



PROPUESTA PARA MODALIDAD DE GRADO

1 Información General

1.1 Título

Registre el título propuesto para la modalidad de grado.

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y EFECTOS CITOGENOTÓXICOS DEL HERBICIDA OXADIAZON (MOISS 250 EC) EN DOS ESTADIOS LARVALES DE *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864)

1.2 Modalidad

Marque la modalidad del trabajo de grado de la propuesta presentada en este documento.

Trabajo de investigación	x	Práctica de innovación y emprendimiento	
Trabajo de creación artística			

1.3 Estudiantes

Registre los datos de los estudiantes que desarrollarán la modalidad de grado. El trabajo de Investigación podrá ser desarrollado por máximo tres (3) estudiantes, al igual que el trabajo de Creación Artística. La práctica de innovación y emprendimiento podrán desarrollarla un máximo de cuatro (4) estudiantes.

Código	Nombres y apellidos	Programa Académico
2011138002	Natalia Mercedes Molina Guerrero	Biología
2014238120	Hugo Armando Llanos Ramos	Biología

1.4 Director y Codirector

Registre los datos de los profesionales que asesorarán el desarrollo de la modalidad de grado. En caso de ser más de uno, se debe indicar quién asume el rol de Director y quién el rol de codirector.

Nombres y apellidos	Rol	
	Director	Codirector
German Emilio Blanco Cervantes	X	





Nota: La propuesta debe tener una extensión máxima de 4000 palabras sin incluir la información general, el resumen y las referencias.

2 Resumen

El uso de herbicidas para controlar las malezas y aumentar la producción de los cultivos agrícolas es cada vez más común y aunque tiene ventajas desde el punto de vista económico trae consigo serias repercusiones ambientales, entre las que tenemos la contaminación indirecta de suelos y ambientes acuáticos por medio del transporte de residuos a través de sistemas de riego y escurrimiento lo que afecta no solo al organismo objetivo sino a la fauna no objetivo, como las aves, los mamíferos y anfibios. Estos últimos son altamente sensibles a las perturbaciones en el medio debido a su piel permeable y a su ciclo de vida acuático-terrestre.

En Colombia es común que en cultivos de arroz se utilice el herbicida oxadiazon por ser un herbicida de amplio espectro, este mismo aparece catalogado por la Asociación Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) como extremadamente tóxico para organismos acuáticos pero su efecto en anfibios ha sido poco estudiado a nivel mundial y no se reportan estudios en fauna de la Región Caribe. Es necesario observar como los herbicidas afectan a los anfibios para poder contribuir en su conservación y a crear planes de manejo más adecuados para la fauna regional.

En el presente trabajo se propone la evaluación de los efectos letales, subletales y hematológicos de la especie de anuro *Engystomops pustulosus* en los estadios 25 y 32 al ser expuestos a diferentes concentraciones del herbicida oxadiazon mediante un ensayo de 96 horas en condiciones de laboratorio. Adicionalmente se proponen barridos sanguíneos para observar posibles anomalías hematológicas. Se espera encontrar diferencias significativas en el efecto que el herbicida oxadiazon tiene en los renacuajos por estadio de desarrollo y por densidad, así como observar efectos subletales y cambios en las células sanguíneas debido a reacciones citotóxicas provocadas por la exposición a oxadiazon.

3 Motivación y Justificación

La demanda de productos agrícolas ha aumentado por lo que ha sido necesario implementar nuevas tecnologías enfocadas en mejorar la productividad de los cultivos y combatir factores bióticos adversos como las plagas y las malezas, las cuales compiten con los cultivos por nutrientes y espacio además de hospedar patógenos; y aunque existen diferentes estrategias de control de malezas, el control químico con herbicidas se ha generalizado en el sector agrícola (Diez de Ulzurrun, 2013) y aunque esto representa una ventaja en la producción pues permite el aumento de la productividad al reducir las pérdidas (Aktar *et al.*, 2009) tiene repercusiones a nivel ambiental y ecológico.

