



**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL HERBICIDA  
OXADIAZÓN (MOISS 250EC) EN LARVAS DE  
*Engystomops pustulosus* (COPE, 1864).**

**Natalia Mercedes Molina Guerrero  
Hugo Armando Llanos Ramos**

**Universidad Magdalena**

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Santa Marta, Colombia

2020





**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL HERBICIDA  
OXADIAZÓN (MOISS 250EC) EN LARVAS DE  
*Engystomops pustulosus* (COPE, 1864).**

**Natalia Mercedes Molina Guerrero  
Hugo Armando Llanos Ramos**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Biólogo**

Director  
German Emilio Blanco Cervantes

Universidad del Magdalena  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Biología  
Santa Marta, Colombia  
2020



# Nota de aceptación:

Aprobado por el Consejo de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por el Acuerdo Superior N° 11 de 2017 y Acuerdo Académico N° 41 de 2017 para optar al título de Biólogo

---

Jurado

---

Jurado

Santa Marta, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_



*A mi padre Hugo Molina y mi abuelo Hermes Guerrero que desde niña motivaron e incentivaron mi curiosidad científica.*

*A mi madre Luz Guerrero por inculcarme su amor por la naturaleza.*

*A mi hermano Jhonatan con el que compartí horas de juego, televisión y diversión.*

*A Sofía a cual motivaré e incentivaré en su incipiente curiosidad como ella me motiva a mí.*

Natalia Molina

*Dedicada a la memoria de mi Madre Petrona Ramos Muñoz quien me enseñó que incluso la tarea más grande se puede terminar si se hace un paso a la vez.*

*A mi tía Digna Ramos, a quien quiero como a una madre, por compartir muchos momentos conmigo y por siempre estar dispuesta a ayudarme en cualquier circunstancia.*

*A mi hija Miranda que su sonrisa me ayuda todos días a seguir mejorando.*

*A mi familia por apoyarme a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida.*

Hugo Llanos





## Agradecimientos

Gracias a Dios por su guía y acompañamiento durante este proceso, agradecemos también al docente Germán Emilio Blanco Cervantes por sus aportes, tiempo y dedicación para la realización de este trabajo, a la Universidad del Magdalena por el espacio brindado en el laboratorio de Fisiología Animal y Vegetal, al laboratorista Juan Luis Rivera por su atención y disposición.

Agradecemos a amigos y familiares que de una u otra forma nos alentaron a culminar este proceso.

**x**

# Contenido

	Pág.
Agradecimientos .....	IX
Contenido.....	XI
Lista de figuras .....	XIII
Lista de tablas.....	XV
Lista De Símbolos.....	XVII
Resumen .....	XIX
1. Introducción.....	23
2. Materiales y Métodos .....	27
3. Resultados .....	33
4. Discusión .....	49
5. Conclusión.....	55
6. Referencias Bibliográficas.....	57



# Lista de figuras

Pág.

<b>Figura 1.</b> Campos de arroz de riego. Corregimiento Cauca (Aracataca). Fotos: Hugo Armando Llanos Ramos.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Ejemplar de <i>Engystomops pustulosus</i> . Foto: Hugo Armando Llanos Ramos.....	<b>26</b>
<b>Figura 3.</b> Cuenca del Río Gaira. Tomado de: Noriega <i>et al.</i> , (2011).....	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Nido de espuma <i>Engystomops pustulosus</i> . Fotos: Hugo Armando Llanos Ramos.....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema de los bioensayos que se aplicaron para evaluar la toxicidad de Oxadiazón en larvas en <i>Engystomops pustulosus</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b> Medidas morfométricas. a) Vista lateral. C: Longitud del cuerpo, LC: Longitud de la cola, LT: Longitud total. b) Vista dorsal. AC: Ancho el cuerpo. Tomado de: Arenas Rodríguez, (2014).....	<b>31</b>
<b>Figura 7.</b> Tendencia general de la temperatura por cada volumen ensayado.....	<b>34</b>
<b>Figura 8.</b> Tendencia general de la temperatura y el pH por cada volumen ensayado.....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 200 mL primer ensayo. A. Cola curvada. B. Hemorragia cefálica vista ventral. C. Abdomen hinchado. D. Abdomen reducido vista ventral. E. Hemorragia cefálica vista dorsal.....	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 1000 mL primer ensayo. A. Hemorragia abdominal. B. Despigmentación. C. Hemorragia cefálica. D. Abdomen reducido vista ventral. E. Abdomen hinchado. F. Cola curvada.....	<b>40</b>
<b>Figura 11.</b> Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 40 mL. A. Despigmentación. B. Cuerpo en forma de diamante. C. Cola curvada. D. Hemorragia abdominal.....	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 200 mL. A. Cola curvada. B. Hemorragia abdominal. C. Cuerpo en forma de diamante. D. Despigmentación.....	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 1000 mL. A. Cuerpo en forma de diamante. B. Despigmentación. C. Hemorragia abdominal.....	<b>44</b>

## **XIV**

**Figura 14.** Gráfica de la media de las medidas morfométricas a las 96 h comparadas con las condiciones iniciales.....**45**

# Lista de tablas

Pág.

<b>Tabla 1.</b> Información general de la recolección de puestas.....	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Media y la desviación estándar de la temperatura a las 24 y 96 horas.....	<b>34</b>
<b>Tabla 3.</b> Media y la desviación estándar de la temperatura y el pH a las 24 y 96 horas....	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de mortalidad.....	<b>36</b>
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de mortalidad, los valores de $CL_{50}$ e intervalos de confianza al 95% por volumen.....	<b>37</b>
<b>Tabla 6.</b> Proporción de anormalidades a los 200 mL.....	<b>38</b>
<b>Tabla 7.</b> Proporción de anormalidades a los 1000 mL.....	<b>39</b>
<b>Tabla 8.</b> Proporción de anormalidades a los 40 mL.....	<b>41</b>
<b>Tabla 9.</b> Proporción de anormalidades a los 200 mL.....	<b>42</b>
<b>Tabla 10.</b> Proporción de anormalidades a los 1000 mL.....	<b>44</b>
<b>Tabla 11.</b> Herbicidas usados en los cultivos de arroz en el departamento del Magdalena.....	<b>47</b>
<b>Tabla 12.</b> Efectos subletales y teratológicos causados por herbicidas.....	<b>48</b>





## Lista De Símbolos

Símbolo	Significado
cm	Centímetro
Km	Kilómetro
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
mg/L	Miligramos/Litros
mL	Mililitros
mm	Milímetro
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
°C	Grados centígrados



## Resumen

El herbicida Oxadiazón es usado como control de malezas en Colombia; sin embargo, la aplicación de esta sustancia, al igual que otros herbicidas puede afectar la fauna asociada a cuerpos de agua. El presente estudio evaluó los efectos letales, subletales, morfométricos y teratológicos en larvas de *Engystomops pustulosus* expuestas a este herbicida en dos etapas de degradación y en tres volúmenes de hábitat. Se utilizaron 10 larvas en estado 25 de Gosner y se expusieron durante 96 horas a tres volúmenes de hábitat (40, 200 y 1000 mL) y tres concentraciones del herbicida; tanto en soluciones frescas como degradadas, con tres replicas para cada uno. La CL<sub>50</sub> hallada para los renacuajos en un volumen de 40 ml fue 1,46 mg/L y en 1000 ml de fue de 1,5 mg/L en soluciones frescas, mientras que en soluciones degradadas no se pudo determinar la CL<sub>50</sub> por causa de la baja mortalidad en los ensayos. En cuanto a los efectos subletales, las anormalidades quietud prolongada y cola curvada fueron frecuentes en todos los volúmenes tanto para soluciones frescas (de 27% a 70% y de 37% a 43%, respectivamente) como degradadas (de 10% a 20% y 13% a 40%, respectivamente), aun así, el análisis de regresión no mostró relación entre la variación del volumen y la aparición de anormalidades ( $p > 0,05$ ). En cambio, el desarrollo corporal de los renacuajos está relacionado con el volumen, debido a que en volúmenes mayores se observan renacuajos con tallas superiores (3,10-3,25 mm, aproximadamente) en comparación con los depositados en un menor volumen (2,92-2,97 mm, aproximadamente). Al comparar los efectos letales y subletales observados en este trabajo y los revisados en otros herbicidas, se evidencia que aunque son diferentes en composición química, los efectos sobre los renacuajos presentan similitud, comprometen el rol ecológico y la supervivencia de las especies.

**Palabras clave:** Oxadiazón, ecotoxicología, herbicidas, efectos subletales.

**XX**

## Abstract

The Oxadiazón herbicide is used as weed control in Colombia; however, the application of this substance, like other herbicides, can affect fauna associated with water bodies. The present study evaluated the lethal, sublethal, morphometric and teratological effects in *Engystomops pustulosus* larvae exposed to this herbicide in two stages of degradation and in three levels of habitat. Ten Gosner stage 25 larvae were used and exposed for 96 hours to three volumes of habitat (40, 200 and 1000 mL) and three volumes of the herbicide; both in fresh and degraded solutions, with three replicates for each. The LC50 found for tadpoles in a volume of 40 ml was 1.46 mg / L and in 1000 ml it was 1.5 mg / L in fresh solutions, whereas in degraded solutions the LC50 could not be determined due to the low mortality in trials. Regarding sublethal effects, prolonged stillness and curved tail abnormalities were frequent in all volumes, both for fresh solutions (from 27% to 70% and from 37% to 43%, respectively) and degraded solutions (from 10% to 20%). and 13% to 40%, respectively), even so, the regression analysis not determined relationship between the variation of the volume and the appearance of abnormalities ( $p > 0.05$ ). On the other hand, the body development of the tadpoles is related to the volume, because in larger volumes the tadpoles are observed with larger sizes (approximately 3.10-3.25 mm) in comparison with the deposits in a smaller volume. (Approximately 2.92-2.97mm). When comparing the lethal and sub-lethal effects observed in this work and those reviewed in other herbicides, it is evident that although they are different in chemical composition, the effects on tadpoles are similar, compromising the ecological role and survival of the species.

**Key words:** Oxadiazon, ecotoxicology, herbicides, sublethal effects.



# 1.Introducción

La transformación del sector agrícola ha sido notable en los últimos años debido al crecimiento en la demanda de alimentos y a su vez las estrategias para incrementar la producción (Diez de Ulzurrun, 2013). Las malezas compiten con el cultivo por los nutrientes y afectan su crecimiento (Menalled, 2010). Dentro de los métodos de control de malezas, el control químico a través de herbicidas ha sido adoptado en gran número de cultivos (Diez de Ulzurrun, 2013), por ser económicos (Menalled, 2010), aumentar el rendimiento y la producción (Aktar *et al.*, 2009), reducir el trabajo manual y adaptarse al tiempo y necesidades del cultivo (Diez de Ulzurrun, 2013).

Según el momento de aplicación de los herbicidas y el estado fenológico del cultivo, estos pueden ser de presembrado cuando se aplican en la preparación del terreno, preemergentes cuando se aplican antes de la germinación del cultivo y posembrados cuando se aplican después de la germinación del cultivo pero antes de que su estado sea avanzado, además estos pueden ser selectivos o no selectivos, así como ser de contacto, cuando atacan la parte de la planta en la que son aplicados y sistémicos, cuando entran por la raíz y son transportados por la savia al resto de la planta manifestando efectos de fitotoxicidad (Diez de Ulzurrun, 2013).

