

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Toxicidad de un herbicida basado en glifosato sobre el desarrollo
embrionario de *Drosophila melanogaster***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

ANDRÉS EDUARDO GORTAIRE LÓPEZ

QUITO, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas del Sr. Andrés Eduardo Gortaire López ha sido concluida con conformidad de las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la certificación correspondiente.

Dr. Andrés Romero Carvajal

Director de la disertación

Quito, 8 de enero de 2020

**A mis padres y hermana por acompañarme y
apoyarme en este camino.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres y hermana, por brindarme las herramientas y el apoyo necesario para alcanzar mis metas. Gracias por estar presentes y ser mi soporte principal en la vida.

Agradezco al Dr. Andrés Romero, por todas las enseñanzas brindadas, todo su apoyo y dirección durante el tiempo que tuve la oportunidad de trabajar dentro del laboratorio. Sus consejos y apoyo serán valorados para siempre. A todos mis compañeros del laboratorio 116 de Biología del Desarrollo, por estar siempre presentes, y ser de gran ayuda.

Un Agradecimiento especial al laboratorio de Genética Evolutiva y a la Dra. Doris Vela por brindarme todo el material y el apoyo necesario para la realización de este proyecto.

Quiero agradecer a todos mis amigos, en especial a Bryan, Belén, Mauricio, Nacho, Camilo, Duncan, Esteban y Heisel por todos los grandes momentos que pasamos juntos y por brindarme toda su amistad incondicional.

Finalmente, quiero agradecer a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por darme la oportunidad y el financiamiento para realizar esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCION.....	3
	3.1.HERBICIDAS BASADOS EN GLIFOSATO.....	3
	3.2.ADITIVOS Y COADYUVANTES.....	3
	3.3. EFECTOS TOXICOS DE LOS HERBICIDAS BASADOS EN GLIFOSATO.....	5
	3.3.1. TOXICIDAD EN HUMANOS.....	5
	3.3.2. TOXICIDAD EN VERTEBRADOS.....	7
	3.3.3. TOXICIDAD EN INVERTEBRADOS.....	8
	3.4. <i>Drosophila melanogaster</i> COMO ORGANISMO DE ESTUDIO.....	9
	3.5.OBJETIVOS.....	10
	3.5.1. GENERAL.....	10
	3.5.2. ESPECIFICOS.....	11
4.	MATERIALES Y METODOS.....	11
	4.1.OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ADULTOS Y EMBRIONES DE <i>Drosophila melanogaster</i>	11
	4.2.BIOENSAYOS.....	12
	4.2.1. FIJACION Y OBSERVACION DE EMBRIONES.....	13
	4.2.2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50).....	14
5.	RESULTADOS.....	15
	5.1.MORTALIDAD DE UN HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE <i>EMBRIONES DE Drosophila melanogaster</i>	15
	5.2.DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50).....	16
	5.3. EFECTOS DEL HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	16
6.	DISCUSIÓN.....	17
	6.1.DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50).....	18

6.2.EFECTOS DEL HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	21
7. CONCLUSIONES.....	25
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	27
9. FIGURAS.....	32
10. TABLAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema para la obtención de embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 2. Esquema del bioensayo de toxicidad.....	33
Figura 3. Esquema de bioensayo para determinar la concentración letal media de un herbicida basado en glifosato sobre embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Figura 4. Datos de normalidad para los bioensayos de toxicidad 1-4 y los controles.....	35
Figura 5. Datos de mortalidad expresados en porcentaje de acuerdo a las dosis del herbicida basado en glifosato expuestas a los embriones.....	36
Figura 6. Dosis letal media (LC) o curva de mortalidad medida en porcentaje.....	37
Figura 7. Efectos de la exposición de un herbicida basado en glifosato a diferentes concentraciones sobre algunas estructuras embrionarias en <i>Drosophila melanogaster</i>	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Registro de la mortalidad de embriones expuestos a una concentración de 4% metanol obtenidos de los bioensayos control.....	39
Tabla 2. Registro de la mortalidad de embriones expuestos a diferentes concentraciones de un herbicida basado en glifosato obtenidos de los bioensayos de toxicidad.....	40
Tabla 3. Valores probit de la dosis letal media de los bioensayos 1-4 obtenidos del programa estadístico R junto con los intervalos de confianza y el promedio de cada uno.	41
Tabla 4. Registro de la presencia o ausencia de diferentes estructuras embrionarias tomadas a partir de la realización de fotografías a los embriones expuestos en las concentraciones mencionadas de un herbicida basado en glifosato.....	42

1. RESUMEN

Los herbicidas basados en glifosato (N-fosfometil glicina) son empleados para eliminar malezas no deseadas en ambientes agrícolas y forestales. Debido al modo específico de acción de estos herbicidas, generalmente se asume que son relativamente seguros desde el punto de vista toxicológico. Desde su aparición, el uso de los mismos solo ha aumentado, sin medir el posible impacto que tienen sobre los diferentes organismos de un ecosistema en especial en la entomofauna. Las formulaciones de herbicidas basados en glifosato generalmente están constituidas por un 36-48% de glifosato, agua, sales, aditivos coadyuvantes y surfactantes. La toxicidad e impacto ambiental de muchos de estos aditivos y coadyuvantes tampoco ha sido evaluado. Al no haber investigaciones previas de esta sustancia sobre sus efectos embriológicos en la entomofauna, el presente estudio amplía esa información mediante la evaluación de la toxicidad de un herbicida basado en glifosato sobre el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, por medio de la obtención de la dosis letal media (LC50) y la descripción del daño que produce el mismo en estructuras embrionarias como la formación del surco cefálico, la masa de yema y el desarrollo de segmentos. Los embriones recolectados después de 4 horas post fertilización fueron expuestos a distintas concentraciones de un herbicida basado en glifosato durante setenta y dos horas. Los ensayos de laboratorio demostraron que la dosis letal media es de 3,4565% v/v. Los efectos del herbicida sobre el desarrollo de los embriones, son visibles desde la concentración 1% en adelante. Los herbicidas basados en glifosato han sido estudiados como agentes teratógenos en el desarrollo de otros organismos vertebrados, mostrando una afectación directa de la formación del sistema nervioso y causando anomalías morfológicas, sin embargo, existen pocos estudios que analicen los efectos de los mismos en el desarrollo embrionario de insectos, a pesar de esto, los resultados obtenidos muestran que el herbicida tiene un efecto similar en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* con la observación de anomalías morfológicas. Esto demuestra que este y más invertebrados, incluidos los polinizadores, pueden estar expuestos a los efectos tóxicos de estos herbicidas perjudicando directamente su ciclo de vida y aumentando la mortalidad de los mismos.

Palabras clave: *Drosophila melanogaster*, dosis letal media (LC50), herbicidas basados en glifosato, aditivos, coadyuvantes.

2. ABSTRACT

The herbicides based on glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) are used to eliminate undesirable weeds in agricultural and forestry environments. Due to the specific mode of action of these herbicides, it is generally assumed that these herbicides are relatively safe from a toxicological point of view. Since their appearance, their use has only increased, without measuring the possible impact they have on the different organisms of an ecosystem, especially in the entomofauna. Glyphosate herbicide formulations typically consist of 36-48% glyphosate, water, salts, adjuvant additives and surfactants. The toxicity and environmental impact of many of these additives and adjuvants have not been evaluated. In the absence of previous investigations of this substance on its embryological effects on entomofauna, the present study expands this information by evaluating the toxicity of a glyphosate-based herbicide on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*, by obtaining the mean lethal dose (LC50) and describing the damage it produces to embryonic structures such as the formation of cephalic groove, the mass of yolk and the development of segments. Embryos collected after 4 hours post fertilization were exposed to different concentrations of a glyphosate-based herbicide for seventy-two hours. Laboratory tests showed that the average lethal dose is 3.4565% v/v. The effects of the herbicide on the development of the embryos were visible from the concentration 1% onwards.

Glyphosate-based herbicides have been studied as teratogenic agents in the development of other vertebrate organisms, showing a direct effect on the formation of the nervous system and causing morphological abnormalities. However, there are few studies that analyze their effects on the embryonic development of insects, despite this, the results obtained show that the herbicide has a similar effect on the embryonic development of *D. melanogaster* with the observation of morphological abnormalities. This shows that this and more invertebrates, including pollinators, can be exposed to the toxic effects of these herbicides, directly damaging their life cycle and increasing their mortality.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, mean lethal dose (LC50), herbicides based on glyphosate, additives, adjuvants.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. HERBICIDAS BASADOS EN GLIFOSATO

Los herbicidas basados en glifosato (N-fosfometil glicina) son empleados para eliminar malezas no deseadas en ambientes agrícolas y forestales (Mesnage, Defarge, Spiroux de Vendômois y Séralini, 2015). Después de la aplicación, el compuesto activo (glifosato) es absorbido por el follaje y desplazado a lo largo de tallos, hojas y raíces de toda la planta (Dill et al., 1997).

Estos herbicidas trabajan bloqueando la actividad de la enzima 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS) en la vía de señalización del ácido shikímico usado por las plantas para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y, en última instancia, hormonas y otros metabolitos necesarios (Martínez, Loening y Graham, 2018). La disrupción de esta vía de señalización previene la síntesis de los mismos, causando la muerte de las plantas (Martínez et al., 2018). Debido al modo específico de acción del glifosato, al inhibir la actividad de una enzima esencial en todas las plantas y no en animales, generalmente se asume que estos herbicidas son relativamente seguros desde el punto de vista toxicológico (Mesnage et al., 2015). Gracias a esta especificidad y efectividad, los herbicidas basados en glifosato se usan ampliamente en las áreas urbanas para el control de malezas, en los bordes de las carreteras, en los parques públicos y zonas cercanas a ciudades (Martínez et al., 2018).

3.2. ADITIVOS Y COADYUVANTES

Las formulaciones de herbicidas basados en glifosato generalmente están constituidas por un 36 a 48 % de glifosato, agua, sales y adyuvantes como las alquilaminas etoxiladas (POEA). El glifosato nunca es usado sin sus aditivos y adyuvantes, lo que potencia su actividad herbicida y, en muchos casos, aumenta su toxicidad (Mesnage et al., 2015).

Cuando el herbicida es aplicado en la superficie de la hoja, el glifosato debe superar varios obstáculos antes de que pueda ser letal para una planta, entre ellos la cera epicuticular, la cutícula, las paredes de las células epidérmicas y el plasmalema de las células (Metzler y

Kahl, 2015). Los coadyuvantes y aditivos se consideran y declaran como diluyentes inertes debido a que no se los responsabiliza de la actividad de los pesticidas. Se clasifican, incluso, como confidenciales para fines reglamentarios, lo cual dificulta la evaluación de la toxicidad de los mismos (Mesnage et al., 2015).