Dentro de las repercusiones ecológicas está el descenso de las poblaciones de anfibios ya que, los principios activos de los herbicidas, se transportan por escurrimiento,



Carrera 32 No.22-08 Sector San Pedro Alejandrino
Edificio Administrativo `Roque Morelli Zárate` 2do Piso
Santa Marta - Colombia PBX: (57-5) 421 7940 Ext. 3140, 3170 y 3274
vinvestigacion@unimagdalena.edu.co
www.unimagdalena.edu.co

PAGE *
MERGEFOR
MAT8



permaneciendo tiempo después en el suelo o en la columna de agua alcanzando concentraciones elevadas (Agostini et al., 2020). Además, los anfibios son sensibles a la contaminación, más que las aves y los mamíferos, debido a que enfrentan las alteraciones tanto en ambientes terrestres como acuáticos y su piel es altamente permeable lo que la hace susceptible a los cambios en el medio, a pesar de esto, los análisis que se realizan a los agroquímicos para su uso reglamentario no suele considerar las afectaciones a estos organismos (Brühl et al., 2011).

En Colombia el sector agrícola también ha incrementado, para el año 2019 el PBI de las actividades económicas correspondientes a agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca creció en conjunto un 2,0% con relación al año anterior, y un 18,9% con respecto al cuarto trimestre del 2018, de estos, se destaca el crecimiento del cultivo de arroz puesto que aumentó 14,9% con respecto al cuarto trimestre del año 2018 (Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2020), además para el segundo semestre del 2019 las hectáreas cultivadas con arroz aumentaron 7,2% con respecto al segundo semestre del año 2018 (Ministerio de agricultura, 2020). En Colombia se cultiva arroz, principalmente en los departamentos de Meta, Casanare, Tolima y Huila, y en menor cantidad en los departamentos de Antioquia, Arauca, Atlántico, Bolívar, Caquetá, Cauca, Cesar, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, La Guajira, Guaviare, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Santander, Sucre, Vichada y Valle del Cauca (DANE, 2019).

Para el mantenimiento del cultivo de arroz se usan diversos tipos de herbicidas, entre los cuales tenemos aquellos que contienen oxadiazon, estos son de uso común debido a su eficiencia en el control de malezas predominantes en la zona y su potencialidad para ser usados como pre-emergente y post-emergente. Este herbicida está categorizado por el ANLA como extremadamente tóxico para organismos acuáticos, aunque en la resolución que reglamenta su uso no se menciona la toxicidad que éste herbicida puede tener en anfibios (ANLA, 2018) además a nivel nacional los estudios del efecto ambiental de éste herbicida son limitados (Gil & Castro, 2017), y no han sido estudiados para la fauna de la Región Caribe.

Esta región posee gran diversidad de especies anfibias entre las que se destaca *Engystomops pustulosus* como organismo modelo para ensayos toxicológicos y evaluaciones del efecto de la contaminación química en el hábitat, esto se debe a que es una especie abundante y fácil de monitorear, además esta especie ha sido observada en agroecosistemas, son organismos de libre natación en estado larvario y por lo tanto ideales para estimar la toxicidad en agua (Díaz et al., 2004), su rango de distribución incluye los departamentos de Antioquia, Atlántico, Caquetá, Cesar, Córdoba, Guajira Magdalena y Tolima (Ospina & Bedoya, 2018), en los cuales se cultiva arroz por lo que podría suponerse que en ambientes naturales esta especie si podría encontrarse expuesta al herbicida oxadiazon.

Es necesario identificar el impacto que tienen los herbicidas de uso común en los anfibios, para contribuir a las estrategias de conservación y disminuir los impactos en sus poblaciones (Agostini et al., 2020), además el estudio de su efecto en especies de amplia distribución que son





observadas en sitios con perturbaciones (Ospina, & Bedoya-Cañón, 2018) como *Engystomops pustulosus* puede servir de base para futuros estudios en la modelación de la especie y como los agroquímicos podrían convertirse en agentes modeladores de una población.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar los efectos letales, subletales, teratológicos y citogenotóxicos del herbicida Oxadiazon en dos estadios larvales de *Engystomops pustulosus* en condiciones de laboratorio.

4.2 Objetivos Específicos

Evaluar el efecto letal y subletal del herbicida Oxadiazon sobre dos estados larvales de *Engystomops pustulosus* y en tres densidades.

Determinar posibles efectos teratológicos y morfométricos del herbicida Oxadiazon en larvas de *Engystomops pustulosus*.