Sin embargo el control químico genera impactos en el ambiente (Menalled, 2010), porque las malezas generan resistencia lo que conlleva a un aumento en las dosis y aplicaciones por cultivo (Fischer & Valverde, 2010). Además, la aplicación de agroquímicos en cultivos genera daños en el suelo, disminuye la cantidad de organismos benéficos presentes en éste, contamina las fuentes hídricas y afecta no solo al organismo que se quiere controlar sino también a aquellos que no eran objetivo como aves, peces, mamíferos y anfibios, causándoles la muerte o disminuyendo sus capacidades supervivencia (Agostini *et al.*, 2020; Aktar *et al.*, 2009; Boudh & Singh, 2019).

En Colombia el sector agropecuario ha incrementado su producción lo que supone una mayor cantidad de hectáreas cultivadas y por ende una mayor cantidad de agroquímicos para su mantenimiento. Particularmente, el cultivo de arroz pasó de 117.708,8 a 126.221,2 hectáreas a nivel nacional en el segundo semestre del año 2018 y de 951,8 a 1.336,3

hectáreas en el departamento del Magdalena durante el segundo semestre del 2019, lo que representa un incremento de aproximadamente el 7,2% y 40,4% respectivamente (Ministerio de Agricultura, 2020). De acuerdo al tipo de manejo agrícola, el cultivo de arroz puede ser arroz de riego, cuando el cultivo se hace en sitios inundados que disponen de canales conectados a distritos de riego (Figura 1), este tipo de manejo agrícola es el más común en el departamento. El otro sistema se denomina arroz seco en donde el riego depende principalmente de las lluvias, y en ambos casos se requiere el uso de agroquímicos (Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2017).



**Figura 1. Campos de arroz de riego. Corregimiento Cauca (Aracataca). Fotos: Hugo Armando Llanos Ramos.**

De acuerdo al registro nacional de plaguicidas químicos de uso agrícola publicado por el Instituto Nacional Agropecuario (ICA), de los aproximadamente 2.558 plaguicidas registrados 1.336 pueden ser usados en arroz, de estos 117 corresponden a herbicidas, de los cuales 44 tienen como ingrediente activo el Oxadiazón (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019). El cual puede ser utilizado en pre-emergencia y en post-emergencia.

El Oxadiazón fue reglamentado por el ANLA mediante Resolución N° 00913 del 2018 (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018). El nombre químico según la IUPAC es 5-tert-butil-3-(2,4-dicloro-5-isopropoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona, su fórmula empírica es  $C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$  pertenece al grupo de los Oxadiazoles, tiene poca solubilidad en agua, es persistente en suelos y agua y está catalogado como extremadamente tóxico para organismos acuáticos (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018). Se utiliza para el control de malezas gramíneas y de hoja ancha, es sistémico ya que, es absorbido a través de la raíz y llevado al tallo y hojas en



donde bloquea el proceso de fotosíntesis al inhibir la enzima cloroplástica protoporfirinógeno oxidasa (PPO) lo que ocasiona que se acumule protoporfirina que al reaccionar con oxígeno produce oxígeno simple y peróxido de hidrógeno que destruye las membranas celulares, las malezas tratadas con Oxadiazón presentan clorosis en hojas y tallos y posteriormente necrosis (Diez de Ulzurrun, 2013).

Estudios han demostrado que el Oxadiazón reduce el número de esporas de hongos micorrizales, afecta el crecimiento de algas y es tóxico para las abejas (Aktar *et al.*, 2009). Mesléard *et al.*, (2016) comparó su efecto solo y combinado con el insecticida Alfa-Cipermetrina en huevos, larvas y renacuajos pre-metamórficos de la especie *Pelophylax perezi*, confirmando su efecto letal en renacuajos al aplicar estos agroquímicos, solos o combinados. Milan *et al.*, (2019) comparó la degradación del Oxadiazón en cultivos de arroz señalando que la concentración de residuos encontradas en el cultivo de arroz seco fue mayor que en cultivos inundados, demostrando que el Oxadiazón es persistente en tierra, su degradación es lenta y el riesgo de contaminar fuentes de agua es alto. En la ficha técnica el tiempo de degradación es de 21 días (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018), aun así, puede persistir en el suelo por más tiempo, Das *et al.*, (2003) reportó que luego de 60 días de haber aplicado Oxadiazón en un campo de arroz aún persistía un 0,5% del herbicida y Mendes *et al.*, (2016) encontró Oxadiazón en la capa superficial de los suelos (0-10 cm) después de 64 días de aplicación.

Una de las especies que podría estar expuesta al efecto del Oxadiazón es *Engystomops pustulosus* o rana túngara (Figura 2) esta es una especie de anfibio de amplia distribución y ha sido reportada en cultivos de arroz (Acuña-Vargas, 2016; Triana-Velásquez *et al.*, 2017). Se caracteriza por tener el cuerpo redondeado con el dorso de color marrón, gris o de manchas café y una franja dorsal estrecha o franjas pareadas dorsolaterales, rostro corto y ojos alargados con iris color bronce o café claro, extremidades cortas, presenta glándulas en la piel dorsal lo que le da la apariencia pústulas, presenta glándulas parótidas, glándulas en los flancos y huevos en nidos de espuma, no presenta dientes vomerianos (Ospina & Bedoya-Cañón, 2018). Los individuos son pequeños, los machos adultos de 25-34 mm y las hembras adultas de 26-35 mm, los renacuajos en el estadio 26 miden aproximadamente 9,5 mm y al llegar al estadio 37 alcanzan una longitud de 20 mm (Ospina & Bedoya-Cañón, 2018). En Colombia se reporta en los departamentos de Antioquia, Caldas, Caquetá, Cesar,

Córdoba, Chocó, Guajira, Magdalena, Santander y Tolima en un rango altitudinal que va desde los 0 hasta 1540 m s.n.m (Ospina & Bedoya-Cañon, 2018).



**Figura. 2. Ejemplar de *Engystomops pustulosus*. Foto: Hugo Llanos Ramos.**

La especie *Engystomops pustulosus* ha sido utilizada en estudios de toxicidad, porque es una especie abundante y fácil de monitorear, ideal para estimar la toxicidad en agua en estado larvario (Díaz-Báez *et al.*, 2004), además por su rango de distribución es probable que en ambientes naturales esta especie se encuentre expuesta al herbicida Oxadiazón. Se ha evaluado el efecto que tienen en sus embriones y larvas el Cosmo-Flux® 411F (Henao-Muñoz *et al.*, 2013), el Glifosato (Henao-Muñoz, 2014), Propanil (Triana-Velásquez *et al.*, 2016) y Cipermetrina (Triana-Velásquez *et al.*, 2017).

La exposición de renacuajos a agroquímicos puede generar efectos letales, subletales y teratológicos en los individuos, algunos de los efectos subletales y teratológicos más comunes incluyen natación irregular, quietud prolongada e inmovilidad, además los renacuajos pueden presentar edemas en distintas partes del cuerpo, cola curvada o anomalías axiales, anomalías intestinales y disminución en el número de queratodontes (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019). Este trabajo pretende evaluar los efectos letales, subletales y teratológicos del herbicida Oxadiazón en larvas de *Engystomops pustulosus* en condiciones de laboratorio.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Área de estudio

Los ejemplares de *Engystomops pustulosus* que fueron utilizados para los ensayos de toxicidad se obtuvieron recolectando las puestas en el sector de Puerto Mosquito, cuenca baja del Río Gaira (Figura 3). La Cuenca del Río Gaira tiene un área total de 10.464,3 hectáreas, nace en el cerro de San Lorenzo a 2.750 m.s.n.m y recorre una distancia aproximada de 32.53 Km a lo largo de la vertiente noroccidental de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) entre los 74,01,07" y 74,46,22" W y los 11,10,08" y 11,52,56" N (Noriega *et al.*, 2011). Puerto Mosquito se encuentra entre las coordenadas 11°10'26" N, 74°10'37" W a 80 m de altitud, la vegetación predominante en la zona es la de Monte espinoso tropical (Me-T), algunas de las actividades antrópicas presentes son los cultivos, la ganadería no intensiva y la recreación puesto que el sector es utilizado como balneario, el promedio multianual de temperatura es de 28,2 °C y el de precipitación es 448 mm (Tamariz-Turizo, 2018), el muestreo se realizó durante los meses de enero y febrero del año 2020.

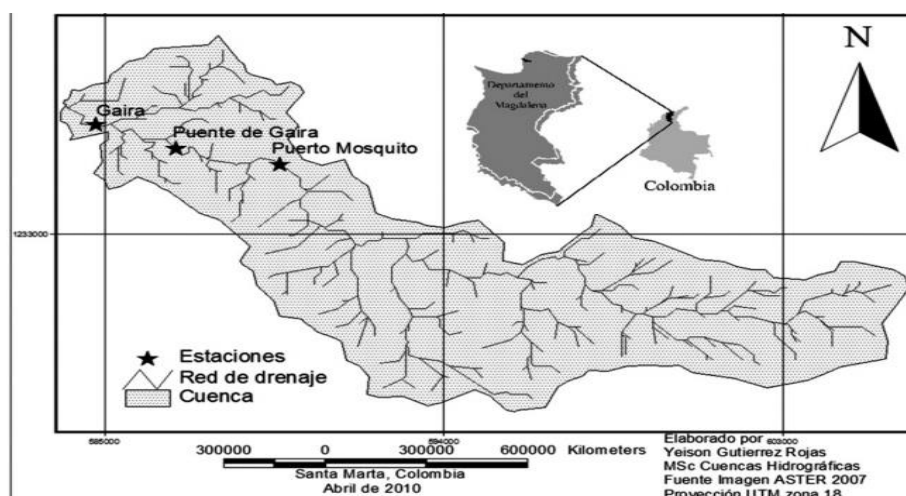


Figura. 3. Cuenca del Río Gaira. Tomado de: Noriega *et al.*, (2011).

## 2.2. Fase de campo.

Las puestas (Figura 4) fueron colectadas en horas de la mañana, en el sitio de recolección se tomaron los valores de temperatura, pH y dureza. Las puestas fueron introducidas en bolsas plásticas Ziploc® y transportadas al Laboratorio de Biología y Fisiología Animal de la Universidad del Magdalena, donde se mantuvieron en agua hasta que los individuos alcanzaron el estadio 25 según la escala Gosner (Gosner, 1960).



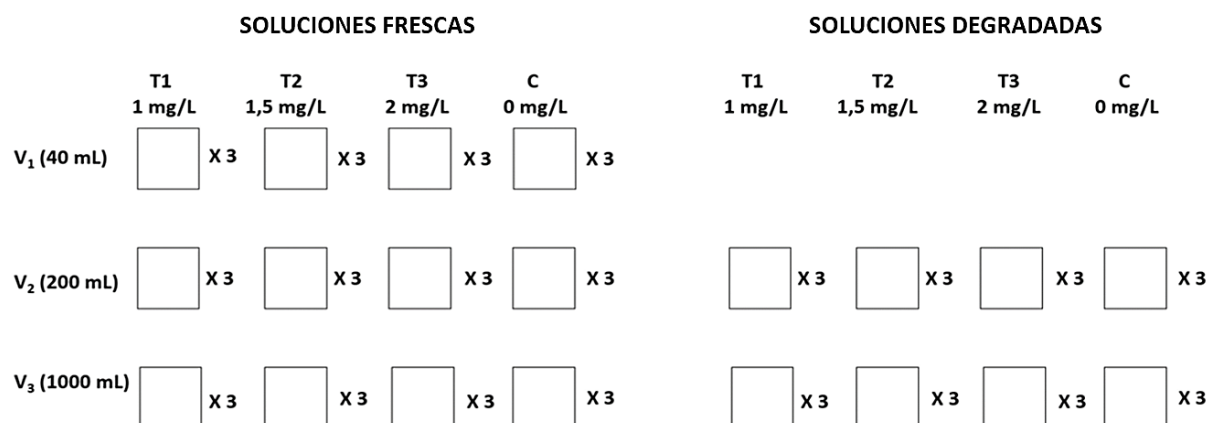
**Figura 4. Nido de espuma *Engystomops pustulosus*. Fotos: Hugo Armando Llanos Ramos.**

## 2.3. Montaje del bioensayo.

El bioensayo se realizó con individuos en estadio 25, este estadio pertenece a la etapa pre-metamórfica de acuerdo a las etapas de desarrollo de Gosner (Gosner, 1960). Los renacuajos se expusieron a dos tipos de soluciones, una solución madre con una concentración inicial de 0,25 mg/L que se preparó en el laboratorio y se dejó sellada durante 15 días en un Erlenmeyer transparente para que se degradara por efecto de la luz tomando como indicador la transparencia y la formación de cristales en la solución. Con esta se realizó un bioensayo con dos volúmenes (200 mL y 1000 mL), tres tratamientos (1 mg/L, 1,5 mg/L y 2 mg/L) y un control (0 mg/L) con tres réplicas, en cada recipiente se colocaron 10 larvas, a estas soluciones se les denominó **soluciones degradadas**.

