

Tesis Doctoral

Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae)

Svartz, Gabriela Verónica

2014-06-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Svartz, Gabriela Verónica. (2014-06-26). Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Svartz, Gabriela Verónica. "Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-06-26.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae).**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Gabriela Verónica Svartz**

Director de tesis: Dra. Cristina S. Pérez Coll

Consejero de estudios: Dr. Dante Paz

Lugares de trabajo: Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental-

Universidad Nacional de San Martín.

Instituto de Ciencias Ambientales y Salud-

Fundación PROSAMA.

Buenos Aires, 2014

Fecha de defensa: 26 de junio de 2014

# **Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae).**

**RESUMEN** Se evaluó la toxicidad aguda y crónica de dos insecticidas, endosulfán (ES) y cipermetrina (CY), y del fungicida Maxim® XL (2,5% fludioxonil, 1,0% metalaxil-M), sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, un anfibio autóctono de Argentina. Los resultados mostraron que los insecticidas fueron más tóxicos (el ES en el período agudo y la CY en el periodo crónico) en relación al fungicida. La susceptibilidad a estos agroquímicos fue estadio-dependiente encontrándose un patrón diferente para las tres sustancias de acuerdo al modo de acción de cada una de ellas. La toxicidad de los insecticidas aumentó significativamente en los estadios tardíos, siendo el periodo larval el más sensible y causando severas alteraciones en el comportamiento en concordancia con su acción neurotóxica. Por el contrario, la mayor toxicidad del Maxim® XL fue observada en los estadios embrionarios tempranos (blástula el más sensible), con severos efectos teratogénicos. La interacción de ES y CY en mezclas, mostraron tanto un efecto antagónico como aditivo durante los periodos agudo y crónico corto, así como sinergismo durante el periodo crónico. La toxicidad de un formulado comercial con CY resultó hasta 7 veces mayor que la del ingrediente activo, hecho muy relevante considerando que es el producto comercial el que efectivamente se aplica en los cultivos. Teniendo en cuenta los resultados de toxicidad y el análisis de peligrosidad, estos tres agroquímicos utilizados a nivel mundial, y en particular en nuestro país, podrían poner en riesgo la continuidad de las poblaciones de esta especie representativa de la herpetofauna regional asociada a los agroecosistemas de nuestro país.

**Palabras clave:** Anfibios; Toxicidad en el desarrollo; Endosulfán; Cipermetrina; Fungicida; Susceptibilidad estadio-dependiente; Bioensayos estandarizados.

# **Toxicity assessment of endosulfan, cypermethrin and a commercial fungicide isolated and in mixtures on the early development of *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae).**

**ABSTRACT** The acute and chronic toxicity of two insecticides, endosulfan (ES) and cypermethrin (CY), and of the Maxim® XL fungicide (2.5% fludioxonil, 1.0% metalaxyl-M) was assessed on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*, a native amphibian of Argentina. The results showed that the insecticides were more toxic (ES during the acute exposure period and CY during the chronic exposure period) than the fungicide. The sensitivity to these agrochemicals was stage-dependent establishing a different pattern for the three substances according to their mode of action. The toxicity of the insecticides was significantly increased in later stages, the larval period being the most sensitive, and causing severe alterations in behaviour consistent with its neurotoxic action. In contrast, the greater toxicity of Maxim® XL was observed at early embryonic stages (blastula stage being the most sensitive), with severe teratogenic effects. The interaction of ES and CY in mixtures showed antagonistic and additive effects during the acute and short term chronic periods, and synergism during the chronic period. The toxicity of a CY commercial formulation was 7 times greater than the active ingredient, a very relevant fact considering that the commercial product is actually applied on crops. Taking into account the results of toxicity and hazard assessment, these three agrochemicals worldwide used, and particularly in our country, could threaten the continuity of populations of this species, representative of the regional herpetofauna associated to agroecosystems of our country.

**Keywords:** Amphibians; Developmental toxicity; Endosulfan; Cypermethrin; Fungicide; Stage-dependent sensitivity; Standardized bioassays.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cristina Pérez Coll, mi directora de tesis, por su confianza desde el primer momento, por todo lo que me enseñó y me ayudó, por su paciencia, muchas gracias!

Al Dr. Jorge Herkovits, director del Instituto ICAS (Instituto de Ciencias Ambientales-Fundación PROSAMA), por abrirme las puertas de mi primer lugar de trabajo, con todas las herramientas a disposición.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que a través de las becas de estudio me permitió los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Dr. Damian Marino por su colaboración en las mediciones químicas, en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, Departamento Química, Facultad Ciencias Exactas, UNLP.

Al Instituto Argentino Massone por las donaciones de hormonas hCG.

A mis compañeras del laboratorio, Ianina y Carolina por acompañarme durante todos estos años en el laboratorio, aconsejándome, escuchándome y brindándome su apoyo y amistad. A los de antes Abelardo, Julie y a los de ahora Joni, Caro.

A mis dos amores y motores de mi vida: Hernán y mi pimpollo Elina. Gracias por el aguante incondicional y la fuerza que me dan todos los días.

A mi familia, Nori, José, Ale, Nati, Mati, Gus, Gra, Ri, flia. Goweiz y a los peques, por apoyarme y darme fuerza en los malos momentos y darme toda esa alegría infinita cuando las cosas salen bien.

A mis amigas de siempre, Gise, Noe y Yani, por brindarme su corazón, y por enseñarme a explicar lo que hago de una forma sencilla.

# DEDICATORIA

*A Hernán por todo su amor, apoyo y comprensión*

*A Elina mi fuerza de hoy y mañana*

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>1</b>
<b>GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>7</b>
1.1 Plaguicidas: Situación agroquímica a nivel nacional e internacional .....	8
1.2 Incorporación de los plaguicidas en los ecosistemas .....	12
1.3 Situación de los anfibios .....	14
1.4 El modelo biológico: <i>Rhinella arenarum</i> .....	17
1.5 Estudio de la toxicidad mediante bioensayos.....	24
1.6 Evaluación de peligrosidad .....	25
1.7 Objetivos generales.....	29
1.8 Hipótesis .....	30
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....</b>	<b>31</b>
2.1 Obtención y mantenimiento del material biológico .....	32
2.2 Criterio de aceptación del material biológico .....	33
2.3 Bioensayos de toxicidad .....	34
2.4 Condiciones de los bioensayos .....	35
2.5 Registro de los datos .....	35
2.6 Análisis de datos.....	36
2.7 Evaluación de peligrosidad .....	37
<b>CAPÍTULO 3: TOXICIDAD DEL INGREDIENTE ACTIVO ENDOSULFÁN SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-LARVAL DE <i>RHINELLA ARENARUM</i> .....</b>	<b>39</b>
3.1 Introducción.....	40
3.2 Objetivos e Hipótesis.....	42
3.3 Materiales y métodos.....	43
3.3.1 Preparación de las soluciones de exposición .....	43
3.3.2 Bioensayos de toxicidad .....	43
3.3.3 Acumulación de endosulfán.....	44
3.4 Resultados .....	46
3.4.1 Exposición continua crónica a ES a partir del estadio de blástula (E4).....	46
3.4.2 Exposición continua crónica a ES a partir del estadio de opérculo completo (E25) .....	49
3.4.3 Exposición a ES por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios.....	53
3.4.4 Acumulación de endosulfán.....	56
3.4.5 Evaluación de peligrosidad .....	57
3.5 Discusión.....	58
3.6 Conclusiones .....	63

**CAPÍTULO 4: TOXICIDAD DEL INGREDIENTE ACTIVO Y DE UN FORMULADO COMERCIAL DE CIPERMETRINA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM* ..... 65**

4.1 Introducción.....	66
4.2 Objetivos e hipótesis .....	69
4.3 Materiales y métodos.....	70
4.3.1 Preparación de las soluciones de exposición .....	70
4.3.2 Bioensayos de toxicidad .....	71
4.4 Resultados .....	71
4.4.1 Exposición continua crónica al FC de CY a partir del estadio de blástula (E4) .....	72
4.4.2 Exposición continua crónica al FC y al i.a de CY a partir del estadio de opérculo completo (E25) .....	75
4.4.3 Exposición al FC de CY por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios .....	78
4.4.4 Evaluación de peligrosidad .....	81
4.5 Discusión.....	82
4.6 Conclusiones .....	87

**CAPÍTULO 5: TOXICIDAD DEL MAXIM® XL SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM* ..... 89**

5.1 Introducción.....	90
5.2 Objetivos e Hipótesis.....	94
5.3 Materiales y métodos.....	95
5.3.1 Preparación de las soluciones de exposición .....	95
5.3.2 Condiciones de los bioensayos.....	95
5.3.3 Análisis de los datos de los bioensayos post-metamorfosis.....	98
5.4 Resultados .....	98
5.4.1 Exposición continua crónica a Maxim® XL a partir del estadio de blástula temprana (E4) .....	98
5.4.2 Exposición continua crónica a Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25) .....	110
5.4.3 Exposición a Maxim® XL por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios .....	112
5.4.4 Evaluación de peligrosidad .....	114
5.5 Discusión.....	115
5.6 Conclusiones .....	117

**CAPÍTULO 6: TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ENDOSULFÁN Y CIPERMETRINA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM* ..... 119**

6.1 Introducción.....	120
6.2 Objetivos e Hipótesis.....	124
6.3 Materiales y métodos.....	125
6.3.1 Bioensayos de toxicidad .....	125
6.3.2 Preparación de las soluciones de exposición .....	125
6.3.3 Análisis de datos.....	126
6.4 Resultados .....	127
6.4.1 Exposición continua crónica de embriones a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las mezclas de ES y CY .....	127
6.4.2 Exposición continua crónica de larvas tempranas a partir del estadio de opérculo completo (E25) a las mezclas de ES y CY.....	134

6.5 Discusión.....	140
6.6 Conclusiones .....	143
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>150</b>
Anexo 1:.....	151
A) Los primeros estadios del desarrollo en <i>Bufo arenarum</i> .....	151
B) Estadios de la metamorfosis en <i>Bufo arenarum</i> (Anura) .....	156
ANEXO 2. Características fisicoquímicas del endosulfán .....	158
ANEXO 3. Características fisicoquímicas de la cipermetrina .....	160
ANEXO 4. Características fisicoquímicas de MAXIM® XL .....	162
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## Figuras

<b>Figura 1.1</b> Destinos posibles de los plaguicidas en el ambiente luego de su aplicación .....	13
<b>Figura 1.2</b> Categorización del estado de conservación de las especies de anfibios en el mundo según la IUCN (2013).....	15
<b>Figura 1.3</b> Porcentaje de especies de anfibios amenazadas según los distintos factores (IUCN, 2013). .....	16
<b>Figura 1.4</b> Imágen de un ejemplar adulto de <i>Rhinella arenarum</i> (sapo común sudamericano). 17	
<b>Figura 1.5</b> Reproducción de <i>Rhinella arenarum</i> (A) Llamada de apareamiento del macho; (B) amplexo; (C) ristra de huevos fecundados; (D) larvas de vida libre (renacuajos). .....	19
<b>Figura 1.6</b> Desarrollo de <i>Rhinella arenarum</i> .....	22
<b>Figura 1.7</b> Distribución de <i>Rhinella arenarum</i> en Argentina.....	23
<b>Figura 1.8</b> Componentes básicos de la evaluación de riesgo.....	26
<b>Figura 2.1</b> Imágenes obtenidas con cámara digital que muestran la secuencia del protocolo de ANFITOX para la obtención del material biológico.....	33
<b>Figura 3.1</b> Estructura química del endosulfán (ES) grado técnico. ....	40
<b>Figura 3.2</b> Curvas de sobrevivencia de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos en forma continua al ES a partir de la blástula (E4). ....	47
<b>Figura 3.3</b> Perfiles de toxicidad (curvas TOP) del ES con sus intervalos de confianza para embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos en forma continua a partir del estadio de blástula temprana (E4). ....	48
<b>Figura 3.4</b> Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a distintas concentraciones de ES a partir del estadio de blástula temprana (E4), a las 240 h.....	49
<b>Figura 3.5</b> Curvas de sobrevivencia de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua al ES a partir del estadio de opérculo completo (E25). ....	50
<b>Figura 3.6</b> Perfiles de toxicidad (curvas TOP) del ES con sus intervalos de confianza para larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25). ....	51
<b>Figura 3.7</b> Comparación de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25) a distintas concentraciones de ES (mg/L), a las 336 h. En la foto se observa talla reducida y subdesarrollo general en las larvas expuestas al ES, efecto que se ve incrementado con el aumento de la concentración del ES. ....	52
<b>Figura 3.8</b> Las barras representan el tiempo medio y el desvío estándar en completar la metamorfosis de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua al ES a partir del estadio de opérculo completo (E25). Dentro de cada ensayo, no se registraron DS entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$ ).....	53
<b>Figura 3.9</b> Susceptibilidad diferencial de <i>Rhinella arenarum</i> al ES. Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza a distintos tiempos de los embriones expuestos a pulsos de 24 h en diferentes estadios del desarrollo embrionario. ....	54

<b>Figura 3.10</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas expuestas a diferentes concentraciones de ES por pulsos de 24 h, durante el estadio de respuesta muscular (E18), fijados a las 96 h.....	55
<b>Figura 3.12</b> Comparación de la acumulación del ES para embriones y larvas en dos tiempos de exposición.....	57
<b>Figura 4.1</b> Estructura química de la molécula de cipermetrina (CY) grado técnico. ....	67
<b>Figura 4.2</b> Curvas de sobrevida de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a distintas concentraciones del FC de CY a partir del estadio de blástula (4).....	72
<b>Figura 4.3</b> Curvas TOP del FC de CY para embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos en forma continua a partir del estadio de blástula (E4). Aclaración: el PROBIT no permitió obtener los intervalos de confianza. ....	73
<b>Figura 4.4</b> Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a CY a partir del estadio de blástula (E4), a las 168 h, .....	74
<b>Figura 4.5</b> Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a CY a partir del estadio de blástula (E4), a las 336 h .....	74
<b>Figura 4.6</b> Curvas de sobrevida de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a: (a) ingrediente activo (i.a) de CY; (b) formulado comercial (FC) de CY.....	76
<b>Figura 4.7</b> Valores de CL 50 y sus intervalos de confianza del ingrediente activo (i.a) y del formulado comercial (FC) de cipermetrina (CY) obtenidos por exposición continua de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> a diferentes tiempos. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ....	77
<b>Figura 4.8</b> Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a distintas concentraciones de CY a las 192 h .....	78
<b>Figura 4.9</b> Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza de la cipermetrina (CY) a distintos tiempos post-exposición de los embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos por pulsos de 24 h en distintos estadios del desarrollo embrionario.....	79
<b>Figura 5.1</b> Estructura química de los principios activos del formulado comercial del fungicida Maxim® XL. ....	90
<b>Figura 5.2</b> Bioensayos post-metamorfosis.....	97
<b>Figura 5.3</b> Curvas de sobrevida de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a Maxim® XL a partir del estadio de blástula temprana (E4). ....	99
<b>Figura 5.4</b> Perfil de toxicidad (curvas TOP) con sus intervalos de confianza del Maxim® XL para embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos en forma continua a partir de estadio de blástula temprana (E4). ....	100
<b>Figura 5.5</b> Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a Maxim® XL a partir de blástula (E4).....	101
<b>Figura 5.6</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a Maxim® XL a partir de blástula (E4), a las 240 h .....	102
<b>Figura 5.8</b> Larvas prometamórficas y metamórficas control y expuestas en forma continua a 3 mg/L de Maxim® XL a partir del estadio de blástula (E4), a los 57 días de tratamiento. ....	103
<b>Figura 5.9</b> Larvas metamórficas expuestas en forma continua a partir del estadio de blástula (E4), a los 57 días de exposición al fungicida Maxim® XL.....	103

<b>Figura 5.7</b> Las barras respresentan el tiempo medio y el desvío estándar en completar la metamorfosis de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua al Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25). Dentro de cada ensayo, no se registraron DS entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $p>0,05$ ). .....	104
<b>Figura 5.10</b> Talla de los juveniles (a) y talla de las gónadas de los juveniles (b) de <i>Rhinella arenarum</i> al alcanzar los 60 días post-metamorfosis. ....	106
<b>Figura 5.11</b> Imágenes obtenidas por microscopía estereoscópica del complejo riñón-gónada de juveniles de <i>Rhinella arenarum</i> , a los 60 días post-metamorfosis, expuestos durante el desarrollo embrio-larval a distintas concentraciones del fungicida: .....	107
<b>Figura 5.12</b> Imágenes obtenidas por microscopía óptica del órgano de Bidder y las gónadas de los juveniles control de <i>Rhinella arenarum</i> : .....	108
<b>Figura 5.13</b> Imágenes obtenidas por microscopía óptica de las gónadas y el órgano de Bidder de los juveniles de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos durante el desarrollo embrio-larval a Maxim® XL .....	109
<b>Figura 5.14</b> Curvas de sobrevivida de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25). ....	110
<b>Figura 5.15</b> Perfil de toxicidad (curvas TOP) con sus intervalos de confianza del Maxim® XL para larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25). ....	111
<b>Figura 5.16</b> .....	112
<b>Figura 5.17</b> Comparación de las CLs 50 con sus intervalos de confianza de los embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a Maxim® XL por pulsos de 24 h en diferentes estadios del desarrollo embrionario, a distintos tiempos post-exposición.....	113
<b>Figura 5.18</b> Embriones expuestos a distintas concentraciones del fungicida.....	114
<b>Figura 6.1</b> Isoblograma de respuesta modelo para mezclas binarias, con comportamientos aditivo, sinérgico o antagónico.....	123
<b>Figura 6.2</b> Sobrevida de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las mezclas de ES y CY por 240 h.....	128
<b>Figura 6.3</b> Comparación de las CLs 50 con sus intervalos de confianza obtenidas de la mezcla de ES y CY con respecto a las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla (ESm, CYm) y de cada sustancia por separado, para embriones de <i>Rhinella arenarum</i> a distintos tiempos de exposición.....	129
<b>Figura 6.4</b> Isoblogramas para las CLs 50 (línea sólida) de las mezclas de ES y CY y a cada sustancia por separado, con sus intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas) para embriones de <i>Rhinella arenarum</i> a distintos tiempos de exposición.....	131
<b>Figura 6.5</b> Imágenes obtenidas por microscopía estereoscópica y MEB de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a partir del estadio de blástula a las mezclas de ES y CY, a las 168 h.....	133
<b>Figura 6.6</b> Sobrevida de las larvas de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a las mezclas de ES y CY por 240 h. ....	134
<b>Figura 6.7</b> Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza obtenida de la mezcla de ES y CY, de las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla y para cada sustancia por separado, de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> a distintos tiempos de exposición.....	135

**Figura 6.8** Isobogramas para las CLs 50 (línea sólida) con sus intervalos de confianza de 95/ (líneas punteadas) de las mezclas de ES y CY y de cada sustancia por separado, de larvas de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición. .... 138

## **Tablas**

**Tabla 3.1** Toxicidad y cocientes de peligrosidad (HQ) del ES para el desarrollo embrionario a partir del estadio de blástula (E4) y larval a partir del estadio de opérculo completo (E25) de *Rhinella arenarum*. .... 58

**Tabla 3.2** Datos publicados de toxicidad del ES sobre el desarrollo larval de diferentes anfibios. .... 59

**Tabla 4.1** Valores NOEC (mg CY/L) para efectos subletales y letales a distintos tiempos post tratamiento de los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos por pulsos de 24 h en distintos estadios del desarrollo embrionario. .... 81

**Tabla 4.2** Valores NOEC para efectos letales (mg CY/L) y cocientes de peligrosidad (HQ) para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h), y crónico (336 h) al ingrediente activo (i.a) y al formulado comercial (FC) de cipermetrina (CY). 82

**Tabla 4.5** Datos publicados de toxicidad de CY sobre el desarrollo larval de diferentes anfibios. .... 85

**Tabla 5.1** Tamaño de la muestra (N) inicial de los individuos metamorfoseados y final que fue analizado, y mortalidad durante el periodo post-metamórfico. .... 104

**Tabla 5.2** Valores NOEC para efectos letales (mg Maxim/L) y cocientes de de peligrosidad (HQ) del Maxim® XL para el desarrollo embrionario a partir del estadio de blástula (E4) y larval a partir del estadio de opérculo completo (E25) de *Rhinella arenarum* expuestos por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h), y crónico (336 y 504 h). .... 115

**Tabla 6.1** Datos de las CLs 50 de la mezcla de ES y CY, y de las CLs 50 de cada sustancia en la mezcla (ESm y CYm) y de cada sustancia por separado, para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula temprana (E4) a distintos tiempos de exposición. . 130

**Tabla 6.2** Valores de Índice S, Índices de aditividad (IA) y sus respectivos límites inferiores (LI) y superiores (LS), obtenidos mediante el análisis de los datos de la toxicidad de las mezclas de ES y CY en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula (E4) por 240 h ..... 132

**Tabla 6.3** Datos de las CLs 50 de la mezcla de ES y CY, y de las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla (ESm y CYm) y de cada sustancia por separado, de larvas de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición. .... 136

**Tabla 6.4** Valores de Índice S, Índices de aditividad (IA) y sus respectivos límites inferiores (LI) y superiores (LS), obtenidos mediante el análisis de los datos de la toxicidad de las mezclas de ES y CY en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del estadio de opérculo completo (E25) por 240 h ..... 139

## **GLOSARIO Y ABREVIATURAS**

**ANFITOX:** Batería de bioensayos de toxicidad estandarizados con embriones de anfibio.

**CEA:** Concentración Esperada en el Ambiente

**CE:** Concentración Efectiva.

**CL:** Concentración Letal.

**CL 10:** Concentración que produce el 10% de letalidad.

**CL 50-x:** Concentración que produce el 50% de letalidad en x cantidad de tiempo.

**CL 90:** Concentración que produce el 90% de letalidad.

**CY:** Cipermetrina.

**DS:** Diferencia Significativa.

**E:** Estadio del desarrollo según tablas en ANEXO 1.

**EER:** Evaluación Ecológica de Riesgo.

**ES:** Endosulfán.

**FC:** Formulado Comercial.

**HQ:** Cociente de Peligrosidad (del inglés: *Hazard Quotient*).

**IA:** Índice de Adividad.

**i.a:** Ingrediente Activo.

**IT:** Índice Teratogénico.

**LOC:** Nivel de preocupación (del inglés: *Level of Concern*).

**LOEC:** Mínima concentración que produce efecto observable (del inglés: *Lowest Observed Effect Concentration*).

**MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido.

**NOEC:** Máxima concentración que no produce efecto observable (del inglés: *No Observed Effect Concentration*).

**S:** Índice de mezclas, sumatoria de las actividades biológicas.

**SA:** Solución ANFITOX.

**TOPs:** Curvas de isoletalidad (del inglés: *Toxicity Profile curves*). Representación de los resultados de toxicidad en gráficos de concentración-respuesta en función del tiempo de los valores correspondientes a las concentraciones letales.