Los coadyuvantes, aditivos y surfactantes ayudan a superar estas barreras mejorando la eficacia del glifosato y comúnmente son denominados como inertes; por ejemplo, el Saflufenacil, un compuesto tensoactivo inhibidor de la protoporfirinógeno oxidasa y el POEA, el cual no es más que un aditivo sinérgico, es decir, que aumenta los efectos del compuesto original (Duarte y Barragan, 2003; Metzler y Kahl, 2015). Además de todos estos compuestos, los herbicidas también contienen colorantes e ingredientes como la polioxietilen-amina, que tienen como función el mejoramiento de la penetración del herbicida a los tejidos de la planta, disminuyendo la tensión superficial de las hojas (Lipok, Studnik y Gruyaert, 2010)

El hecho de que el ingrediente activo de los herbicidas sea el glifosato no necesariamente significa que sea el más tóxico de la composición. Generalmente, se cree que el principio activo de los herbicidas (glifosato) en contra del metabolismo de las plantas es el compuesto más tóxico de las formulaciones, sin embargo, se ha demostrado que los aditivos y coadyuvantes que se emplean en la mayoría de formulaciones tienen mayor toxicidad que el glifosato mismo, por ejemplo, la Seboamina polietoxilada o POE-15, un compuesto común dentro de los herbicidas basados en glifosato, ha demostrado ser más tóxico que el glifosato mismo (Gasnier y Dumont, 2009; Mesnage, Bernay y Seralini, 2013).

A nivel de regulaciones, solo el glifosato se analiza dentro de estudios de toxicidad y ecología con el fin de evaluar la salud de organismos modelo y ecosistemas (Mesnage et al., 2015). Esto genera una problemática debido a que la toxicidad e impactos ambientales de muchos de estos aditivos y coadyuvantes no han sido evaluados.

Varios aditivos, coadyuvantes y surfactantes como los mencionados anteriormente deben ser puestos a evaluación de riesgo, pues, algunos estudios han demostrado que varios de ellos, incluidas las seboaminas, usadas a menudo en estas formulaciones, se separan rápidamente de la columna de agua y terminan siendo mucho más tóxicos que el glifosato en sí mismo (Huaracahuaraca, 2017).

3.3. EFECTOS TÓXICOS DE LOS HERBICIDAS BASADOS EN GLIFOSATO

3.3.1. TOXICIDAD EN HUMANOS.

El compuesto activo de los herbicidas, el glifosato, ha sido asociado con desordenes neurodegenerativos como el Parkinson (Gui, Fan, Wang, Wang, y Chen, 2019). Estudios previos indicaron que la exposición a glifosato en células PC12 de feocromocitoma indujo la muerte celular a través de vías de autofagia además de activar vías apoptóticas, ligando la toxicidad del glifosato con la enfermedad de Parkinson (Gui et al ., 2019).

Por otro lado, el glifosato puro ha sido relacionado con efectos proliferativos en el cáncer de mama humano dependiente de hormonas. Las concentraciones de glifosato indujeron la activación de la transcripción del elemento de respuesta al estrógeno, llegando a ser de 5 a 13 veces mayor que el control. Esta activación fue inhibida por un antagonista de estrógenos, lo que indica que la actividad estrogénica del glifosato fue mediada a través de los receptores de estrógenos. Estos resultados indicaron que las concentraciones bajas y ambientalmente relevantes de glifosato poseían actividad estrogénica que podría estar relacionada con el cáncer de mama en humanos. (Thongprakaisang, Thiantanawat, Rangkadilok, Suriyo y Satayavivad, 2013).

Los efectos tóxicos del glifosato puro no solo se dan a grandes concentraciones. Se ha demostrado que el glifosato en las concentraciones utilizadas comúnmente en la agricultura (dosis consideradas como no perjudiciales de 21–42 mM), es tóxico para las células embrionarias y placentarias humanas (Benachour et al., 2007).

Además, se han demostrado posibles efectos que incluyen acidosis metabólica subclínica inducida por cambios en el microbioma intestinal humano, disfunción mitocondrial, alteración endocrina, daño en el ADN y la inhibición del sistema enzimático del citocromo P450 (Schweizer, Brilisauer, Triebkorn, Forchhammer y Köhler, 2019).

Los coadyuvantes como la seboamina polietoxilada - POEA y alquil poliglucósido – APG encontrados dentro de los herbicidas en base a glifosato más usados en el mundo, demostraron tener efectos citotóxicos medidos en la actividad de la aromatasa, una enzima clave en el equilibrio de las hormonas sexuales, incluso muy por debajo de las

diluciones agrícolas normales (1 %). No solo el principio activo de los herbicidas (glifosato) es responsable de la toxicidad presentada en la actividad de esta enzima en células humanas. La actividad de la enzima disminuyó tanto por los co-formuladores solos, como por las formulaciones a partir de concentraciones 800 veces menores que las diluciones agrícolas. Se demostró, por primera vez, que la alteración endocrina producida por los herbicidas basados en glifosato no solo se debe al ingrediente activo declarado sino también, a los co-formulantes (Defarge, Vendômois y Séralini, 2018).

Estos resultados demuestran que tanto las formulaciones como los co-formulantes solos, han probado ser hasta 1000 veces más tóxicos en células humanas que el compuesto activo principal. Esto, desafía la relevancia del valor de ingesta diaria aceptable para las exposiciones a herbicidas basados en glifosato, actualmente calculadas a partir de pruebas de toxicidad del ingrediente activo aislado (Defarge et al., 2016).

El daño producido por los aditivos y coadyuvantes también se ha observado en líneas celulares hepáticas (HepG2), embrionarias (HEK293) y placentarias (JEG3) humanas. Al medir las actividades mitocondriales, degradaciones de membrana y actividades de caspasas. Se demostró que todas las formulaciones de los herbicidas son más tóxicas que el glifosato, entre ellos POE-15, un aditivo usado comúnmente, resultó ser el componente más tóxico contra las células humanas. Además, POE-15 induce necrosis al ser capaz de interrumpir las membranas celulares por micelización con la bicapa lipídica en células hepáticas, embrionarias y placentarias. En contraste con el glifosato, que promueve los efectos alteradores endocrinos después de ingresar a las células (Mesnage, Bernay y Séralini, 2013).

Existen varios reportes epidemiológicos de pueblos que se encuentran en constante contacto con estos herbicidas y podrían demostrar una relación entre los herbicidas basados en glifosato y enfermedades como el cáncer (Hurtig, Sebastián, Soto, Shingre y Amunárriz, 2010).

En Argentina, Monte Maíz es un pueblo agrícola con 8000 habitantes, todos ellos expuestos a herbicidas basados en glifosato. El estudio reveló residuos de estos herbicidas por toda la zona agrícola y un aumento en la frecuencia de cáncer que llegó a ser 3 a 4 veces más que el valor de referencia de la OMS (Vazquez, Maturano, Etchegoyen y Difilippo, 2017).

En el Ecuador, se analizó las consecuencias de la pulverización aérea con glifosato agregado a una solución de surfactante, en la parte norte del país. Los individuos fueron seleccionados de las zonas cercanas a la exposición con herbicidas y comparados con un grupo control no expuesto. Los resultados mostraron un mayor grado de daño en el ADN en el grupo expuesto. Estos resultados sugieren que en la formulación utilizada durante la pulverización aérea, el glifosato tuvo un efecto genotóxico en los individuos expuestos (Paz-y-miño et al., 2007).

3.3.2. TOXICIDAD EN OTROS VERTEBRADOS.

Varios estudios de toxicidad en roedores revelaron los efectos adversos del glifosato. Este, provocó daño oxidativo en hígado y riñón al alterar el metabolismo mitocondrial (Myers et al., 2016). Estos estudios examinaron dosis bajas de herbicidas basados en glifosato, dentro del rango de lo que ahora se considera "seguro" para los humanos, y muestran que estos compuestos pueden inducir daño hepatorenal (Myers et al., 2016).

Los estudios de toxicidad en animales acuáticos como el pez cebra (*Danio rerio*) son necesarios debido a que gran parte de los residuos de herbicidas basados en glifosato terminan en fuentes de agua donde afectan a los ecosistemas acuáticos. Estudios recientes revelaron que altas concentraciones de glifosato asociados con un pH bajo promueven retrasos en el desarrollo y malformaciones en embriones de pez cebra, demostrando que el glifosato acelera significativamente la eclosión en comparación con los embriones no expuestos, incluso a la concentración más baja probada (1.69 mg/L). Además, el glifosato afectó la frecuencia cardíaca de los peces (Schweizer et al., 2019).

Recientemente, se han realizado ensayos bioquímicos con embriones viables de pez cebra. Después de la exposición a herbicidas basados en glifosato, la actividad de la hexoquinasa se alteró significativamente a través del acoplamiento molecular, demostrando por primera vez que las interacciones de glucoquinasa y hexoquinasas 1 y 2 con glifosato muestran interacciones significativas en los sitios activos, sugiriendo que el herbicida puede inducir problemas en la embriogénesis de los peces en relación con la incapacidad de inflar la vejiga natatoria (Gomes, Panetto, Gomes, Fraga, y Campos, 2019).

También, se ha demostrado que el glifosato y sus formulaciones generan anomalías morfológicas en el pez cebra, incluyendo reducciones cefálicas y oculares con una pérdida de ventrículos cerebrales delineados y cambios estructurales en el cerebro en desarrollo (Roy, Carneiro, y Ochs, 2016). Mediante el análisis de hibridación *in situ*, se detectó una reducción en la expresión de los genes sobre las regiones del cerebro, ojo anterior y cerebro medio, incluidos *pax2*, *pax6*, *otx2* y *ephA4*. (Roy, Carneiro, y Ochs, 2016).

En anfibios, los embriones tratados con dosis de herbicidas basados en glifosato fueron altamente anormales, con claras alteraciones en la formación de la cresta neural y cefálica, además de un acortamiento del eje antero posterior. Las alteraciones en los marcadores de la cresta neural se correlacionaron con malformaciones en los cartílagos craneales en los estadios de renacuajos (Paganelli, Gnazzo, Acosta y Lopez, 2010).

Cauble y Wagner (2005) demostraron que los herbicidas de glifosato son tóxicos para especímenes de *Rana. Cascadae*, de la familia Ranidae. Estos no solo murieron después de un contacto con glifosato, sino que las que sobrevivieron sufrieron una metamorfosis temprana y se atrofiaron durante el crecimiento.

3.3.3. TOXICIDAD EN INVERTEBRADOS.

En las abejas melíferas, se ha demostrado que la exposición a glifosato, comúnmente encontrado en zonas agrícolas, reduce las capacidades cognitivas necesarias para la obtención y procesamiento de la información espacial requerida para el regreso exitoso a la colmena (Hahn, Greggers, Menzel, y Farina, 2015). Además, se ha demostrado que la exposición a glifosato produce una mayor porción de larvas con desarrollo tardío y peso reducido (Iliina, Pagano, Zavala y Farina, 2018).

En cuanto a los aditivos y coadyuvantes, Los estudios realizados en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (nematodo) demostraron que al ser expuesto a concentraciones de 0.01, 10 y 100 μM , de herbicidas basados en glifosato se produjo una letalidad de 20%, 50% y 100% respectivamente. En el 87% de los individuos se produjo inhibición de la locomoción después de una exposición a 10 μM . El tamaño de la progenie se redujo en un 23% y 93% después de la exposición a 0,01 y 10 μM de herbicida basado en glifosato respectivamente. Se produjeron cambios en la expresión génica de varios genes,

destacando la expresión de *sod-1*, *sod-4* y *gpx-4* que aumentó más de dos veces después de la aplicación de 10 μM de un herbicida basado en glifosato (García-Espiñeira, Tejada-Benitez, y Olivero-Verbel, 2018).