También se preparó una solución madre con una concentración inicial de 0,25 mg/L con la que se realizó otro bioensayo de forma inmediata para evitar que el herbicida se degradara. Los individuos fueron depositados en recipientes plásticos de 40 ml, 200 mL y 1000 mL se aplicaron 3 tratamientos (1 mg/L, 1,5 mg/L y 2 mg/L) y un control (0 mg/L) con tres repeticiones para cada uno y en cada recipiente se colocaron 10 larvas, a estas soluciones se les denominó **soluciones frescas**.

Ambos bioensayos se ilustran en la figura 5, se evaluaron distintos volúmenes teniendo en cuenta que la densidad poblacional junto con otros factores puede influir en la respuesta del organismo (Díaz *et al.*, 2004).



**Figura. 5. Esquema de los bioensayos que se aplicaron para evaluar la toxicidad de Oxadiazón en larvas en *Engystomops pustulosus*.**

## 2.4. Bioensayo de toxicidad para efectos letales y subletales.

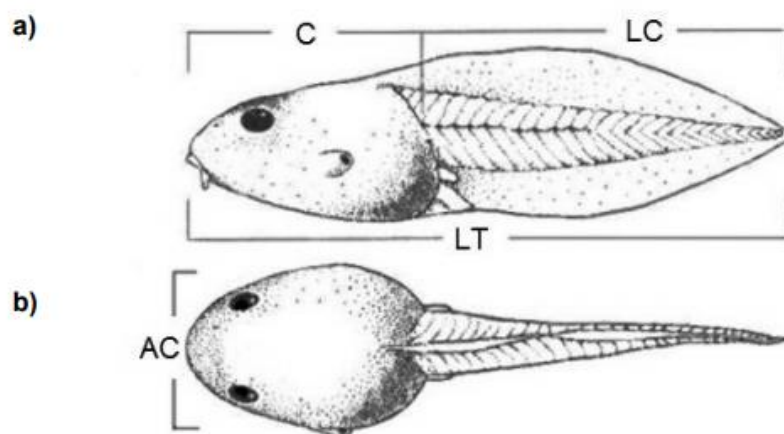
En ambos bioensayos las larvas fueron expuestas durante 96 horas a tres concentraciones del herbicida Oxadiazón (1 mg/L, 1.5 mg/L y 2 mg/L) y un control (0 mg/L), sin recambio de agua, para simular la degradación de este herbicida en el ambiente (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018). Las muestras fueron revisadas a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, en cada revisión, se midió la temperatura en cada recipiente para el primer bioensayo y el pH y la temperatura en cada recipiente para el segundo bioensayo con un Tester de pH/Temperatura pHep®4 marca Hanna HI 98127, se tomaron estos parámetros

teniendo en cuenta que la temperatura y el pH influyen en la degradación del Oxadiazón y que a su vez este genera otros productos químicos como ácido carboxílico, fenoles, derivados desalquilados y productos polares (Ambrosi et al., 1977; Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018).

Los individuos fueron observados en un estereoscopio marca Nikon modelo SMZ 745, se contabilizó el número de individuos muertos para determinar los efectos letales del herbicida (Murialdo, 2016) y el número de individuos con anormalidades, cambios morfológicos y bajo desempeño locomotor para determinar los efectos subletales (Arenas-Rodriguez, 2014).

## **2.5. Bioensayo para efectos teratológicos y morfométricos.**

Para el segundo bioensayo las larvas observadas al estereoscopio (sobre papel milimetrado) se revisaron buscando anomalías del desarrollo (teratología) como escoliosis, hemorragia, despigmentación, exfoliación, edema, etc. Luego se realizó un registro fotográfico para una evaluación morfométrica mediante el programa ImageJ (Cortés & De Dulce, 1996; Triana Velásquez et al., 2016). Para el análisis morfométrico se tuvo en cuenta la longitud corporal total, la longitud de la cola, la longitud del cuerpo y el ancho del cuerpo de los organismos experimentales (Fig. 6) y se compararon entre tratamientos y volúmenes (Hena Muñoz, 2014).



**Figura. 6. Medidas morfométricas. a) Vista lateral. C: Longitud del cuerpo, LC: Longitud de la cola, LT: Longitud total. b) Vista dorsal. AC: Ancho el cuerpo. Tomado de: Arenas Rodríguez, (2014).**

## **2.6. Revisión de efectos subletales en otros herbicidas.**

Para comparar las anormalidades causadas por herbicidas en renacuajos con las observadas en el ensayo con Oxadiazón fueron compilados estudios toxicológicos de los siguientes recursos a) Bases de datos bibliográficas: Science Direct, PubMed y Google Scholar; b) Capítulos de libros sobre manejo de herbicidas, y; c) La información aportada por agricultores del departamento del Magdalena. La búsqueda fue restringida a las palabras anfibias, anuras, herbicidas, Glifosato, Propanil, Clomazone, Oxadiazón, Paraquat, 2,4D, renacuajos, malformaciones, ecotoxicología, cultivos de arroz, toxicidad.

## **2.7. Análisis Estadístico.**

A la temperatura y el pH se les aplicó una prueba de correlación de Spearman mediante el programa Statgraphics Centurion XVII.II (Díaz-Báez *et al.*, 2004), para comprobar que existe cierta tendencia de cambio en la temperatura y el pH a medida que pasa el tiempo y si esta tendencia es significativa (Glantz, 2006; Henao-Muñoz *et al.*, 2013).

Para determinar la toxicidad del herbicida Oxadiazón se registró el porcentaje de mortalidad, se calcularon los valores de concentración letal media  $CL_{50}$ , es decir, la concentración que se estima letal para la mitad de los organismos ensayados (Díaz-Báez *et al.*, 2004) e intervalos de confianza al 95% para cada volumen, éstos permiten calcular los límites de valores en una proporción específica, describiendo la magnitud del efecto y su grado de certeza (Glantz, 2006), el cálculo del  $CL_{50}$  se realizó mediante el método PROBIT y los intervalos de confianza mediante el análisis grafico (Uc-Peraza & Delgado-Blas, 2012) en el programa Statgraphics, además se calcularon los valores de NOEC, la concentración más alta a la cual no se observa efecto, y LOEC, la concentración más baja a la que se observa efecto (Díaz-Báez *et al.*, 2004; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

Se calculó la proporción de individuos afectados con malformaciones y se realizó un análisis de regresión para determinar el efecto de la concentración en la presencia de anormalidades (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019), además se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con el tratamiento como factor (Arenas-Rodríguez, 2014).

Para evaluar la morfometría se tomaron registros fotográficos de los renacuajos sobrevivientes a las 96 horas, las medidas fueron tomadas mediante el programa ImageJ y se aplicó una prueba de análisis multivariado de varianza (MANOVA), tomando como factores la concentración y el volumen luego las medidas morfométricas se analizaron con ANOVAS factoriales para determinar diferencias entre concentraciones (Henao-Muñoz, 2014), a las medidas morfométricas estadísticamente significativas se les aplicó una prueba de Fischer para determinar diferencias morfométricas entre los tratamientos y los volúmenes (Glantz, 2006).

Con la información recolectada mediante la revisión bibliográfica se identificó cuáles eran los herbicidas más utilizados en cultivos de arroz en el departamento del Magdalena, estos se organizaron en una tabla comparativa mostrando sus principales características y mecanismos de acción, con este resultado se compilaron los efectos que tienen éstos herbicidas en anfibios para compararlos con los efectos que obtuvimos en nuestro ensayo.



### 3.Resultados

#### 3.1. Parámetros físico-químicos en el sitio de recolección.

En la Tabla se registran los valores de temperatura, pH y dureza al momento de la recolección.

**Tabla 1. Información general de la recolección de puestas.**

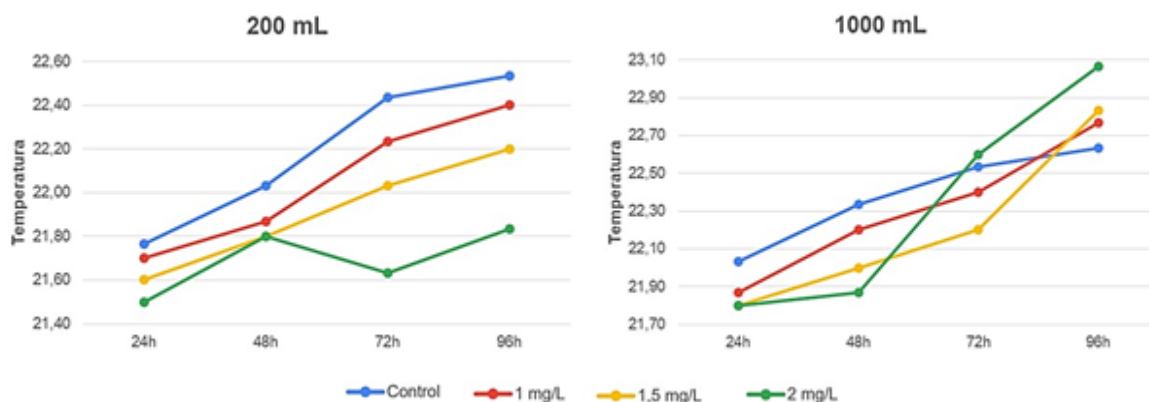
Colecta	T°	pH	Dureza
1	24,5	8,9	90 ppm CaCO <sub>3</sub>
2	24,2	8,1	90 ppm CaCO <sub>3</sub>

#### 3.2. Parámetros físico-químicos bioensayo con soluciones degradadas.

La tendencia general de la temperatura para los ensayos con la solución degradada del herbicida se presenta en la Figura 7 y en la Tabla 2 se muestra la media y la desviación estándar a las 24 y a las 96 horas por volumen. En el ensayo realizado con soluciones degradadas se observó un aumento en la temperatura (Figura 7) tanto para los 200 mL como para los 1000 mL, en ambos casos la temperatura está correlacionada con el paso de las horas para todos los tratamientos (Spearman,  $p < 0,05$ ) excepto con el tratamiento 3 (Spearman,  $p > 0,05$ ).