**UT:** Unidades de Toxicidad.

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1 Plaguicidas: Situación agroquímica a nivel nacional e internacional

*“Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras; y tienen el deber de preservarlo. El daño ambiental generará prioritariamente la obligación de recomponer, según lo establezca la ley”.*

Constitución Nacional de la República Argentina, Art. 41.

La creciente incidencia de actividades antrópicas a escala global está generando una enorme cantidad de residuos tóxicos que afectan el medio ambiente. En el caso particular de los agroecosistemas, los mismos han sido y continúan siendo expuestos desde hace muchas décadas a diversos tipos de plaguicidas, sin que se disponga de la información suficiente de los efectos que estas sustancias tienen sobre los organismos de vida silvestre, “no blanco” de la aplicación. Los plaguicidas son compuestos que se utilizan para prevenir, mitigar, repeler o controlar alguna plaga de origen animal o vegetal y vectores transmisores de enfermedades que afectan a la biota y al hombre. También se los incluye como productos fitosanitarios, pesticidas o agroquímicos. Existen más de 1.500 principios activos que, en distintas mezclas y concentraciones, generan más de 50.000 productos registrados en el mundo como plaguicidas (Villamil Lepori y col., 2013). En la agricultura, se utilizan herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y rodenticidas. El uso de los plaguicidas coincide con la "era química", que ha transformado la sociedad desde 1950. En lugares donde se practica el monocultivo intensivo, los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra las plagas. Se aplican durante la producción, el almacenamiento, el transporte, la distribución y la elaboración de productos agrícolas y sus derivados, a fin

de incrementar el rendimiento de los cultivos, en la mayoría de los casos sin conocimiento de los posibles efectos sinérgicos cuando se hacen aplicaciones simultáneas.

La explosión demográfica dio lugar a la expansión de la frontera agrícola y tecnificación de las prácticas agronómicas, lo que permitió aumentar la productividad si bien con los consecuentes y no bien controlados incrementos en la aplicación de agroquímicos en cultivos y pasturas. Los monocultivos y la aplicación continua de las mismas formulaciones de plaguicidas llevan a que éstos generen resistencias en los organismos que pretenden controlar favoreciendo la aparición de nuevas plagas y enfermedades (Herzog y Funderburk, 1986). De esta manera los productores, en ausencia de un plan estratégico, suelen incrementar tanto la cantidad como las dosis de aplicación. Todo esto hace que por un lado, la agricultura sea cada vez más costosa, y por otro, empobrece y enferma a agricultores y ecosistemas. Un caso bien documentado es el de glifosato en el que se comenzó con una sola aplicación de 3 L por Ha, a fines de los años '90, pasándose a más de 3 aplicaciones de más de 12 L por Ha y por año a mediados de la década del 2000 (Arias, 2005). Desde 1982 estos problemas vienen siendo denunciados por la Red de Acción en Plaguicidas (PAN), advirtiendo que productos agroquímicos prohibidos en su país de origen o donde nunca fue aprobado su uso, se utilizan intensamente en países del tercer mundo, causando 14.000 muertes al año (Wesseling y col., 2005). Tal es el caso de Colombia, donde más de 50 empresas importan por lo menos 510 productos químicos para uso agrícola, muchos de ellos prohibidos en países desarrollados. Esta enorme incidencia de muerte se debe principalmente a una insuficiente educación, manejo no seguro de agroquímicos e ingesta de alimentos contaminados (Papale, 2003).

Argentina es un país productor agrícola cuya economía primaria se basa en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, maní, frutas de pepita, cítricos, pasturas, hortalizas, papa, algodón, tabaco, frutas de carozo, caña de azúcar, arroz, vid, porotos

y otros. Un cambio agrario importante ocurrido en los últimos años en Argentina fue la introducción de la soja transgénica resistente al glifosato, lo que trajo un aumento notable en el rendimiento de las cosechas y de las superficies sembradas, existiendo actualmente alrededor de 25 millones de hectáreas de cultivos extensivos en siembra directa. Este cambio ha generado un crecimiento considerable en el uso de paquetes tecnológicos basados en la utilización de semillas modificadas genéticamente y un considerable volumen de plaguicidas, de aproximadamente 317,17 millones de Kg/L/año, entre los cuales se encuentran principalmente el herbicida glifosato e insecticidas como clorpirifos, endosulfán y cipermetrina (CASAFE, 2012).

Desde la década de los 40 a los 70, los plaguicidas organoclorados (POC) fueron ampliamente utilizados en Argentina al igual que en el resto del mundo. En la misma época, irrumpieron en el mercado los plaguicidas organofosforados (POF) y los carbámicos (PCar). El organismo responsable del registro de agroquímicos en Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad Vegetal y Calidad Agroalimentaria (SENASA), mediante diferentes resoluciones, fue restringiendo y prohibiendo el uso de los POC y ciertos POF y PCar, debido a sus conocidos efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente, así como por su elevada persistencia. Paulatinamente, se fueron incorporando otras clases de plaguicidas, como los insecticidas piretroides. La legislación relativa al registro, comercialización y aplicación de plaguicidas es incompleta, permisiva y obsoleta. A modo de ejemplo, basta citar que la legislación actual en nuestro país (Código Alimentario Argentino, Capítulo XII, Ley 18284, Decreto N°2126/71), permite la presencia, tanto en el agua potable de suministro público como envasada, de cantidades preestablecidas de diversas sustancias, entre ellas plaguicidas. Sin embargo, una rápida lectura de las mismas, nos permite apreciar que de las 26 sustancias permitidas en el agua, 16 son plaguicidas pero solo uno de ellos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) se encuentra permitido actualmente para su aplicación, el resto está prohibido, discontinuado o restringido. Este marco de referencia, implica

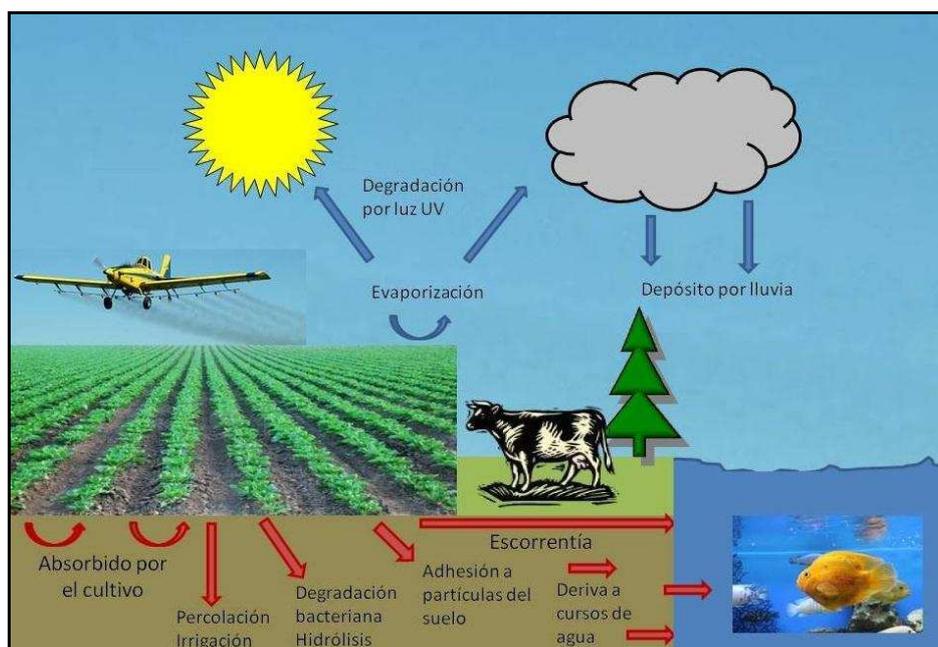
la necesidad de urgentes acciones tanto en lo referente al conocimiento actualizado del estado de nuestros acuíferos y aguas subterráneas, como de la adecuación y actualización de la legislación vigente en lo referente a plaguicidas (INTA, 2013). Asimismo, la legislación prohíbe las aplicaciones a distancias menores que los 500 a 1500 metros de donde habitan comunidades (Ley Nacional de Plaguicidas N° 20.418; Sistema Nacional de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos, Resolución del SENASA 500/2003, bajo el marco de la Ley de Política Ambiental Nacional N° 25.675; Ley N° 10.699 de la Provincia de Buenos Aires; Ley N° 3378 de la Provincia de Chaco; Ley N° 5665 de la Provincia de Mendoza; Ley N° 6291 de la Provincia de Tucumán), sin embargo no se contemplan las viviendas aisladas que persisten en las áreas rurales y que pueden ser alcanzadas por los plaguicidas. De la misma manera, el transporte de los plaguicidas por aire, agua y suelo contribuye a la dispersión más allá de donde son aplicados. En el caso de la comercialización, las restricciones son menores. Las formulaciones de plaguicidas se expenden en ferreterías, forrajerías, semillerías, casa de venta de artículos de limpieza, supermercados, etc. Se pueden comprar sin obligación de presentar prescripción profesional y la aplicación “segura” queda librada al productor o usuario. Otro aspecto de consideración es cuando no se aplican las buenas prácticas en el desecho de envases y líquidos remanentes luego de la aplicación de plaguicidas, lo cual se asocia a casos de intoxicación humana y elevada contaminación ambiental (Souza Casadinho, 2009). Las normativas establecen restricciones acerca de los cultivos a los cuales aplicar los plaguicidas, las concentraciones, las condiciones atmosféricas para la aplicación, etc. Sin embargo, al no existir supervisiones, queda librado a la buena voluntad, conocimiento y compromiso del aplicador acatar las normativas. Estos defectos en la legislación y en el control se suman a la deficiencia de medidas que contemplen los efectos de las mezclas de plaguicidas. En Brasil se da un fenómeno parecido en Argentina, un mercado desregulado (o de laxas regulaciones que solo considera la producción y no al ambiente y a la salud de la población), donde aumenta progresivamente la

superficie cultivada con transgénicos sufriendo un aumento explosivo del consumo de agroquímicos que lo llevo a alcanzar el primer lugar como consumidor mundial de plaguicidas. Para una superficie de 70 millones de Ha, Brasil tuvo una demanda de 850 millones de kg/L/año (Dossie Abrasco, 2012). En EEUU, el 2º mayor consumidor (el 3º es Argentina), los promedios de utilización son inferiores, reflejando mayores controles de las autoridades de fiscalización pero también tienden a un aumento contante que es inevitable dentro del sistema de la agricultura actual. Como se puede vislumbrar, el aumento del consumo de agroquímicos es un fenómeno mundial, y la problemática relacionada con su uso es compleja y dinámica incluyendo a varios actores en una complicada trama de relaciones.

## **1.2 Incorporación de los plaguicidas en los ecosistemas**

A fin de mejorar su rendimiento, la agricultura utiliza plaguicidas y fertilizantes que a menudo contaminan los ecosistemas y alimentos, lo que puede derivar en costos significativos a corto, mediano y largo plazo para la salud humana y también para el medio ambiente, reduciendo la biodiversidad de fauna y flora cultivada o silvestre y poniendo en peligro de extinción a las especies vulnerables. Desde los años 70, se reportan datos sobre el impacto ambiental, en los alimentos y en la salud humana en el país. Aunque los plaguicidas tienen sin duda efectos en la superficie terrestre, el principal medio de daño ecológico es el agua contaminada. Los plaguicidas pueden alcanzar los cuerpos de agua ya sea por las aplicaciones directas sobre los mismos como por la percolación entre las partículas del suelo, llegando a las napas de agua o por la deriva y escurrimiento durante o luego de su aplicación (Fig. 1.1). De la misma manera, los plaguicidas pueden quedar adsorbidos al suelo durante muchos años antes de ser removidos (Davies, 1990). Incluso, fueron informadas situaciones en las cuales los equipos de aplicación (mochilas y tanques de aplicaciones mecánicas) se lavaban en acequias, arroyos y ríos con la consecuente

contaminación del agua. Aunque la aplicación de los plaguicidas se restrinja a zonas determinadas, su dispersión es universal. Ya desde los 70 se ha demostrado la presencia de plaguicidas POC en el Sector Antártico Argentino y en la costa atlántica (García Fernández y col., 1979; Kang y col., 2012; Zhang y col., 2013). Los efectos de los plaguicidas en los ecosistemas puede darse a partir de los siguientes factores: el ingrediente activo (i.a) en la formulación del plaguicida, los contaminantes que existen como impurezas, los aditivos de la formulación (humectantes, diluyentes o solventes, aprestos, adhesivos, soluciones reguladoras, conservantes y emulsionantes), y el producto degradado que se forma durante la degradación química, microbiana o fotoquímica del i.a. El factor más importante que influye sobre la persistencia de un compuesto es la naturaleza química del mismo, es decir, sus propiedades: solubilidad en agua, volatilidad, estabilidad química y biológica (Hornsby y col., 1996).



**Figura 1.1** Destinos posibles de los plaguicidas en el ambiente luego de su aplicación (figura modificada a partir de Barbash y Resek, 1996).

Los dos mecanismos más importantes por los cuales la biota puede incorporar un xenobiótico en la cadena trófica son la bioconcentración y la biomagnificación (Gobas y Morrison, 2000). La bioconcentración es el proceso por el cual los

organismos, especialmente los acuáticos, pueden absorber y concentrar sustancias, como los plaguicidas, directamente del medio que los rodea (agua), a través de sus superficies respiratorias y de su piel. Cuando este proceso implica, además de la absorción directa desde el medio, la absorción de las sustancias en el tracto digestivo a partir de los alimentos, se lo conoce como bioacumulación. Estos procesos ocurren cuando un organismo absorbe una cantidad de sustancia mayor a la que puede eliminar y por ello la sustancia se acumula dentro de su cuerpo. Dentro del organismo, el principal "sumidero" de algunos plaguicidas es el tejido graso (lípidos). Algunos plaguicidas, como el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), son lipofílicos y se acumulan en el tejido graso. Otros plaguicidas, como el glifosato, se metabolizan y se eliminan a través de las excretas.

Si bien los valores de coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) reflejan el potencial de un compuesto químico para atravesar las membranas celulares de un organismo constituidas por una bicapa lipídica a través de un mecanismo de difusión pasiva, no necesariamente indican su capacidad de acumulación en el tejido adiposo ya que el mismo puede llegar a metabolizarse. La acumulación puede medirse a través de la bioconcentración la cual expresa la relación entre la concentración de la sustancia en un organismo y la concentración de la misma en el ambiente. La biomagnificación es el proceso por el cual una sustancia tóxica se presenta en bajas concentraciones en organismos al principio de la cadena trófica y en mayor proporción a medida que se asciende en la misma. Esto significa que las presas tienen menor concentración de sustancias tóxicas que sus predadores.

### **1.3 Situación de los anfibios**

Desde 1969 se viene informando una disminución alarmante de las poblaciones de anfibios en tamaño y número de individuos a nivel global (Relyea y col., 2005; Hayes y col., 2006). En este sentido, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2013) reconoce 6 categorías según el estado

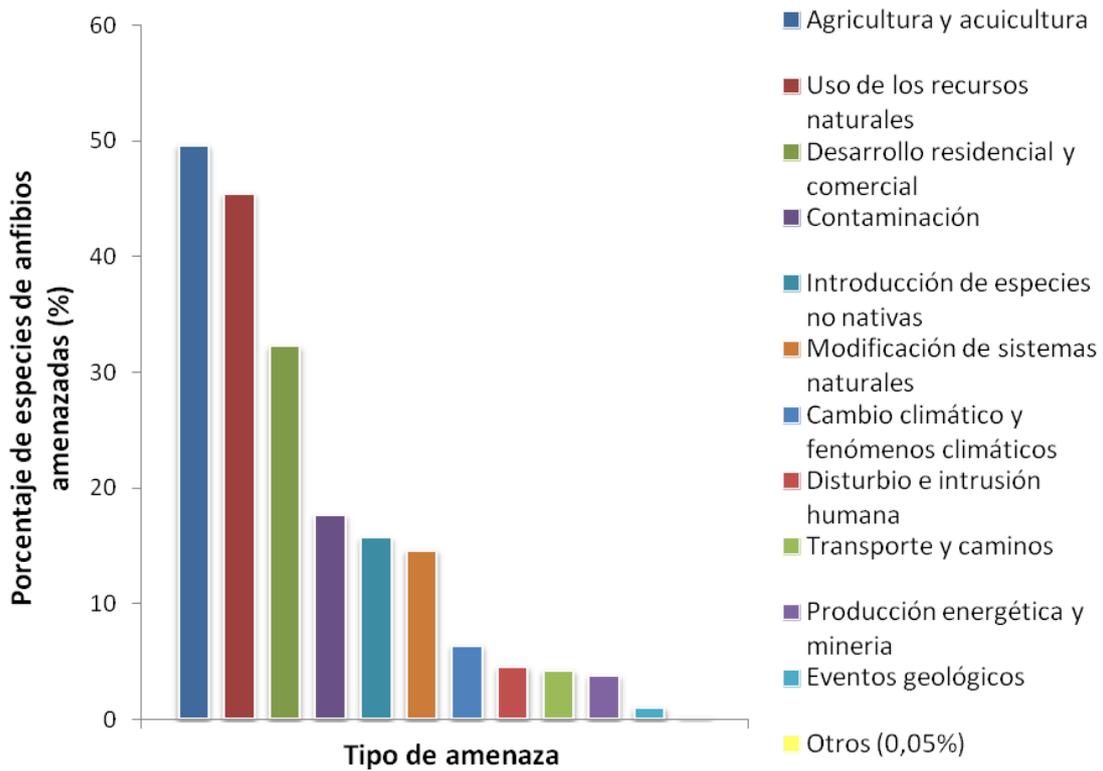
de conservación de los anfibios basado en antecedentes científico-técnicos, del que se desprende que el 36,5 % de las especies se encuentran bajo algún grado de amenaza (Fig. 1.2).

### Situación mundial de los anfibios



**Figura 1.2** Categorización del estado de conservación de las especies de anfibios en el mundo según la IUCN (2013).

Existen diversos factores sobre esta disminución que, según Collins y Storfer (2003), pueden ser clasificados en dos grupos. El primero incluye factores generales críticos para la biodiversidad como destrucción, modificación y fragmentación del hábitat, competencia o predación por especies introducidas y sobreexplotación. Sin embargo, las poblaciones de anfibios han sufrido declives en ambientes naturales remotos sin perturbaciones aparentes. El segundo grupo incluye factores más complejos como el cambio climático, el incremento en la radiación UV-B, los contaminantes químicos como plaguicidas, fertilizantes y metales pesados, enfermedades infecciosas y malformaciones. Según la IUCN (2013), el factor de riesgo más importante para los anfibios es la actividad agrícola y la acuicultura (Fig. 1.3). Los mecanismos subyacentes a estos factores son complejos y pueden estar interactuando sinérgicamente con los factores del primer grupo exacerbando la caída en los números poblacionales.



**Figura 1.3** Porcentaje de especies de anfibios amenazadas según los distintos factores (IUCN, 2013).

Los anfibios ocupan un lugar estratégico en las tramas tróficas, con formas acuáticas y terrestres, y debido a su alta susceptibilidad, resultan muy buenos indicadores del estado de salud del ambiente (Welsh y Ollivier, 1998). La piel de los adultos, los epitelios de revestimiento de las larvas y las membranas de los huevos son altamente permeables a los contaminantes (Croteau y col., 2008). En general, los anfibios constituyen un taxón particularmente afectado por la aplicación de muchos plaguicidas en los campos agrícolas, ya que éstos se acumulan en charcas temporales y resultan en altas concentraciones durante la primavera y el verano, coincidiendo con la época reproductiva y las etapas altamente susceptibles del ciclo de vida de estos organismos (Mann y col., 2009).

Teniendo en cuenta la importancia de los anfibios en los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres, la declinación de sus poblaciones puede tener consecuencias a gran escala a través de alteraciones en las redes alimentarias

(Regester y col., 2008). En este contexto surge la importancia de realizar estudios con anfibios principalmente en sus etapas de mayor sensibilidad, el desarrollo embrionario y larval, evaluando la toxicidad de sustancias, como un modelo para obtener información útil para su protección (Boyer y Grue, 1995; Herkovits y Pérez-Coll, 2003).