3.4. *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO DE ESTUDIO.

Ante el crecimiento exponencial del uso del glifosato, surge la necesidad de iniciar más estudios que evalúen y confirmen los efectos de estos herbicidas sobre la flora y fauna de los ecosistemas, y buscar métodos que reduzcan el tiempo de degradación del mismo en el ambiente.

Un organismo versátil para el estudio de nuevas técnicas de degradación del glifosato es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que ha sido usada como organismo modelo para investigación en genética y desarrollo embrionario desde hace aproximadamente 100 años (Ong, Yung, Cai, Bay, y Baeg, 2015). Recientemente, *D. melanogaster* ha sido desarrollada como un modelo para estudios en toxicología debido a sus características, tales como presentar estados de desarrollo claramente visibles, un ciclo de vida muy corto y una numerosa descendencia, lo que la convierte en el organismo ideal (Ong et al., 2015). Así, cada hembra es capaz de poner hasta 100 huevos por día y cada embrión tarda aproximadamente 10 días a 25 °C en desarrollarse en un adulto fértil (Jennings, 2011).

Existen muy pocos estudios del efecto de estos herbicidas sobre organismos como *D. melanogaster* y otros invertebrados. Sin embargo, se ha demostrado previamente que este compuesto sí posee efectos sobre estos organismos.

De Aguiar, Gottschalk y Da Rosa (2016) demostraron el efecto que tiene el herbicida en la respuesta de defensa antioxidante en los adultos de *D. melanogaster*. Sus resultados indicaron que el herbicida redujo los niveles de especies reactivas de oxígeno y aumentó la expresión génica del sistema de defensa antioxidante.

No obstante, la información sobre el efecto de estos herbicidas en la embriología de *D. melanogaster* y de otros invertebrados es escasa; tomando en cuenta que el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* está muy bien descrito, y consta de fases muy definidas

que pueden ser utilizadas para verificar la salud de los embriones, lo convierte en un candidato idóneo para demostrar los efectos que tienen estos herbicidas sobre los embriones.

El análisis de la formación del surco cefálico después del movimiento de las células polares y el inicio de la segmentación son muy útiles para describir el efecto de ciertos tratamientos sobre el desarrollo embrionario, ya que son estructuras fácilmente visibles y nos brindan información suficiente para determinar el estado de los embriones (Gilbert, 2005). Débarre, Olivier, Supatto y Beaurepaire (2014) analizaron los movimientos celulares y la formación del surco cefálico y ventral en su investigación sobre la mitigación de la fototoxicidad en el desarrollo de embriones vivos.

La invaginación del surco cefálico es una de primeras manifestaciones morfológicas del destino celular y los programas de diferenciación en el embrión. Esta, tiene lugar lateralmente a ambos lados del embrión, en el extremo anterior y separa la futura región de la cabeza de la banda germinal, que formara el tórax y el abdomen (Vincent, Blankenship, y Wieschaus, 1997). Cuando la banda germinal se encuentra en su posición extendida, se producen varios procesos morfológicos que dan origen a la organogénesis, segmentación y segregación de los discos imaginales. Todos estos procesos terminaran formando estructuras importantes en el adulto como las alas, los ojos, la cabeza, las antenas, etc. (Gilbert, 2005).

Si estos movimientos celulares se ven afectados, todas estas estructuras podrían no llegar a formarse correctamente o directamente causar la muerte del embrión. Se ha observado que algunas sustancias como el metanol afectan el desarrollo de embrionario de *D. melanogaster*, donde se observa un rango de defectos morfológicos en sus capas germinales, y el movimiento celular se ve afectado negativamente (Mellerick y Liu, 2004).

3.5.OBJETIVOS

3.5.1. GENERAL

- Evaluar el efecto de un herbicida basado en glifosato en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

3.5.2. ESPECÍFICOS

- Obtener la dosis letal media del herbicida basado en glifosato para embriones de *Drosophila melanogaster*.
- Realizar un análisis descriptivo mediante fotografías para determinar el efecto de un herbicida basado en glifosato sobre embriones de *Drosophila melanogaster*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ADULTOS Y EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*.

Se utilizaron moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*), cepa Oregon, proporcionadas por el laboratorio de Genética Evolutiva de la Pontificia Universidad Católica Del Ecuador (PUCE). Las moscas adultas se mantuvieron en medios de cultivo, en base a plátano, proporcionados por el mismo laboratorio a una temperatura de 22 °C y fueron cambiadas de medio cada 7 días.

Para la obtención de los embriones, se colocaron moscas adultas provenientes de los frascos con medio de cultivo dentro de una cámara de reproducción, formada por un tubo grueso con dos aberturas a cada lado bloqueadas con tela elástica. La cámara de reproducción se mantuvo a temperatura ambiente (18-24 °C). Dentro del tubo se colocó una placa Petri que contenía una mezcla de agua, gelatina sin sabor, levadura y jugo de uva, en donde las moscas adultas colocaron los embriones necesarios para la realización de los bioensayos (Figura 1).

La recolección de los embriones se realizó aproximadamente cada 4h después de colocados los adultos dentro de la cámara de reproducción. Los embriones fueron

depositados en las placas donde se realizaron los bioensayos de toxicidad con la ayuda de agujas de disección y pinzas entomológicas.

4.2. BIOENSAYOS

Antes de la realización de los bioensayos de toxicidad, fue necesario realizar un bioensayo independiente que incluye el uso de metanol al 4% propuesto por Mellerick y Liu (2004). Este bioensayo fue realizado para probar la eficacia del protocolo a usar en los bioensayos de toxicidad, ya que se conoce el porcentaje exacto de letalidad que produce esta sustancia. En base a este protocolo se realizaron todos los bioensayos de toxicidad siguientes, con variaciones descritas a continuación (Mellerick y Liu, 2004).

El protocolo usado, consistió en la recolección de los embriones 4 horas después de que los adultos fueron colocados en las cámaras de reproducción.

Inmediatamente, se procedió a colocar los embriones sobre pequeños cuadros de papel absorbente estéril, previamente insertados dentro de placas Petri plásticas. En cada caja se colocó 500 µl de la concentración del herbicida correspondiente diluido con una pequeña cantidad de levadura y colorante para facilitar la observación de los embriones. Para los grupos control se realizó el mismo procedimiento, pero con la utilización de agua destilada (Figura 2).

Los embriones se mantuvieron a temperatura ambiente y tuvieron un periodo máximo de observación de 72h. Generalmente, los embriones de los bioensayos de control eclosionan en 24h de desarrollo, sin embargo, se amplió el tiempo de observación (48h), por si los efectos del herbicida estaban alterando el tiempo de desarrollo de los mismos. Concluido este tiempo, si el embrión no había eclosionado se consideraba muerto.

Cada bioensayo constó de una unidad experimental por cada concentración del herbicida basado en glifosato, y un grupo control basado en agua destilada. La unidad experimental consistió de tres réplicas, cada réplica de 10 embriones expuestos a la solución de herbicida correspondiente.

El grupo control fue idéntico a la unidad experimental, pero usando agua destilada. El bioensayo se repitió tres veces (Figura 3).

Cada 24h se volvió a colocar la misma cantidad de herbicida y agua destilada correspondiente a cada una de las concentraciones y grupos control para evitar la desecación y mantener a los embriones siempre en contacto con el herbicida o las soluciones control.

4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50)

Para determinar los efectos del herbicida basado en glifosato y determinar la dosis letal media en los embriones de *D. melanogaster*, se probaron 4 concentraciones observadas como perjudiciales en diferentes organismos como: *Xenopus laevis* (0,016ml/100ml) (Paganelli, Gnazzo, Acosta y Lopez, 2010), *Drosophila melanogaster* (3,2ml/100ml) (Hernández-ramírez, Córdoba-ortega y Aranda-rosero, 2013) y *Danio rerio* (0,05ml/100ml) (Roy et al., 2016) más la adición de una concentración extra (0,036ml/100ml).

Debido a la baja mortalidad producida por las concentraciones de herbicida mencionados anteriormente en los embriones de *D. melanogaster*, fue necesario generar ensayos con concentraciones más altas para determinar correctamente la dosis letal media (LC50) empezando por la concentración 1: 0,05ml/100ml, 2: 0.25ml/100ml, 0,5ml/100ml, 1ml/100ml, 2,5ml/100ml, 5ml/100ml y 10ml/100ml.

La dosis letal media (LC50) es la concentración del material en agua que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo (Hernando y Bautista, 2011). Ésta se obtuvo a partir de los resultados obtenidos de los bioensayos con las concentraciones finales mencionadas anteriormente. Se utilizó el paquete Ecotox (Analysis of Ecotoxicology), versión 1.4.0 del programa R que permite predecir mediante una regresión probit la dosis letal media (LC50), la cual también nos indica los intervalos de confianza UCL (límite de control superior) y LCL (límite de control inferior), que indican los extremos de la variabilidad esperada de los bioensayos (Russell, 2012).

4.2.2. FIJACION Y OBSERVACION DE EMBRIONES.

El protocolo fue obtenido de Cold Spring Harbor Protocols (2007). Se realizó en paralelo con los bioensayos y consistió en recolectar los embriones inmediatamente en cloro después de aproximadamente 12 horas de exposición al herbicida, para su fijación y decorionación.

Técnica de fijación basada en formaldehído

Se colocó a los embriones en el borde interior de un vial de vidrio de 5 ml. Con una pipeta Pasteur llena con 1 ml de heptano saturado con formaldehído. Posteriormente, se lavó los embriones en el frasco. Los trozos contaminantes de agar se retiraron manualmente.

Inmediatamente se fijaron los embriones usando el método de fijación rápida basada en formaldehído. Al final, los embriones se ubicaron en la interfaz entre la capa inferior (formaldehído) y la capa superior (heptano). Luego, se agregó un volumen igual de 37% de formaldehído y se atornilló la tapa firmemente, agitando vigorosamente durante 15 segundos.

Se dejó reposar el vial a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se retiró con cuidado la fase de formaldehído inferior del fluido. Usando una punta de pipeta y formando un ángulo con el vial para eliminar la mayor cantidad de formaldehído posible sin retirar los embriones.

Se agregó 1,0 ml de metanol y se tapó el vial. Agitando vigorosamente durante 15 segundos, se dejó reposar durante 1 minuto. Por lo general, alrededor de la mitad de los embriones se encuentran desvitelinizados y se hundieron hasta el fondo del vial.

Finalmente, se retiró la capa superior de heptano, junto con los embriones que no se hundieron y se agregó el metanol a los embriones restantes hasta que el frasco estuvo lleno aproximadamente dos tercios para luego almacenar los embriones en metanol a 4 ° C.

Para la observación de los embriones, se los retiró de su fijación en formaldehído y metanol, para montarlos en placas mediante la utilización de glicerol. Se realizó un montaje para cada dilución, en la que se colocaron todos los embriones disponibles de

cada bioensayo y se observaron en el microscopio con la función de luz transmitida. Se realizaron fotografías de los embriones que fueron analizadas posteriormente.