Analizar los efectos citogenotóxicos del herbicida Oxadiazon sobre eritrocitos en dos estados larvales de *Engystomops pustulosus* en tres densidades mediante la técnica de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN).

5 Fundamentación

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La transformación del sector agrícola ha sido notable en los últimos años debido a que ha crecido la demanda de alimentos y a su vez las estrategias para incrementar la producción (Diez de Ulzurrun, 2013). Los agricultores tienen que hacer frente a diversos desafíos, como lo son, suelos pobres en nutrientes, plagas, pocos sistemas naturales de riego y además el desarrollo de malezas en el agroecosistema que compiten con el cultivo por los nutrientes y pueden afectar su crecimiento (Menalled, 2010). Para controlar las malezas existen diferentes métodos de control (físico, mecánico, natural, entre otros) pero el control químico realizado a través de herbicidas ha reemplazado otros métodos en gran número de cultivos (Diez de Ulzurrun, 2013), esto se debe a que los herbicidas representan para los agricultores una ventaja económica (Menalled, 2010), aumentando el rendimiento y la producción (Aktar et al., 2009), reduciendo el trabajo manual y adaptándose al tiempo y necesidades del cultivo (Diez de Ulzurrun, 2013).

Según el tiempo de aplicación los herbicidas pueden ser de presembrado, preemergentes y postemergentes, además estos pueden ser selectivos para malezas específicas o no selectivos,





así como ser de contacto, cuando atacan la parte de la planta en la que son aplicados (generalmente hojas y tallos) y sistémicos, cuando entran por la raíz y son transportados por la savia al resto de la planta, el cual es absorbido por la maleza que manifestará efectos fisiológicos de fitotoxicidad (Diez de Ulzurrun, 2013).

Pese a las ventajas que ofrece este tipo de control de malezas su uso constante genera impactos en el ambiente (Menalled, 2010), cuando en un cultivo el único medio de control es químico es probable que las malezas empiecen a generar resistencia lo que conlleva a que el agricultor aumente las dosis y el número de aplicaciones por cultivo lo que a su vez aumenta la carga ambiental (Fischer & Valverde, 2010). Además, la aplicación de sustancias químicas en los cultivos genera daños en el suelo, al disminuir la cantidad de organismos benéficos presentes en éste, contaminar las fuentes hídricas por las altas concentraciones en la columna y afectando no solo al organismo que se quiere controlar sino también a aquellos que no eran objetivo como las aves, peces, mamíferos y anfibios asociados a los suelos de cultivo o a las fuentes de agua contaminadas, causándoles la muerte o disminuyendo sus capacidades supervivencia ((Ahtar *et al.*, 2009; Boudh & Singh, 2019; Agostini *et al.*, 2020).

Colombia no se encuentra aislada de este panorama, 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, tenemos el caso del cultivo de arroz que pasó de 117.708,8 a 126.221,2 hectáreas a nivel nacional en el segundo semestre del año 2018. A nivel del departamento del Magdalena pasó 951,8 a 1.336,3 hectáreas 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, los cultivos de arroz pueden ser arroz de riego, cuando el cultivo se hace en sitios inundados que disponen de canales conectados a distritos de riego tanto públicos o privados (Fig. 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, en ambos casos se requiere el uso de agroquímicos, ya sea con mano de obra mecanizada o manual (DANE, 2017).





Figura 1. Campos de arroz de riego. Carmen de Bolívar. Fotos: Luis Horacio Ochoa.

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 oxadiazon (ICA, 2019).

El oxadiazon es un herbicida que puede ser utilizado en pre-emergencia y en post-emergencia del cultivo de arroz; y fue reglamentado por el ANLA mediante Resolución N° 00913 del 2018 (ANLA, 2018). El nombre químico según la IUPAC es 5-tert-butyl-3-(2,4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one, su fórmula empírica es $C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$ pertenece al grupo químico de los Oxadiazoles y aunque tiene poca solubilidad en agua está catalogado como persistente en suelos y agua, además de tener un alto potencial de lixiviación hacia aguas subterráneas por lo cual está catalogado como “Extremadamente Tóxico para organismos acuáticos” (ANLA, 2018), además el oxadiazon es un herbicida sistémico, que generalmente se aplica en pos emergencia aunque puede ser aplicado en preemergencia. El oxadiazon se utiliza para el control de malezas gramíneas y de hoja ancha, es absorbido por la maleza a través de la raíz y llevado al tallo y hojas en donde bloquea el proceso de fotosíntesis al inhibir de la enzima cloroplástica 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 (Diez de Ulzurrun, 2013). Las malezas tratadas con oxadiazon presentan clorosis en hojas y tallos que posteriormente se convierte en necrosis cuando la planta es expuesta a la luz (Diez de Ulzurrun, 2013).