#### 1.4 El modelo biológico: *Rhinella arenarum*



**Figura 1.4** Imágen de un ejemplar adulto de *Rhinella arenarum* (sapo común sudamericano).

**Clasificación taxonómica de la especie** (según Hensel 1867)

**Phyllum:** Chordata

**Clase:** Amphibia

**Subclase:** Lissamphibia

**Orden:** Anura

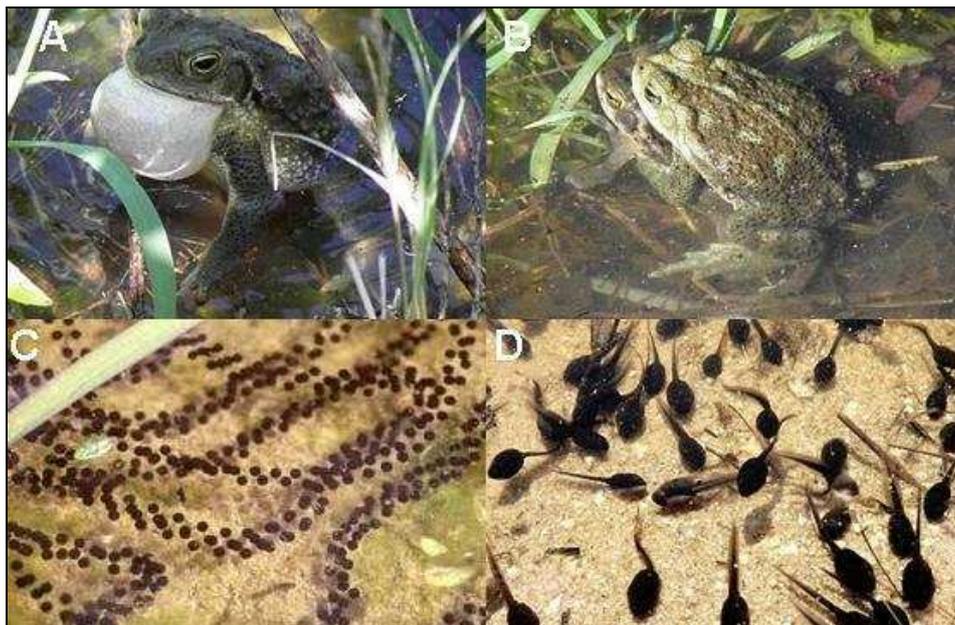
**Familia:** Bufonidae

**Género:** *Rhinella*

**Especie:** *Rhinella arenarum*

*Rhinella (Bufo) arenarum*, vulgarmente conocido como sapo común sudamericano (Fig. 1.4), es una especie de anfibio anuro que se distribuye ampliamente en Sudamérica. Mide aproximadamente unos 15 cm de longitud hocico-cloaca, presentando el dorso de color marrón verdoso con verrugas y el vientre de color claro.

Debido a que su piel es altamente permeable, suelen ser más susceptibles a los contaminantes en el medio ambiente que otros organismos como las aves o los mamíferos. En invierno se ocultan en refugios naturales o bajo tierra. Los grandes cuerpos grasos son utilizados para cubrir sus limitadas necesidades metabólicas durante la hibernación. Se alimentan de insectos, lombrices y crustáceos terrestres. En concordancia con un ciclo sexual potencialmente continuo, la reproducción y puesta se extienden durante gran parte del año pero mayoritariamente ocurre durante la primavera y principios del verano, lo cual coincide con la estación de lluvias. En la Figura 1.5 se muestra el proceso reproductivo de esta especie. Las hembras son atraídas por la voz de los machos. El amplexo o abrazo se realiza en el agua. Éstas expulsan sus huevos por el estímulo que ejerce el macho durante el amplexo. Los huevos, pequeños y oscuros, son expulsados en cordones gelatinosos mientras son fecundados externamente por los machos. Un promedio de 4000-5000 huevos es frecuente para la puesta de una hembra madura en una temporada reproductiva (Cei, 1980; Gallardo, 1987).



**Figura 1.5** Reproducción de *Rhinella arenarum* (A) Llamada de apareamiento del macho; (B) amplexo; (C) ristra de huevos fecundados; (D) larvas de vida libre (renacuajos).

*R. arenarum* posee huevos de características heterolecíticas ya que el vitelo se acumula en mayor cantidad en el polo inferior (polo vegetativo), si bien queda mezclado todavía con citoplasma. Condición inversa se encuentra en el polo animal, en el que se ubica una mayor cantidad de citoplasma mezclado con escasa cantidad de vitelo. Durante la fecundación se produce la rotación cortical formando la “media luna gris”. El desarrollo embrionario comienza con la primera división mitótica del oocito recientemente fecundado dando lugar a dos blastómeros. Al inicio de la segmentación se producen dos divisiones meridionales iguales. Luego ocurre la primera división ecuatorial, desplazada hacia el polo animal, por lo que se produce una desigualdad en el tamaño de los blastómeros de los polos (segmentación holoblástica desigual), formando micrómeros y macrómeros. Los micrómeros, células más ricas en citoplasma, se dividen con un ritmo bastante más acelerado que las del polo vegetativo, macrómeros, abundantes en vitelo (Pisanó, 1977).

Del Conte y Sirlin (1951) publicaron un trabajo en el que incluyen una tabla de identificación de los estadios desde la fecundación del oocito (E1) hasta la finalización del desarrollo embrionario (E25) coincidente con el inicio de la etapa larval, representada por un organismo de vida libre con branquias internas que comienza a alimentarse (Anexo 1A).

El embrión de dos blastómeros (E3) continúa experimentando divisiones mitóticas, sin aumento en el tamaño ni cambios en su forma esférica, pasando por diferentes estadios en los que predomina la división celular. Este proceso es conocido como segmentación (E3 a E9). La blástula que se forma como consecuencia de la segmentación es una blástula con un verdadero blastocele (celoblástula), cuya pared tiene por lo menos dos capas de células, siendo considerablemente mayores las del polo vegetativo. Estas células impiden una invaginación completa durante la gastrulación.

Entre los E10 y E12 transcurre la gastrulación, proceso en el cual es muy importante el desplazamiento de células hacia el interior del embrión, quedando determinado un organismo triblástico (endodermo, mesodermo y ectodermo), con tres capas de células a partir de las cuales se formarán los futuros órganos y tejidos. La gastrulación comienza gracias a la invaginación, un movimiento de rotación interna que involucra al endodermo y mesodermo, conocido como rotación vegetativa. La involución de células emigrantes formará el labio dorsal del blastoporo. Mientras que continúan dichos movimientos de invaginación e involución, la epibolia de las células del anillo germinal acabará aislando a las células del vitelo dentro de los límites del blastoporo, en un área que se conoce como tapón vitelino (Gilbert, 2005).

Posteriormente ocurre la neurulación (E13-E16) que culmina con la formación del tubo neural, el incipiente sistema nervioso del embrión. Conjuntamente con la neurulación, el embrión va adquiriendo simetría bilateral y va elongándose.

A partir del E17, los embriones eclosionan espontáneamente de la membrana vitelina y de la gelatina y posteriormente adquieren movimientos expresados mediante contracciones musculares (E18).

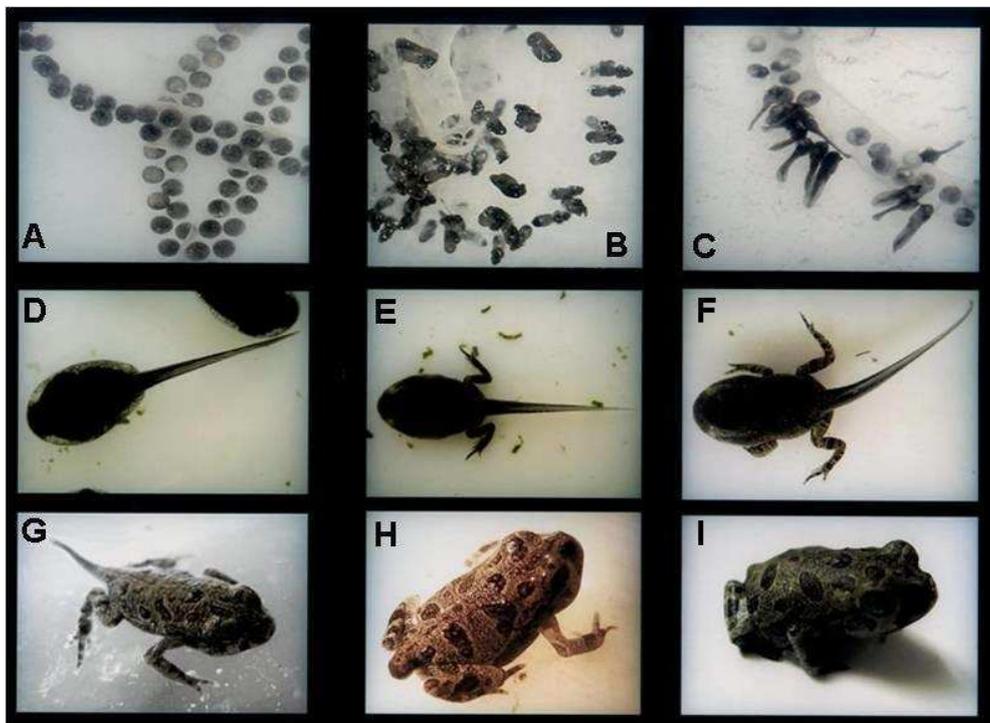
A partir del E18 su cuerpo comienza a alargarse, se diferencia más netamente el cuerpo de la cola y van transformándose en embriones-larvas de vida libre.

El funcionamiento del sistema cardiovascular se pone de manifiesto al observarse el latido cardíaco en el E19 y la circulación de la sangre se observa por primera vez en las branquias (E20). Posteriormente se abre la boca (E21), si bien todavía no se alimenta a partir de nutrientes del medio externo sino que utilizan sus reservas internas (plaquetas vitelinas).

En el E22, la circulación ya puede observarse en la aleta y a partir del E23 y hasta el E25 se va formando la cámara opercular, por lo que las branquias pasan a ser internas.

Al alcanzar el E25, las larvas miden aproximadamente 10 mm de longitud, son de cuerpo claviforme y coloración negruzca. A partir de esta etapa del desarrollo, las larvas buscan activamente su alimento, aumentan de tamaño y culminan su desarrollo, luego de transitar por los distintos estadios larvales hasta completar la metamorfosis, transformándose en pequeños juveniles, semejantes a los adultos pero sin madurez sexual. La duración del desarrollo varía con las condiciones de temperatura y fotoperíodo, siendo más corto al aumentar las dos variables. El desarrollo embrionario temprano desde la formación de los 2 blastómeros hasta el desarrollo de una larva de vida libre con branquias internas (E25), a 18-20 °C puede tardar aproximadamente de 7 a 10 días. A partir de este momento comienza el desarrollo larval, el cual es más variable dependiendo de las condiciones externas como disponibilidad de alimento y luz, pudiendo demorar un par de meses. El periodo larval se extiende desde la aparición del esbozo de los miembros posteriores hasta la desaparición completa de la cola. Durante la prometamorfosis, los organismos buscan activamente su alimento y

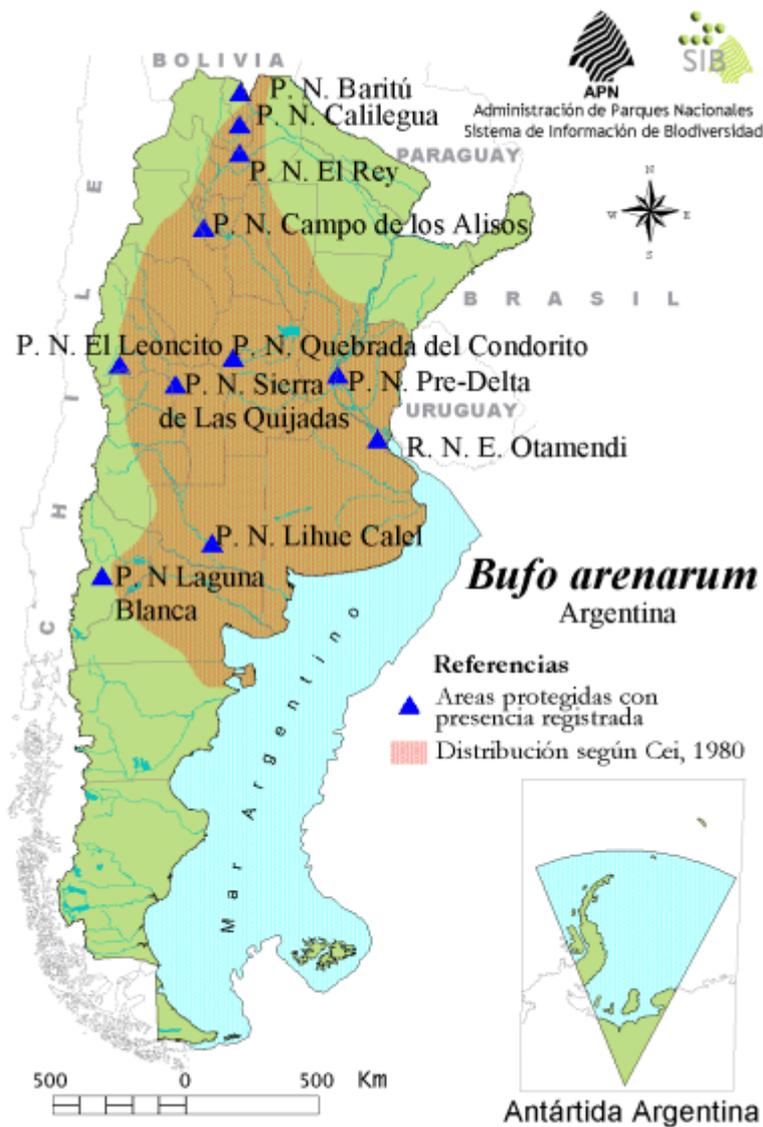
aumentan de tamaño a la vez que se desarrollan los miembros posteriores. El clímax metamórfico se caracteriza por la emergencia y el desarrollo de los miembros anteriores y la reabsorción de la cola (Fig. 1.6). Los estadios larvales de esta especie fueron clasificados por Echeverría y Fiorito de López (1981) (anexo 1B).



**Figura 1.6** Desarrollo de *Rhinella arenarum* (Fotos tomadas por De Bonis, 2005): (A) huevos; (B) embriones dentro de la ristra gelatinosa; (C) embriones recién eclosionados que permanecen fijados a la ristra; (D) larva premetamórfica; (E) larva prometamórfica, miembros posteriores en desarrollo; (F) larva metamórfica, miembros anteriores en desarrollo; (G) larva metamórfica, cola reabsorbiéndose; (H, I) juveniles recién metamorfoseados.

Estos anfibios poseen una amplia distribución, tanto en ambientes húmedos como áridos siempre que exista un cuerpo de agua cercano. En Argentina, se encuentran desde el norte de la provincia de Jujuy hasta el río Chubut, cerca de la costa patagónica, hacia el oeste alcanzan la frontera sur del Neuquén, cerca del río Limay (Fig. 1.7). También se encuentran en el sur de Brasil, en Uruguay y Bolivia (Cochabamba) (Ceï, 1980; Gallardo, 1987). Habitan preferentemente ambientes de

bosques bajos, estepas y pastizales. Esta especie está adaptada no sólo a la vida en distintas condiciones térmicas sino también a distintas situaciones de humedad y altitud. Habita desde regiones de clima tropical a regiones de temperaturas cercanas a 0°C y zonas húmedas de más de 1000 mm anuales de precipitación a zonas secas con menos de 500 mm. En la cordillera alcanza los 1500 m en latitudes como Mendoza y hasta 2400 m en latitudes más al norte como Catamarca o La Rioja.



**Figura 1.7** Distribución de *Rhinella arenarum* en Argentina. Fuente: Sistema de Información de Biodiversidad (SIB) de la Administración de Parques Nacionales.

## 1.5 Estudio de la toxicidad mediante bioensayos

Una vez que los agroquímicos abandonan el sitio de aplicación y alcanzan los cuerpos de agua pueden ingresar a los organismo *no blanco* y causar efectos tóxicos, pasando de ser compuestos para la “protección del cultivo” y “control de plagas” a contaminantes ambientales (Battaglin y Fairchild, 2002). La necesidad de contar con una rápida evaluación de la toxicidad acuática e información útil para la protección de la biota ha llevado a desarrollar bioensayos estandarizados de laboratorio que puedan ser utilizados como rutina. Los bioensayos de toxicidad presentan como ventaja que demandan poco equipamiento y dinero (Fulladosa y col., 2005). Asimismo, los organismos utilizados en los bioensayos requieren de una sensibilidad importante. Hay muchas especies que se utilizan incluidas las bacterias, protozoos, algas, crustáceos, peces y anfibios (USEPA, 1993).

Los anfibios son apropiados para la realización de ensayos de toxicidad debido a que ocupan un lugar clave en las cadenas tróficas, viven en o cerca de reservorios de agua por lo que están directa o indirectamente afectados por los contaminantes acuáticos. Asimismo, presentan una elevada sensibilidad a agentes fisicoquímicos principalmente durante sus fases embrionarias y larvales y la metamorfosis (Boyer y Grue, 1995; Herkovits y Pérez-Coll, 2003). En este sentido, en muchos estudios se han evaluado los efectos letales y subletales producidos por diferentes plaguicidas en las etapas más susceptibles en la vida de los anfibios, el desarrollo embrio-larval (Berrill y col., 1993; Bernabó y col., 2008; Harris y col., 2000; Brodeur y col., 2009; Aronzon y col., 2011; Svartz y col., 2012).

El ANFITOX es un conjunto de ensayos estandarizados con embriones y larvas de anfibios empleando *Rhinella arenarum* como organismo de ensayo, que se desarrolló a partir de una amplia experiencia en la evaluación de la toxicidad de diferentes matrices (Herkovits y Pérez-Coll, 1999, 2003; Herkovits y col., 2002). El antecedente del ANFITOX fue el FETAX, en el que se demostró la utilidad del

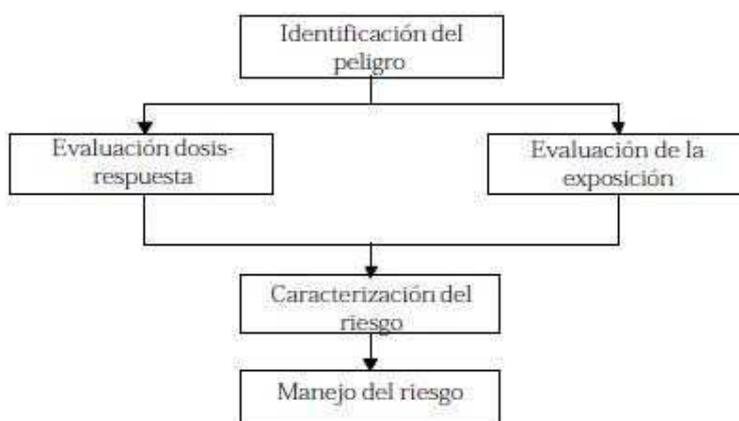
desarrollo embrionario de otro anfibio (*Xenopus laevis*) como modelo para evaluar efectos letales y subletales en organismos *no blanco* (ASTM, 1993; Morgan y col., 1996; Richards y Cole, 2006). Las exposiciones subletales son útiles en la evaluación de la sensibilidad a un contaminante, los cuales pueden producir efectos adversos como aumento en la vulnerabilidad a la predación y reducción del *fitness* que eventualmente pueden afectar a las poblaciones de organismos acuáticos (Little y col., 1990). Estos efectos pueden tener un impacto y pueden ser más severos que los efectos directos por mortalidad. Por otro lado, la exposición por pulsos de 24 h, utilizando concentraciones altas, brinda información importante sobre los efectos tóxicos en la biota en casos de emergencia ambiental. Asimismo, esta modalidad de bioensayos provee información adicional sobre los mecanismos de acción del contaminante sobre un estadio particular del ciclo de vida de una especie.

Metodológicamente también son muy útiles las curvas TOPs (del inglés *Toxicity Profile curves*) curvas de isoletalidad que consisten en la representación de los resultados de toxicidad expresados como variación de las concentraciones letales (CLs) en función del tiempo de exposición. Estos perfiles proveen mayor información y comprensión de los umbrales de toxicidad en función de la concentración y tiempo de exposición a una determinada muestra o sustancia (ver por ej. Herkovits y col., 1997).

## **1.6 Evaluación de peligrosidad**

La evaluación de peligrosidad (*hazard assessment*) de una sustancia está comprendida dentro del marco general de la evaluación de riesgo (*risk assessment*). La evaluación ecológica de riesgo (EER) se define como "un proceso que evalúa la probabilidad de que se produzcan efectos ecológicos adversos como resultado de la exposición a una o más sustancias" (USEPA, 1992). El riesgo no existe a menos que: (1) el contaminante tenga la capacidad de causar un efecto adverso y (2) una planta o

animal puedan entrar en contacto con un contaminante el tiempo suficiente y a una concentración suficientemente alta como para que provoque un efecto adverso. Las actividades antrópicas causan cambios en el ambiente que en ocasiones son de gran importancia y que en última instancia van en detrimento de los propios seres humanos, ya que acaban con los bienes y servicios que se obtienen de la naturaleza, afectando así a futuras generaciones. En los últimos años, la EER se ha convertido en una herramienta muy útil para desarrollar programas de protección ambiental pues sirve para apoyar la toma de decisiones para el manejo del ambiente. El riesgo ambiental es estimado a partir de la relación entre la exposición y los efectos (tomando en cuenta un cierto grado de incertidumbre) de una manera muy parecida a la que se hace en la evaluación de los riesgos para la salud humana (Evans y col., 2003). Los efectos se estiman a partir de la información generada en laboratorio, calculando las cantidades de químicos que se liberan al ambiente y usando modelos para estimar el destino y la concentración de los mismos en los diferentes componentes del ambiente. Los componentes básicos de una evaluación de riesgo, que se explicarán con mayor detalle más adelante, incluyen: la identificación del peligro, la evaluación de la exposición, la evaluación dosis-respuesta, y la caracterización del riesgo (NAS, 1983). Estos cuatro elementos se relacionan entre sí como se muestra en la figura 1.8:



**Figura 1.8** Componentes básicos de la evaluación de riesgo (tomado de Evans y col., 2003).

Hay dos categorías de evaluación de riesgo: retroactiva y predictiva. En la evaluación retroactiva, se toman en cuenta las condiciones existentes como la contaminación de una cuenca por filtraciones, mientras que la predictiva parte de condiciones propuestas o planeadas como la planificación de una descarga de desechos cloacales. En ciertas situaciones, la evaluación de riesgo predictiva también puede lidiar con consecuencias futuras de una situación existente. Por ejemplo, una evaluación predictiva podría estimar las consecuencias de una pluma de contaminación en aguas subterráneas que emergería en un arroyo o llegaría a pozos de agua potable (Newman, 1998).

El conocimiento que se tiene de las respuestas de los ecosistemas ante un estrés ambiental, su capacidad de recuperación/adaptación y los procesos involucrados en ello, es en general poco profundo y por ende está plagado de incertidumbre (Evans y col., 2003). Así, medir el cambio en estos sistemas complejos y estocásticos, que están continuamente en transición, no es una tarea fácil. La EER tiene cuatro objetivos principales:

- Determinar si hay probabilidad de que se produzcan efectos nocivos en la biota expuesta a un sitio con compuestos químicos peligrosos; si estos efectos significan un riesgo significativo.
- Si hay un riesgo significativo, calcular un nivel de limpieza de protección que reduzca el riesgo.
- Determinar el potencial impacto de las actividades de limpieza en el hábitat, plantas y animales.
- Proveer información que pueda ser usada como línea de base para programas de monitoreo biológico a largo plazo a fin de determinar si la limpieza es efectiva.