5. RESULTADOS.

Los resultados del bioensayo con metanol al 4 %, utilizado para probar si el protocolo era funcional, produjeron una mortalidad del 35,5 % en el grupo expuesto. Mientras que, en el grupo control se observó una mortalidad del 17,5 %, como se observa en la tabla 1.

Los embriones recolectados en las cámaras de reproducción fueron revisados cada 24h para determinar el número de embriones que eclosionaron y el número de embriones muertos. Esta evidencia permitió evaluar si el protocolo a usarse en los bioensayos de toxicidad con un herbicida basado en glifosato era funcional y determinar el efecto del herbicida de mejor manera.

Al comprobar que el protocolo era funcional, se pudo adaptar para la realización de los siguientes bioensayos, ya que se utilizó la misma metodología propuesta por Mallerick (2004), con pequeñas variaciones descritas anteriormente.

Se observó que una concentración de 4% de metanol produce aproximadamente una mortalidad del 35% en embriones de *D. melanogaster*, además de daños en los embriones sobrevivientes que no fueron cuantificados. La mortalidad en el grupo control también se presenta ligeramente elevada en la tabla 1.

5.1. MORTALIDAD DE UN HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*.

Los resultados de los embriones de *D. melanogaster* expuestos a la actividad del herbicida a las concentraciones finales, son presentados en la tabla 2. El aumento de la mortalidad es notorio a las concentraciones elevadas de 2,5 %, 5 % y 10 %, llegando casi al 100 % de letalidad en la concentración más elevada. Por otra parte, se observa que, a

concentraciones bajas de 0,05, 0,25, 0,5 y 1 %, existe una mortalidad superior al control, exponiendo que el herbicida tiene efectos sobre los embriones desde la concentración más baja probada (0,05) (Tabla 2).

5.2. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50).

Debido a la baja mortalidad de los embriones de *D. melanogaster* a las concentraciones mencionadas como tóxicas para otros organismos, fue necesario, para la obtención de la regresión probit y la dosis letal media, ocupar las concentraciones planteadas al final (1: 0,05ml/100ml, 2: 0.25ml/100ml, 0,5ml/100ml, 1ml/100ml, 2,5ml/100ml, 5ml/100ml y 10ml/100ml).

Los resultados obtenidos se colocaron en el programa estadístico R usando el paquete Ecotox, dando como respuesta una dosis letal media en promedio para todos los bioensayos de 3.4565 % como se muestra en la tabla 3 y figura 6. Además, se observan los límites de control o intervalos de confianza (UCL y LCL) que indican los extremos de la variabilidad esperada en los bioensayos.

Los resultados del bioensayo 5 no fueron tomados en cuenta para la determinación de la dosis letal media, debido a que hubo mucha variación entre la mortalidad de los mismos con respecto a los bioensayos anteriores.

Los datos obtenidos de los bioensayos 1 a 4 y los datos de control, se encuentran en distribución normal y son presentados en la figura 4.

5.3. EFECTOS DEL HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*.

Los efectos que presenta este herbicida sobre el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* son presentados en la figura 7 y tabla 4. Se observa que los efectos tóxicos del herbicida son notorios desde la dosis de 1% en adelante. Los embriones afectados tienen tamaño reducido y carecen de estructuras embrionarias, tales como el surco

cefálico, las masas de yema y además presentan un número reducido de segmentos (Figura 7).

En las dosis más bajas (1 y 2,5 %), pocos embriones muestran ausencia de las estructuras mencionadas. En las dosis más elevadas (5% y 10%), se observa claramente como estas estructuras están afectadas en la mayoría de embriones, y se puede apreciar cómo los embriones tienen tamaño reducido, forma anormal y menor número de segmentos, que se visualizan anormales e incompletos en comparación con el control (Figura 7). En la concentración 5% se observa como solo 3 de los 7 embriones observados presentaron una formación correcta del surco cefálico y la formación de la masa de yema, mientras que en la formación de los segmentos se observa como 5 de los 7 embriones presentaron una segmentación ligeramente anormal (figura 7 y tabla 4).

En la concentración más elevada (10%) puede apreciarse como ninguno de los 7 embriones observados presenta una segmentación completa o normal, solo 1 de los 7 embriones presentó una formación correcta del surco cefálico y 2 embriones presentaron masa de yema (Tabla 4).

6. DISCUSIÓN.

El bioensayo previo realizado con metanol al 4% sobre los embriones de *Drosophila melanogaster*, permitió validar el protocolo para los bioensayos siguientes y determinar los efectos del herbicida basado en glifosato sobre los mismos. Los resultados obtenidos de este coinciden con los propuestos por Mallerick (2004). En los cuales se demuestra que en presencia de metanol al 4%, el 35% de los embriones muere y la exposición al mismo conduce a defectos severos en el SNC (sistema nervioso central). Además, observó un rango de defectos morfológicos en otras capas germinales y efectos negativos en el movimiento celular.

Como se puede observar en la tabla 1, al exponer nuestros embriones de acuerdo al protocolo, se obtuvo una mortalidad de aproximadamente 35% de los embriones, que coincide con la investigación realizada por Mallerick (2004).

En los resultados obtenidos en nuestra investigación, existe una mortalidad elevada en los embriones no expuestos a metanol. Principalmente, a que estos primeros ensayos fueron realizados en el proceso de estandarización del protocolo, lo cual produjo un mal manejo de los embriones en un inicio; esto podría haber afectado ligeramente los datos. A pesar de esto, existe una mayor mortalidad que coincide con el estudio realizado por Mallerick en los embriones expuestos a metanol, y se pudo comprobar que el protocolo a usar era funcional.

6.1. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LC50).

Los bioensayos realizados en este estudio se conformaron de 5 ensayos con 3 repeticiones cada uno y cada repetición contó con 10 embriones por placa. Debido al número limitado de embriones se podría esperar una variación considerable entre los bioensayos, lo cual ocurrió en uno de ellos (bioensayo 5), como se puede observar en la tabla 2. El resto de bioensayos poseen una distribución normal y no existe variación significativa en los mismos como se puede observar en la figura 4. Se sugiere aumentar el número de repeticiones para reducir la variación en los datos.

A medida que las concentraciones del herbicida aumentan, se puede observar como los embriones se ven afectados y aumentan su mortalidad hasta casi el 100% en la dosis más elevada (10%) (Figura 5). Estos datos nos pueden brindar una idea real de cuál es la dosis letal media para los embriones de *Drosophila melanogaster* expuestos a un herbicida basado en glifosato. Sin embargo, por el número limitado de embriones en los datos, se considera necesario realizar más bioensayos que amplíen la información disponible y complementen los datos de esta investigación.

Los datos para la obtención de la dosis letal media, usando el paquete Ecotox para la regresión probit, indican que la dosis letal media corresponde a una concentración v/v de 3.4565 % como se observa en la tabla 3 y figura 6. El porcentaje obtenido de la dosis letal media, representa un valor elevado en comparación con la cantidad de producto que debe ser usada para la eliminación de maleza en plantaciones agrícolas (hasta 1% en malezas y 3,2 % en cultivos de alta calidad) (Hernández-ramírez et al., 2013). Sin embargo, como se puede observar en los datos presentados en la figura 7. Incluso dosis

menores a la concentración letal media generan daños en algunas estructuras embrionarias, lo cual podría afectar el desarrollo embrionario de varias especies de insectos expuestas al herbicida.

Existen varios estudios de toxicidad de herbicidas basados en glifosato sobre otros organismos de estudio que pueden servir para comparar mejor la dosis letal media obtenida en este estudio. Hay que considerar que para este y todos los demás estudios de toxicidad realizados con herbicidas basados en glifosato, las formulaciones iniciales no son las mismas y pueden contener diferentes aditivos y coadyuvantes, lo que puede resultar en formulaciones más o menos tóxicas para los organismos de estudio.

Muchos de los herbicidas basados en glifosato usados en el mundo terminan cerca o directamente en fuentes de agua (Duarte y Barragan, 2003). El tiempo de degradación de los mismos es variable debido a la composición de la mezcla del herbicida y de la fuente de agua contaminada; el glifosato solo puede llegar a disiparse en aproximadamente 3 a 4 días, sin embargo, sus residuos pueden llegar a degradarse en hasta 14 días, sin contar los aditivos que podrían aumentar esta cifra (Borggaard y Gimsing, 2008; Gordon y Brown, 1993).

Esto podría estar afectando a la supervivencia de diferentes organismos acuáticos. Por ejemplo, *Artemia salina* necesita ser expuesta a una concentración aproximada de 1.419 % de un herbicida basado en glifosato para que se produzca una mortalidad del 50% en sus larvas (Rodriguez., et al, 2016). De esta manera se puede comprobar que varios organismos de un ecosistema pueden estar expuestos a los efectos tóxicos de estos herbicidas y no se requiere de dosis muy elevadas para que se observen consecuencias en los embriones o larvas de los mismos.

En vertebrados como la rana *Xenopus laevis*, se demostró que inyecciones con concentraciones de 0,016% de un herbicida basado en glifosato producen efectos letales sobre los embriones de estos organismos y generan graves daños sobre la formación del sistema nervioso (Paganelli, Gnazzo, Acosta y Lopez, 2010). Esto implica que nuestros embriones de estudio tienen una mayor resistencia al herbicida en cuanto a letalidad; sin embargo, los daños celulares se podrían estar produciendo desde dosis ligeramente bajas.

Varias compañías agroquímicas fabrican herbicidas basados en glifosato bajo múltiples nombres comerciales. Estas formulaciones comerciales contienen varios aditivos, muchas

veces basados en productos de petróleo. Además, contienen aditivos y coadyuvantes que por lo general no son mencionados en las etiquetas de los productos por políticas de empresas. Por lo tanto, los impactos de las formulaciones basadas en glifosato en las plantas y otros organismos pueden diferir sustancialmente del compuesto activo (glifosato) y sus sales (Martinez et al., 2018). Es complicado comparar los efectos de estos herbicidas sobre organismos que podrían llegar a estar expuestos, entre ellos, los seres humanos, debido a que la toxicidad de las formulaciones no solo viene del compuesto principal (glifosato) sino también de los aditivos y coadyuvantes que pueden ser de diferentes tipos y en concentraciones distintas.

Cabe recalcar que la obtención de la dosis letal media del producto utilizado para esta investigación representa solo uno de los más de 750 diferentes productos que contienen glifosato en sus formulaciones y que existen actualmente en el mercado, lo que podría provocar una variación considerable en ensayos similares entre otros productos basados en el mismo compuesto (Mesnage et al., 2015).

Otra problemática, en países donde las regulaciones son menos estrictas es la cantidad y concentración del producto que es aplicada en los campos de cultivo. El uso de plantas transgénicas resistentes a este herbicida ha aumentado de manera exponencial durante esta última década, provocando que se utilice dosis hasta ocho veces mayores a las recomendadas por las etiquetas de cada producto (Vazquez, et al., 2017).