**Tabla 2. Media y la desviación estándar de la temperatura a las 24 y 96 horas.**

P. físico-químicos	200 mL		1000 mL	
	24 h	96 h	24 h	96 h
T°	21,64 (0,12)	22,24 (0,28)	21,87 (0,17)	22,82 (0,18)



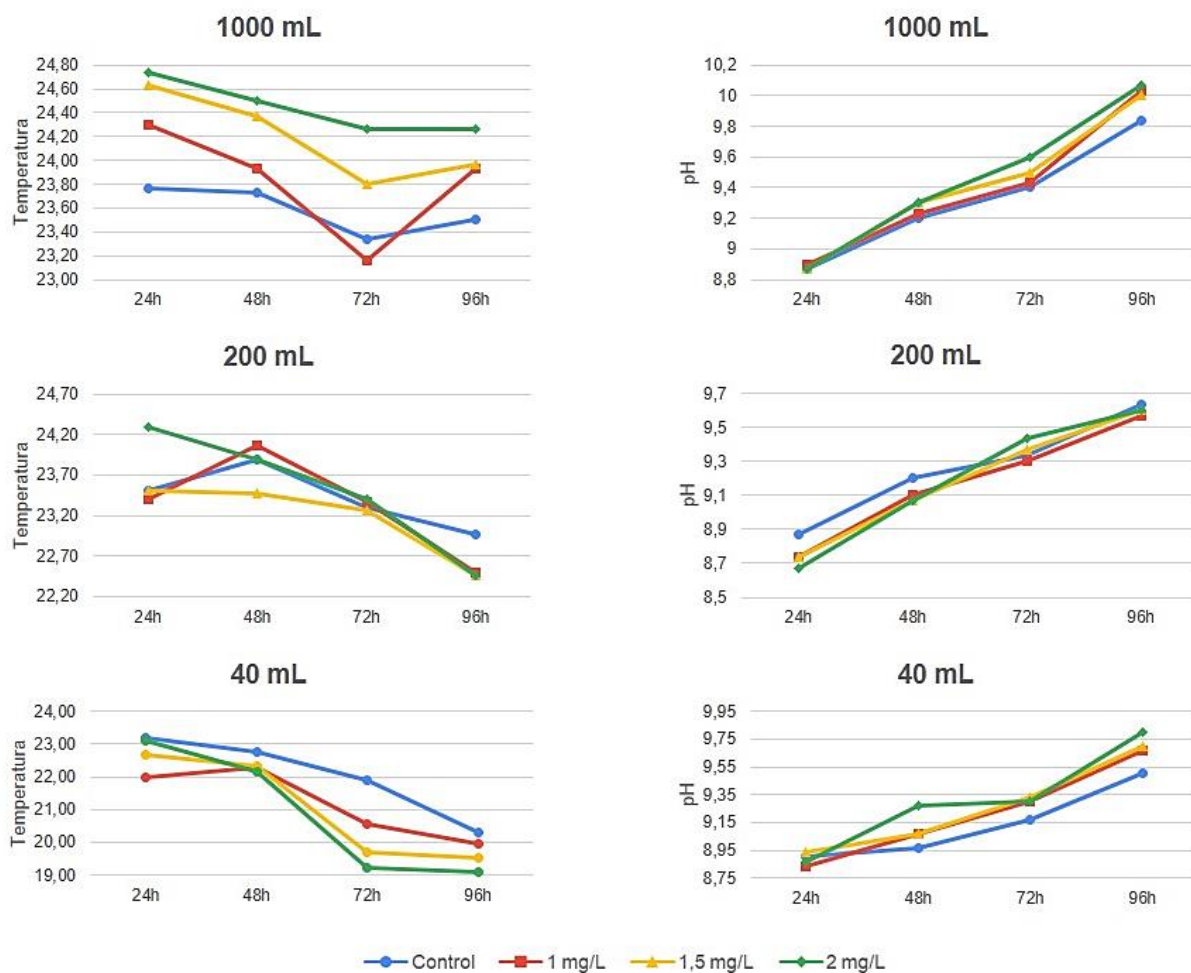
**Figura 7. Tendencia general de la temperatura por cada volumen ensayado.**

### 3.3. Parámetros físico-químicos ensayo con soluciones frescas.

La tendencia general de la temperatura y el pH se presenta en la Figura 8 y en la Tabla 3 se muestra la media y la desviación estándar de los parámetros a las 24 y las 96 horas por cada volumen, se observó un incremento en los valores de pH y un descenso en los valores de la temperatura, al aplicar la prueba de correlación de Spearman, se encontró una relación significativa entre la disminución de la temperatura y el incremento del pH con respecto a las horas del experimento (Spearman,  $p < 0,05$  para todos los casos).

**Tabla 3. Media y la desviación estándar de la temperatura y el pH a las 24 y 96 horas.**

P. físico-químicos	40 mL		200 mL		1000 mL	
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
pH	8,88 (0,07)	9,65 (0,15)	8,75 (0,09)	9,60 (0,04)	8,88 (0,05)	9,98 (0,11)
T°	22,73 (0,90)	19,3 (0,61)	23,68 (0,47)	22,60 (0,51)	24,36 (0,47)	23,92 (0,35)



**Figura 8. Tendencia general de la temperatura y el pH por cada volumen ensayado.**

### 3.4. Toxicidad del Oxadiazón en soluciones degradadas.

En la tabla 4 se muestra la proporción de muertes por cada volumen y tratamiento ensayado, solo se presentaron muertes en la concentración más alta (2 mg/L) para ambos volúmenes y la mortalidad fue mayor en el volumen de 1000 mL, aunque debido a las bajas proporciones registradas en los ensayos con soluciones degradadas no fue posible calcular valores de  $CL_{50}$  para ninguno de los dos volúmenes.

**Tabla 4. Porcentaje de mortalidad**

Volumen	Porcentaje (%) de mortalidad por concentración		
	1 mg/L	1,5 mg/L	2 mg/L
200 ml	0	0	0,03
1000 ml	0	0	0,20

### 3.5. Toxicidad del Oxadiazón en soluciones frescas.

El porcentaje de mortalidad, los valores de  $CL_{50}$  e intervalos de confianza al 95% se presentan en la Tabla 5, el valor de  $CL_{50}$  para el volumen de 40 mL fue ligeramente menor (1,46 mg/L), con respecto al valor de  $CL_{50}$  registrado para los 1000 mL (1,5 mg/L). La mortalidad en los 200 mL fue muy baja con respecto a los otros dos volúmenes por lo que no se pudo calcular el  $CL_{50}$ . Tanto para el volumen de 40 mL como para el volumen de 1000 mL, los valores de NOEC y LOEC fueron los mismos.

**Tabla 5. Porcentaje de mortalidad, los valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% por volumen.**

Volumen	Porcentaje (%) de mortalidad por concentración			CL <sub>50</sub>	Intervalos de confianza al 95%	NOEC	LOEC
	1 mg/L	1,5 mg/L	2 mg/L				
<b>40 ml</b>	0,00	66,67	100,00	1,46	1,20 - 1,71	1 mg/L	1,5 mg/L
<b>200 ml</b>	23,33	33,33	30,00	-	-	-	-
<b>1000 ml</b>	23,33	50,00	76,67	1,5	1,28 - 1,71	1 mg/L	1,5 mg/L

\*El valor de CL<sub>50</sub> para los 200 mL no fue calculado por el programa debido a la baja mortalidad.

### **3.6. Efectos subletales producidos por el Oxadiazón.**

#### **3.6.1. Anormalidades observadas en soluciones degradadas.**

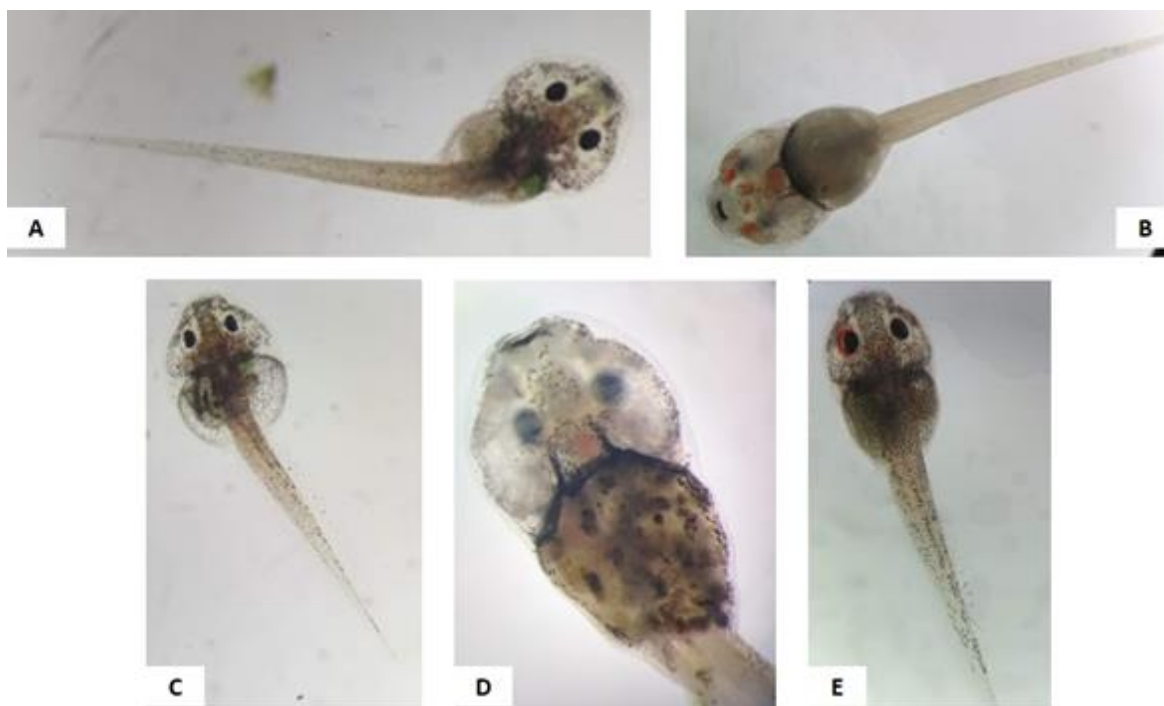
Al exponer larvas de *Engystomops pustulosus* a diferentes concentraciones de Oxadiazón, se observaron, además de la mortalidad, anormalidades morfológicas, teratológicas y de comportamiento en mayor o menor proporción en todos los volúmenes y concentraciones ensayadas.

**Tabla 6. Proporción de anomalías a los 200 mL.**

Tratamiento	Anormalidades							
	Malformación			Hemorragia			Comportamiento	
	Despigmentación*	Edema*	Cola Curvada*	Caudal	Cefálica	Abdominal	Natación. irregular	Quiétude
<b>T1</b>	0,07							
<b>1 mg/L</b>		0,03	0,3	0,03	-	-	-	-
<b>T2</b>	0,23		-	-	-	-	-	-
<b>1,5 mg/L</b>		0,10						
<b>T3</b>	0,13	0,23	0,40	0,03	0,13	-	-	0,20
<b>2 mg/L</b>								

En Tabla 6 se registran las anomalías observadas en el volumen de 200 mL y su proporción de aparición y en la Figura 9 se observan algunas de las anomalías observadas. La cola curvada, la despigmentación y los edemas fueron las anomalías de mayor frecuencia de aparición, en el tratamiento 3 fueron observadas la mayoría de éstas.

Al aplicar la prueba ANOVA se evidencia que existen diferencias significativas entre los tratamientos para las anomalías despigmentación, edema, hemorragia cefálica y quietud prolongada, el análisis de regresión mostró relación entre la hemorragia cefálica ( $r=0,79$ ) y la quietud prolongada ( $r=0,77$ ) con el aumento de la concentración.