El desarrollo de una EER se divide en tres etapas (USEPA, 1998):

**1) Definición del problema:** se examinan los factores causantes del estrés ambiental y los efectos ecológicos potenciales así como las características del ecosistema en riesgo. Se elabora la descripción del sitio, se seleccionan los indicadores apropiados y se desarrollan las hipótesis que tratarán de ser demostradas a lo largo de la evaluación. Asimismo, se identifican las fuentes y los faltantes de información. Finalmente se desarrolla un modelo conceptual de las rutas de exposición a la sustancia química y se definen los objetivos y preguntas para la evaluación del riesgo.

**2) Análisis de riesgo:** comprende la caracterización de la exposición y de los efectos ecológicos. Debido a diferencias fundamentales entre los métodos para caracterizar los efectos sobre la salud humana y los impactos en los ecosistemas, las evaluaciones de riesgo basadas en individuos tienen un uso muy limitado en las evaluaciones de riesgo ambiental (por ejemplo, al evaluar especies en peligro de extinción). En las EER los efectos deben ser evaluados a nivel de poblaciones o niveles jerárquicos incluso más altos, como las comunidades. Aunque las pruebas toxicológicas miden efectos en individuos, las consecuencias a nivel de poblaciones son las más importantes. Por ejemplo, si un tóxico disminuye la capacidad reproductiva o la supervivencia de las hembras de una especie, esto puede afectar el patrón de crecimiento poblacional. Más aun, si se trata de una especie que es normalmente depredada por otras dentro de la comunidad, la afectación de esta especie puede alterar sin duda las cadenas tróficas del ecosistema.

**3) Caracterización del riesgo:** en esta etapa se integra la información de exposición y de efectos, se describen las fuentes de incertidumbre y se evalúa qué tan significativos son los cambios ecológicos pronosticados.

En la evaluación de peligrosidad se compara la concentración de un compuesto esperada en el ambiente con algún valor umbral de efecto, con la intención de decidir si: (1) la situación es segura, (2) la situación no es segura o (3) no hay suficiente información para tomar una decisión.

### **Estimación de peligrosidad:**

La peligrosidad puede ser estimada numéricamente utilizando el cociente de peligro, HQ (*Hazard Quotient*). El HQ es un parámetro que puede ser utilizado para estimar si riesgo a padecer efectos adversos debidos a un contaminante en cuestión (USEPA, 1998). El HQ se calcula mediante la ecuación:

$$HQ = CEA / \text{valor de referencia}$$

CEA: concentración (máxima) esperada en el ambiente, en un sitio; por ej. cantidad de residuos de un plaguicida en el suelo, en el sedimento o en el agua (por ej: mg contaminante/kg peso o mg/L)

Valor de referencia = es generalmente un nivel de concentración al cual no se observan efectos adversos (Ej: NOEC); si la concentración del contaminante es o está por debajo de ese nivel, el contaminante probablemente no produzca efectos adversos.

Luego del cálculo del HQ, se compara con un nivel de referencia (LOC, del inglés *level of concern*) Si:

HQ > 1 existe riesgo a que los efectos adversos se produzcan debido a la exposición al contaminante.

HQ ≤ 1 no existe riesgo a que los efectos adversos se produzcan debido a la exposición al contaminante.

Si un HQ calculado para un determinado contaminante es mayor a uno, ese contaminante es referido como un Contaminante de Potencial Preocupación Ecológica (COPEC). El valor de HQ es una aproximación y valoración inicial de una sustancia bajo el marco de una evaluación de riesgo ecológica.

## **1.7 Objetivos generales**

- ✓ Evaluar los efectos tóxicos de tres sustancias frecuentemente presentes en los agroecosistemas de nuestro país: endosulfán, cipermetrina y un fungicida comercial (Maxim® XL), solos y en mezclas, durante el desarrollo embrionario,

larval y la metamorfosis de *Rhinella arenarum*, mediante bioensayos estandarizados.

- ✓ Comparar las concentraciones tóxicas obtenidas (letales y subletales) con las concentraciones esperadas en el ambiente a partir de la aplicación de los plaguicidas, a fin de realizar una evaluación de peligrosidad de estos compuestos químicos para organismos *no blanco* como en este caso, los anfibios en su desarrollo temprano, pudiendo esta información perfeccionar los criterios aplicados en estudios de evaluación de riesgo.

Los objetivos fueron planteados con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis:

## 1.8 Hipótesis

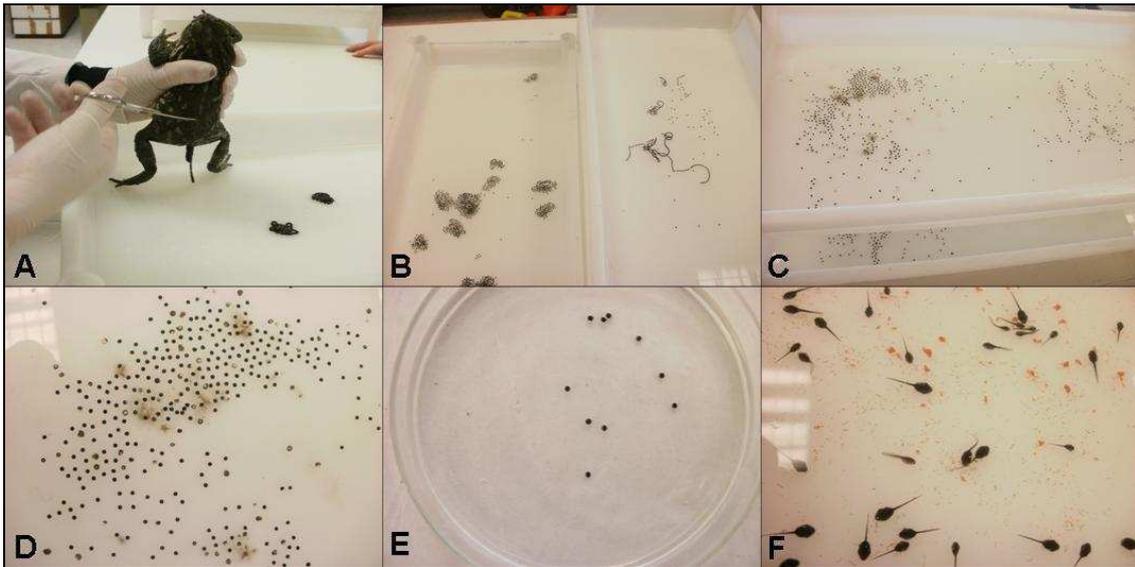
- ✓ El endosulfán, la cipermetrina y el Maxim® XL producen efectos tóxicos sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum* que se manifiestan mediante efectos letales y subletales, entre estos últimos malformaciones, alteraciones en el comportamiento y en el proceso de metamorfosis.
- ✓ El endosulfán, la cipermetrina y el Maxim® XL tienen una toxicidad dependiente del estadio embrionario/larval en que se expone a los organismos, registrándose estadios del desarrollo más susceptibles que otros.
- ✓ El endosulfán, la cipermetrina y el Maxim® XL presentan un potencial de peligrosidad para las poblaciones de *R. arenarum*.

# **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**

## 2.1 Obtención y mantenimiento del material biológico

Los ejemplares adultos de *Rhinella arenarum* (200-250 g) fueron recolectados en un sitio no impactado de la localidad de Lobos, provincia de Buenos Aires, Argentina (35° 11' S; 59° 05' O). Se seleccionaron sapos saludables y sexualmente maduros. El mantenimiento de los animales, la ovulación y la obtención de los embriones se realizó de acuerdo al protocolo ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll, 1999). Se indujo la ovulación de las hembras por inyección intraperitoneal de hipófisis homóloga (Pisanó, 1956), con un refuerzo de 5000 UI de hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) (donada por el Instituto Argentino Massone). Las hembras se mantuvieron a 25°C durante 48 h antes de la estimulación. Luego de 16 a 24 horas post-inducción, las hembras comenzaron a ovular. En ese momento las hembras fueron “exprimidas” mecánicamente por suave compresión abdominal con el fin de completar la expulsión de los oocitos que son liberados dentro de las ristras de gelatina. Tanto la hembra como el macho fueron desmedulados. Los oocitos remanentes en los ovisacos fueron extraídos por disección de los ovisacos y colocados en bandejas plásticas apenas humedecidas con Solución ANFITOX (SA) (Fig. 2.1). Composición SA: NaCl 36 mg/L, KCl 0,5 mg, CaCl<sub>2</sub> 1 mg, NaHCO<sub>3</sub> 2 mg/L preparada en agua destilada, asegurando la disponibilidad de oxígeno (Herkovits y col., 2002). La fecundación de los oocitos se realizó pincelándolos con una suspensión de macerado testicular preparado en 1 mL de SA. La viabilidad de los espermatozoides fue confirmada observando su movimiento y morfología bajo microscopio óptico. Para los estudios de teratogénesis en estadios tempranos, los embriones fueron degelatinizados con una solución de ácido tioglicólico al 2% en SA neutralizada con NaOH a pH 7,2-7,4, luego de lo cual, los oocitos, se lavaron con abundante SA a fin de evitar la continuación de los efectos del ácido tioglicólico. Para los estudios realizados con embriones en estadios posteclosionales (a partir de E18, Del Conte y Sirlin, 1951), se emplearon los embriones emergidos espontáneamente de

la membrana vitelina y de la gelatina. El material biológico se mantuvo en SA hasta el estadio en que fueron utilizados para los bioensayos. La solución fue renovada diariamente, momento en el cual los embriones detenidos o muertos fueron retirados de las bandejas. La SA fue renovada en forma total día por medio y monitoreada semanalmente, para asegurarse que los valores de pH fueran aceptables ( $7 \pm 0,5$ ). Los estadios embrionarios fueron clasificados de acuerdo a Del Conte y Sirlin (1951).



**Figura 2.1** Imágenes obtenidas con cámara digital que muestran la secuencia del protocolo de ANFITOX para la obtención del material biológico: (A) hembra de *Rhinella arenarum* expulsando los oocitos; (B) huevos recién fecundados inmersos en la gelatina; (C, D) huevos fecundados luego de la desgelatinización; (E) huevos seleccionados dispuestos en las placas de bioensayos en el experimento; (F) larvas en estadios premetamórficos alimentándose.

## 2.2 Criterio de aceptación del material biológico

La calidad y fertilidad de los huevos fueron inspeccionadas, considerando aceptable una tasa de fecundación mayor que el 75% y más de un 70% de sobrevivencia de embriones normales al alcanzar el estadio de néurula (E13) (Herkovits y Pérez-Coll, 1999).

## 2.3 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron ensayos preliminares utilizando 5 concentraciones con un factor de dilución de 0,1 a fin de acotar las concentraciones finales. Los rangos de concentración en los ensayos definitivos fueron los adecuados para estimar las distintas concentraciones letales y subletales a fin de obtener las curvas de toxicidad de las sustancia a diferentes tiempos de exposición.

Se realizaron básicamente 4 diseños experimentales:

1) Exposición continua por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (336/504 h) a partir del estadio de blástula temprana de 4 blastómeros (E4).

2) Exposición continua a partir de la finalización del desarrollo embrionario (E25) por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (336/504 h). De acuerdo a USEPA (1991) tratamientos crónicos en organismos de vida libre se consideran a partir de 7 días de exposición.

3) Exposición por pulsos de 24 h en diferentes estadios embrionarios: blástula temprana (E4), placa neural (E13), respuesta muscular (E18), circulación branquial (E20), pliegue opercular (E23) y opérculo completo (E25), a fin de evaluar la toxicidad estadio-dependiente.

4) Exposición crónica a partir del estadio de opérculo completo (E25, larvas tempranas) hasta completar la metamorfosis a fin de evaluar los efectos en la metamorfosis.

Cada uno de estos ensayos se repitió, como mínimo, tres veces, realizándose con organismos provenientes de distintas ovulaciones.

## 2.4 Condiciones de los bioensayos

Los bioensayos de toxicidad se realizaron según el método estandarizado ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll, 1999). Se colocaron 10 embriones en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro tapadas, formando cámaras, con 40 mL de solución, y para los estudios en metamorfosis se dispusieron 5 larvas en E25 en cápsulas de Petri de 20 cm de diámetro con 150 mL de solución. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA y en la máxima concentración de acetona utilizada en el bioensayo, (si correspondiese la dilución del tóxico en este solvente), la cual siempre estuvo por debajo del 1.1% (ASTM, 1993). Cada condición de concentración y los controles se realizaron por triplicado. Los ensayos fueron semiestáticos con renovación de las soluciones cada 48 h. Con cada cambio de solución, se retiraron los individuos muertos. Para los estudios por pulsos de toxicidad estadio-dependiente, los embriones se expusieron a las diferentes soluciones durante 24 h, pasado este tiempo fueron lavados exhaustivamente con 150 mL de SA, y colocados en las placas de Petri con 40 mL de SA, continuándose las observaciones hasta completar el tiempo de evaluación. Las larvas a partir del E25 fueron alimentadas *ad libitum* día por medio con alimento balanceado para peces (Tetramin-TetraColor®). La temperatura ambiente durante todo el bioensayo se mantuvo constante a  $20 \pm 2$  °C, y se empleó un fotoperíodo de 12:12 (luz/oscuridad).

## 2.5 Registro de los datos

Los parámetros de evaluación (“end points”) fueron: letalidad, malformaciones (disociación celular, tapón vitelino persistente, alteraciones en la formación del tubo neural, microcefalia/acefalia, alteraciones en la formación del aparato bucal, incurvaciones en el eje, hidropesía general, cardíaco, abdominal, subdesarrollo/agenesia de branquias, desórdenes de pigmentación, tumores y formación de pliegues

externos, etc.), y otras alteraciones tales como retraso en el desarrollo, inhibición del crecimiento, en la locomoción, en el comportamiento en general y en el tiempo medio en completar la metamorfosis. Los efectos letales, teratogénicos y neurotóxicos se evaluaron cada 24 h, durante al menos 168 h, registrándose estos datos en tablas de sobrevivencia y de malformaciones. Las alteraciones en el desarrollo fueron observadas bajo microscopio estereoscópico binocular (Zeiss Stemi DV4), y fotografiadas con una cámara digital Sony DSC-S90 e identificadas con el “Atlas de Anormalidades” (Bantle y col., 1998). El estudio de los efectos sobre la ultraestructura de los embriones se realizó por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). A tal fin, se procedió a la fijación de los organismos con las malformaciones más representativas de cada tratamiento en formol 10% seguida por deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (10, 25, 50, 75 y 100 %), secado a punto crítico y metalización con oro–paladio. Los preparados fueron observados en el microscopio de barrido electrónico Philips XL-30 operado a 10 kw del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”.

### **2.6 Análisis de datos**

Las concentraciones letales fueron estimadas estadísticamente mediante el programa PROBIT (USEPA, 1988), y se construyeron los perfiles de toxicidad (curvas TOPs) en base a las CL 10, 50 y 90. Si el mismo no podía realizarse, la CL 50 se calculaba mediante TSK (Trimmed Spearman Karber). A fin de comparar estadísticamente las CL 50 obtenidas se consideró que hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando el cociente CL 50 mayor/CL 50 menor excedió el valor crítico (las barras de error indican 95% de intervalo de confianza) establecido por APHA (2005). Los datos de letalidad y subletalidad fueron utilizados para obtener el índice teratogénico (IT), el cual se calculó como el cociente NOEC letalidad/NOEC subletalidad. Valores de  $IT > 1,5$ , demuestran estar en presencia de una sustancia principalmente teratogénica, implicando un alto riesgo de que una gran proporción de

los embriones expuestos resulten malformados en ausencia de una mortalidad significativa (ASTM, 1993). El análisis de los datos de sobrevivencia fue realizado mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tiempo y concentración de exposición), por medidas repetidas. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Tukey. El valor NOEC fue determinado como la concentración máxima que no presentó diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ). Los valores de tiempo medio en completar la metamorfosis correspondientes a los distintos tratamientos fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Para ello se utilizó el software GraphPad Prism, versión 6.03. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron verificados mediante las pruebas de Lillieford y Bartlett, respectivamente (Steel y Torrie, 1985), considerándose significativas las diferencias con un  $p < 0,05$ .

### **2.7 Evaluación de peligrosidad**

Las concentraciones esperadas en el ambiente (CEA) para cada sustancia fueron calculadas como el porcentaje de la tasa de aplicación máxima propuesta para cada una de éstas. Este porcentaje depende del tipo de exposición, tomando en cuenta la deriva, escorrentía o lavado (10%, utilizado para el cálculo de HQ1) o una sobreexposición durante las aplicaciones aéreas (100%, utilizado para el cálculo de HQ2). Las CEA fueron calculadas asumiendo una profundidad del agua de 15 cm y un área de 1 m<sup>2</sup> (Boutin y col., 1993; 1995). El cociente de peligrosidad (HQ) es el valor estimado a partir del cociente entre el potencial de exposición de una sustancia y el nivel al cual se espera que no produzca efectos adversos (USEPA, 1998), calculado en esta tesis como CEA/NOEC para efectos letales.

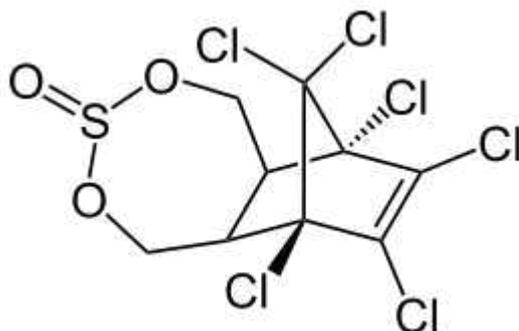
Luego que el cociente de peligrosidad fue calculado, se comparó con el valor de preocupación (LOC, del inglés *level of concern*) de USEPA. Este valor es una

herramienta que se utiliza para interpretar y analizar el potencial riesgo de exposición de organismos *no blanco* a un compuesto tóxico, y analizar la necesidad de considerar acciones regulatorias. El valor LOC es 1. Si HQ es mayor que 1, existe riesgo de que se produzcan efectos adversos debido a la exposición al contaminante en cuestión.

**CAPÍTULO 3:**  
**TOXICIDAD DEL INGREDIENTE**  
**ACTIVO ENDOSULFÁN SOBRE EL**  
**DESARROLLO EMBRIO-LARVAL DE**  
***RHINELLA ARENARUM***

### 3.1 Introducción

El endosulfán (ES), 3-Oxido 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina, es un compuesto organoclorado sintético usado como insecticida y acaricida que actúa por contacto e ingestión aunque a altas temperaturas, puede actuar también por inhalación. Su principal mecanismo de acción es por la sobreestimulación del sistema nervioso central, inhibiendo la ATPasa de calcio y magnesio (WHO, 2000). El ES de grado técnico (Fig. 3.1, Anexo 2) consiste en una mezcla de isómeros alfa y beta, siendo la relación 7:3 la forma química más frecuente (ATSDR, 2000), resistente a la fotodegradación (Schuphan y col., 1972). Tiene un peso molecular de 406.96 y una fórmula empírica C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S (Anexo 2). El ES grado técnico es muy poco soluble en agua (0,32 mg/l, a 22°C) pero soluble en solventes orgánicos. Posee una presión de vapor de 1200 mPa (a 80°C) y un log K<sub>ow</sub> de 5. La vida media del ES es de 35 y 150 días en suelo y agua, respectivamente (EXTOXNET, 1996).



**Figura 3.1** Estructura química del endosulfán (ES) grado técnico. Mezcla de estereoisómeros, alfa y beta, en una relación 7:3.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) ha clasificado al ES en la categoría 1b, "altamente peligroso", y es considerado un Contaminante Orgánico Persistente (COP) debido a su persistencia en el ambiente,

capacidad para migrar largas distancias desde el lugar de aplicación, su alto potencial de bioacumulación y toxicidad en todos los organismos estudiados. Los países de mayor uso de ES (Argentina, Australia, Brasil, China, India, México, Pakistán y Estados Unidos) aplican en conjunto un total de 15.000 toneladas de ES anualmente. El impacto de este plaguicida en Argentina es muy importante teniendo en cuenta que sólo en 2010, se aplicaron 5,5 millones de litros de ES para control de insectos en cultivos de soja, alfalfa, algodón, girasol y maíz (CASAFE, 2012). El uso de ES fue recientemente prohibido por la Organización de las Naciones Unidas, siguiendo la recomendación del Comité Científico, pero con excepciones (ONU, 2011), por lo que todavía se utiliza en gran medida a escala mundial, en particular en algunos países en desarrollo. Cabe señalar que la normativa Argentina prohibió la importación del principio activo y sus formulados desde el 30 de junio de 2012, y por la Resolución N° 511/11 la elaboración de los formulados, así como su comercialización desde el 30 de junio de 2013 (SENASA, 2013).

Hay numerosos estudios que demuestran claramente la elevada toxicidad en particular sobre vertebrados acuáticos, tanto del ES grado técnico como de sus productos formulados. En anfibios se ha informado que concentraciones ambientalmente relevantes de ES causaron mortalidad en muchas especies (Jones y col., 2009), como también efectos subletales, por ej: retraso en el tiempo para completar la metamorfosis (Brunelli y col., 2009), malformaciones en las branquias (Bernabó y col., 2008) y diferentes alteraciones en el comportamiento (Berrill y col., 1998; Agostini y col., 2009).

Se informaron niveles de ES en zonas rurales entre 0,0001 y 0,016 mg/L en aguas subterráneas y superficiales (Dalvie y col., 2003; Tombesi y col., 2014). Por otra parte, existe abundante información que confirma la presencia de ES en lugares muy distantes del área de aplicación (Ruedel, 1997; UNEP, 2009).