A consecuencia de esto, debido a la mala utilización de estos herbicidas, las concentraciones que se podrían encontrar en los campos de cultivo fácilmente superan la concentración de la dosis letal media resultante de este estudio; considerablemente más elevada que la obtenida por otras investigaciones en diferentes organismos (Rodrigues, et al, 2016). Esto implica que, concentraciones muy elevadas de estas formulaciones lleguen a diferentes ecosistemas y provoquen daños significativos a organismos no objetivo (Cerdeira y Duke, 2006). Como vimos anteriormente, no es necesario de dosis muy elevadas de estos herbicidas para que se genere letalidad y daños irreparables en el desarrollo de algunos organismos. Esto incluye a los polinizadores, que de verse afectados de la misma manera que los embriones en nuestro estudio, estarían aumentando su tasa de mortalidad y reduciendo peligrosamente sus números (Hahn, Greggers, Menzel, y Farina, 2015).

6.2. EFECTOS DEL HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*.

El ensayo de biotoxicidad extra, permitió analizar los embriones mediante 7 fotografías por cada una de las concentraciones más elevadas (1, 2.5, 5 y 10%) del herbicida basado en glifosato sobre el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, como se observa en la figura 7 y tabla 4. Los embriones tomados en cuenta para las fotografías tuvieron aproximadamente el mismo tiempo de desarrollo (12 h) lo que permitió realizar un análisis descriptivo de los embriones expuestos al mismo. Sin embargo, se considera necesario la realización de un mayor número de fotografías y análisis para complementar la información brindada en este estudio.

En las concentraciones más elevadas, los daños en la formación de los segmentos, el surco cefálico, las masas de yema y el tamaño corporal de los mismos son evidentes. En las dosis más bajas no se apreció a simple vista como las mismas estructuras fueron afectadas, sin embargo, los datos de letalidad indican que incluso en las dosis más bajas los embriones sufren daños que provocan su mortalidad.

En *Drosophila melanogaster*, durante la gastrulación se producen dos invaginaciones, el surco ventral y cefálico, estos, representan las primeras manifestaciones morfológicas del destino celular y los programas de diferenciación. La invaginación del surco cefálico tiene lugar lateralmente a ambos lados del embrión, cerca de su extremo anterior, subdividiendo al embrión temprano en dos territorios que corresponden al procéfalo, futura región de la cabeza, y la banda germinal que formara el tórax y el abdomen (Bownes, 1975; Vincent et al., 1997). Como se observa en la tabla 4, 6 de los 7 embriones expuestos a la concentración más alta (10%) presentaron ausencia de surco cefálico, dejando en evidencia que los procesos de movimientos celulares que dan origen a estas estructuras, están siendo afectados por el herbicida, evitando que el embrión desarrolle correctamente la región del procéfalo y la banda germinal.

Cuando la banda germinal se encuentra en su posición extendida, se producen varios procesos morfológicos que dan origen a la organogénesis, segmentación y segregación de los discos imaginales. Todos estos procesos terminaran formando los segmentos larvales y en un futuro estructuras importantes en el adulto como las alas, los ojos, la

cabeza, las antenas, el tórax, etc (Gilbert, 2005). Los embriones expuestos a la concentración 10 % presentaron total ausencia de segmentación, lo que podría indicar que las futuras estructuras mencionadas anteriormente se vean afectadas por el herbicida basado en glifosato, impidiendo que el embrión desarrolle estructuras importantes como los ojos o el tórax (figura 7 y tabla 4).

Los resultados obtenidos, presentados en la tabla 4, demuestran que el herbicida estaría afectando directamente el proceso de gastrulación, debido a que en las concentraciones más altas, no se puede observar la presencia de surco cefálico o segmentación, en el caso de que se encuentren presentes están totalmente anormales en comparación con las fotografías realizadas en los controles, en las cuales se observa que la formación de las mismas estructuras son totalmente normales (Figura 7).

En el momento en el que comienzan a aparecer los segmentos del cuerpo, mientras que la banda germinal está en posición extendida, se producen los procesos morfogénicos clave: segmentación y segregación de los discos imaginales. Tres de estos segmentos forman el tórax, y otros ocho segmentos forman el abdomen (Gilbert, 2005). Como se observa en la tabla 4, entre mayor es la concentración del herbicida basado en glifosato, el número de segmentos en los embriones expuestos se va reduciendo llegando a estar totalmente ausentes en la concentración más alta (10 %).

La segmentación comienza después de que la extensión de la banda germinal es completada (Bownes, 1975). De esta manera, cada segmento posee su propio destino de desarrollo, que terminará con la formación de la mayoría de estructuras y órganos en el adulto (Bownes, 1975). Según los resultados obtenidos, el proceso de segmentación se ve afectado en la mayoría de embriones lo que podría causar que varias estructuras en el adulto se vean afectadas (figura 7 y tabla 4). Los embriones control muestran una presencia normal de todas las estructuras mencionadas anteriormente.

Los resultados indican que a medida que aumenta la concentración del herbicida, la presencia de estas estructuras embrionarias va disminuyendo. Es necesario tomar en cuenta que las concentraciones usadas en los campos de cultivo agrícolas (hasta 3,2 %) son mucho menores que la concentración más elevada de nuestros bioensayos, por lo que los daños vistos en esta concentración no podrían replicarse en el campo si se siguen las indicaciones correctas de cada producto (Hernández-ramírez et al., 2013). Aun así, como se observa en la tabla 2 y figura 5, la mortalidad de los embriones expuestos aumenta

desde la concentración más baja, y como se puede ver en la tabla 4 y figura 7, las estructuras como el surco cefálico, la segmentación y la presencia de masa de yema empiezan a verse claramente afectados desde la concentración 1%.

Los análisis genéticos y moleculares de los patrones del embrión de *Drosophila* han demostrado que el proceso de segmentación de la cabeza y la formación del surco cefálico se deben a la expresión del gen de regla par *eve*, que presagia la formación de los parasegmentos y el gen *gap* (*btd*) que se requiere para la formación de los segmentos antenal, intercalario, mandibular y parte del segmento maxilar. Si estos genes se ven afectados en mutantes, los segmentos y el surco cefálico se eliminan o se ven anormales (Vincent et al., 1997).

En los resultados obtenidos, se puede ver como en las concentraciones más elevadas, en casi todos los embriones presentan segmentación anormal o no presentan ninguna segmentación, lo que podría indicar que además de que los movimientos de gastrulación se ven afectados también los genes *gap* y de regla par podrían estar siendo afectados de manera que no se produciría la segmentación en estos embriones.

El herbicida basado en glifosato posiblemente podría estar afectando la expresión de estos genes y evitando que se formen las estructuras mencionadas anteriormente. Sin embargo, se requiere realizar análisis moleculares para complementar y confirmar esta información.

Mallerick (2004), demostró que la exposición a metanol interfiere con los movimientos morfológicos celulares, e incrementa la apoptosis en embriones de *Drosophila melanogaster*, llegando a observar un rango de defectos morfológicos en las capas germinales, mientras que, De Aguiar, Gottschalk y Da Rosa (2016) demostraron que la exposición de un herbicida basado en glifosato sobre los adultos de *Drosophila melanogaster* causaba que los niveles de expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante aumentaran considerablemente. Estos estudios podrían brindarnos información de lo que podría estar pasando con los embriones expuestos al herbicida en este estudio.

El glifosato actúa sobre la vía metabólica del ácido shikímico en las plantas mediante la inhibición de la enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate sintasa (EPSPS), que participa en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos. La inhibición de esta enzima por el glifosato causa escasez de proteínas y, en consecuencia, muerte de las plantas. Dado

que esta vía bioquímica no existe en animales, incluidos vertebrados e invertebrados, se suele suponer que el glifosato es seguro para los mamíferos, incluidos los humanos (Mesnage et al., 2015). Sin embargo, nuestro estudio y varios más indican que el glifosato y sus aditivos tienen efectos secundarios en animales. Muchas veces los aditivos agregados a las formulaciones tienen mucha mayor toxicidad que el compuesto activo principal.

Algunos estudios demuestran cómo los herbicidas basados en glifosato afectan el desarrollo de algunos vertebrados como *Xenopus laevis* en el cual una exposición a los embriones del mismo, produce marcadas alteraciones en el desarrollo de la cresta cefálica, neural y un acortamiento del eje antero posterior. Finalmente, estas alteraciones fueron correlacionadas con malformaciones en los cartílagos craneales en los estadios de renacuajo (Paganelli, Gnazzo, Acosta y Lopez, 2010). Además, estudios en el pez cebra demuestran que exposiciones a herbicidas basados en glifosato producen anomalías morfológicas que incluyen reducciones cefálicas, oculares y una pérdida de ventrículos cerebrales delineados. Consecuentemente con los cambios estructurales en el cerebro en desarrollo, mediante el análisis de hibridación *in situ*, se detectó disminuciones en los genes expresados en las regiones del cerebro, ojo anterior y cerebro medio, incluidos *pax2*, *pax6*, *otx2* y *ephA4* (Roy et al., 2016).

Si bien estos estudios fueron realizados en vertebrados, es evidente que los embriones de *Drosophila melanogaster* usados para este estudio también presentan daños internos que podrían estar produciendo malformaciones similares a las vistas en estos vertebrados y por lo tanto, generando una mortalidad elevada de los mismos. Si consideramos a todos los insectos que pudieran estar expuestos a estos herbicidas en los campos de cultivo, incluidos en ellos a los polinizadores, se estaría generando un daño irreparable al ciclo de vida de todos estos y creando un desbalance en los ecosistemas que difícilmente se podría recuperar.

En las abejas melíferas, el polinizador más importante del mundo, se ha demostrado que la exposición a diferentes niveles de glifosato comúnmente encontrados en zonas de cultivo, deteriora las capacidades cognitivas dificultando su regreso a la colmena. Por lo tanto, su navegación se ve afectada por la ingesta de glifosato, con consecuencias negativas para el éxito de la búsqueda de nuevas colonias (Hahn, Greggers, Menzel, y Farina, 2015). Además, se ha demostrado que la contaminación con glifosato en las

colmenas, produce una mayor porción de larvas con desarrollo tardío y peso reducido, indicando que el herbicida es un factor estresante que afecta el desarrollo larvario, dependiendo de la susceptibilidad individual y de la colonia (Irina, Pagano, Zavala y Farina, 2018).

Los invertebrados terrestres, fundamentales para el balance de los ecosistemas como las lombrices de tierra, también se ven afectados por la exposición de estos herbicidas. Se ha demostrado que la reproducción de las lombrices de tierra se reduce en un 56% dentro de tres meses posteriores a la aplicación del herbicida basado en glifosato (Gaupp-berghausen, Hofer, Rewald y Zaller, 2015). Estos considerables impactos inducidos por herbicidas en los agroecosistemas son particularmente preocupantes porque estos herbicidas se han utilizado a nivel mundial durante décadas.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

El glifosato es el compuesto activo de cientos de herbicidas que emplean formulaciones que incluyen aditivos y coadyuvantes, estos en conjunto, además de incrementar la efectividad de estos herbicidas, también generan grandes problemas en los ecosistemas expuestos. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la toxicidad de estos herbicidas puede observarse en embriones de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* desde las concentraciones más bajas, que resultan ser menores a las que se utiliza en los campos de cultivos para controlar las malezas hasta la dosis más elevadas se puede observar daños en el desarrollo de los embriones expuestos y una mortalidad de casi el 100%.