Algunos estudios realizados con Oxadiazon han demostrado que reduce el número de esporas de hongos micorrizales, tiene efectos negativos en el crecimiento de algas y es tóxico para las abejas (Aktar, 2009). Mesléard et al., (2016) comparó el efecto del herbicida oxadiazon solo y combinado con el insecticida Alphacypermetrine, utilizado para el control de plagas en Francia, el estudio se realizó en huevos, larvas y renacuajos pro-metamórficas de la especie *Pelophylax perezi*, una especie de rana abundante en campos de arroz en donde no encontró gran impacto





en la eclosión o en las larvas jóvenes al aplicar Oxadiazon, aunque se confirmó su efecto letal en renacuajos pre-metamórficos al aplicar estos agroquímicos, solos o combinados.

Milan et al., (2019) comparó en un estudio la disipación del oxadiazon en cultivos de arroz riego y arroz seco señalando que la concentración de residuos de oxadiazon encontradas en el cultivos de arroz seco fue más elevada que en cultivos inundados demostrando que el oxadiazon es persistente en tierra, además que su degradación es lenta y el riesgo de contaminación de fuentes de agua es alta en campos de arroz debido los sistemas de riego y las inundaciones temporales que podrían facilitar el transporte de residuos del herbicidas a otros sitios. Además, en la ficha técnica del oxadiazon aparece que su tiempo de degradación es de 21 días (ANLA, 2018), aun así, el oxadiazon puede persistir en el suelo por más tiempo, Das et al., (2006) reportó que luego de 60 días de haber aplicado oxadiazon en un campo de arroz aún persistía un 0,5% del herbicida y Mendes et al., (2016) encontró oxadiazon en la capa superficial de los suelos (0-10 cm) después de 64 días de aplicación, lo que supone el riesgo de que fauna no objetivo sea expuesta al ingrediente activo de dicho herbicida.

Una de las especies que podría llegar a estar expuesta al efecto del oxadiazon es *Engystomops pustulosus* o rana túngara (Fig.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, presentan 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, 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, 2018). Tienen una distribución geográfica amplia, en Colombia es posible encontrar individuos 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, 2018).





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

La especie *Engystomops pustulosus* ha sido utilizada en diversos estudios de toxicidad, 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), cipermetrina (Triana Velásquez et al., 2017), entre otros, no se encuentran reportados ensayos con oxadiazon para Colombia.

Se trabajará con individuos es estadio 25 y estadio 32, ambas etapas pre-metamórficas, los estadios fueron seleccionados debido a que la edad puede influir en la respuesta del organismo ante el agente tóxico (Díaz-Báez et al., 2004). La etapa pre-metamórfica fue señalada por Gonçalves et al., (2017) como una de las más sensible al efecto del herbicida atrazina, utilizado en cultivos de maíz y que al igual que el oxadiazon tiene efecto sobre el proceso de fotosíntesis de las malezas, además Mesléard et al., (2016) señaló que el oxadiazon puede tener un efecto diferencial según el desarrollo del renacuajo, puesto que la vascularización epidérmica puede aumentar la sensibilidad del individuo debido al transporte del herbicida a través de la piel.

La exposición de renacuajos a agroquímicos puede generar efectos subletales, teratológicos y citogenotóxicos en los individuos, algunos de los efectos subletales y teratológicos más comunes incluyen alteraciones en la actividad de natación que pueden manifestarse como natación irregular y quietud prolongada o 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).

Uno de los efectos citogenotóxicos más estudiados es la presencia de micronúcleos en los eritrocitos, debido a la simplicidad, sensibilidad y confianza de la prueba como indicador de factores ambientales estresantes capaces de provocar daños en el ADN, además suministra resultados inmediatos de daños genéticos, brindando una medida sistemática de alteraciones en el hábitat, siendo un indicador importante en el monitoreo ambiental al momento de evaluar los



efectos de la exposición a compuestos químicos ajenos al ambiente en especies que pueden tener contacto con el agente estresor (Benvindo-Souza et al., 2020).