## 3.2 Objetivos e Hipótesis

### Objetivos:

- ✓ Obtener los perfiles de toxicidad (TOPs, curvas de isotoxicidad) del ingrediente activo (i.a) de ES para embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a partir de los resultados de letalidad.
- ✓ Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente al ES, en siete estadios comprendidos entre la segmentación temprana y la finalización del desarrollo embrionario.
- ✓ Dentro del rango de concentraciones subletales, evaluar los efectos teratogénicos, sobre el crecimiento, progreso del desarrollo, alteraciones en el comportamiento y en la metamorfosis por exposición al ES en distintas etapas del desarrollo.
- ✓ Evaluar la incorporación del insecticida a distintos tiempos de exposición durante el desarrollo embrionario y larval y correlacionarla con la sensibilidad diferencial al plaguicida.
- ✓ Evaluar el potencial de peligrosidad de las poblaciones de *R. arenarum* expuestas a ES.

Los objetivos fueron planteados con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis:

### Hipótesis:

- ✓ El ES produce efectos tóxicos en los embriones y larvas de *R. arenarum* y se manifiestan mediante efectos letales y subletales, entre éstos últimos: malformaciones, alteraciones en el comportamiento y en el proceso de metamorfosis.

- ✓ El ES tiene una toxicidad dependiente del estadio embrionario/larval en que se expone a los organismos, registrándose estadios del desarrollo más susceptibles que otros.
- ✓ El ES presenta un potencial de acumulación dependiente de la concentración, tiempo de exposición y estadio del desarrollo.
- ✓ El ES presenta un potencial de peligrosidad para las poblaciones de *R. arenarum*.

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Preparación de las soluciones de exposición**

Los bioensayos de toxicidad fueron realizados utilizando ES grado técnico (PS81, Supelco) con una pureza del 99%. Se preparó una solución madre de 1.000 mg ES/L en acetona grado analítico, y las soluciones de exposición se prepararon por dilución con SA dependiendo del diseño experimental. La concentración de acetona en las soluciones de exposición siempre fue menor al 1,1% (ASTM, 1993). Se realizaron dos controles, uno con SA y otro con acetona a la máxima concentración empleada en los tratamientos. La concentración del ES en la solución madre fue analizada por el Dr. Damián Marino en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA-UNLP) mediante HPLC-ESI-MS operando en modo negativo, confirmación por detección scan y cuantificación por iones  $m/z=405$  y  $407$ . La solución se analizó a diario comprobándose su estabilidad en el tiempo. El error entre la concentración nominal y la medida no superó el 5%.

#### **3.3.2 Bioensayos de toxicidad**

Se realizaron 3 tipos de bioensayos:

- 1) Exposición continua a ES a partir del estadio de blástula temprana (E4) por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (504 h). El rango de concentraciones fue: 0,01-20 mg ES/L.
- 2) Exposición continua a ES a partir del estadio de opérculo completo (E25, larvas tempranas) hasta completar la metamorfosis, durante 107 días. El rango de concentraciones fue: 0,005-1 mg ES/L.
- 3) Exposición por pulsos de 24 h a ES en diferentes estadios: blástula temprana (E4), gástrula (E11), placa neural (E13), respuesta muscular (E18), circulación branquial (E20), pliegue opercular (E23) y opérculo completo (E25). El rango de concentraciones fue: 0,5-20 mg ES/L.

### 3.3.3 Acumulación de endosulfán

Para la cuantificación de la incorporación del ES, se realizaron bioensayos utilizando concentraciones subletales. Se realizaron dos tipos de tratamiento:

- Exposición continua a ES a partir del estadio de blástula temprana (E4). El rango de concentraciones fue: 0,001-0,005 mg ES/L.
- Exposición continua a ES a partir del estadio de opérculo completo (E25). El rango de concentraciones fue: 0,0005-0,075 mg ES/L.

Se colocaron 50 individuos en placas de Petri de 20 cm de diámetro con 150 mL de la solución de exposición. Simultáneamente se mantuvieron individuos control en SA y en acetona (máxima concentración utilizada, que nunca superó el 1,1%). El periodo de exposición total fue de 504 h, realizándose las cuantificaciones a las 96, 240 y 504 h. Tanto los tratamientos como los grupos control se realizaron por triplicado para cada tiempo de medición. Los bioensayos fueron semiestáticos, con renovación del medio cada 48 h. En cada uno de los tiempos se tomaron muestras para medir:

### CAPÍTULO 3: Toxicidad del endosulfán sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

---

- Peso húmedo de los individuos: se tomaron 10 individuos de cada réplica de cada tratamiento, los que fueron lavados exhaustivamente en placas de Petri con 200 mL de SA, escurridos con papel absorbente, y posteriormente pesados.

- Incorporación: se tomaron muestras de 50 individuos de cada réplica de cada tratamiento las que se almacenaron a -20 °C en tubos Khan de 10 mL. Tres días antes de la determinación del contenido de ES, se eliminó el agua residual de las muestras en baño maría a 100 °C (aprox. 8 h) llevándolas a peso constante. En cada tubo se agregó una punta de espátula de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (para secar y disgregar) y 2 mL de acetona macerando con ayuda de una varilla de vidrio. Las muestras se dejaron reposar por 10 minutos. A continuación se sonicaron 2 veces por 10 minutos y luego se centrifugaron por 5 minutos. Se separó la fase orgánica, y se repitió el procedimiento anterior. Se juntaron los extractos obtenidos. Las muestras se evaporaron a 45 °C, se agregaron 2 mL de metanol y se sonicaron 3 veces por 5 minutos. Las muestras se filtraron y se analizaron por cromatografía gaseosa y detección por captura electrónica (ECD). Se utilizó un cromatógrafo gaseoso marca Hewlett Packard 5890-II, con detector ECD y un espectrómetro de masas modelo HP-5971, la separación analítica se realizó con una columna HP-5 de 30m×0.32mm, usando hidrógeno como carrier a 0.8 ml/min, inyector en modo splitless, en relación 1:50 a 220 °C, horno con rampa de temperatura entre los 160°C y los 250°C. La cuantificación del ES se realizó por detección con ECD a 250°C, confirmando la identidad del pico por espectrometría de masas.

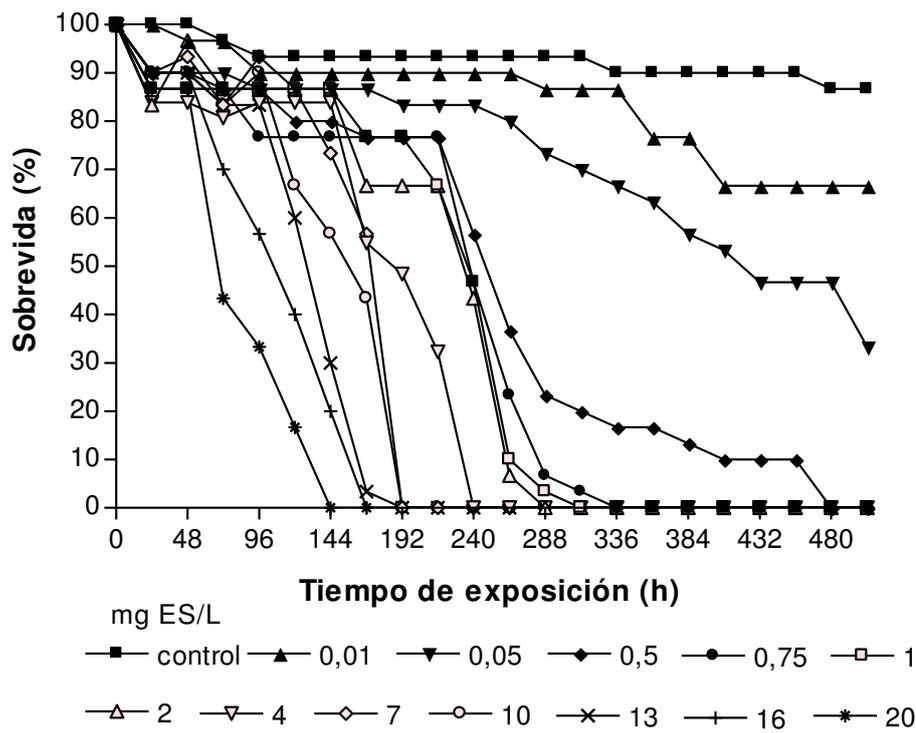
La acumulación se calculó como el cociente entre la concentración de ES en el organismo, expresada en µg/mg de peso fresco y la concentración nominal de exposición, expresada en mg/L. Los valores de acumulación se calcularon para distintos periodos de tiempo y distintas concentraciones de exposición.

## 3.4 Resultados

Los resultados de letalidad y subletalidad de los controles de SA y acetona no difirieron entre ellos, con lo cual el término control en el resto de éste estudio se refiere a ambos controles. Las concentraciones de ES de las soluciones de exposición no pudieron ser medidas, si la de la solución madre. Como el error entre la concentración nominal de la solución madre de la ES y la cuantificada por HPLC-ESI-MS no superó el 5%, las concentraciones de exposición fueron expresadas como concentraciones nominales.

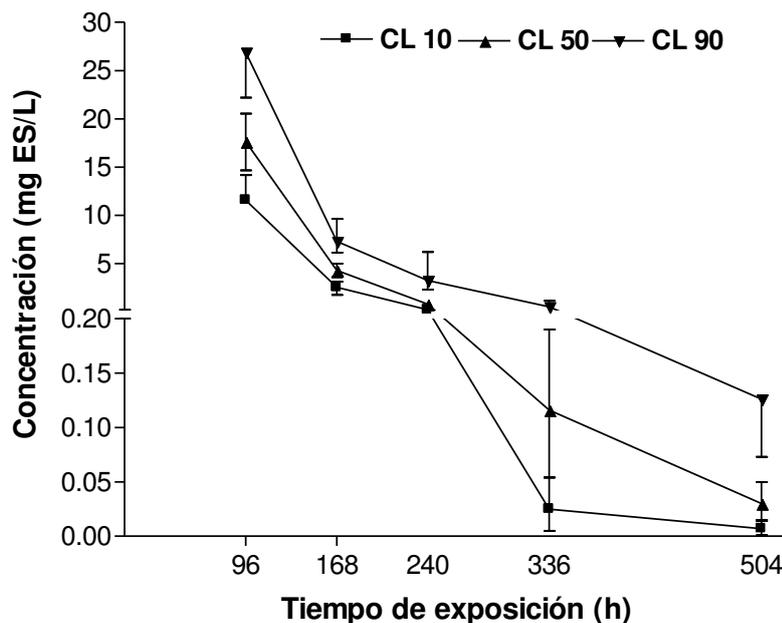
### 3.4.1 Exposición continua crónica a ES a partir del estadio de blástula (E4)

La figura 3.2 muestra las curvas de sobrevivencia de los embriones expuestos al ES a partir de la blástula temprana (E4) hasta alcanzar el estadio de opérculo completo (E25). Esta figura destaca el efecto letal agudo expresado a partir de las 96 h sólo en las concentraciones más altas, a partir de 16 mg ES/L. Sin embargo, la toxicidad letal se incrementó durante la exposición crónica a corto plazo, a las 168 h, coincidente con el inicio de la etapa larval, obteniéndose por ejemplo para la concentración de 0,5 mg ES/L una letalidad del 23%, del 83% en la exposición crónica hasta las 336 h, y al final de la exposición (504 h), la letalidad alcanzó el 100%.



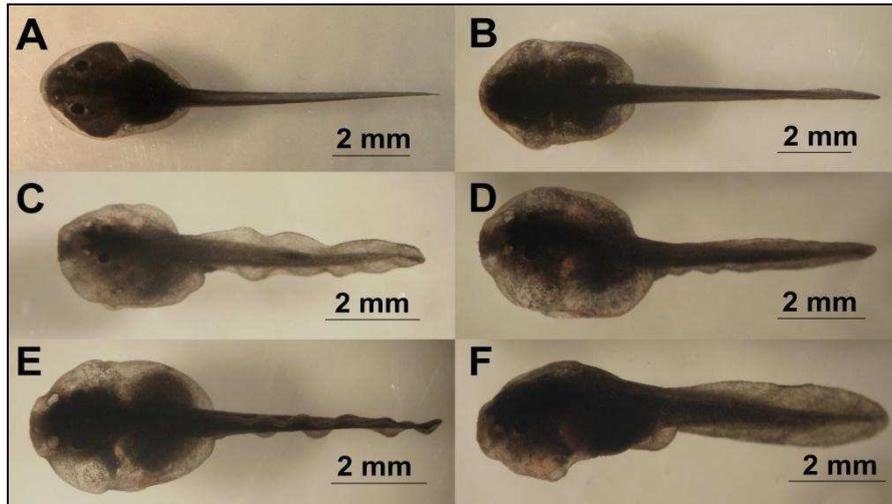
**Figura 3.2** Curvas de sobrevivida de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua al ES a partir de la blástula (E4).

La figura 3.3 muestra las curvas TOP basadas en las CLs obtenidas a partir del análisis Probit. La figura denota el aumento abrupto de la toxicidad del ES al incrementarse el tiempo de exposición. El valor NOEC a las 96 h fue de 13 mg ES/L cayó a tan sólo 0,01 mg ES/L a las 504 h, lo que significa un incremento de la toxicidad en 1300 veces.



**Figura 3.3** Perfiles de toxicidad (curvas TOP) del ES con sus intervalos de confianza para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de blástula temprana (E4).

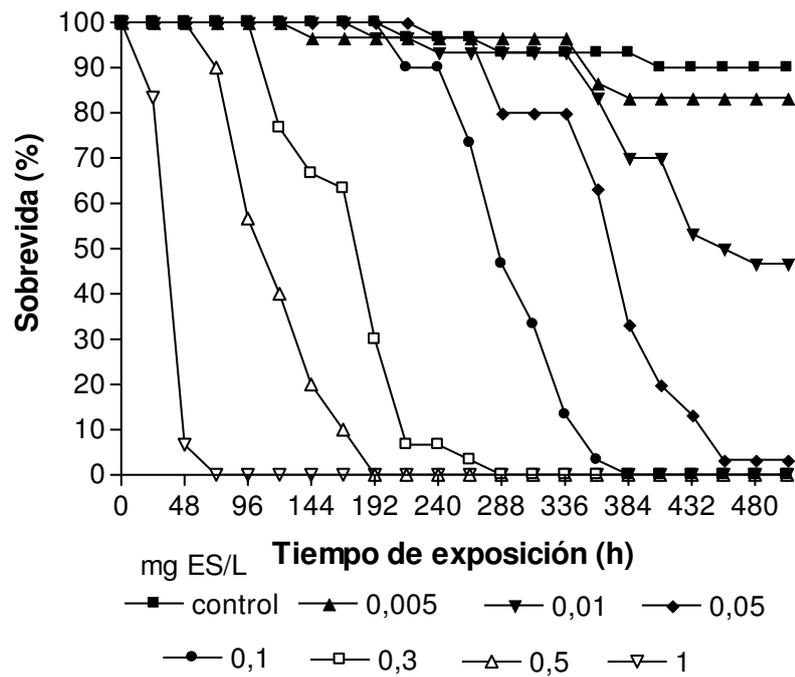
Con respecto a los efectos subletales, los embriones a las primeras horas de exposición exhibieron retraso en el desarrollo, disociación celular, superficie irregular y tapón vitelino persistente. Al avanzar el desarrollo, presentaron talla reducida, subdesarrollo de branquias, microcefalia, cola ondulada e hidropesía muy marcada (Fig. 3.4). También presentaron severas alteraciones en el comportamiento como contracciones espasmódicas que evolucionaron hacia una reducción en los movimientos de natación hasta permanencia en el lugar y ausencia total de movimiento. El valor NOEC a las 240 h para efectos letales fue de 0,05 mg ES/L, mientras que el valor NOEC de subletalidad (incluyendo las alteraciones en el comportamiento) fue 0,01 mg ES/L, por lo tanto el IT de ES para las 240 h fue 5.



**Figura 3.4** Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a distintas concentraciones de ES a partir del estadio de blástula temprana (E4), a las 240 h: (A) larva control; (B) 0,05 mg ES/L, hidropesía; (C) 0,5 mg ES/L, hidropesía, cola ondulada; (D) 0,5 mg ES/L, hidropesía, cola ondulada; (E) 0,75mg ES/L, hidropesía, cola ondulada; (F) 1 mg ES/L, subdesarrollo general.

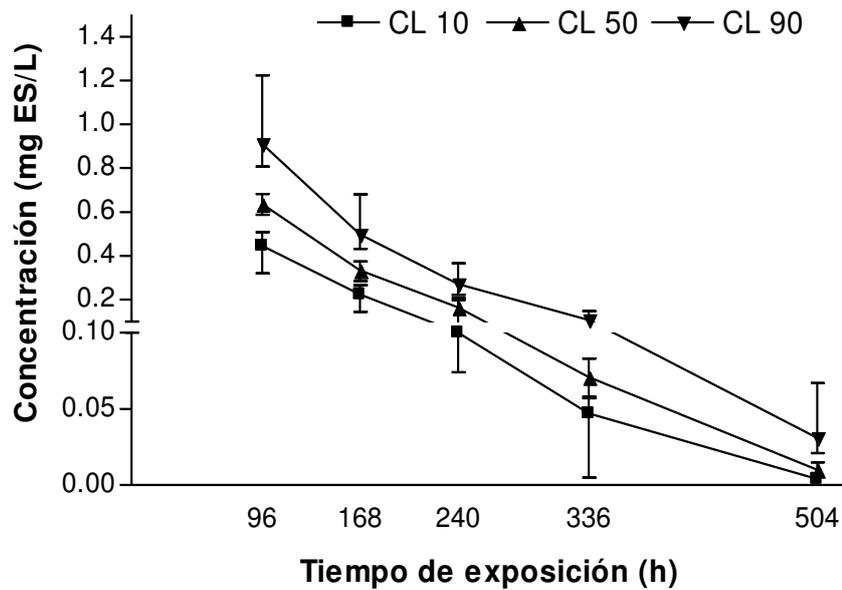
### 3.4.2 Exposición continua crónica a ES a partir del estadio de opérculo completo (E25)

Las larvas tempranas de *R. arenarum* expuestas al ES presentaron efectos letales desde las 24 h a partir de 1 mg ES/L, alcanzando el 100% de letalidad hacia el final del periodo agudo. El aumento en la letalidad fue más gradual en las concentraciones menores, excepto en la más baja (0,005 mg ES/L) que no presentó DS (ANOVA,  $p > 0,05$ ) con respecto a los controles, aún a las 504 h (Fig. 3.5).



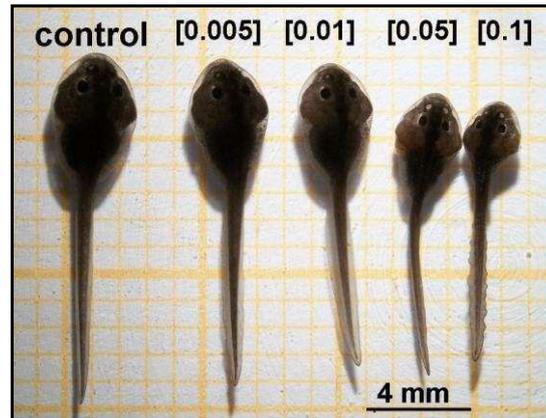
**Figura 3.5** Curvas de supervivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua al ES a partir del estadio de opérculo completo (E25).

Las curvas TOP muestran que este estadio del desarrollo fue muy sensible al ES desde las primeras horas. Los valores de CLs desde las 48 h fueron menores que 1 mg ES/L. Más aún, mientras el valor NOEC a las 96 h fue 0,3 mg ES/L, a las 504 h fue de solo 0,005 mg ES/L evidenciando un aumento de toxicidad de 60 veces (Fig. 3.6).



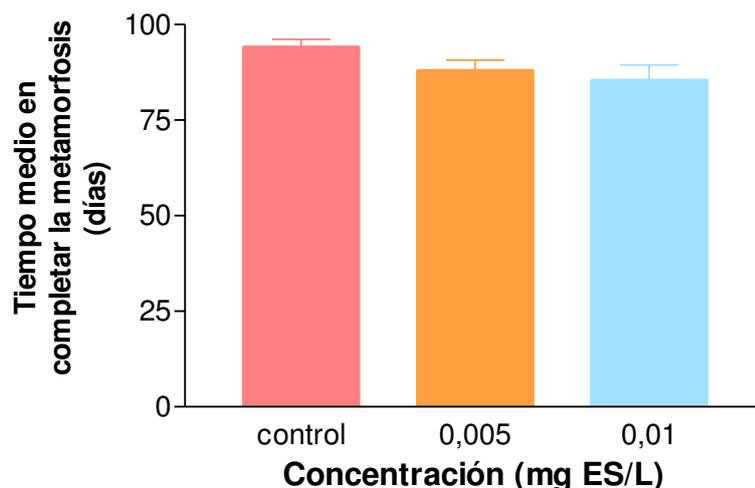
**Figura 3.6** Perfiles de toxicidad (curvas TOP) del ES con sus intervalos de confianza para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25).

Se observaron efectos subletales desde las primeras horas de exposición a concentraciones a partir de 0,01 mg ES/L que consistieron en comportamiento anormal expresado como nado errático, contracciones espasmódicas, disminución del movimiento hasta ausencia total de movimiento. Estos efectos fueron concentración dependiente. Las funciones esenciales como la alimentación fueron fuertemente afectadas por el plaguicida, por lo cual las larvas expuestas se alimentaban menos que los controles. Al cabo de 336 h de exposición, las larvas presentaron retraso en el desarrollo, talla reducida y ondulaciones en la cola en las concentraciones más altas que no se registró letalidad (fig. 3.7).



**Figura 3.7** Comparación de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25) a distintas concentraciones de ES (mg/L), a las 336 h. En la foto se observa talla reducida y subdesarrollo general en las larvas expuestas al ES, efecto que se ve incrementado con el aumento de la concentración del ES.