La dosis letal media obtenida para este estudio resulto ser más elevada que la obtenida por otras investigaciones para diferentes organismos de estudio. A pesar de esto, debido a la mala utilización de estos herbicidas, las concentraciones que se pueden encontrar en los campos de cultivo fácilmente superan la concentración de la dosis letal media resultante de este estudio.

Los resultados expuestos en esta investigación brindan información respecto a lo que estos herbicidas podrían estar provocando en el ciclo de vida de todos los insectos que están expuestos a estos. Esto incluye a los insectos polinizadores que de verse afectados

de la misma manera que en nuestro estudio, estarían en un grave riesgo de desaparecer debido a la alta tasa de mortalidad y mal formaciones que estas formulaciones producen en los embriones de estos organismos.

Los resultados expuestos en este estudio deben ser complementados con más bioensayos y un mayor número de embriones. Además, deben realizarse análisis moleculares y celulares para determinar de mejor manera que efectos están teniendo estos herbicidas basados en glifosato sobre el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Se considera necesario la realización de más investigaciones que incluyan todo tipo de herbicidas basados en glifosato junto con sus adyuvantes y coaditivos para ampliar la información disponible sobre los posibles efectos que estos herbicidas podría estar provocando en diferentes organismos, ya sean vertebrados o invertebrados y de esta manera saber cómo estos herbicidas están afectando la salud de todos los organismos expuestos, incluido el ser humano.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C y Sørvalini, G. (2007). Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells, *133*, 126–133. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0154-8>
- Borggaard, O., y Gimsing, A. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters : a review, *456*(March 2007), 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Bownes, M. (1975). A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*. *Embryol*, *33*, 789–801.
- Cauble, K y Wagner, R. (2005). Sublethal Effects of the Herbicide Glyphosate on Amphibian metamorphosis and development. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>
- Cerdeira, A y Duke, S. (2006). The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops: A Review, *1658*, 1633–1658. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0378>
- De Aguiar, L., Figueira, F., Gottschalk, M y Da Rosa, C. (2016). Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *185–186*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.006>
- Débarre, D., Olivier, N., Supatto, W y Beaurepaire, E. (2014). Mitigating Phototoxicity during Multiphoton Microscopy of Live *Drosophila* Embryos in the 1.0–1.2 μm Wavelength Range. *PLoS ONE* *9*(8): e104250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104250>
- Defarge, N., Vendômois, J y Séralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, *5*(December 2017), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- Defarge, N., Takács, E., Lozano, V., Mesnage, R., Vendômois, J., Séralini, G y Székács, A. (2016). Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase

Activity in Human Cells below Toxic Levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.
<https://doi.org/10.3390/ijerph13030264>

Dill, G., Sammons, R., Feng, P., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., ... y Hauptfear, E. (1997). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties 1, 1–34.

Duarte, R., Barragán, R y Mocha, E. Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (revisión de literatura) Orinoquia, vol. 7, núm. 1-2, julio, 2003, pp. 70-100 Universidad de Los Llanos Meta, Colombia. (2003).

García-Espiñeira, M., Tejada-Benitez, L y Olivero-Verbel, J. (2018). Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156(February), 216–222.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.075>

Gasnier, C., Dumont, N., Benachour, N., Clair, E., Changon, M y Séralini, G. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184–191.

Gaupp-berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B y Zaller, J. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Nature Publishing Group*, (February), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep12886>

Gilbert, S. (2005). *Biología del desarrollo*. Ed. medica panamericana (Vol. septima ed).

Gomes, H., Panetto, O., Gomes, H., Fraga, D y Campos, E. (2019). The effects of Roundup ® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*) *Comparative Biochemistry and Physiology* , Part C The effects of Roundup ® in embryo development and energy metabolism of the zebra fish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 222(July), 74–81.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.007>

Gordon, L y Brown, J. (1993). Environmental Chemistry dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds golds borough * ^ and DENNIS, 12, 1139–1147.

- Gui, Y., Fan, X., Wang, H., Wang, G y Chen, S. (2019). Neurotoxicology and Teratology
Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms.
Neurotoxicology and Teratology, 34(3), 344–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.03.005>
- Hahn, M., Greggers, U., Menzel, R y Farina, W. (2015). Effects of sublethal doses of
glyphosate on honeybee navigation. *The Journal of Experimental Biology*, 218,
2799–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>
- Hernández-ramírez, I., Córdoba-ortega, C y Aranda-rosero, S. (2013). El glifosato:
¿inocuo? *Desarrollo Humano*, 11(19), 87–94.
- Hernando, M y Bautista, B. (2011). tolerancia al ph en embriones y renacuajos de cuatro
especies. *Revista Academica de Colombia*, XXXV, 105–110.
- Huaracahuaraca, L. (2017). Evaluación ecotoxicológica de aguas contaminadas con
glifosato a partir de los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*. *ESCUELA
POLITÉCNICA NACIONAL*, 244. Retrieved from
<file:///C:/Users/HOGAR/Downloads/CD-2042.pdf>
- Hurtig, A., Sebastián, M., Soto, A., Shingre, A y Amunárriz, M. (2010). Archives of
Environmental Health: An International Pesticide Use among Farmers in the
Amazon Basin of Ecuador Pesticide Use among Farmers in the Amazon Basin of
Ecuador. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 58, 223–228.
<https://doi.org/10.3200/AEOH.58.4.223-228>
- Iliina, N., Pagano, E., Zavala, J y Farina, W. (2018). Glyphosate affects the larval
development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLOS ONE*,
13, 1–19.
- Jennings, B. (2011). Drosophila-a versatile model in biology & medicine. *Materials
Today*, 14(5), 190–195. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4)
- Lipok, J., Studnik, H y Gruyaert, S. (2010). The toxicity of Roundup® 360 SL
formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-
target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7),
1681–1688. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.017>

- Martinez, D., Loening, U y Graham, M. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environmental Sciences Europe*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0131-7>
- Mellerick, D y Liu, H. (2004). Methanol exposure interferes with morphological cell movements in the *Drosophila* embryo and causes increased apoptosis in the CNS. *Journal of Neurobiology*, 60(3), 308–318. <https://doi.org/10.1002/neu.20020>
- Mesnage, R., Bernay, B y Séralini, G. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2–3), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J y Séralini, G. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Metzler, M y Kahl, M. (2015). Interacción de la mezcla de glifosato + saflufenacil con diferentes coadyuvantes y volúmenes de aplicación, 1–21.
- Myers, J., Antoniou, M., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L., ... y Benbrook, C. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Ong, C., Yung, L., Cai, Y., Bay, B y Baeg, G. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., Lopez, S y Carrasco, A. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *American Chemical Society*, xxxx.
- Paz-y-miño, C., Sánchez, M., Arévalo, M., Muñoz, M., Witte, T., De-la-carrera, G y Leone, P. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetic and Molecular Biology*, 460, 456–460.
- Rodrigues, D., Oliveira, R., Abe, F., Brito, L., Moura, D., Valadares, M., ... y Oliveira, G. (2016). Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on

- different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7).
<https://doi.org/10.1002/etc.3580>
- Roy, N., Carneiro, B y Ochs, J. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.003>
- Russell, G y Delgado, V. (2012). Determinación de la concentración letal media (cl 50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (webster 1879) (polychaeta: annelida) Russell. *Contaminaion Ambiental*, 28(2), 137–144.
- Schweizer, M., Brilisauer, K., Tribskorn, R., Forchhammer, K y Köhler, H. (2019). How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebra fish (*Danio rerio*), 1–25. <https://doi.org/10.7717/peerj.7094>
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T y Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- Vazquez, E., Maturano, A., Etchegoyen, F y Difilippo, B. (2017). Asociación entre cáncer y exposición ambiental a glifosato. *International Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 73–85.
- Vincent, A., Blankenship, J y Wieschaus, E. (1997). Integration of the head and trunk segmentation systems controls cephalic furrow formation in *Drosophila*. *Development*, 124, 3747–3754.

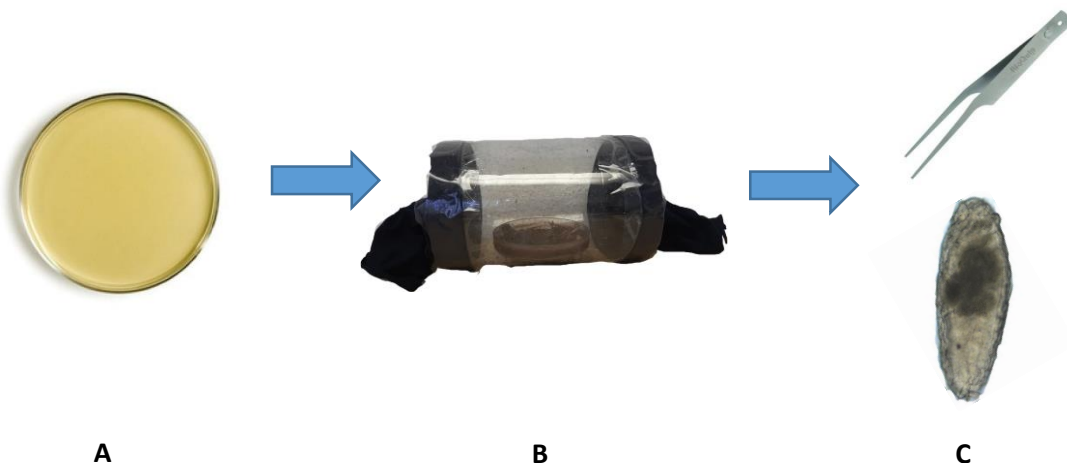
9. FIGURAS.

Figura 1. Esquema para la obtención de embriones de *Drosophila melanogaster*. A placa con gelatina sin sabor, jugo de uva y levadura. B cámara de reproducción. C recolección mecánica de los embriones cada 4h después de colocados en la cámara de reproducción.

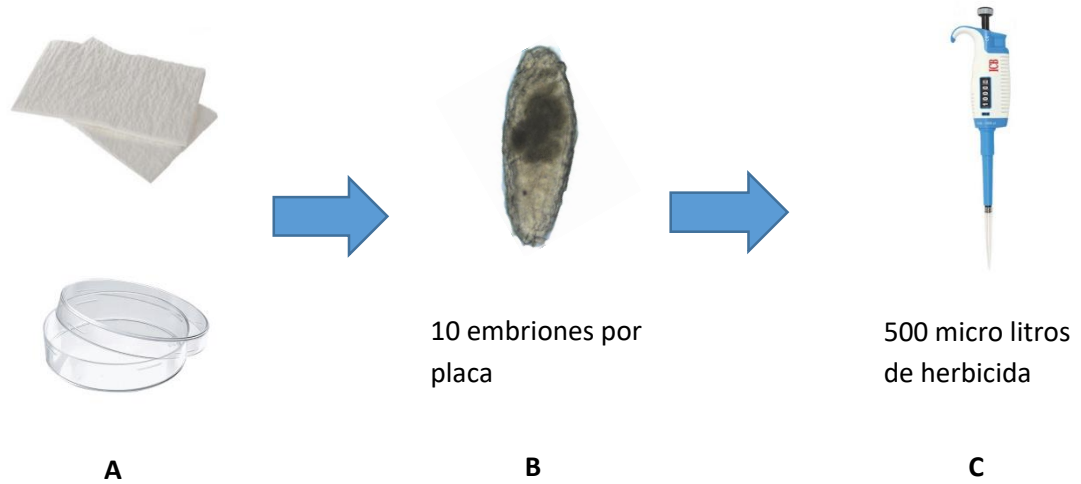


Figura 2. Esquema del bioensayo de toxicidad. A. Las placas Petri contienen un cuadrado de papel absorbente estéril. B. Cada placa contuvo 10 embriones de aproximadamente el mismo tiempo de desarrollo. C. En cada placa se colocó 500 micro litros del herbicida basado en glifosato, la misma cantidad fue colocada cada 24h.