Para realizar la prueba de micronúcleos hay que tener en cuenta criterios ya establecidos, como la forma del micronúcleo que puede ser esférica u ovalada, además debe encontrarse dentro del citoplasma celular, su diámetro debe ser en comparación con el del núcleo principal de 1/3 a 1/16, separado del mismo y con un claro el límite nuclear y su refracción y color deben ser como la del núcleo principal o mayor (Benvindo-Souza et al., 2020; Caraffa et al., 2013).

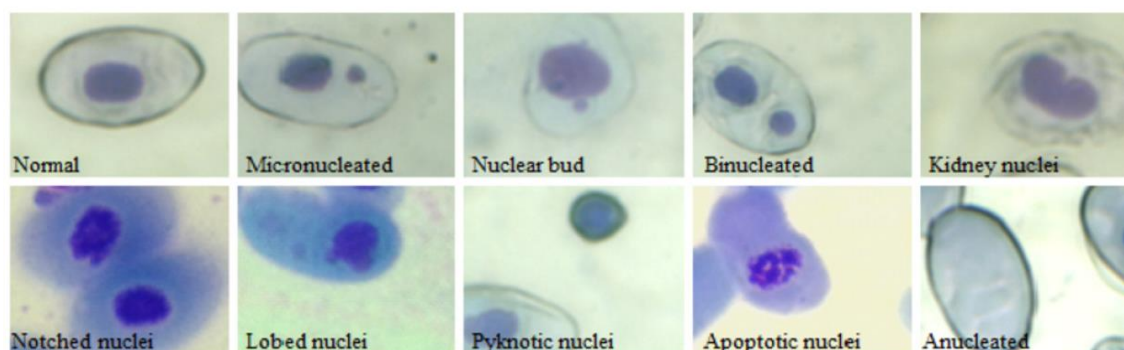


Fig. 3. Micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de renacuajos a 1000X, con tinción Giemsa, tomado de: Benvindo-Souza, et al., (2019).

Además de los micronúcleos es posible observar otras anomalías nucleares como la yema nuclear o núcleo ampollado (nuclear bud) que ocurre cuando un micronúcleo no se separa completamente del núcleo sino que permanece unido por una cromátida, células binucleadas (binucleated) originadas por divisiones celulares anormales por bloqueo de la citocinesis, núcleos reniformes (Kidney nuclei), que son aquellos con apariencia morfológica semejante a la de un riñón y que podría representar la formación de un micronúcleo y una binucleación, núcleos con muescas (notched nuclei) que son aquellos con vacuolas y espacios en donde no se contiene material genético, núcleos lobulados (lobed nuclei) cuando el núcleo tiene evaginaciones nucleares formando lóbulos, células picnóticas (pyknotic nuclei) en las que el núcleo es de tamaño reducido, células apoptóticas (apoptotic nuclei) en las que se observa el núcleo fragmentado pero el citoplasma intacto y células anucleadas (anucleated) (Fig. 3) que han sido sugeridas como un mecanismo para aumentar la eficiencia del transporte de oxígeno en aguas contaminadas (Benvindo-Souza, et al., 2019).

FUNDAMENTACIÓN METODOLÓGICA

FASE DE CAMPO

Los ejemplares de *Engystomops pustulosus* que serán utilizados para los ensayos de toxicidad se obtendrán recolectando las puestas en el sector de Puerto Mosquito, cuenca baja del Río Gaira (Fig. 4), el muestreo se realizará durante el primer trimestre del año 2020. Las



Carrera 32 No.22-08 Sector San Pedro Alejandrino
Edificio Administrativo 'Roque Morelli Zárate' 2do Piso
Santa Marta - Colombia PBX: (57-5) 421 7940 Ext. 3140, 3170 y 3274
vinvestigacion@unimagdalena.edu.co
www.unimagdalena.edu.co

PAGE *
MERGEFOR
MAT8



puestas serán colectadas en horas de la mañana. Luego serán introducidas en bolsas plásticas Ziploc® y transportadas al Laboratorio de Biología y Fisiología Animal de la Universidad del Magdalena, donde se mantendrán en agua hasta que alcancen el estadio 25 y el estadio 32 según la escala Gosner (Gosner, 1960).