Solo un bajo porcentaje de las larvas expuestas a las dos concentraciones más bajas 0,005 y 0,01 mg ES/L sobrevivió y logró completar el proceso metamórfico. El 37% y el 16% de las larvas expuestas a 0,005 y 0,01 mg ES/L murieron antes de completar la metamorfosis, presentando subdesarrollo general, talla y peso reducidos, y comportamiento aletargado. Distinto a lo esperado, las larvas expuestas a estas dos concentraciones comenzaron a metamorfosear antes que el grupo control. Sin embargo, estos juveniles recién metamorfoseados presentaron un peso y talla reducida comparados con los juveniles del grupo control. En el análisis estadístico en el tiempo medio en completar la metamorfosis de las larvas expuestas a ES no se observaron DS (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ) con respecto a los controles (Fig. 3.8).

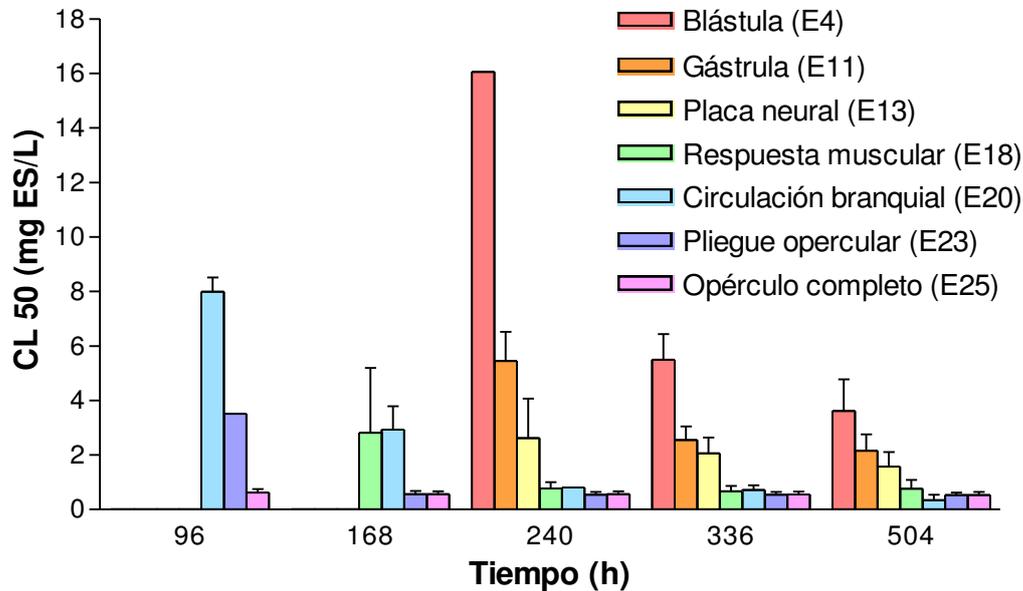


**Figura 3.8** Las barras representan el tiempo medio y el desvío estándar en completar la metamorfosis de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua al ES a partir del estadio de opérculo completo (E25). Dentro de cada ensayo, no se registraron DS entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ )

### 3.4.3 Exposición a ES por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios

En línea con lo que se observaba en los tratamientos continuos, la sensibilidad de los embriones de *R. arenarum* al ES fue menor en los estadios embrionarios tempranos y aumentó significativamente en los estadios tardíos, siendo las CL 50 a las 336 h para E4 y E25 de 5,49 (3,52-6,43) y 0,55 (0,43-0,66) mg ES/L respectivamente. Los embriones expuestos al ES en los estadios tempranos (entre E4 y E18) fueron tan resistentes que no se produjo mortalidad significativa ni aún a concentraciones tan altas como 20 mg ES/L en periodos agudo y crónico corto. Aunque el estadio 25 fue el más sensible, la toxicidad se mantuvo relativamente constante desde las 96 hasta las 504 h, siendo la CL 50-96h=0,62 (0,49-0,74) mg ES/L y la CL 50-504h=0,53 (0,38-0,64) mg ES/L, mientras que la exposición al ES en el E4, a pesar que no dió mortalidad en los periodos agudo y crónico corto, comenzó a producir letalidad al

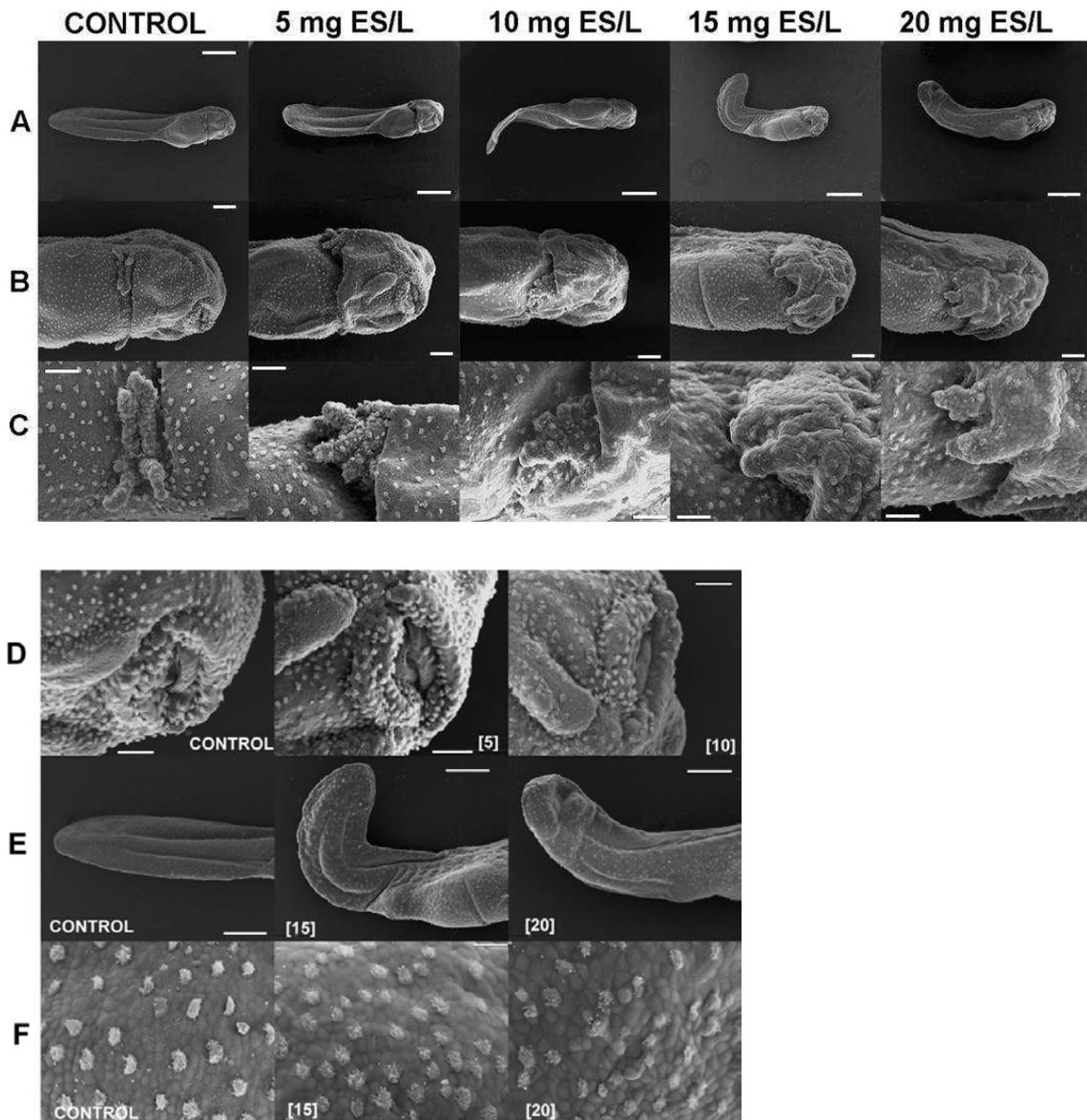
alcanzar el estadio larval, aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ), hasta casi 5 veces en 10 días, siendo la CL 50-240h=16,05 mg ES/L y la CL 50-504h=3,62 (1,80-4,77) mg ES/L (Fig. 3.9).



**Figura 3.9** Susceptibilidad diferencial de *Rhinella arenarum* al ES. Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza a distintos tiempos de los embriones expuestos a pulsos de 24 h en diferentes estadios del desarrollo embrionario. Aclaración: Los datos de CL 50-96 y 168 h para los estadios tempranos no se pudieron obtener por no registrarse mortalidad.

Los principales efectos subletales observados fueron subdesarrollo general, hidropesía, ondulaciones en la aleta y alteraciones en el comportamiento (contracciones espasmódicas, nado errático y finalmente ausencia de movimientos).

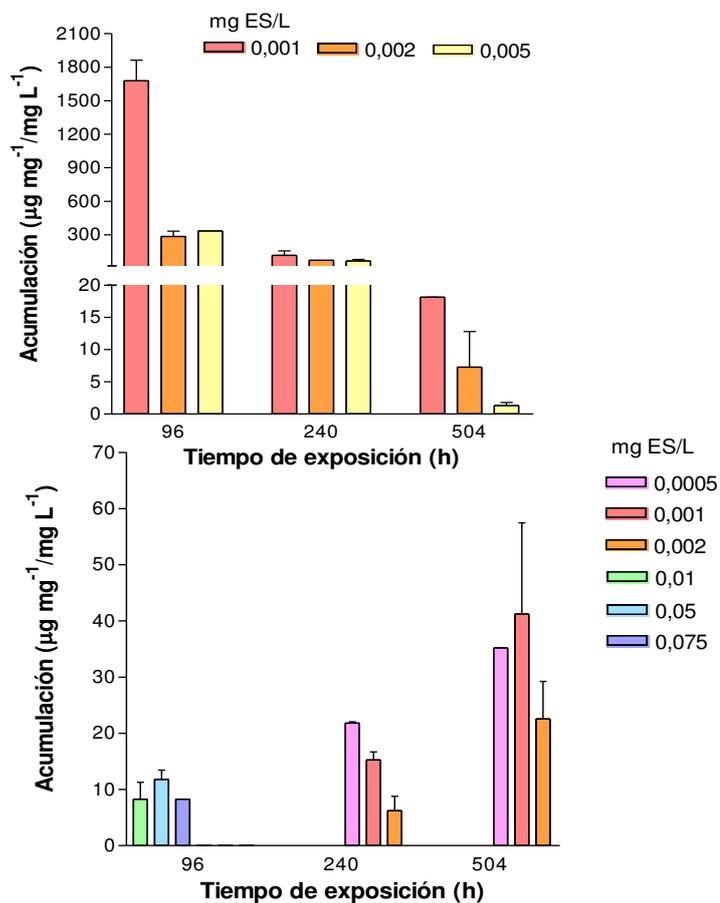
A modo de ilustración, la figura 3.10 muestra la ultraestructura de larvas malformadas expuestas a ES por pulsos de 24 h durante el estadio de respuesta muscular (E18).



**Figura 3.10** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas expuestas a diferentes concentraciones de ES por pulsos de 24 h, durante el estadio de respuesta muscular (E18), fijados a las 96 h: (A) a partir de 10 mg ES/L se observan incurvaciones dorsales y laterales del eje; (B y C) a partir de 5 mg ES/L se observa subdesarrollo de los pliegues operculares y de las branquias, filamentos branquiales malformados, más finos y cortos que los filamentos de los controles, este efecto se profundiza con la concentración; (D) en 5 y 10 mg ES/L se observa persistencia del aparato adhesivo oral; (E) en 15 y 20 mg ES/L se observa incurvación del eje; (F) se observan diferentes grados de disociación celular de la superficie, persistencia de células ciliadas en regiones específicas del epitelio y desorganización general del epitelio. Escalas (en  $\mu\text{m}$ ): (A): 1000; (B): 200; (C): 100; (D): 100; (E): 500; (F): 50. Aumentos: (A): 21x; (B):68x; (C): 200x; (D): 200x; (E): 45x; (F): 375x.

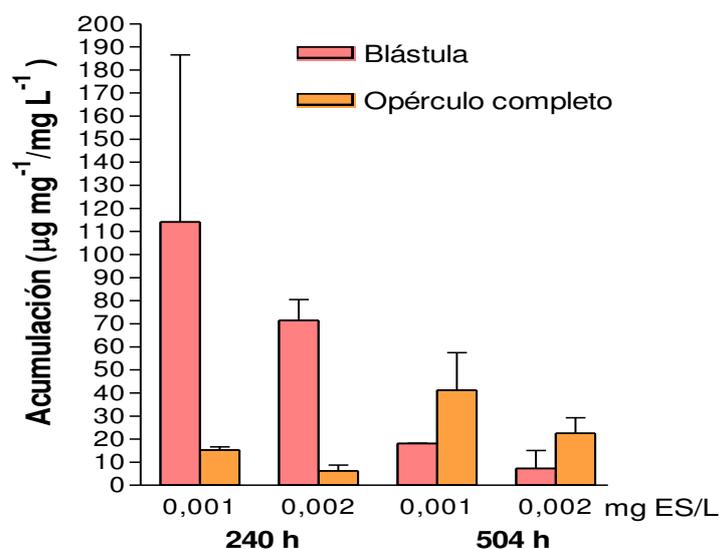
### 3.4.4 Acumulación de endosulfán

Se confirmó la importantísima acumulación del plaguicida en los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* en distintos periodos de exposición. Se detectó una acumulación diferencial del compuesto en función de la etapa del desarrollo en que fueron expuestos, alcanzándose una acumulación de hasta  $1600 \mu\text{g mg}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$  en embriones a las 96 h y de  $40 \mu\text{g mg}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$  como máximo en larvas a las 504 h de exposición. Asimismo, la acumulación disminuyó con el tiempo de exposición para los embriones (Fig.3.11a), mientras que para las larvas (Fig. 3.11b) aumentó con el tiempo dando cuenta del incremento en la acumulación de ES.



**Figura 3.11** Acumulación del ES a distintos tiempos de exposición a partir de: (a) blástula temprana (E4); (b) opérculo completo (E25). Las barras indican el valor medio y el desvío estándar.

En la Figura 3.12 se representan los resultados en forma comparada para embriones y larvas expuestos a dos de las concentraciones ensayadas a las 240 y 504 h. Se puede observar que: 1) tanto para embriones como para larvas, la acumulación fue significativamente mayor en la concentración de exposición más baja; 2) a las 240 h la acumulación para los embriones fue significativamente mayor que para las larvas, mientras que a las 504 h esta tendencia fue inversa.



**Figura 3.12** Comparación de la acumulación del ES para embriones y larvas en dos tiempos de exposición.

### 3.4.5 Evaluación de peligrosidad

Se realizó la evaluación de peligrosidad del ES para las exposiciones continuas a partir del estadio de blástula y de opérculo completo. La concentración esperada en el ambiente (CEA) para ES fue calculada como el 10% y el 100% de la tasa de aplicación máxima sugerida (4,37 g i.a/L/ha) (Formulagro S.R.L, 2012), con lo cual los CEA calculados fueron 0,0437 y 0,437 mg ES/L/m<sup>2</sup>, respectivamente. Usando estos valores se estimaron los cocientes de peligrosidad (HQ=CEA/NOEC) para ambos escenarios. La tabla 3.1 resume los valores de HQ obtenidos a diferentes tiempos. Los resultados para la exposición a partir de cada uno de los dos estadios destacan que

CAPÍTULO 3: Toxicidad del endosulfán sobre el desarrollo embrio-larval de  
*Rhinella arenarum*

los valores de HQ1 para periodos de exposición agudo y crónico corto fueron menores que el valor LOC, siendo solo mayores los valores de HQ2 a las 96 y 168 h para larvas. Mientras que para la exposición crónica los HQs fueron mayores que el valor LOC tanto para embriones como para larvas.

	Tiempo de exposición (h)											
	96			168			336			504		
Estadio	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2
<b>Blástula</b>	13	0,003	0,034	2	0,021	0,21	0,01	4,4*	44*	<0,005	8,7*	87*
<b>Opérculo completo</b>	0,3	0,146	1,46*	0,1	0,437	4,37*	0,01	4,4*	44*	<0,005	8,7*	87*

**Tabla 3.1** Toxicidad y cocientes de peligrosidad (HQ) del ES para el desarrollo embrionario a partir del estadio de blástula (E4) y larval a partir del estadio de opérculo completo (E25) de *Rhinella arenarum*. Valores de NOEC para efectos letales (mg ES/L) y cocientes de peligrosidad (HQ) para las exposiciones aguda (96 h), crónico corta (168 h), y crónica (336 y 504 h). \*HQ>1, significa que existe riesgo de que se produzcan efectos adversos debidos a la exposición al ES.

### 3.5 Discusión

Los resultados obtenidos confirman los efectos letales y subletales producidos por el ES sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*. Este estudio también revela que comparando las CLs 50, las larvas son al menos 27 y 3 veces más sensibles que los embriones en exposiciones aguda y crónico-corta, respectivamente. En este sentido, los embriones y larvas expuestas al ES mostraron diferencias en los patrones de toxicidad, siendo las larvas más sensibles al plaguicida desde las primeras horas, mientras que los embriones aumentaron significativamente la sensibilidad a partir del desarrollo neuromuscular, principal sistema *blanco* de este plaguicida. Más aún, las exposiciones por pulsos de 24 h confirmaron esta tendencia, siendo el E25 el estadio más sensible, mientras que los estadios tempranos (E4-E18) fueron tan resistentes que concentraciones tan altas como 20 mg/L produjeron poco

CAPÍTULO 3: Toxicidad del endosulfán sobre el desarrollo embrio-larval de  
*Rhinella arenarum*

efecto, por lo que los embriones sobrevivieron y se desarrollaron en forma similar a los controles.

El patrón general de susceptibilidad estadio-dependiente obtenido en este estudio está en línea con lo informado por Harris y colaboradores (2000), quienes observaron que larvas de *Rana pipiens* en estadio metamórfico no pudieron sobrevivir a concentraciones de ES que eran subletales para embriones. Asimismo, los parámetros de toxicidad del ES obtenidos en este estudio para las larvas de *R. arenarum* están en el rango de aquellos determinados en estudios con otras especies de bufónidos, mientras que algunas especies de ranas estudiadas presentaron mayor sensibilidad al ES debido posiblemente a su piel más húmeda y permeable (tabla 3.2).

Especie (estadio larval)	Efectos Letales	Efectos Subletales		Referencia
	(CL 50-96h, mg/L)	Comportamiento	Morfología	
<i>Rhinella arenarum</i>	0,64	Aletargamiento, contracciones espasmódicas	Subdesarrollo general, talla reducida, ondulaciones en la aleta	Presente estudio (publicado en Svartz y col., 2014)
<i>Bufo regularis</i>	0,73	Alteraciones en el comportamiento	-	Isioma y Lawrence, 2013
<i>Bufo bufo</i>	0,43	Interf. en osmoregulación, intercambio gaseoso	Malformaciones de branquias, malformaciones en la boca y peso reducido	Bernabó y col., 2008 Brunelli y col., 2009
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	0,13	Narcosis	-	Agostini y col., 2009
<i>Rana dalmatina</i>	0,074	Alteraciones en el nado	Retraso en el crecimiento, malformaciones, alteraciones en la metamorfosis	Lavorato y col., 2013
<i>Rana clamitans</i>	0,015	-	-	Harris y col., 1998

**Tabla 3.2** Datos publicados de toxicidad del ES sobre el desarrollo larval de diferentes anfibios.

### CAPÍTULO 3: Toxicidad del endosulfán sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

---

En referencia a los efectos subletales, Broomhall y Shine (2003) también observaron retraso en el desarrollo en larvas de la rana *Litoria freycineti*. Por su parte, larvas de *Bufo bufo* expuestas a 0,2 mg ES/L presentaron alteraciones en la ultraestructura y composición celular de las branquias, indicando mal funcionamiento en el intercambio gaseoso y la osmoregulación (Bernabó y col., 2008), como así también aumento en la incidencia de malformaciones bucales y peso reducido (Brunelli y col., 2009). La reducción de la ingesta también puede contribuir a la reducción del crecimiento de embriones y larvas expuestas al ES. El potencial teratogénico de este plaguicida representado por el IT-240h de 5, es 3 veces mayor que el valor umbral de 1.5, a partir del cual se considera que existe un alto riesgo de elevada incidencia de malformaciones en los embriones en ausencia de letalidad significativa (ASTM, 1993). Cabe destacar que a partir de las 336 h la sobrevivencia a la menor concentración ensayada comenzó a caer, por lo que si bien no se tienen datos a concentraciones menores, el NOEC es aún mucho más bajo y más alto el índice de teratogenicidad al continuar cronificando la exposición.

Asimismo, confirmamos y extendemos resultados de estudios anteriores sobre alteraciones en el comportamiento y la actividad locomotora, como pérdida de equilibrio y postura lateralizada, movimientos de giro sobre el propio eje, reducción de la ingesta y parálisis (Berrill y col., 1998; Denoël y col., 2013). Estas alteraciones podrían estar asociadas con el aumento de la concentración de neurotransmisores sinápticos, incluyendo la disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa como se observó en ranas expuestas al ES (Sparling y col., 2001), como así también con la degeneración neuronal, en órganos *blanco* como el mesencéfalo y el hipotálamo, informado en peces expuestos al ES (Giusi y col., 2005).

Es ya bien conocido que la hormona tiroidea regula el proceso metamórfico (Brown y Cai, 2007). Los escenarios adversos que producen estrés ambiental como la exposición a plaguicida, pueden inducir la actividad de estas hormonas (Denver,

1997), acelerando el desarrollo larval y completando la metamorfosis en menos tiempo, fenómeno característico de larvas de anfibios llamado plasticidad fenotípica (Alford y Harris, 1988). Sin embargo, estas larvas tienen un peso y talla reducidos disminuyendo su *fitness* en el medio terrestre (Pough y Kamel, 1984). Los resultados obtenidos a partir de la exposición al ES en larvas durante la metamorfosis están en concordancia con esta hipótesis, mostrando que larvas expuestas a concentraciones tan bajas como 0,005 mg ES/L comenzaron a metamorfosear antes que los controles pero con un tamaño reducido. Sin embargo el tiempo medio en completar la metamorfosis no se vio afectado por la exposición al ES.

Estas observaciones confirman la importancia de informar alteraciones en el desarrollo, las cuales los hace más vulnerables a la predación o a estresores ambientales como agentes infecciosos, especies invasoras, cambios en los parámetros físico-químicos del ambiente, influenciando las condiciones físicas de los animales y por lo tanto su éxito reproductivo (Semlitsch, 1990).