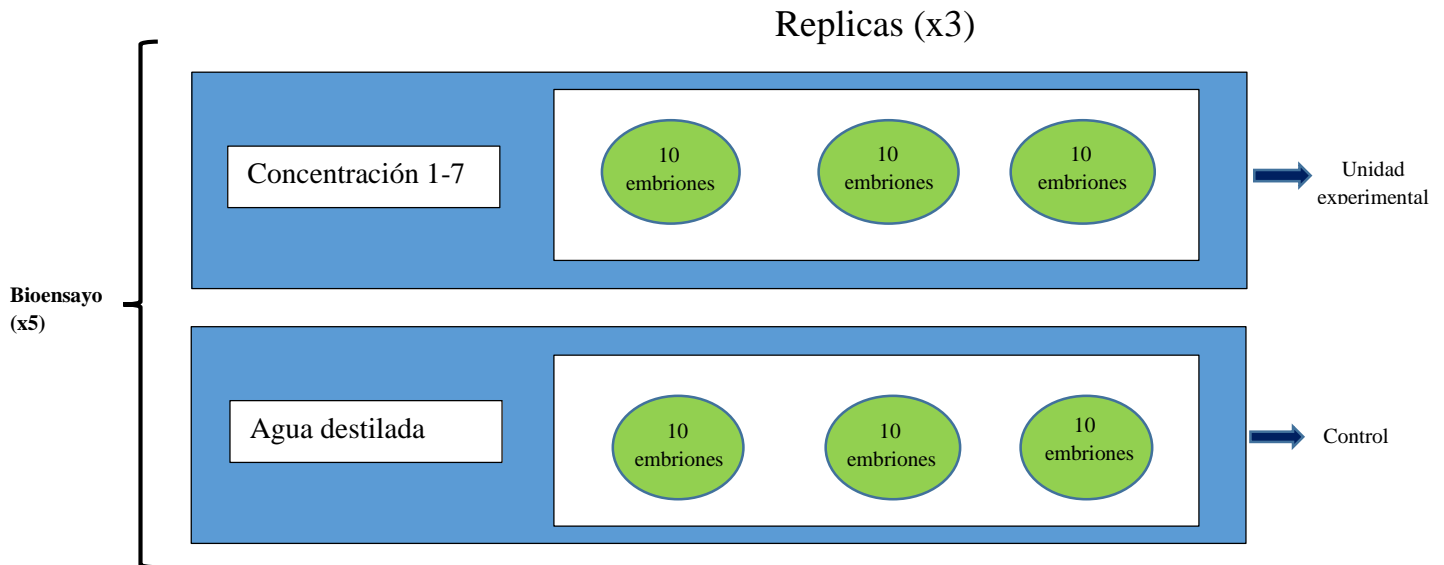


figura 3. Esquema de bioensayo para determinar la concentración letal media de un herbicida basado en glifosato sobre embriones de *Drosophila melanogaster*. Cada bioensayo consta de una unidad experimental por cada concentración y un grupo control. Se realizaron cinco réplicas de cada bioensayo. La unidad experimental consiste de tres réplicas; cada réplica consta de 10 embriones, ubicados en una caja petri y expuestas a la solución de prueba. El grupo control es similar a una unidad experimental, pero está expuesto únicamente a agua destilada.

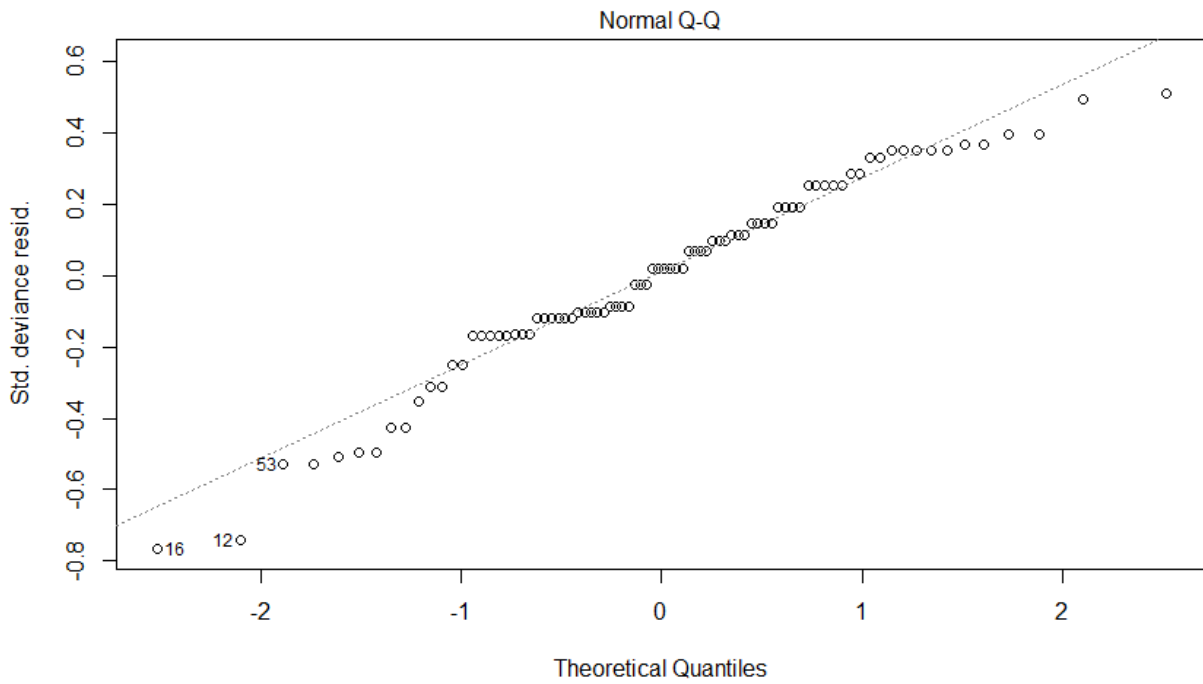


Figura 4. Datos de normalidad para los bioensayos de toxicidad 1-4 y los controles.
Los datos se encuentran en distribución normal.

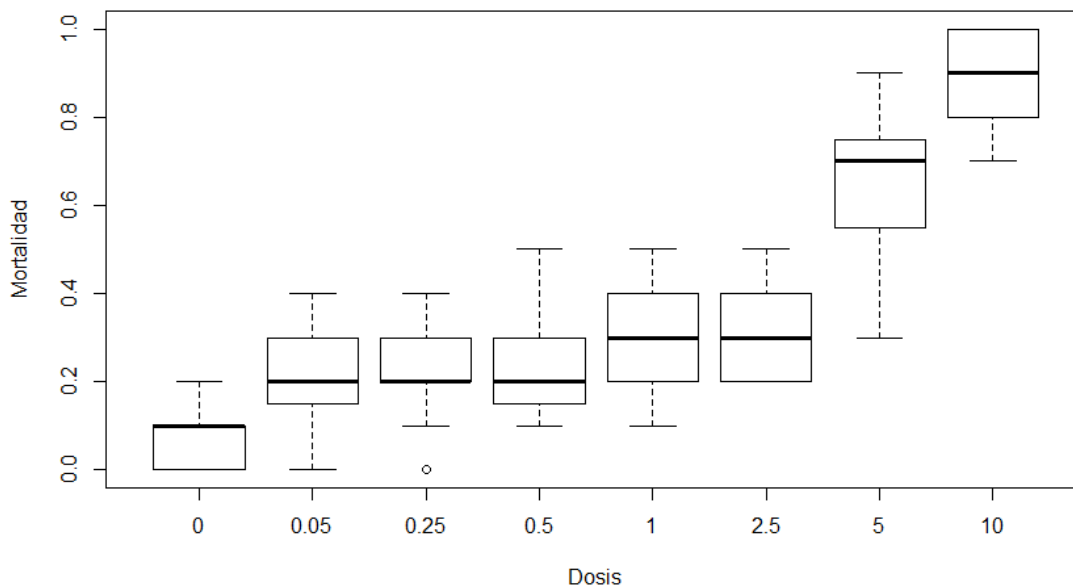


Figura 5. Datos de mortalidad expresados en porcentaje de acuerdo a las dosis del herbicida basado en glifosato sobre los embriones. En la menor concentración se llega a una mortalidad menor al 50% mientras que en la concentración más alta se llega a una mortalidad de casi el 100% de letalidad. La caja representa el 50% intermedio de los datos. La línea que se encuentra en cada caja representa la media de los datos recolectados y las barras de error indican los rangos del 25 % de valores de datos de la parte inferior y el 25 % de la parte superior, excluyendo los valores atípicos.

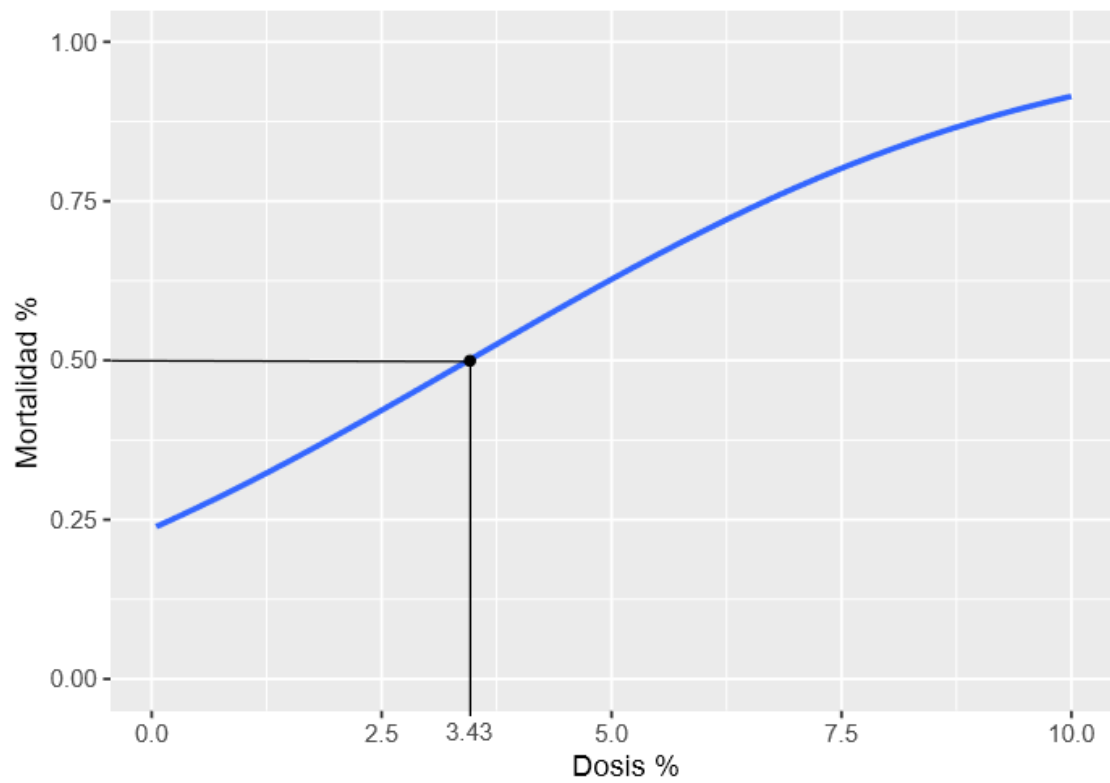


Figura 6. Dosis letal media (LC) o curva de mortalidad medida en porcentaje. El punto representa la dosis letal media obtenida mediante el programa estadístico R.