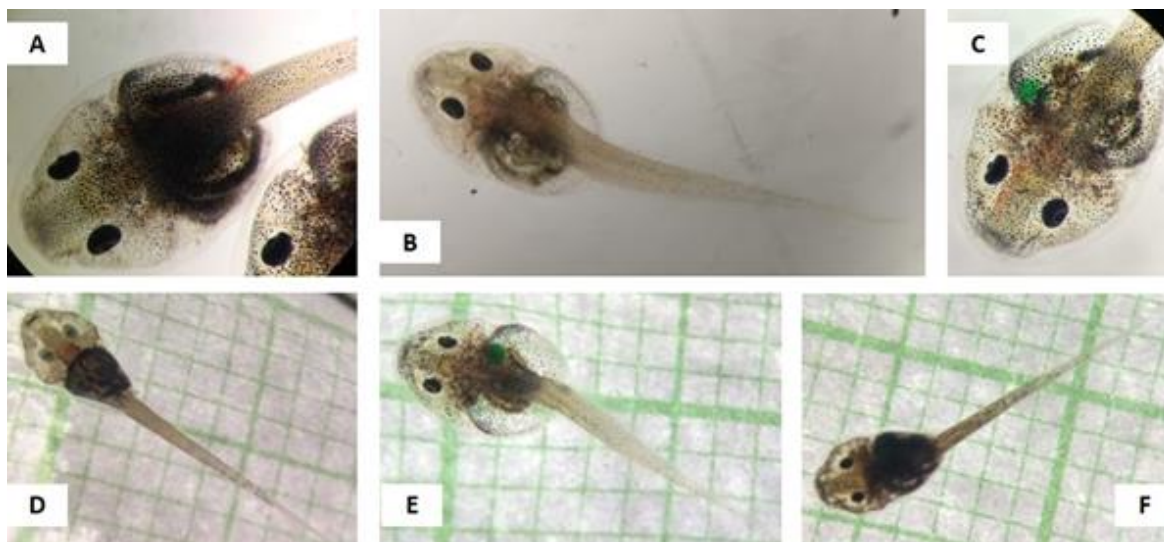


**Figura 9. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 200 mL primer ensayo. A. Cola curvada. B. Hemorragia cefálica vista ventral. C. Abdomen hinchado. D. Abdomen reducido vista ventral. E. Hemorragia cefálica vista dorsal.**

**Tabla 7. Proporción de anormalidades a los 1000 mL primer ensayo.**

Tratamiento	Anormalidades							
	Malformación			Hemorragia			Comportamiento	
	Despigmentación*	Edema*	Cola Curvada*	Caudal	Cefálica	Abdominal	Natación. irregular	Quietud
<b>T1</b>	0,13							
<b>1 mg/L</b>		0,07	0,10	0,10	-	-	-	0,03
<b>T2</b>	0,10		-	0,13	-	-	-	-
<b>1,5 mg/L</b>		-						
<b>T3</b>	0,23	0,03	0,13	-	0,13	-	0,03	0,03
<b>2 mg/L</b>								

En la Tabla 7 se registraron la proporción de anomalías observadas en el ensayo de 1000 mL y en la Figura 10 se muestran algunas de estas anomalías. La anomalía de mayor proporción fue la despigmentación, al igual que en el ensayo de 200 mL en el tratamiento 3 se presentaron la mayoría de anomalías, aun así, no existen diferencias significativas ni relación entre la frecuencia de aparición y la concentración al aplicar las pruebas de ANOVA y regresión lineal ( $p > 0,05$ ).



**Figura 10. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 1000 mL primer ensayo. A. Hemorragia abdominal. B. Despigmentación. C. Hemorragia cefálica. D. Abdomen reducido vista ventral. E. Abdomen hinchado. F. Cola curvada.**

### **3.6.2. Anormalidades observadas en las soluciones frescas.**

La mayor cantidad de anomalías en el volumen de 40 mL se presentó en los tratamientos 2 y 3 (Figura 11), en donde la cola curvada y la quietud prolongada fueron las más comunes respectivamente (Tabla 8), además, la despigmentación aunque no fue frecuente, presentó, al igual que las dos anomalías anteriores, diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $p < 0,05$ ), así mismo, el análisis de regresión dio como resultado que la concentración del herbicida incide en la despigmentación ( $r = -0,78$ ,  $p < 0,05$ ) y en la deformación de la cola ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,05$ ).



Tabla 8. Proporción de anormalidades a los 40 mL.

Tratamiento	Anormalidades							
	Malformación			Hemorragia			Comportamiento	
	Despigmentación*	Edema*	Cola Curvada*	Caudal	Cefálica	Abdominal	Natación. irregular	Quietud
<b>T1</b> <b>1 mg/L</b>	0,63	-	-	-	-	-	-	-
<b>T2</b> <b>1,5 mg/L</b>	-	-	0,20	-	-	0,07	0,07	0,70
<b>T3</b> <b>2 mg/L</b>	-	-	0,43	0,07	0,10	0,07	-	0,27

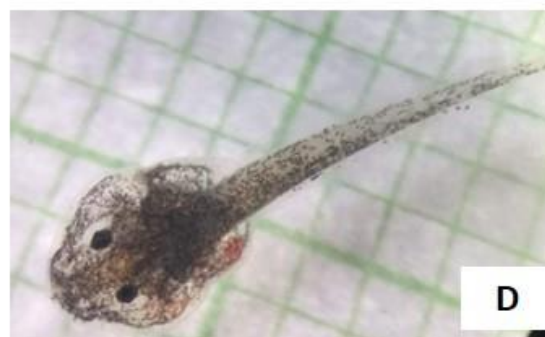
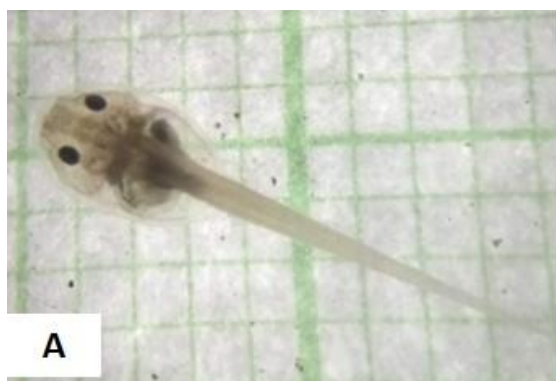
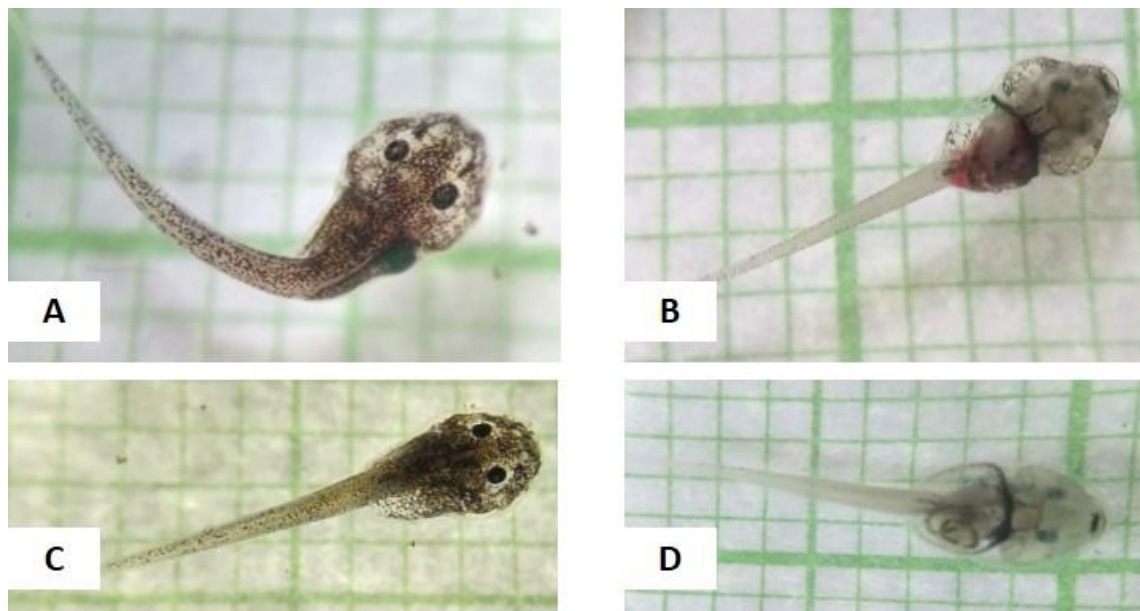


Figura 11. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 40 mL. A. Despigmentación. B. Cuerpo en forma de diamante. C. Cola curvada. D. Hemorragia abdominal.

En el volumen de 200 mL se presentaron la mayoría de anormalidades en todas las concentraciones (Figura 12), las de mayor frecuencia de aparición fueron la cola curvada y la quietud prolongada (Tabla 9) como en el caso del volumen de 40 mL, al aplicar la prueba ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0,05$ ) y al aplicar el análisis de regresión no se demostró un efecto significativo de las concentraciones en la aparición de anormalidades.

**Tabla 9. Proporción de anormalidades a los 200 mL.**

Tratamiento	Anormalidades							
	Malformación			Hemorragia			Comportamiento	
	Despigmentación*	Edema*	Cola Curvada*	Caudal	Cefálica	Abdominal	Natación irregular	Quietud
<b>T1</b> <b>1 mg/L</b>	0,10	0,07	0,17	-	-	-	0,20	0,60
<b>T2</b> <b>1,5 mg/L</b>	0,13	-	0,40	0,03	-	-	0,17	0,63
<b>T3</b> <b>2 mg/L</b>	-	0,10	0,37	0,13	-	0,20	0,03	0,67

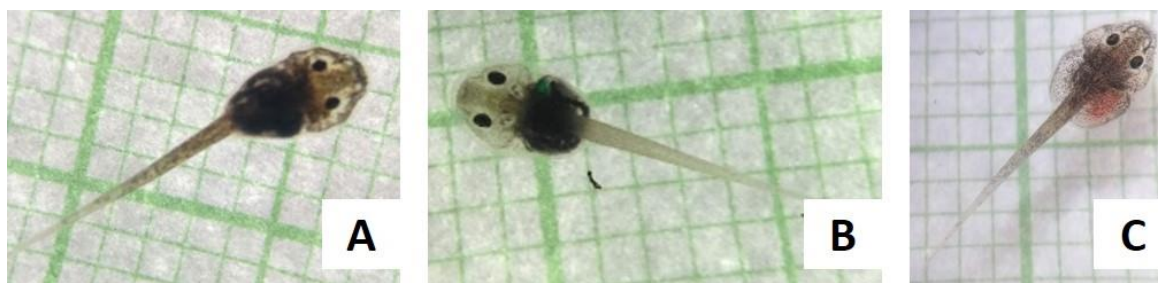


**Figura 12. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 200 mL. A. Cola curvada. B. Hemorragia abdominal. C. Cuerpo en forma de diamante. D. Depigmentación.**

Para el ensayo en 1000 mL las anormalidades más frecuentes fueron también la cola curvada y la quietud prolongada (Tabla 10), como en el los dos ensayos anteriores, de estas, solo la cola curvada presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos, aunque el análisis de regresión indicó que no existe un efecto de la concentración en la aparición de esta anormalidad ( $p > 0,05$ ), además se observaron anormalidades como depigmentación, hemorragia abdominal y cuerpo en forma de diamante (Figura 13).

Tabla 10. Proporción de anormalidades a los 1000 mL.