Los resultados obtenidos destacan una acumulación diferencial de este compuesto de acuerdo al estadio del desarrollo que es expuesto. En este sentido, los valores de acumulación para las larvas aumentaron con el tiempo de exposición si bien no fueron concentración-dependientes, mientras que los valores de acumulación para los embriones disminuyeron con el tiempo de exposición y la concentración, lo cual podría sugerir la maduración de mecanismos/sistemas metabólicos de detoxificación del ES durante el desarrollo embrionario, que al alcanzar el estadio larval les permite tolerar concentraciones del plaguicida que son letales para las larvas que son expuestas al compuesto a partir del E25. Así, los mecanismos que le dan tolerancia a las larvas al ES deben ser inducidos previamente por exposición durante el desarrollo embrionario. Es notable la capacidad de acumular el ES de las larvas devenidas de embriones expuestos de un orden de magnitud mayor que las larvas sin pre-exponer. Así, por ejemplo, a las 240 h y a una exposición de 0,002 mg/L ES, la

acumulación es de  $70 \mu\text{g mg}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$  en el primer caso y de sólo  $7 \mu\text{g mg}^{-1}/\text{mg L}^{-1}$  en el segundo. Esta diferencia tan marcada en la acumulación del insecticida entre embriones y larvas podría deberse a la alta composición lipídica del vitelo de los embriones, que luego se va consumiendo a medida que avanza el desarrollo embrionario. En este sentido ya se había informado la relación entre la absorción y la lipofilicidad en huevos de peces en otro insecticida como el diazinón, y el ES en particular presenta una baja solubilidad en agua, lo que lo hace fácil de absorberse (Hamm y col., 2001). Los resultados muestran que los embriones tempranos tienen una capacidad extraordinaria de acumular y tolerar altas concentraciones del insecticida sin afectarse y recién en estadios larvales y a tiempos crónicos regulan la concentración interna del tóxico. En cambio, las larvas muestran mucha mayor sensibilidad al tóxico aún con una baja acumulación. Comparando la sensibilidad diferencial entre embriones y larvas con los correspondientes valores de acumulación, es claro que la acumulación del plaguicida está relacionada positivamente con la tolerancia a la sustancia. La acumulación puede producir consecuencias ecológicas graves ya que los plaguicidas pueden ser retenidos en los tejidos del cuerpo y cuando son ingeridos por los predadores, los compuestos se concentran de un nivel trófico al siguiente, dando lugar a la biomagnificación (Newman y Unger, 2003).

Un factor importante a tener en cuenta para la evaluación de la toxicidad de un plaguicida como el ES en el desarrollo embrio-larval de los anfibios es la temperatura, ya que éstos a mayor temperatura presentan una tasa más alta de metabolización y por lo tanto de biotransformación de estos compuestos causándoles una mayor toxicidad. Ésta cuestión se ve reflejada en los estudios de Johnson y col (2013), quienes observaron que larvas de *Agalychnis callidryas* expuestas a ES en condiciones naturales (donde la temperatura era más cálida y variable) eran más sensibles que aquellas expuestas en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura. Asimismo, el cambio climático global está conduciendo a que el clima

sea más cálido y variable con lo cual podría aumentar el impacto de los plaguicidas sobre los anfibios.

Considerando que se han informado niveles ambientales de ES entre 0,0001 y 0,016 mg/L en aguas subterráneas y superficiales (Dalvie y col., 2003; Tombesi y col., 2014), y que el NOEC-504h para larvas expuestas al plaguicida fue tan bajo como 0,0005 mg/L, los valores podrían exceder hasta 32 veces las concentraciones que permiten la sobrevivencia de *R. arenarum*.

Con respecto a la evaluación de peligrosidad, los valores de HQs alcanzaron valores mayores a 1 (LOC) destacando que el ES puede representar una amenaza para *R. arenarum* en los casos de exposición crónica durante el desarrollo embrio-larval. Esto podría suscitarse especialmente en regiones con uso intensivo del plaguicida, pudiendo alterar las poblaciones de este anfibio nativo. Los resultados confirman la alta toxicidad del ES y están en línea con la decisión de restringir y promover la prohibición mundial de su uso, reemplazándolo por alternativas menos tóxicas.

### 3.6 Conclusiones

- 1) El ES causó toxicidad sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* que se manifestó mediante efectos letales y subletales.
- 2) La toxicidad del ES sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum* fue estadio-dependiente.
- 3) Los estadios embrionarios tardíos presentaron una susceptibilidad mayor al ES, siendo el estadio de opérculo completo (E25) el más susceptible, probablemente como consecuencia del mayor desarrollo del sistema nervioso, órgano *blanco* del ES.

- 4) El ES causó efectos subletales como distintas malformaciones, reducción en la talla, hidropesía e incurvaciones del eje, pero principalmente se vió afectado el comportamiento (contracciones espasmódicas, nado errático, y finalmente parálisis), como consecuencia del desarrollo del sistema nervioso.
- 5) El tiempo en completar la metamorfosis no se vió afectado por la exposición al ES. El momento de inicio de la metamorfosis se vió adelantado por la exposición al ES, resultando con un peso y talla reducidos.
- 6) Los valores de acumulación elevados tanto para los embriones como para las larvas de *R. arenarum* indican una alta capacidad para acumular el ES y la posibilidad de biomagnificarlo en las cadenas alimentarias.
- 7) Los valores de acumulación mayores en embriones que en larvas podría estar dado por la alta composición de lípidos presente en el vitelo de los embriones lo que les permite la acumulación, que luego se va consumiendo a medida que avanza el desarrollo embrionario.
- 8) Los valores de acumulación del ES durante el desarrollo embrionario disminuyeron con el tiempo de exposición, lo cual podría sugerir la maduración de mecanismos/sistemas metabólicos de detoxificación del ES.
- 9) Los valores de acumulación del ES durante el desarrollo larval aumentaron con el tiempo de exposición.
- 10) El aumento de la tolerancia al ES está directamente relacionado con el aumento de la acumulación.
- 11) De acuerdo a los niveles de ES que se han encontrado en aguas superficiales próximas a áreas agrícolas, y teniendo en cuenta los valores de HQ obtenidos por la evaluación de peligrosidad, este insecticida podría poner en riesgo la sobrevivencia de las poblaciones de esta especie en escenarios de exposición prolongada.

**CAPÍTULO 4:**  
**TOXICIDAD DEL INGREDIENTE**  
**ACTIVO Y DE UN FORMULADO**  
**COMERCIAL DE CIPERMETRINA**  
**SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-**  
**LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM***

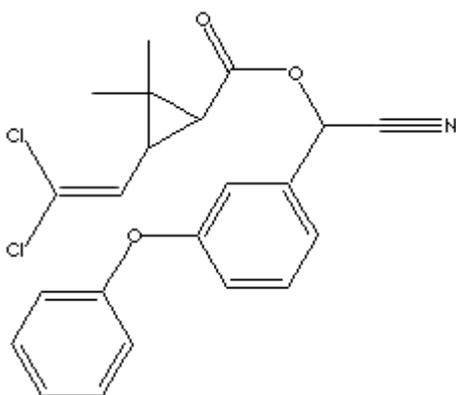
## 4.1 Introducción

La cipermetrina (CY), alfa-ciano-3-fenoxibenzil ester del ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil)-ciclopropan-carboxílico, es un piretroide sintético, similar a las piretrinas naturales pero más estable en el ambiente (Fig. 4.1). Su estructura está basada en el piretro, un extracto de flores secas de crisantemos. Presenta ocho isómeros, tiene un peso molecular de 416,3 g y una fórmula empírica  $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$  (Anexo 3). La CY grado técnico es un líquido viscoso de color amarillo-marrón, muy poco soluble en agua ( $<0,01$  mg/l, a  $20^{\circ}C$ ) pero soluble en solventes orgánicos. Posee una presión de vapor de  $5,1 \times 10^{-7}$  nPa (a  $70^{\circ}C$ ), un  $\log K_{ow}$  de 6,602 (EXTOXNET, 1996).

Las formulaciones de CY, que incluyen generalmente una mezcla de isómeros, son utilizadas como insecticidas no sistémicos que actúan por contacto e ingestión de una gran variedad de insectos asociados a cultivos de algodón, cereales, vegetales y frutales. Debido a su baja toxicidad en mamíferos y aves, es también utilizado para controlar plagas que afectan la salud pública (moscas, mosquitos y cucarachas) y clasificado como Clase II (moderadamente tóxico) por la USEPA.

Los piretroides actúan principalmente sobre el sistema nervioso central (SNC), inhibiendo las enzimas ATPasa que intervienen en el movimiento de los iones en contra de un gradiente de concentración regulado por el transporte activo y extendiendo la apertura de los canales de sodio en los tejidos nerviosos. Estos canales de sodio alterados producen una actividad repetitiva y una despolarización de las neuronas, dependiendo de cuánto tiempo se prolonga la apertura del canal (Narahashi, 2000; Soderlund y col., 2002). Las características de los distintos isómeros determinan el lugar de unión al canal de sodio y según el estereoisómero del que se trate la afinidad que tendrá con el mismo. Esta acción es especialmente crítica para organismos acuáticos, en los que las enzimas ATPasas proporcionan la energía

necesaria para el transporte activo y son muy importantes en los sitios de intercambio de oxígeno. Esta acción posiblemente afecte tanto el movimiento como la capacidad de mantener el equilibrio de iones, por lo que las superficies respiratorias son perturbadas, lo que indicaría que la CY es inherentemente más tóxica para los organismos acuáticos respecto a otros (Siegfried, 1993). La CY pertenece al grupo II dentro de los piretroides, por poseer un grupo CN en posición alfa, teniendo al cloro como halógeno sustituyente.



**Figura 4.1** Estructura química de la molécula de cipermetrina (CY) grado técnico.

La CY es uno de los insecticidas más utilizados de Argentina, donde las tasas de aplicación oscilan entre 60 y 280 g de i.a por hectárea. En nuestro país la utilización de este insecticida pasó de 973.396 en 1999 a 3.534.477 L/año en 2010 (CASAFE, 2010). Las formulaciones de CY están preparadas con coadyudantes que disminuyen la tensión superficial, aumentando su solubilidad y permitiendo una mayor penetración a la cutícula de los artrópodos. Se aplica en el cultivo generalmente antes de la floración o ante la aparición de plagas puntuales. Las dosis recomendadas para la aplicación de CY varían con las plagas objetivo y las formulaciones utilizadas.

La CY tiene persistencia moderada en suelos y se degrada más rápidamente en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica. Se hidroliza en medio acuoso, con mayor tasa de hidrólisis a pH superiores a 8. Posee una vida media en el

agua que varía de 50 a 100 días, siendo susceptible a la fotodegradación. Al presentar muy baja solubilidad y baja presión de vapor, se adsorbe, y se asocia a material particulado en ambientes acuáticos. Esto limita su movimiento particularmente en los suelos (Demetrio, 2012).

Se han informado concentraciones de CY en cuerpos de agua cercanos a agroecosistemas entre 0,0002 y 0,150 mg/L (Garforth y Woodbridge, 1984; Jergentz y col., 2005; Marino y Ronco, 2005). En áreas donde el insecticida fue aplicado en dosis de 150 g/Ha, se observó una severa reducción de organismos acuáticos (Smies y col., 1980).

La CY es altamente tóxica para peces y anfibios, probablemente por su baja tasa de metabolización. Al respecto, se han realizado numerosos estudios sobre los efectos letales y subletales del insecticida en exposiciones agudas, en los que se demostraron severos efectos sobre diferentes organismos acuáticos (Tripathi y Singh, 2004; Agostini y col., 2010; Shi y col., 2011; Wang y col., 2012). Sin embargo, hay escasa información de los efectos producidos por la CY en exposiciones crónicas. De acuerdo a los datos de toxicidad aguda, en larvas de *Hypsiboas pulchellus* se observaron efectos subletales como incurvación del eje, malformaciones en cabeza, ojos e intestinos como así también alteraciones en el comportamiento en concentraciones entre 0,00034-0,0034 mg CY/L (Agostini y col., 2010). En estadios tempranos de *Rana temporaria* expuestos a concentraciones tan bajas como 0,001 mg CY/L se observó, talla reducida, incurvación de la cola, mientras que en estadios tardíos se informó inhibición de la metamorfosis (Paulov, 1990). A nivel subcelular, se informó para larvas de *Odontophrynus americanus* inducción de micronúcleos (Cabagna y col., 2006) y en larvas de *Rana tigrina* inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (Khan y col., 2003).

## 4.2 Objetivos e hipótesis

### Objetivos

- ✓ Obtener los perfiles de toxicidad (TOPs, curvas de isotoxicidad) de un formulado comercial (FC, Glaxtrin 25%) y del ingrediente activo (i.a) de la CY para embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a partir de los resultados de letalidad.
- ✓ Comparar la toxicidad del i.a y un FC de la CY en larvas de *R. arenarum*.
- ✓ Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente al FC, en seis estadios comprendidos entre la segmentación temprana y la finalización del desarrollo embrionario.
- ✓ Dentro del rango de concentraciones subletales, evaluar los efectos teratogénicos, sobre el crecimiento, progreso del desarrollo, y en el comportamiento por exposición a la CY mediante bioensayos con organismos en distintas etapas de su desarrollo.
- ✓ Evaluar el potencial de peligrosidad de las poblaciones de *R. arenarum* expuestas a la CY.

Estos objetivos fueron planteados con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis:

### Hipótesis

- ✓ La CY produce efectos tóxicos sobre los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* y se manifiestan mediante efectos letales y subletales, entre éstos últimos, malformaciones, alteraciones en el comportamiento.
- ✓ El FC es más tóxico que el i.a.

- ✓ La CY causa toxicidad dependiente del estadio embrionario/larval en que se expone a los organismos, registrándose estadios del desarrollo más susceptibles que otros.
- ✓ La CY presenta un potencial de peligrosidad para las poblaciones de *R. arenarum*.

## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1 Preparación de las soluciones de exposición

Los bioensayos de toxicidad se realizaron utilizando CY grado técnico (95,1 % de pureza, CAS N° 52315-07-8), obtenido en Sigma Aldrich SA, y un formulado comercial con 25% de i.a (Glextrin 25®, Gleba S.A.). La composición del FC y del i.a es una mezcla de isómeros de CY  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil( $\pm$ )-cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxylato. Las soluciones de exposición fueron preparadas a partir de una solución madre de 1.000 mg CY/L. La solución madre de CY grado técnico (i.a) fue preparada en acetona grado analítico, mientras que las soluciones de exposición del FC fueron preparadas directamente en SA. Se realizaron 2 controles, uno con SA y otro con acetona a la máxima concentración empleada en los tratamientos que nunca supero el 1,1 % (ASTM, 1993). La concentración de CY grado técnico en la solución madre fue verificada de acuerdo a las siguientes condiciones cromatográficas: Equipo: Agilent 5975C, (GC/MS) con detector selectivo de masas para la identificación de los isómeros de CY de la solución madre; Columna: DB5-MS, capilar de 30 m de longitud, 0,25 mm d.i. y 0,25  $\mu$ m espesor de película; Gas portador: He; Programa de temperatura: 150°C-8°C/min-280°. El error entre las concentraciones nominales y las medidas no excedió el 5%.

### 4.3.2 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron 3 tipos de bioensayos:

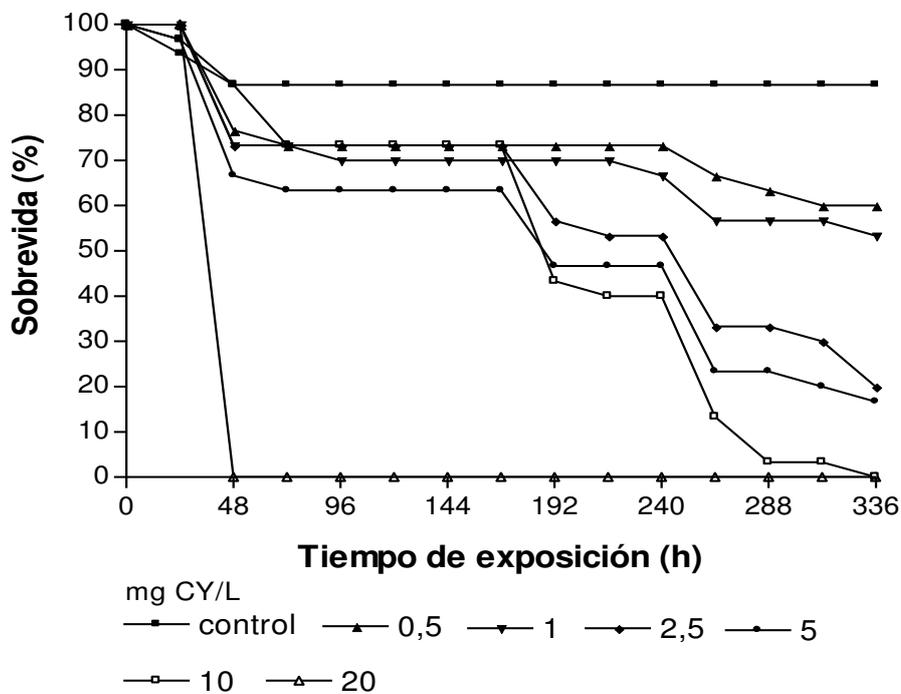
- 1) Exposición continua a CY (formulado comercial, FC) por períodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (336 h) a partir del estadio de blástula (E4). El rango de concentraciones fue: 0,5-20 mg CY/L.
- 2) Exposición continua al FC y al i.a por períodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (336 h) a partir del estadio de opérculo completo (E25). El rango de concentraciones fue: 0,005-30 mg CY/L.
- 3) Exposición por pulsos de 24 h a CY (formulado comercial, FC) en determinados estadios: blástula temprana (E4), placa neural (E13), respuesta muscular (E18), circulación branquial (E20), pliegue opercular (E23) y opérculo completo (E25). El rango de concentraciones fue: 0,05-30 mg CY/L.

## 4.4 Resultados

Los resultados de letalidad y efectos subletales de los controles de SA y acetona no difirieron entre ellos, con lo cual el término control en el resto de este estudio se refiere a ambos controles. Las concentraciones de CY de las soluciones de exposición no pudieron ser medidas, si la de la solución madre. Como el error entre la concentración nominal de la solución madre de la CY grado técnico y la cuantificada por CG/MS no superó el 5%, las concentraciones de exposición fueron expresadas como concentraciones nominales. Asimismo, las concentraciones del FC de CY están expresadas como la concentración del i.a en el FC (de acuerdo a lo indicado en el marbete).

#### 4.4.1 Exposición continua crónica al FC de CY a partir del estadio de blástula (E4)

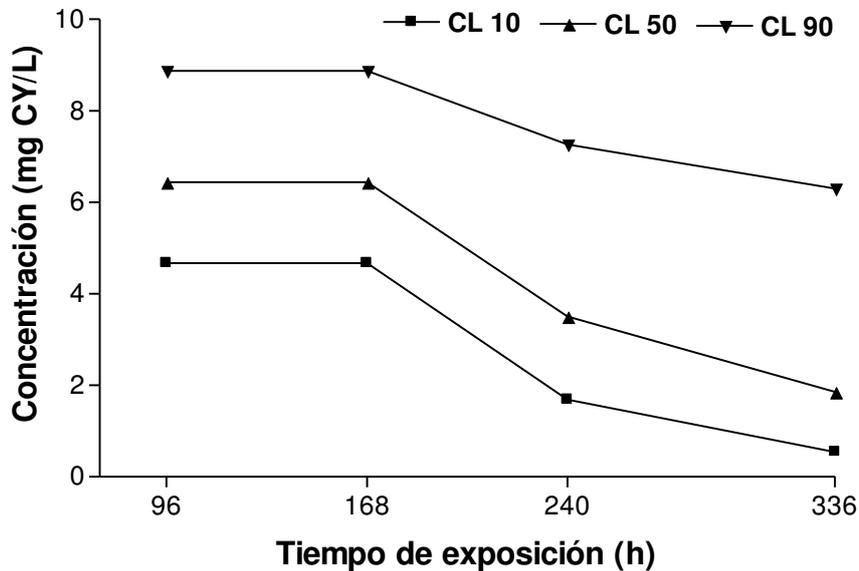
Se comenzaron a observar efectos letales significativos en la exposición aguda únicamente a la concentración más alta de 20 mg CY/L, alcanzándose el 100% de mortalidad antes de las 48 horas, mientras que la letalidad fue más gradual en relación al tiempo para el resto de las concentraciones hasta completarse el periodo agudo. Al extenderse el tiempo de exposición se observó un que la mortalidad se mantuvo constante hasta las 168 h. A partir de ese momento, se observó un nuevo aumento progresivo en la toxicidad letal hasta las 336 h (Fig. 4.2).



**Figura 4.2** Curvas de supervivencia de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones del FC de CY a partir del estadio de blástula (4).

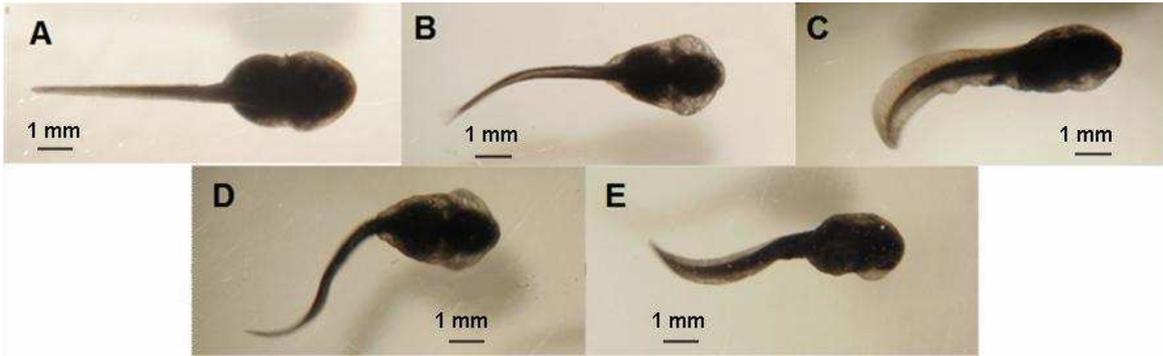
Las curvas TOP (Fig. 4.3) reflejaron el aumento significativo de la toxicidad del insecticida con el tiempo de exposición, obteniéndose por ejemplo, una CL 50 a las 96

y 168 h de 6,44 mg CY/L, y una CL 50 a las 240 y 336 h de 3,50 y 1,85 mg CY/L respectivamente. El valor NOEC de efectos letales a las 336 h fue 0,5 mg CY/L.