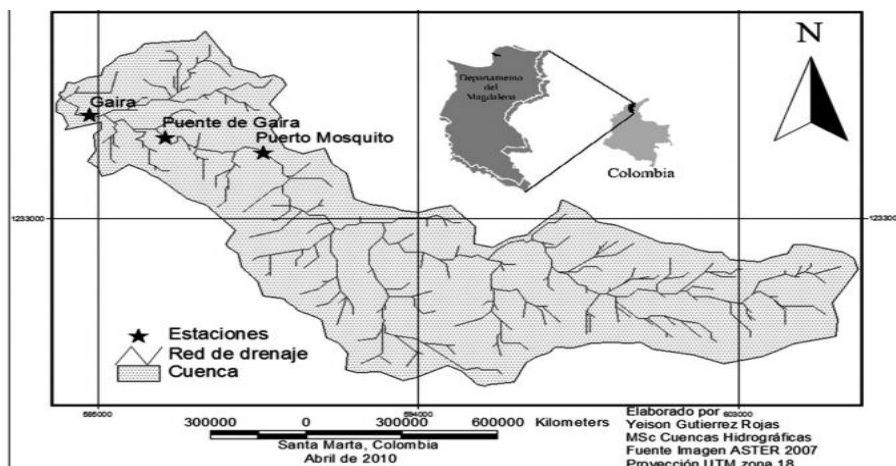


Fig. 4. Cuenca del Río Gaira. Tomado de: Noriega *et al.*, (2011).

FASE DE LABORATORIO

Se realizarán dos bioensayos, el primero con individuos en estadio 25 y el segundo con individuos en estadio 32, ambos estadios pertenecen a la etapa pre-metamórfica de acuerdo a las etapas de desarrollo de Gosner.

Los individuos serán 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 colocarán 10 larvas como se ilustra en la figura 5, esto teniendo en cuenta que la densidad poblacional junto con otros factores puede influir en la respuesta del organismo (Díaz *et al.*, 2004).

ESTADIO 25					ESTADIO 32				
	T1 1 mg/L	T2 1,5 mg/L	T3 2 mg/L	C 0 mg/L		T1 1 mg/L	T2 1,5 mg/L	T3 2 mg/L	C 0 mg/L
V ₁ (40 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	V ₁ (40 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3
V ₂ (200 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	V ₂ (200 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3
V ₃ (1000 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	V ₃ (1000 mL)	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3	<input type="text"/> X 3



Fig. 5. Esquema de los bioensayos que se aplicaran para evaluar la toxicidad de oxadiazon en larvas en *Engystomops pustulosus*.

Bioensayo de toxicidad para efectos letales y subletales

En cada bioensayo las larvas serán expuestas durante 96 horas a tres concentraciones del herbicida Oxadiazon (1 mg/L, 1.5 mg/L y 2 mg/L) y un control (0 mg/L), sin recambio de agua. Las muestras serán revisadas a las 0, 6, 24, 48, 72 y 96 horas, en cada revisión los individuos serán observados en el estereoscopio y se contabilizará el número de individuos muertos para determinar los efectos letales del herbicida y el número de individuos con anomalías, cambios morfológicos y bajo desempeño locomotor para determinar los efectos subletales (Arenas Rodríguez, 2014).

Bioensayo para efectos teratológicos y morfométricos

Las larvas muertas y las vivas observadas al estereoscopio (sobre papel milimetrado) se revisarán buscando anomalías del desarrollo (teratología) como cola curvada, hemorragia, despigmentación, exfoliación, edema, etc. Luego se realizará registro fotográfico para una evaluación morfométrica mediante el programa ImageJ (Triana et al., 2016). Para el análisis morfométrico se tendrán en cuenta la longitud corporal total, la longitud de la cola, la longitud del cuerpo y el ancho del cuerpo de los organismos experimentales y se compararán con los de control (Fig. 6).

