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 24.8.2005	4,427	4,477	0,005	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	4,424	5,102	0,001	Yes
28.7.2004 vs. 25.8.2004	4,405	5,680	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2004	4,155	5,357	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
b vs. e	2,639	5,026	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto within 28.7.2004**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	9,610	8,762	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **fecha within b**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
28.7.2004 vs. 27.7.2005	8,977	7,320	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 24.8.2005	8,667	5,587	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	8,582	6,998	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 25.8.2004	8,543	7,789	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2004	8,177	7,455	<0,001	Yes

Triciclazol

Comparisons for factor: **fecha**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
25.8.2004 vs. 27.7.2005	152,392	8,788	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 24.8.2005	152,312	7,703	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2005	150,839	8,698	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2004	128,650	8,294	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 27.7.2005	149,642	8,629	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 24.8.2005	149,562	7,564	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	148,089	8,540	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2004	125,900	8,117	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
b vs. e	109,662	10,443	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto within 28.7.2004**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	297,567	13,565	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto within 11.8.2004**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	48,500	2,211	0,041	Yes

Comparisons for factor: **punto within 25.8.2004**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	305,333	13,920	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **fecha within b**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
25.8.2004 vs. 27.7.2005	304,683	12,424	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 24.8.2005	304,293	9,809	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2005	301,278	12,285	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2004	257,067	11,719	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 27.7.2005	298,050	12,153	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 24.8.2005	297,660	9,595	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2005	294,645	12,014	<0,001	Yes
28.7.2004 vs. 11.8.2004	250,433	11,417	<0,001	Yes

Propiconazol

Comparisons for factor: fecha					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050	
24.8.2005 vs. 11.8.2005	0,728	3,422	0,049		Yes
Comparisons for factor: punto					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050	
b vs. e	1,169	11,118	<0,001		Yes
Comparisons for factor: punto within 28.7.2004					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
b vs. e	1,433	6,528	<0,001		Yes
Comparisons for factor: punto within 11.8.2004					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
b vs. e	1,400	6,376	<0,001		Yes
Comparisons for factor: punto within 25.8.2004					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
b vs. e	1,133	5,162	<0,001		Yes
Comparisons for factor: punto within 27.7.2005					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
b vs. e	1,100	4,090	<0,001		Yes
Comparisons for factor: punto within 24.8.2005					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
b vs. e	1,505	4,570	<0,001		Yes
Comparisons for factor: fecha within b					
Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05	
24.8.2005 vs. 11.8.2005	1,260	3,826	0,020		Yes
11.8.2004 vs. 11.8.2005	0,960	3,911	0,017		Yes

Carbendazima

Comparisons for factor: **fecha**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
25.8.2004 vs. 28.7.2004	11,500	4,384	0,006	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2004	11,167	4,257	0,008	Yes
25.8.2004 vs. 27.7.2005	11,125	3,793	0,022	Yes

Comparisons for factor: **punto**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
b vs. e	9,769	5,501	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto within 25.8.2004**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	24,000	6,469	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **punto within 11.8.2005**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	10,700	2,355	0,031	Yes

Comparisons for factor: **punto within 24.8.2005**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
b vs. e	21,000	3,774	0,002	Yes

Comparisons for factor: **fecha within b**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,05
25.8.2004 vs. 27.7.2005	23,000	5,545	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 28.7.2004	23,000	6,200	<0,001	Yes
25.8.2004 vs. 11.8.2004	22,333	6,020	<0,001	Yes
24.8.2005 vs. 27.7.2005	20,000	3,594	0,034	Yes
24.8.2005 vs. 28.7.2004	20,000	3,812	0,021	Yes
24.8.2005 vs. 11.8.2004	19,333	3,685	0,028	Yes