Tratamiento	Anormalidades							
	Malformación			Hemorragia			Comportamiento	
	Despigmentación*	Edema*	Cola Curvada*	Caudal	Cefálica	Abdominal	Natación. irregular	Quietud
<b>T1</b> 1 mg/L	0,20	-	0,03	-	0,03	0,03	0,13	0,30
<b>T2</b> 1,5 mg/L	-	-	0,47	-	0,03	0,03	0,13	0,43
<b>T3</b> 2 mg/L	-	-	0,27	-	0,03	0,03	0,17	0,13

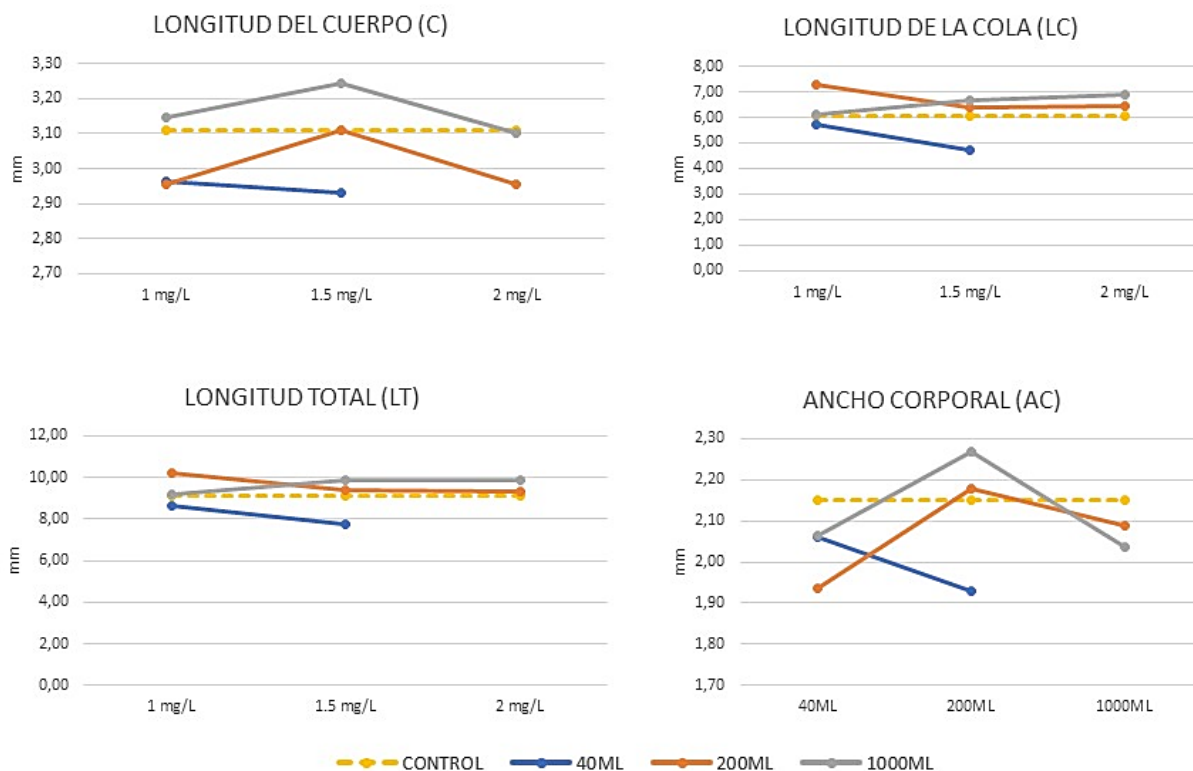


**Figura 13. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 1000 mL. A. Cuerpo en forma de diamante. B. Despigmentación. C. Hemorragia abdominal.**

Al comparar las anormalidades presentes en el tratamiento 1 (1 mg/L) por cada volumen ensayado mediante un análisis de varianza, se encontró diferencias significativas entre los volúmenes para la despigmentación ( $p < 0,05$ ) pero al aplicar el análisis de regresión no se observó que el volumen tuviera efecto en ninguna de las anormalidades. Para el tratamiento 2 (1,5 mg/L) la despigmentación también presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre volúmenes ensayados pero no existe una correlación entre los volúmenes y la frecuencia de aparición ( $p > 0,05$ ). En el tratamiento 3 (2 mg/L) no existen diferencias significativas entre los volúmenes con respecto a la aparición de anormalidades, aunque el análisis de regresión indicó que existe efecto del volumen en la natación irregular ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Morfometría

Al comparar las medidas de la longitud corporal total (LT), la longitud de la cola (LC), la longitud del cuerpo (C) y el ancho del cuerpo (AC) de los renacuajos sobrevivientes a las 96 horas con las medidas de los renacuajos al iniciar el experimento se encontraron algunas diferencias entre tratamientos y volúmenes (Figura 14).



**Figura 14. Gráfica de la media de las medidas morfométricas a las 96 h comparadas con las condiciones iniciales.**

La media de los valores morfométricas a las 96 horas se registran en la Figura 14, al comparar estas valores con los registradas al iniciar el ensayo se puede observar que los renacuajos que se encontraban en el volumen de 1000 mL presentaron mayores valores de longitud del cuerpo, longitud de la cola y longitud total con respecto a las condiciones iniciales en la mayoría de los tratamientos, además también se observa que los renacuajos que se encontraban en 40 mL reportaron para todos los casos un tamaño menor con respecto a las condiciones iniciales. Al aplicar el análisis MANOVA no se encontraron

diferencias significativas entre Morfometría-Volumen (Hotelling= 0,87;  $p<0,05$ ) y Morfometría-Concentración (Hotelling= 0,21;  $p<0,05$ ).

Al aplicar un análisis de ANOVA factorial se encontraron diferencias significativas entre los volúmenes para la longitud del cuerpo (LC) y para la longitud total (LT) ( $p=0,0289$  y  $p=0,0229$ , respectivamente). Al aplicar la prueba de Fischer para ambas medidas morfométricas se encontró que existen diferencias significativas de tamaño para el volumen de 40 mL ( $p<0,05$ ), que en ambos casos fue menor con respecto a los otros dos volúmenes.

### **3.4. Revisión de efectos subletales en otros herbicidas.**

Los principales herbicidas usados en cultivos de arroz, obtenidos mediante entrevistas con agricultores e ingenieros agrónomos del departamento del Magdalena se clasificaron, dando como resultado el listado de la Tabla 11, en la tabla se ordenaron de acuerdo a la frecuencia de uso y sus propiedades químicas (Fuentes, 2010).

El Glifosato resultó ser el herbicida más utilizado en el manejo agronómico de los cultivos de arroz, seguido del Clomazone, el Oxadiazón, Propanil, Paraquat, como los principales herbicidas y por último, el 2,4D que aunque es selectivo, no es tan recomendado para los cultivos de la zona.

De esta clasificación fueron agrupados los efectos subletales y teratológicos según el tipo de herbicida, esto se presenta en la Tabla 12.

**Tabla 11. Herbicidas usados en los cultivos de arroz en el departamento del Magdalena.**

Compuest o (nombre técnico)	Grupo Químico	Modo y sitio en que actúa	Vida media en suelo (días)*	Solubilidad en el (mg/l)	Clasificación
Glifosato	Derivado de la glicina	Inhibición de la enzima EPSP sintasa	De 3 a 9	>10000	No selectivo en Pre-siembra
Clomazone	Isoxazolidinon as	Inhibición de la biosíntesis de carotenoides	10-137	1100	Pre-emergente
Oxadiazón	Oxadiazoles	Inhibe (protoporfirinógeno oxidasa)	60-180	0,7	Pre-emergente Post-emergente
Propanil	Amidas	Inhibición de la fotosíntesis en FS II	1 a 4	130	Post-emergente
Paraquat	Derivado de la glicina	Inhibición del transporte de electrones FS I	1000 - 5000 Persistente	62000	Post-emergentes
2,4 D	Ácidos fenoxicarboxíli cos	Auxinas sintéticas (AIA)	10 Poco persistente	>20000	Post-emergente

**Modificado de Fuentes, (2010).**

Tabla 12. Efectos subletales y teratológicos causados por herbicidas.

Herbicida	Especie	Efectos observados	Referencia
<b>Glifosato</b>	<i>Rhinella granulosa</i> <i>Rhinella marina</i> <i>Hypsiboas crepitans</i> <i>Scinax ruber</i>	Movimientos anormales, quietud prolongada	Bernal <i>et al.</i> , (2009)
	<i>Bufo bufo</i>	Reducción en el crecimiento de la cola, deformaciones en la cola (torcida o lacerada)	Baier <i>et al.</i> , (2016)
	<i>Engystomops pustulosus</i> <i>Rhinela humboldti</i> <i>Rhinela marina</i> <i>Hypsiboas crepitans</i>	Disminución de la longitud total, cola, longitud corporal, ancho de la cabeza	Triana-Velásquez <i>et al.</i> , (2013)
	<i>Lithobates sylvatica</i>	Disminución de actividad, baja respuesta a estímulos, quietud prolongada.	Moore <i>et al.</i> , (2015)
<b>Clomazone</b>	<i>Physalaemus nattereri</i> <i>Rhinella schneideri</i>	Aceleración de la metamorfosis,	Freitas <i>et al.</i> , (2017)
	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Daños en órganos internos, malformaciones celulares	De Oliveira <i>et al.</i> , (2016)
<b>Propanil</b>	<i>Engystomops pustulosus</i> <i>Rhinela humboldti</i> <i>Rhinela marina</i> <i>Hypsiboas crepitans</i>	Diferencias en la longitud entre el control y los embriones expuestos.	Triana-Velásquez <i>et al.</i> , (2016)
	<i>Polypedates cruciger</i>	Escoliosis, sifosis, retraso en el crecimiento	Jayawardena <i>et al.</i> , (2010)
<b>Paraquat</b>	<i>Lithobates berlandieri</i>	Colas anormales: Flexionadas o cortas Dificultades en la natación.	(Bauer-Dial & Dial, 1995)
	<i>Xenopus laevis</i>	Retraso en el crecimiento Flexión de la cola Enrollamiento anormal del intestino	Osano <i>et al.</i> , (2002); Vismara <i>et al.</i> , (2000)
<b>2,4D</b>	<i>Xenopus laevis</i>	Retraso en el crecimiento. Posibles alteraciones endocrinas	Coady <i>et al.</i> , (2013)
	<i>Rhinela arenarum</i>	Neurotoxicidad, Estrés oxidativo	Lajmanovich <i>et al.</i> , (2015)



## 4. Discusión

*Engystomops pustulosus* es una especie útil como modelo para investigaciones en laboratorio, además su amplia distribución y presencia en ambientes con intervención antrópica puede brindar una perspectiva amplia desde el punto de vista ecológico, además el efecto que tiene la contaminación química en su hábitat es un aspecto que puede seguir siendo estudiado para estos organismos (Ospina & Bedoya-Cañon, 2018), por otro lado identificar el impacto que tiene el herbicida Oxadiazón y recopilar el impacto de otros herbicidas usados en cultivos de arroz puede contribuir a mejorar las estrategias de conservación y la disminución del impacto en las poblaciones, no solo de *Engystomops pustulosus* sino de otras especies de anfibios (Agostini *et al.*, 2020).