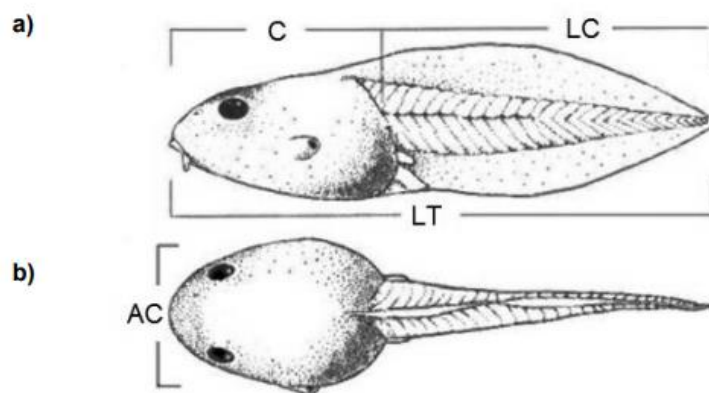


Fig. 6. Medidas morfométricas. **a)** vista lateral. **C:** Longitud del cuerpo, **LC:** Longitud de la cola, **LT:** Longitud total. **b)** vista dorsal. **AC:** Ancho el cuerpo. Tomado de: (Arenas Rodríguez, 2014)

Bioensayo de citogenotoxicidad

Para el ensayo de citogenotoxicidad los individuos serán sumergidos en xilocaina, posteriormente se tomaron muestras sanguíneas mediante amputación caudal, al inicio y al final del ensayo; tanto a individuos no expuestos como expuestos al herbicida y se confeccionarán extendidos sanguíneos en portaobjetos limpios; se dejarán secar al aire libre, se lavarán con metanol y se teñirán hematoxilina-eosina y Giemsa, se dejarán secar y se observarán al microscopio en 100X, se buscará la presencia de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN) en 2000 eritrocitos.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizará el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) para el estadio 25 y para el estadio 32, a través del método TSK Trimmed Spearman-Kärber, para dicho cálculo se usarán los datos de mortalidad para cada bioensayo al transcurrir las 96 horas para cada tratamiento y grupo control. Se realizará una comparación estadística mediante análisis de varianza ANOVA a una vía para determinar si existen diferencias significativas entre las variables respuesta: mortalidad, teratología y micronúcleos para cada estadio y tratamiento, utilizando el programa estadístico InfoStat o PAST (Arenas Rodríguez, 2014; Triana Velásquez et al., 2016).

6 Plan de Actividades

Objetivo	Resultado	Indicadores de resultado
General		
Evaluar los efectos letales, subletales, teratológicos y citogenotóxicos del herbicida Oxadiazon en dos estadios larvales de <i>Engystomops pustulosus</i> en condiciones de laboratorio.	Concentración letal media CL ₅₀ frecuencia de efectos teratológicos, morfométricos y citogenotóxicos inducidos por la exposición al herbicida oxadiazon en larvas de estadio 25 y 32 de <i>Engystomops pustulosus</i>	Cuantificación de la mortalidad acumulada, anomalías físicas, morfométricas y de micronúcleos por cada estado y tratamiento.
Específicos		
Evaluar el efecto letal y subletal del herbicida Oxadiazon sobre dos estados larvales de <i>Engystomops pustulosus</i> y en tres densidades.	Concentración letal media CL ₅₀ del herbicida oxadiazon para larvas en estadio 25 y estadio 32 de <i>Engystomops pustulosus</i>	Datos de la mortalidad acumulada durante las 96 horas de cada bioensayo.
Determinar posibles efectos teratológicos y morfométricos del herbicida Oxadiazon en larvas de <i>Engystomops pustulosus</i>	Frecuencia de aparición de condiciones teratológicas inducidas por la exposición al herbicida. Comparación morfométrica entre individuos expuestos y no expuestos al herbicida.	Cuantificación y descripción de anomalías morfológicas en los renacuajos. Mediciones de la longitud total, caudal, cefálica y ancho cefálico de los renacuajos antes y después de cada bioensayo.
Analizar los efectos citogenotóxicos del herbicida	Comparación de la frecuencia de aparición de micronúcleos	Conteos de micronúcleos en





Oxadiazon sobre eritrocitos en dos estados larvales de <i>Engystomops pustulosus</i> y en tres densidades.	en eritrocitos por cada estado y tratamiento.	extendidos sanguíneos de renacuajos antes y después de cada bioensayo.
--	---	--