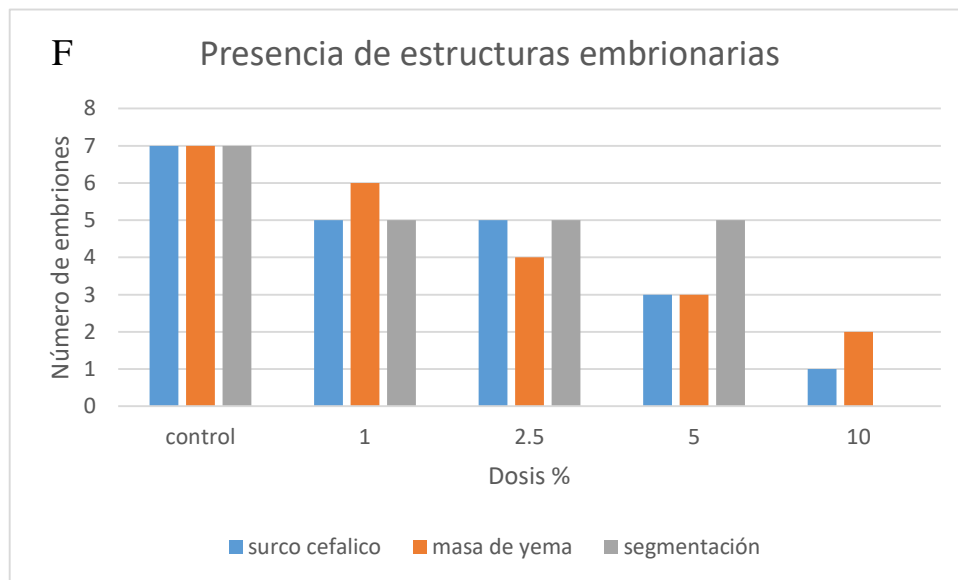
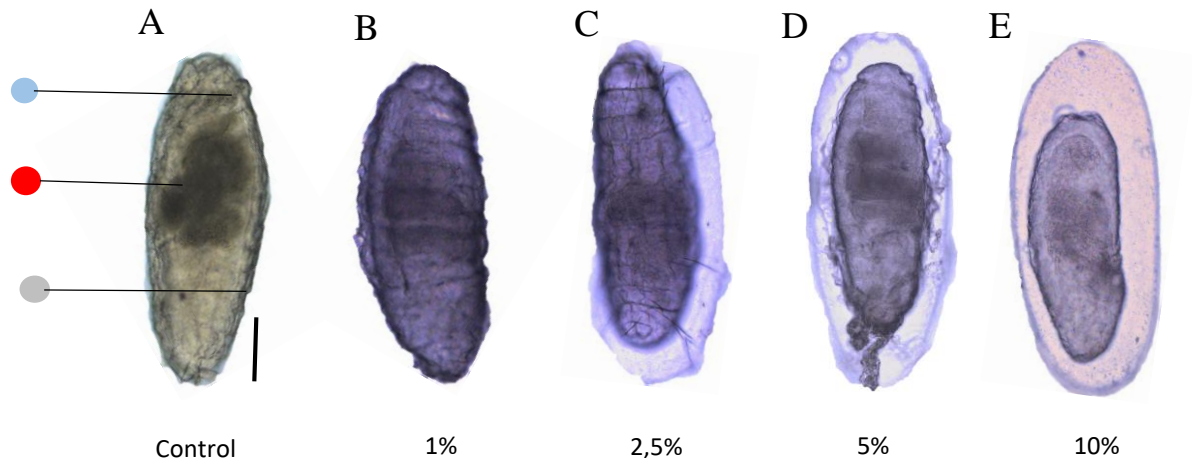


Figura 7. Efectos de la exposición de un herbicida basado en glifosato a diferentes concentraciones sobre algunas estructuras embrionarias en *Drosophila melanogaster*. Los embriones están ubicados verticalmente con la parte anterior hacia arriba. Fotografía A muestra el control con agua destilada. Fotografía B-E muestran concentración 1%, 2.5%, 5% y 10%. Gráfico F muestra el conteo de la presencia o ausencia de surco cefálico, masa de yema y segmentación, en el número de embriones registrados fotográficamente.

10. TABLAS.

Tabla 1. Registro de la mortalidad de embriones expuestos a una concentración de metanol 4% obtenido de los bioensayos control. Se presenta el número de embriones muertos a la izquierda y el número de embriones muertos en porcentaje a la derecha.

FECHA	RÉPLICA	EMBRIONES MUERTOS		DATOS EN PORCENTAJES	
		METANOL 4%	CONTROL	% METANOL	% CONTROL
22/4/2019	1	6/ 10	2/10	3	1
	2	3/10	4/10	1.5	2
	3	5/10	1/10	2.5	0.5
	4	8/10	2/10	4	1
	5	4/10	3/10	2	1.5
MEDIA		5.2	2.4	2.6	1.2
24/4/2019	6	4/10	2/10	2	1
	7	5/10	2/10	2.5	1
	8	2/10	1/10	1	0.5
	9	2/10	1/10	1	0.5
	10	3/10	1/10	1.5	0.5
MEDIA		3.2	1.4	1.6	0.7
25/4/2019	11	2/10	1/10	1	0.5
	12	4/10	2/10	2	1
	13	2/10	1/10	1	0.5
	14	3/10	2/10	1.5	1
	15	5/10	3/10	2.5	1.5
MEDIA		3.2	1.8	1.6	0.9
27/4/2019	16	3/10	2/10	1.5	1
	17	3/10	2/10	1.5	1
	18	2/10	1/10	1	0.5
	19	2/10	1/10	1	0.5
	20	3/10	1/10	1.5	0.5
MEDIA		2.6	1.4	1.3	0.7
TOTAL		71/200	35/200	35,5 %	17,5 %
SUMA DE MEDIAS		14.2	7	7.1	3.5
MEDIA DE MEDIAS		3.55	1.75	1.77	0.87
DESVIACIÓN EST. MEDIAS		0.97	0.40	x	x

Tabla 2. Registro de la mortalidad de embriones expuestos a diferentes concentraciones de un herbicida basado en glifosato obtenidos de los bioensayos de toxicidad.

BIOENSAYO		RÉPLICA	EMBRIONES MUERTOS							
			HERBICIDA BASADO EN GLIFOSATO						CONTROL	
NÚMERO	FECHA		0.05	0.25	0.5	1	2.5	5	10	DH20
1	6/5/2019	1	2	2	2	4	5	7	10	0
		2	4	2	3	2	3	7	9	1
		3	3	3	3	3	4	9	10	1
		MEDIA	3	2.3	2.6	3	4	7.6	9.6	0.6
2	7/5/2019	4	2	0	4	3	4	7	10	0
		5	3	3	3	1	2	8	9	1
		6	4	2	1	2	6	7	9	0
		MEDIA	3	1.6	2.6	2	4	7.3	9.6	0.3
3	13/5/2019	7	2	4	2	4	2	8	8	1
		8	3	3	6	5	5	8	9	0
		9	1	2	2	2	4	7	10	0
		MEDIA	2	3	3.3	3.6	3.6	7.6	9	0.3
4	14/5/2019	10	2	2	1	5	5	8	8	0
		11	3	4	3	3	2	7	9	0
		12	0	2	5	4	4	8	9	1
		MEDIA	1.6	2.6	3	4	3.6	7.6	8.6	0.3
5	18/5/2019	13	2	2	1	2	3	3	8	1
		14	1	2	1	3	3	4	8	1
		15	0	1	2	2	2	4	10	2
		MEDIA	1	1.6	1.3	2.3	2.6	3.6	8.6	1.3
TOTAL			32	34	39	45	54	102	136	9
SUMA DE MEDIAS			10.6	11.1	12.8	14.9	17.8	33.7	45.4	2.8
MEDIA DE MEDIAS			2.12	2.22	2.56	2.98	3.56	6.74	9.08	0.56
DESVIACIÓN ST MEDIAS			0.78	0.55	0.68	0.75	0.51	1.5	0.44	0.38

Tabla 3. Valores probit de la dosis letal media de los bioensayos 1-4 obtenidos del programa estadístico R junto con los intervalos de confianza.

Bioensayo	Dosis letal media CL50 %	Intervalos de confianza %	
		LCL	UCL
1-4	3.456593	1.614514	8.063296

LC50: concentración letal que mata el 50% de los embriones expuestos. Los datos presentados se encuentran en porcentajes.

Tabla 4. Registro de la presencia o ausencia de diferentes estructuras embrionarias tomadas a partir de la realización de fotografías (Figura 7) a los embriones expuestos en las concentraciones mencionadas de un herbicida basado en glifosato.

CONCENTRACIÓN %	NÚMERO DE EMBRIONES	PRESENCIA DE SURCO CEFÁLICO	PRESENCIA DE MASA DE YEMA	PRESENCIA DE SEGMENTOS
CONTROL	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI
	4	SI	SI	SI
	5	SI	SI	SI
	6	SI	SI	SI
	7	SI	SI	SI
TOTAL		7/7	7/7	7/7
1	1	SI	SI	SI
	2	NO	NO	NO
	3	SI	SI	NO
	4	SI	SI	SI
	5	SI	SI	SI
	6	NO	SI	SI
	7	SI	SI	SI
TOTAL		5/7	6/7	5/7
2.5	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	NO	NO	NO
	4	NO	NO	SI
	5	SI	NO	NO
	6	SI	SI	SI
	7	SI	SI	SI
TOTAL		5/7	4/7	5/7
5	1	SI	SI	SI
	2	NO	NO	NO
	3	NO	NO	NO
	4	SI	SI	SI
	5	NO	NO	SI
	6	NO	NO	SI
	7	SI	SI	SI
TOTAL		3/7	3/7	5/7
10	1	NO	NO	NO
	2	NO	NO	NO
	3	NO	NO	NO
	4	NO	NO	NO
	5	SI	SI	NO
	6	NO	SI	NO
	7	NO	NO	NO
TOTAL		1/7	2/7	0/7