### 4.1. Parámetros físico-químicos durante el ensayo de toxicidad.

Durante el ensayo de toxicidad con soluciones degradadas la temperatura en todos los recipientes aumento, a diferencia de lo que ocurrió con las soluciones frescas, en donde la temperatura de todos los recipientes aumentó tal y como lo registró Henao-Muñoz *et al.*, (2013) al realizar una prueba de toxicidad con Cosmo-Flux®411F, aun así estas variaciones no influyen en el desarrollo y la supervivencia de los individuos en las condiciones ensayadas debido a que los rangos de temperatura registrados son similares a los registrados por Henao-Muñoz, (2014), además *Engystomops pustulosus* es una especie con un rango de distribución altitudinal amplio que va desde los 0 a los 1540 m.s.n.m (Ospina & Bedoya-Cañon, 2018). Por otro lado se observaron valores altos de pH en el ensayo con soluciones frescas, aun así en un ensayo para determinar la tolerancia a pH ácidos y básicos en *Engystomops pustulosus* de estadio 25 se encontró que al ser expuestos a Hidróxido de sodio (NaOH) la CL<sub>50</sub> fue de 9,87 (Henao-Muñoz & Bernal-Bautista, 2011), este valor fue superior al reportado a las 96 horas para los volúmenes de 40 mL y 200 mL y sólo superior al reportado en el volumen de 1000 mL (pH=9,98), aunque los renacuajos sobrevivientes en el volumen de 1000 mL tuvieron un mayor desarrollo corporal en comparación con los otros dos volúmenes por lo cual no se considera

como un agente de perturbación, el aumento del pH pudo deberse al amoníaco excretado por los renacuajos (Sadava & Purves, 2009) que se acumuló en el agua por no realizarse recambios.

## 4.2. Toxicidad del Oxadiazón

*Engystomops pustulosus* en otros estudios ha sido catalogada como la especie menos sensible para cipermetrina (Triana-Velásquez *et al.*, 2017), glifosato y Cosmo-Flux®411F En condiciones de laboratorio (Henao-Muñoz, 2014) y Cosmo-Flux®411F en condiciones de microcosmos (Henao-Muñoz *et al.*, 2013) con respecto a otras especies colombianas.

Ambrosi *et al.*, (1977) en su estudio de la persistencia y el metabolismo de Oxadiazón en el suelo señaló que la concentración de Oxadiazón en el agua nunca excedió las 0,06 ppm debido a su baja solubilidad, aun así el coeficiente de partición del Oxadiazón es de 5.33 (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018), lo que indica que presenta una alta bioacumulación en tejidos grasos (Murialdo, 2016), en los organismos acuáticos el factor de bioconcentración está relacionado con las características químicas de la sustancia, en el caso de Oxadiazón que es poco soluble en agua y con un coeficiente de octanol elevado, tiende a permanecer en el organismo y acumularse (Murialdo, 2016). Imanaka *et al.*, (1981) en su estudio reportó una concentración de 0,017 ppm en individuos de *Carassius cuvieri* nueve meses después de haber sido aplicado el Oxadiazón y cuando la concentración en el agua era de 0,024 ppb, lo que demuestra que, aunque el herbicida se degrade en el agua este puede persistir por largos periodos en un organismo.

El resultado para el ensayo de los 200 mL en soluciones frescas difiere de los resultados reportados para los ensayos de 40 mL y 1000 mL, esta diferencia puede tener varias razones las cuales deben ser consideradas como fuentes de variabilidad, variaciones biológicas propias de los individuos, variaciones en el agente químico, entre otras (Díaz-Báez *et al.*, 2004). Además, la tolerancia al agente tóxico varía entre los individuos de la población, aun cuando la población sea homogénea habrán organismos más tolerantes que otros, aunque generalmente la proporción de individuos muy tolerantes siempre es baja (Murialdo, 2016). Al comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo con

soluciones degradadas se observa que en el volumen de 200 mL la mortalidad fue menor en comparación con la reportada en el ensayo de 1000 mL.

El CL<sub>50</sub> de Oxadiazón entre los volúmenes de 40 mL y 1000 mL en soluciones frescas fue similar, esto concuerda con lo reportado por Montealegre-Delgado *et al.*, (2013) en donde para *E. pustulosus* no hubo diferencias significativas en la supervivencia entre los volúmenes evaluados (100 mL, 1000 mL y 2000 mL) a los 20 y 60 días. Además, el CL<sub>50</sub> para los 40 mL fue de 1,46 mg/L y para los 1000 mL fue de 1,5 mg/L, esto también coincide con lo señalado por Montealegre-Delgado *et al.*, (2013) en donde la supervivencia de *E. pustulosus* fue menor en el volumen más pequeño.

En cuanto a la acción del Oxadiazón en las células de *E. pustulosus* podría suponerse que el mecanismo de acción es similar que en las plantas, este herbicida destruye membranas vegetales e inhibe la acción de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPO) (Clavijo, 2010), aunque no se reportan estudios para anfibios Matringe *et al.*, (1989) demostró que el Oxadiazón es un inhibidor de esta enzima, no solo en células vegetales sino también en la mitocondrias de células hepáticas de ratones, en los mamíferos la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) participa en la biosíntesis del grupo hemo en la mitocondria, oxidando al protoporfirinógeno y obteniendo protoporfirina IX (PPIX) que al final forma el grupo hemo por la ferroquelatasa (FC) al catalizar la inserción de un átomo ferroso en la protoporfirina IX<sup>10</sup> (Villavicencio-Queijeiro, 2012).

Al igual que en el estudio realizado por Mesléard *et al.*, (2016) nuestro resultado confirma el efecto letal de Oxadiazón en anfibios pero solo en soluciones frescas, en soluciones degradadas aunque puede inducir mortalidad la proporción es baja.

### **4.3. Efectos subletales producidos por el Oxadiazón.**

#### **4.3.1. Anormalidades**

Los efectos subletales más frecuentes producidos por la exposición a Oxadiazón fueron la cola curvada, despigmentación y la quietud prolongada, a diferencia de los reportado por

(Henao-Muñoz, 2014) en donde los organismos de *Engystomops pustulosus* no presentaron alteraciones en la locomoción al ser expuesto a Glifosato y Cosmo-Flux®411F. Vismara *et al.*, (2000) en un análisis histológico realizado a renacuajos de *Xenopus laevis* con la cola curvada encontró en la zona de curvatura anomalías en la disposición de las miofibrillas y algunos de los miocitos.

En ambientes naturales este tipo de anormalidades disminuye la capacidad de supervivencia de los organismos, ya que al presentar una movilidad reducida se dificulta huir de los depredadores o competir por los recursos (Triana-Velásquez *et al.*, 2016, 2017), El análisis de regresión mostró una relación entre el aumento del volumen y el nado irregular en las soluciones frescas, Henao-Muñoz & Bernal-Bautista, (2011) también reportaron natación irregular en individuos de *Engystomops pustulosus* expuestos a valores de pH muy altos o muy bajos y Triana-Velásquez *et al.*, (2017) reportó esta anormalidad para *Engystomops pustulosus* en presencia de Cipermetrina. En cuanto a la relación entre la natación irregular y el volumen del recipiente esto podría deberse a que los renacuajos en el volumen de 1000 mL en soluciones frescas tuvieron una longitud total superior con respecto a los demás lo que conllevaría a un mayor desempeño locomotor, aunque hayan presentado anormalidades.

La despigmentación también fue una de las anormalidades frecuentes en todos los volúmenes tanto en soluciones frescas como en soluciones degradadas, Cortés & De Dulce, (1996) menciona que la despigmentación en los renacuajos puede ser ocasionada por un descenso en la alfa MSH (Hormona Estimulante de Melanocitos) que además no puede transportarse correctamente a través de los microtúbulos porque esta estructura es afectada por iones.

El Oxadiazón ha sido formulado para que sus efectos como herbicida se cumplan en un determinado periodo de tiempo (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, 2018), es de esperarse que desarrolle su acción durante los periodos requeridos para no afectar el crecimiento de otros cultivos y el metabolismo de fauna no objetiva, sin embargo residuos de Oxadiazón pueden persistir en el suelo por periodos superiores a los descritos en la ficha técnica (Das *et al.*, 2003; Milan *et al.*, 2019) y ser transportados por escorrentía a fuentes de agua temporales que pueden ser utilizadas por anfibios durante su

reproducción (Agostini et al., 2020; Boudh & Singh, 2019), en nuestro ensayo observamos que los organismos expuestos a soluciones degradadas aunque presentaban una tasa baja de mortalidad si manifestaron las mismas anormalidades que aquellos organismos expuestos a soluciones frescas, por lo que se supondría que los componentes químicos del herbicida continúan generando efectos subletales tiempo después de haber sido preparado.

#### 4.3.2. Morfometría

En el ensayo con soluciones frescas los individuos del control solo fueron significativamente más grandes que los individuos contenidos en el volumen de 40 mL, los cuales redujeron su tamaño tal y como reporta Henao-Muñoz *et al.*, (2013) para el Cosmo-Flux®411F, Triana-Velásquez *et al.*, (2016) para el Propanil y Triana-Velásquez *et al.*, (2017) para Cipermetrina, pero contrario a lo que reporta Triana-Velásquez *et al.*, (2013) para Glifosato.

Los individuos contenidos en el volumen de 1000 mL con soluciones frescas fueron significativamente más grandes con respecto al control al igual que lo reportado por Montealegre-Delgado *et al.*, (2013) en donde los hábitats más grandes permitieron que los individuos de *E. pustulosus* tuvieran un desarrollo más avanzado y longitudes totales mayores con respecto al hábitat más pequeño en cambio los renacuajos que estaban en un hábitat más pequeño la longitud total fue menor y su desarrollo más lento, cabe mencionar que en el ensayo realizado por Montealegre-Delgado *et al.*, (2013) el hábitat más pequeño fue de 100 mL, en cambio para nuestro ensayo el hábitat más pequeño fue de 40 mL, en ambos casos se depositaron 10 renacuajos por recipiente.

#### 4.4. Efectos subletales para otros herbicidas en arroz.

Los diferentes mecanismos de acción de los herbicidas permiten actuar de diferentes formas sobre las malezas (Tabla 7), sin embargo, los renacuajos expuestos a éstos evidencian efectos similares entre ellos, Bernal *et al.*, (2009) reporta movimientos anormales y quietud prolongada en *R. granulosa*, *R. marina*, *H. crepitans*, lo que coincide con Bauer-Dial & Dial, 1995 que observó dificultades para nadar en *L. berlandieri*, cuando fueron sometidos a pruebas con Glifosato y Paraquat respectivamente. Así mismo se

evidencia que el retraso en el crecimiento de renacuajos se relaciona con los herbicidas usados en el cultivo de arroz, ya sea Propanil (Triana *et al.* 2016), Paraquat (Osano *et al.*, 2002) y 2,4D (Coady *et al.*, 2013). El clomazone está relacionado con la aceleración de la metamorfosis de *P. nattereri* y *R. schneideri* (Freitas *et al.*, 2017), lo que puede concordar con las alteraciones de la actividad endocrina detectadas en *X. laevis* con 2,4D (Coady *et al.*, 2013). Nuestro trabajo reporta curvatura de la cola y la quietud prolongada producidas por el Oxadiazón como las de mayor frecuencia, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos con glifosato (Bernal *et al.*, 2009; Baier *et al.* 2016; Moore *et al.*, 2015), además se observa que la quietud prolongada y movimientos anormales de los renacuajos pueden estar relacionado con compuestos químicos derivados de la glicina (Paraquat-Glifosato), los cuales pueden actuar como análogos en la síntesis de proteínas dando como resultado proteínas disfuncionales o agentes quelatantes de Mn, Cu y Zn, disminuyendo la biodisponibilidad de minerales (Seneff *et al.*, 2016).

## 5. Conclusión

La variación de la temperatura tanto en soluciones degradadas como en las soluciones frescas tiene relación con el aumento de las horas, al igual que la variación del pH en soluciones frescas.

Se comprobó la toxicidad del herbicida Oxadiazón para los volúmenes de 40 mL y 1000 mL ( $CL_{50}$  1,46 mg/L y 1,5 mg/L) con soluciones frescas. Sin embargo, para el volumen de 200 mL, en este tipo de solución, no se evidenció toxicidad del herbicida al evaluarlo con el parámetro de  $CL_{50}$  en las mismas condiciones.