7 Resultados o Productos Esperados

Los resultados de este proyecto de investigación serán compilados en una tesis de pregrado de la cual se entregará una copia al programa de Biología de la Universidad del Magdalena y una copia a la Biblioteca Germán Bula Meyer para que sea publicada en el Repositorio Digital Institucional. Se espera compilar en este trabajo de investigación los efectos letales y subletales que el herbicida oxadiazon produce en larvas de *Engystomops pustulosus* en los estadios 25 y 32 según la escala de Gosner, así como la influencia que puede tener en la aparición de características teratológicas, diferencias morfométricas y aparición de micronúcleos y anomalías nucleares.

Con esto se espera fortalecer en el conocimiento ecotoxicológico de la especie *Engystomops pustulosus*, así como en el efecto del herbicida oxadiazon en especies no objetivo, así como aportar información para futuras investigaciones relacionadas con toxicidad y efectos de agroquímicos en el ambiente que puedan contribuir en la mejora de estrategias de conservación y disminución en los impactos a poblaciones de anuros.

8 Cronograma

Actividad	Descripción de la actividad	Meses			
		1	2	3	4
Premuestreo	Identificación de zonas de puestas	x			
Fase de campo	Colecta de las puestas	x	x		
Fase de laboratorio	Preparación de los bioensayos		x	x	
	Pruebas de toxicidad y efectos subletales		x	x	
	Toma de muestras sanguíneas		x	x	
Fase de análisis	Análisis hematológico		x	x	
	Cálculo de la concentración letal media CL ₅₀				x
	Comparaciones estadísticas				x
Redacción del documento	Documento final con análisis de los resultados				x





9 Presupuesto

El presupuesto debe tener una relación razonable entre los rubros, cantidades y montos solicitados con los propósitos, las fases del proceso de creación y la duración del proyecto.

Rubro general	Capacidad instalada	Otras fuentes	Total
Gasto de personal	0.0	0,0	0,0
Materiales e insumos	10,000,000	160,000	10,160,000
Bibliografía	0,0	0,0	0,0
Salidas de campo		40,000	40,000
	10,000,000	200,000	10,200,000

10 Referencias

- 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(November 2019), 108355. <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>
- 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.
- Benvindo-Souza, M., Santos Oliveira, E. A., Assis, R. A., Araújo Santos, C. G., Borges, R. E., de Melo e Silva, D., & De Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>
- 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>
- Brühl, C. A., Pieper, S., & Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2465–2472. <https://doi.org/10.1002/etc.650>
- Caraffa, E., Bionda, C., Pollo, F., Salas, N., & Martino, A. (2013). Determinación





- de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicológica Argentina*, 21(2), 78–84.
- 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)
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2019). Boletín Técnico: Encuesta Nacional de arroz mecanizado (ENAM). http://fedearroz.com.co/new/documentos/2019/encuesta_arroz_mecanizado.pdf
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2020). Boletín Técnico: Producto Interno Bruto (PIB) IV Trimestre de 2019. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/pib/bol_PIB_IVtrim19_produccion_y_gasto.pdf
- 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
- Díaz-Báez, M. C., Bustos López, M. C., & Espinosa Ramírez, A. J. (2004). *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos* (Primera). 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. Martínez, & F. Motta (Eds.), *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina* (p. 513). Centro Internacional de Agricultura Tropical. https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/54233/Produccion_eco_eficiente_del_arroz_tomo_1.pdf;sequence=1
- Gil, C., & Castro, H. (2017). Análisis de la problemática ambiental de los plaguicidas en la quebrada La Sardinata vereda El Juncal, Huila, Colombia. *Actas de Ingeniería*, 3, 292–297.
- Gonçalves, M. W., Marins de Campos, C. B., Batista Guerra, V., da Cruz, A. D., de Marco Junior, P., Bastos, R. P., & de Melo e Silva, D. (2017). Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere*, 182, 730–737. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.078>
- 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.
- 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>
- 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>
- Menalled, F. D. (2010). Consideraciones Ecológicas para el desarrollo de Programas De Manejo Integrado De Malezas. *Agroecología*, 5, 73–78.
- 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>
- 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.
- 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>
- 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 Biológica 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 Biológica Colombiana*, 22(3), 340–347. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.62631>