No se evidenció la toxicidad del Oxadiazón en soluciones degradadas al evaluarlo mediante la  $CL_{50}$ , en ninguno de los volúmenes ensayados, comprobando que la letalidad del herbicida degradado disminuye en comparación con las soluciones frescas.

Se comprobó que no existe una relación entre el volumen y el tipo de solución en la aparición de estas anormalidades, tanto las soluciones frescas como las soluciones degradadas inducen el mismo tipo de anormalidades.

Se comprobó que el volumen en el que se desarrolla un organismo de *Engystomops pustulosus* influye en los valores morfométricos alcanzado por los mismo. Por lo tanto, volúmenes mayores permiten que los renacuajos alcancen tallas más cercanas a su nivel de desarrollo y volúmenes menores producen un retraso en su crecimiento. Además, esto no está relacionado con la letalidad o con la aparición de anormalidades.





## 6. Referencias Bibliográficas

Acuña-Vargas, J. C. (2016). Anfibios y Reptiles asociados a cinco coberturas de la tierra, municipio de Dibulla, La Guajira, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 32(2), 133–146. <https://doi.org/10.21829/azm.2016.322940>

Agostini, M. G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A. E., & Bilenca, D. (2020). Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation*, 241, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>

Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>

Ambrosi, D., Kearney, P. C., & Macchia, J. A. (1977). Persistence and Metabolism of Oxadiazon in Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(4), 868–872.

Arenas-Rodriguez, A. (2014). *Efectos letales y subletales en embriones y renacuajos de anuros expuestos a pH ácidos y básicos* (Issue February 2014) [Universidad del Tolima]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4283.6644>

Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA. (2018). “Por la cual se emite Dictamen Técnico Ambiental para el producto formulado OXADIAZON CRL 250 EC, a partir del ingrediente activo grado técnico OXADIAZON.” *Resolución 00092*, 35.

Baier, F., Gruber, E., Hein, T., Bondar-kunze, E., Ivankovi, M., Mentler, A., Brühl, C. A., Spangl, B., & Zaller, J. G. (2016). Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. *PeerJ*, 4(e2641), 1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.2641>

Bauer-Dial, C. A., & Dial, N. A. (1995). Lethal Effects of the Consumption of Field Levels of Paraquat-Contaminated Plants on Frog Tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(6), 870–877.

Bernal, M. H., Solomon, K. R., & Carrasquilla, G. (2009). Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval and Juvenile Colombian Frogs 2 . Field and Laboratory Microcosm Acute Toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 72(15–16), 966–973. <https://doi.org/10.1080/15287390902929717>

Boudh, S., & Singh, J. (2019). Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. In R. N. Bharagava & P. Chowdhary (Eds.), *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management* (pp. 245–269). Springer Singapore. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-8669-4>

Clavijo, J. (2010). Acción de los herbicidas en un arrozal: Modo y mecanismo. In V. Degiovanni B., C. P. Martínez R., & F. Motta O. (Eds.), *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina: Tomo I* (pp. 431–446). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Sosinski, L., Neal, B., & Hammond, L. (2013). An evaluation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in the Amphibian Metamorphosis Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.025>

Cortés, F., & De Dulce, B. (1996). Descripción de las alteraciones de embriones de *Hyla labialis* expuestos a  $Hg^{2+}$ ,  $Cl^-$  y  $NO_3^-$ . *Universitas Scientiarum*, 3(1–2), 41–52.

Das, A. C., Debnath, A., & Mukherjee, D. (2003). Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. *Chemosphere*, 53(3), 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00440-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00440-5)

De Oliveira, C. R., Fraceto, L. F., Rizzi, G. M., Salla, R. F., Abdalla, F. C., Costa, M. J., & Silva-Zacarin, E. C. M. (2016). Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 149, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.076>

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2017). Características que se destacan en el cultivo de arroz seco (Oryza Sativa L.) en Colombia. *Boletín Mensual Insumos y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria*, 58, 1–5. [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol\\_Insumos\\_abr\\_2017.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_abr_2017.pdf)

Díaz-Báez, M. C., Bustos-López, M. C., & Espinosa-Ramírez, A. J. (2004). *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos* (1º Edición). Universidad Nacional de Colombia. [https://books.google.com.co/books?id=Dc7XzDR7GJMC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?id=Dc7XzDR7GJMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Díez de Ulzurrun, P. (2013). Modos de acción herbicida. In REM - AAPRESID (Ed.), *Red de conocimiento de malezas resistentes*.

Fischer, A., & Valverde, B. (2010). Resistencia a herbicidas en malezas asociados con arroz. In V. Degiovanni, C. Martinez, & F. Motta (Eds.), *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina* (pp. 447–487). Centro Internacional de Agricultura Tropical. [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/54233/Produccion\\_eco\\_eficiente\\_del\\_arroz\\_tomo\\_1.pdf;sequence=1](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/54233/Produccion_eco_eficiente_del_arroz_tomo_1.pdf;sequence=1)

Freitas, J. S., Felício, A. A., Teresa, F. B., & De Almeida, E. A. (2017). Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 185, 548–562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061>

Fuentes, C. L. (2010). Manejo de las malezas del arroz en América Latina: Problemas y

soluciones. In V. Degiovanni B., C. P. Martínez R., & F. Motta O. (Eds.), *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina: Tomo I* (pp. 391–412). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Glantz, S. A. (2006). *Bioestadística* (6º Edición). McGraw-Hill Interamericana.

Gosner, K. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.

Henao-Muñoz, L. M. (2014). *Toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada del glifosato (ROUNDUP® ACTIVO) y Cosmo-Flux®411F en renacuajos de anuros colombianos*. Universidad del Tolima.

Henao-Muñoz, L. M., Arango-Cubillos, V., & Bernal-Bautista, M. H. (2013). Toxicidad Aguda Y Efectos Subletales Del Cosmo-Flux®411F En Embriones De Cuatro Especies De Anuros Colombianos. *Actualidades Biológicas*, 35(99), 209–218.

Henao-Muñoz, L. M., & Bernal-Bautista, M. H. (2011). Tolerancia al pH en Embriones y Renacuajos de Cuatro Especies de Anuros Colombianos. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 35(134), 105–110.

Imanaka, M., Matsunaga, K., Shigeta, A., & Ishida, T. (1981). Oxadiazon Residues in Fish and Shellfish. *Journal of Pesticide Science*, 6(4), 413–417.

Instituto Colombiano Agropecuario. (2019). Registros nacionales septiembre 17 2019. In *Instituto Colombiano Agropecuario*. <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>

Jayawardena, U. A., Rajakaruna, R. S., Navaratne, A. N., & Amerasinghe, P. H. (2010). Toxicity of Agrochemicals to Common Hourglass Tree Frog ( *Polypedates cruciger* ) in Acute

and Chronic Exposure. *International Journal Of Agriculture & Biology*, 12(5), 641–648.

Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Grenón, P., & Cabagna-Zenklusen, M. C. (2015). Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D , and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura :Bufonidae). *Water Air Soil Pollut*, 226(427), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>

Matringe, M., Camadro, J., Labbe, P., & Scalla, R. (1989). Protoporphyrinogen oxidase inhibition by three peroxidizing herbicides : oxadiazon , LS 82-556 and M&B 39279. *FEBS Letters*, 245(1), 35–38.

Menalled, F. D. (2010). Condieraciones Ecológicas para el desarrollo de Programas De Manejo Integrado De Malezas. *Agroecología*, 5, 73–78.

Mendes, K. F., dos Reis, M. R., de Jesus Passos, A. B. R., Inoue, M. H., Silva, A. A., & Silva, D. V. (2016). Determination of oxadiazon residues in the field treated soil with and without organic matter incorporated. *Environmental Earth Sciences*, 75(3), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-5061-8>

Mesléard, F., Gauthier-Clerc, M., & Lambret, P. (2016). Impact of the insecticide Alphacypermetrine and herbicide Oxadiazon, used singly or in combination, on the most abundant frog in French rice fields, *Pelophylax perezi*. *Aquatic Toxicology*, 176, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.004>

Milan, M., Ferrero, A., Fogliatto, S., Piano, S., Negre, M., & Vidotto, F. (2019). Oxadiazon dissipation in water and topsoil in flooded and dry-seeded rice fields. *Agronomy*, 9(9), 557. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090557>

Ministerio de Agricultura. (2020). *Base Agrícola EVA 2007-2019 (P)*.

<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=59>

Montealegre-Delgado, X. K., Avendaño-Casadiegos, K., & Hernando Bernal, M. (2013). Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella humboldti* (Anura: Bufonidae). *Papeís Avulsos de Zoologia*, 53(23), 309–314.

Moore, H., Chivers, D. P., & Ferrari, M. C. O. (2015). Ecotoxicology and Environmental Safety Sub-lethal effects of Roundup™ on tadpole anti-predator responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.014>

Murialdo, R. (2016). *Ecología, ecosistemas y ecotoxicología: conceptos fundamentales*. (1ª Edición). Editorial Brujas.

Noriega, O., Gutiérrez-Rojas, Y., & Rodríguez-Barrios, J. (2011). Análisis de la vulnerabilidad y el riesgo a inundaciones en la cuenca baja del río Gaira, en el Distrito de Santa Marta. *Prospectiva*, 9(2), 93–102.

Osano, O., Oladimeji, A. A., Kraak, M. H. S., & Admiraal, W. (2002). Teratogenic Effects of Amitraz, 2,4-Dimethylaniline, and Paraquat on Developing Frog (*Xenopus*) Embryos. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 49, 42–49. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1132-4>

Ospina, A. M., & Bedoya-Cañón, M. A. (2018). *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864) Rana túngara. *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*, 4(1), 7–15.

Pérez-Iglesias, J. M., Brodeur, J. C., & Larramendy, M. L. (2019). An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06880-7>

Sadava, D., & Purves, W. H. (2009). *La ciencia de la biología* (8a edición). Medica Panamericana.

Seneff, S., Morley, W. A., Hadden, M. J., & Michener, M. C. (2016). Does Glyphosate Acting as a Glycine Analogue Contribute To ALS? *Journal of Bioinformatics and Proteomics Review*, 2(3), 1–21. <https://doi.org/10.15436/2381-0793.16.1173>

Tamariz-Turizo, C. E. (2018). *Relaciones tróficas de macroinvertebrados acuáticos en un río tropical de la Sierra Nevada de Santa Marta*. Universidad Nacional de Colombia.

Triana-Velásquez, T. M., Henao-Muñoz, L. M., & Bernal-Bautista, M. H. (2016). Toxicidad del Herbicida Propanil (propanil trust® 500EC) en embriones y renacuajos de tres especies de anuros. *Acta Biologica Colombiana*, 21(3), 627–634. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.54845>

Triana-Velásquez, T. M., Henao-Muñoz, L. M., & Bernal-Bautista, M. H. (2017). Toxicidad Aguda del Insecticida Cipermetrina (CYPERMON® 20 EC) en Cuatro Especies de Anuros Colombianos. *Acta Biologica Colombiana*, 22(3), 340–347. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.62631>

Triana-Velásquez, T. M., Montes-Rojas, C. M., & Bernal-Bautista, M. H. (2013). Efectos Letales Y Subletales Del Glifosato (Roundup® Activo) En Embriones De Anuros Colombianos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 271–278.

Uc-Peraza, R. G., & Delgado-Blas, V. H. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (Webster, 1879) (Polychaeta: Annelida). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(2), 137–144.

Villavicencio-Queijeiro, A. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de

grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 116–132.

Vismara, C., Battista, V., Vailati, G., & Bacchetta, R. (2000). Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 49, 171–179.