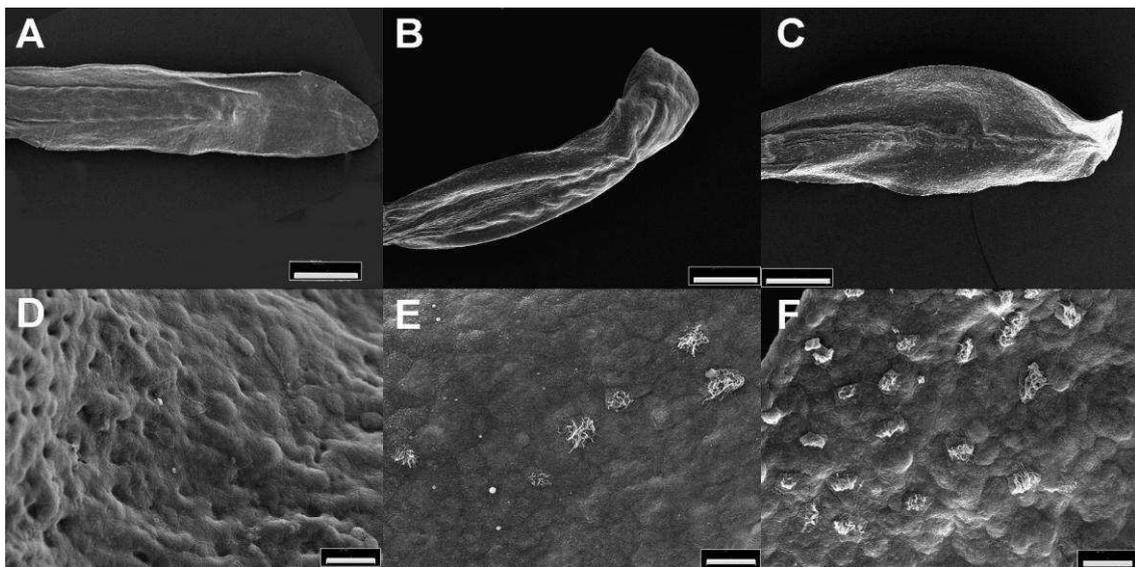


**Figura 4.3** Curvas TOP del FC de CY para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de blástula (E4). Aclaración: el PROBIT no permitió obtener los intervalos de confianza.

Los efectos subletales consistieron en desfasaje en el desarrollo, subdesarrollo de branquias, microcefalia, hidropesía, subdesarrollo general, incurvaciones y ondulaciones de la cola (Fig. 4.4 y 4.5). Los embriones al alcanzar el estadio de respuesta muscular comenzaron a presentar alteraciones en el comportamiento como hiperquinesia, contracciones espasmódicas, nado errático, contorsiones en el lugar, aletargamiento e inanición.



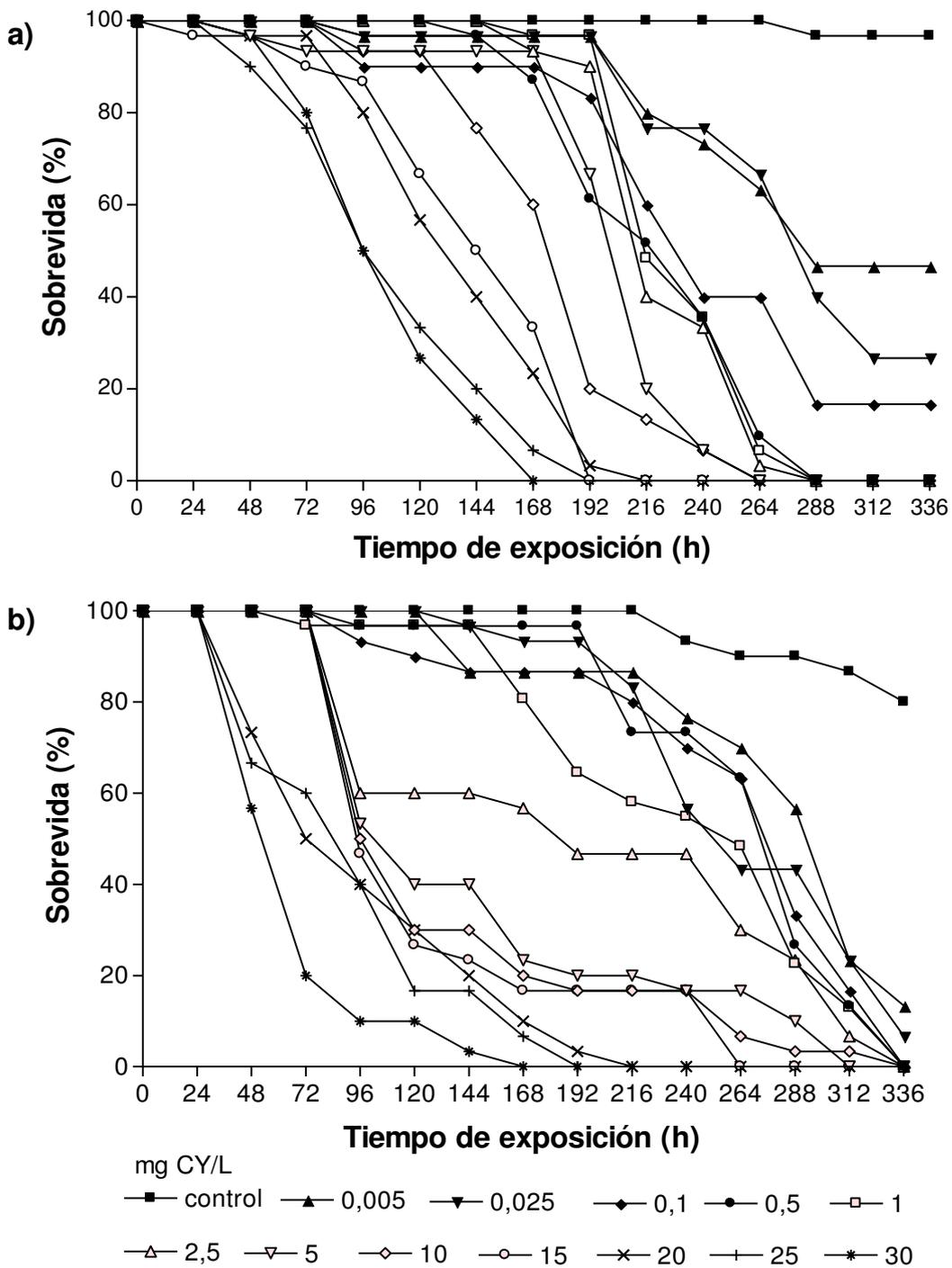
**Figura 4.4** Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a CY a partir del estadio de blástula (E4), a las 168 h,: (A) control, estadio opérculo cerrado en la derecha (E24); (B) 0,5 mg CY/L, hidropesía, incurvación dorsal de la cola; (C) 1 mg CY/L, subdesarrollo general, incurvación dorsal de la cola; (D) 5 mg CY/L, hidropesía, incurvación dorsal de la cola; (E) 10 mg CY/L, subdesarrollo general, incurvación dorsal de la cola.



**Figura 4.5** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a CY a partir del estadio de blástula (E4), a las 336 h: (A-C) detalle de la cola; (A) control; (B) 0.05 mg CY/L, incurvación del eje; (C) 0.5 mg CY/L, ensanchamiento y ondulación de cola; (D-F) detalle de superficie celular; (D) control, ya no posee células ciliadas; (E y F) 0.05 y 0.5 mg/L mg CY/L, abundante cantidad de células ciliadas indicio de retraso en el desarrollo. Escalas (en  $\mu\text{m}$ ): (A-C): 500; (D-F): 20. Aumentos: (A-C): 40x; (D-F): 800x.

#### **4.4.2 Exposición continua crónica al FC y al i.a de CY a partir del estadio de opérculo completo (E25)**

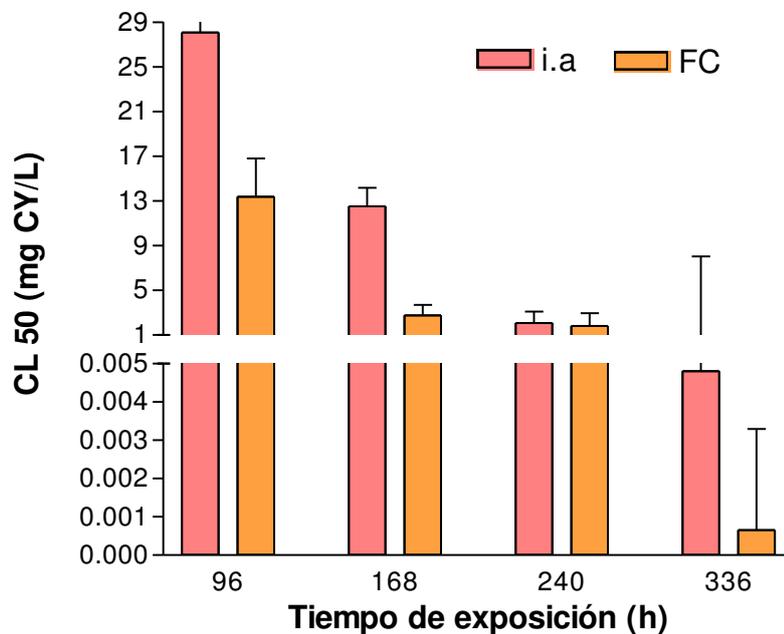
La figura 4.6 muestra la sobrevivencia de las larvas en función del tiempo de exposición a las diferentes concentraciones del i.a (a) y del FC (b). Desde las primeras horas se destacó el importante aumento del efecto letal del FC, por ejemplo a las 96 h la letalidad de las larvas expuestas al i.a fue significativa a partir de los 20 mg CY/L, mientras que para el FC la letalidad comenzó a ser significativa en concentraciones tan bajas como 2,5 mg CY/L (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 4.6** Curvas de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a: (a) ingrediente activo (i.a.) de CY; (b) formulado comercial (FC) de CY.

De acuerdo a los valores de CL 50 (Fig. 4.7), el FC fue significativamente más tóxico para las larvas que el i.a. en todos los tiempos de exposición, excepto a las 240

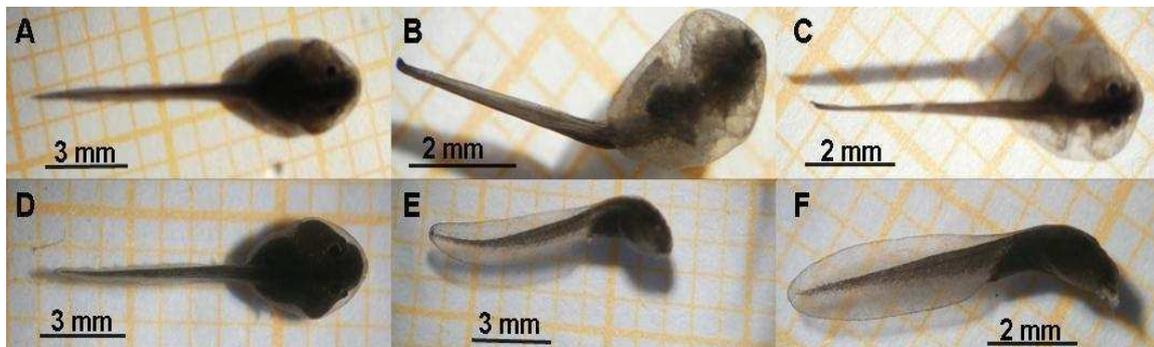
h (sin DS), llegando a ser hasta 7 veces más tóxico a las 336 h. Los resultados también mostraron un aumento significativo de la toxicidad al aumentar el tiempo de exposición tanto para el i.a como para el FC, obteniendo valores de CL 50 a las 96 y 168 h para el i.a de 28,07 (22,84-31,19) y 12,53 (10,93-14,17) mg CY/L respectivamente, mientras que los mismos parámetros para el FC fueron 13,37 (9,22-16,78) y 2,74 (2,02-3,71) mg CY/L. La CL50-336h fue para el i.a y el FC tan baja como 0,0048 (0,0018-0,0008) mg CY/L y 0,00065 (0-0,00325) mg CY/L respectivamente, indicando un aumento marcado en la toxicidad al extender el tiempo de exposición.



**Figura 4.7** Valores de CL 50 y sus intervalos de confianza del ingrediente activo (i.a) y del formulado comercial (FC) de cipermetrina (CY) obtenidos por exposición continua de larvas de *Rhinella arenarum* a diferentes tiempos. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los principales efectos subletales producidos por el i.a y el FC en *Rhinella arenarum* estuvieron asociados con alteraciones en el comportamiento. La neurotoxicidad se expresó como hiperquinesia, contracciones espasmódicas, nado errático y pérdida del equilibrio. Estos efectos se presentaron desde las primeras horas

y aún en las concentraciones más bajas (0,005 mg CY/L), con lo que no se pudo obtener un valor NOEC para efectos subletales. Al extenderse el tiempo, las alteraciones evolucionaron hacia una debilidad general hasta una ausencia total de movimiento espontáneo o inducido mecánica o lumínicamente. También se observó una reducción en la ingesta. Con respecto a las alteraciones morfológicas, las larvas expuestas al FC e i.a exhibieron un retraso en el desarrollo, talla reducida, incurvación lateral de la cola, incurvación del eje y una marcada hidropesía (Fig. 4.8). Todas estas alteraciones tuvieron un patrón concentración-dependiente.



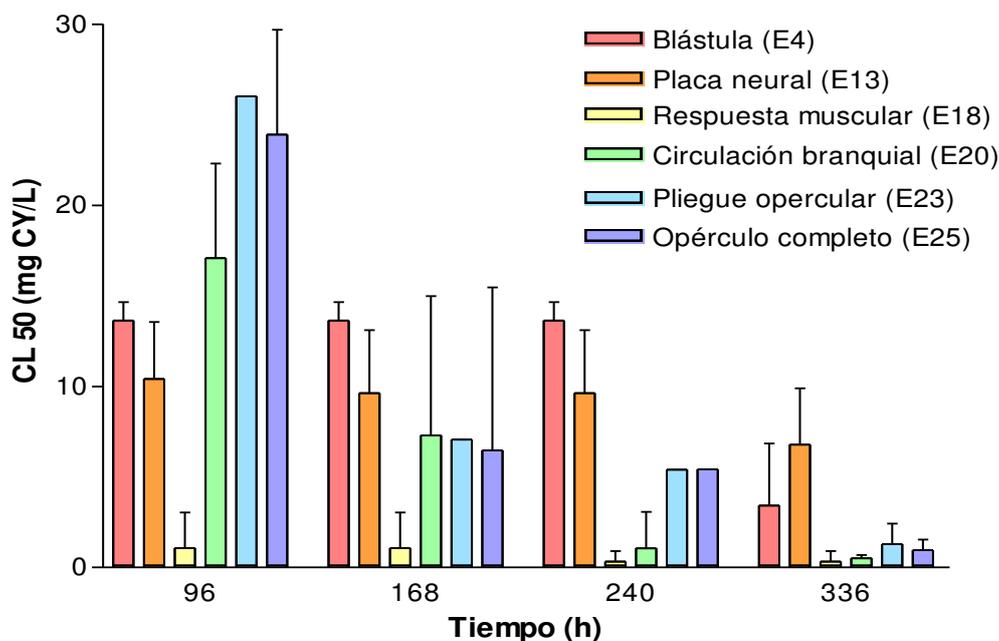
**Figura 4.8** Imágenes de microscopía estereoscópica de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a distintas concentraciones de CY a las 192 h (A-C) y 336 h (D-F). (A y D) control; (B) 0,025 mg CY/L, hidropesía, incurvación lateral del eje; (C) 0,1 mg CY/L, hidropesía; (E) 0,05 mg CY/L, subdesarrollo general, incurvación del eje; (F) 0,025 mg CY/L, subdesarrollo general.

#### 4.4.3 Exposición al FC de CY por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios

En la figura 4.9 se presentan los valores de CLs 50, y sus intervalos de confianza, para los distintos estadios en los diferentes tiempos post exposición a la CY. Se observa un patrón general de sensibilidad creciente hasta el estadio de respuesta muscular (E18), siendo éste el más sensible para todos los tiempos post exposición, siendo la CL50-96h=1,078 (0,47-3,04) mg CY/L y la CL50-336h=0,33

(0,15-0,91) mg CY/L, para luego comenzar nuevamente a aumentar la resistencia al insecticida en estadios más avanzados.

Con respecto a la toxicidad de los estadios en función del tiempo, para la exposición en el estadio de blástula la toxicidad se mantuvo constante hasta las 240 h, pero luego aumentó 3 veces en los 4 días subsiguientes, siendo la CL<sub>50</sub>-240h=13,63 (12,69-14,65) mg CY/L y la CL<sub>50</sub>-336h=3,42 (1,71-6,84) mg CY/L. En los estadios de neurula y de respuesta muscular no se observaron DS ( $p > 0,05$ ) en la toxicidad en función del tiempo, mientras que a partir del estadio de circulación branquial (E20) la toxicidad aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en las primeras horas post exposición, siendo la CL<sub>50</sub>-96h=17,08 (13,09-22,3) mg CY/L y la CL<sub>50</sub>-168h=7,29 (3,55-14,99) mg CY/L. Con respecto a la sensibilidad durante el periodo agudo (96 h) post exposición, se obtuvo el siguiente orden decreciente de sensibilidad: E18 > E13-E4 (sin DS) > E20-E25-E23 (sin DS). Pero al aumentar marcadamente la toxicidad a medida que el embrión fue expuesto a partir de estadios más tardíos, el orden de sensibilidad decreciente cambió a: E18 > E20-E25-E23 (sin DS) > E13-E4 (sin DS).



**Figura 4.9** Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza de la cipermetrina (CY) a distintos tiempos post-exposición de los embriones de *Rhinella*

## CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

---

*arenarum* expuestos por pulsos de 24 h en distintos estadios del desarrollo embrionario.

Se observaron efectos teratogénicos producidos por el insecticida durante las primeras horas post exposición para los estadios tempranos del desarrollo en las concentraciones más altas (a partir de 10 mg/L): disociación celular, retraso en el desarrollo, superficie irregular, tapón vitelino persistente. Al avanzar el desarrollo se observó talla reducida, subdesarrollo de branquias, microcefalia, incurvación del eje, ondulaciones en la aleta e hidropesía.

Los efectos subletales más significativos a partir de la llegada al estadio de respuesta muscular (E18) y durante el periodo larval fueron las alteraciones en el comportamiento. Durante las primeras horas post exposición los embriones y larvas presentaron hiperquinesia, nado anormal (nado en círculo o de lado), contracciones espasmódicas rápidas y lentas, mientras que el insecticida produjo a largo plazo disminución del movimiento evolucionando hasta ausencia de movilidad tanto espontánea como inducida por estímulos de luz/mecánicos. Asimismo, se observó una reducción en la ingesta de alimento de las larvas expuestas con respecto al grupo control. Todos estos efectos fueron concentración-dependientes. En los estadios tardíos (E20, E23 y E25) luego de 10 días post exposición aproximadamente los individuos expuestos a las concentraciones más bajas (hasta 0,5 mg/L) fueron recuperando su comportamiento normal, sin contracciones espasmódicas, y con movimientos natatorios normales.

Con respecto a los valores NOEC para efectos subletales, solo se pudieron obtener en pocos estadios y a determinados tiempos, ya que los embriones expuestos aún a las más bajas concentraciones presentaron alteraciones en el comportamiento (tabla 4.1). En la tabla se observa la marcada diferencia entre los valores NOEC para

CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de  
*Rhinella arenarum*

efectos letales y subletales, lo cual indica que se produce una alta incidencia de efectos subletales sin una mortalidad significativa.

Estadio	NOEC para efectos letales				NOEC para efectos subletales			
	96 h	168 h	240 h	336 h	96 h	168 h	240 h	336 h
Blástula (E4)	10	10	10	1	<0,05	<0,05	<0,05	1
Placa neural (E13)	1	1	1	1	1	<0,05	<0,05	<0,05
Respuesta muscular (E18)	0,1	0,1	0,05	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Circulación branquial (E20)	30	1	0,1	0,5	<0,05	<0,05	<0,05	0,1
Pliegue opercular (E23)	5	5	1	0,5	<0,05	<0,05	0,5	0,5
Opérculo completo (E25)	10	2,5	0,5	0,1	<0,05	<0,05	0,1	0,1

**Tabla 4.1** Valores NOEC (mg CY/L) para efectos subletales y letales a distintos tiempos post tratamiento de los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos por pulsos de 24 h en distintos estadios del desarrollo embrionario.

#### 4.4.4 Evaluación de peligrosidad

La concentración esperada en el ambiente (CEA) estimada para CY fue calculada como el porcentaje de la máxima tasa de aplicación sugerida, 400 g i.a/L/ha (Gleba S.A., 2012), dependiendo de: (a) exposición por deriva, escorrentía (10%), o (b) por una sobreexposición durante las aplicaciones aéreas (100%), por lo que el valor CEA calculado para CY, de acuerdo al primer supuesto (a) es 4 mg i.a/L/m<sup>2</sup>, y para (b) es 40 mg i.a/L/m<sup>2</sup>. Utilizando estos valores, estimamos los cocientes de peligrosidad HQ (HQ=CEA/NOEC) para el i.a y para el FC. La tabla 4.2 resume la información de los HQ obtenida para la exposición continua de larvas a partir del E25 al i.a y al FC,

## CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

para tres tiempos distintos. Estos resultados destacan que los valores de HQ 2, para todos los tiempos de exposición estuvieron por encima del valor de relevancia ambiental, LOC para el FC. Los valores de HQ 1 para el i.a estuvieron por encima de dicho valor en la exposición crónica, mientras que para el FC los valores de HQ 1 estuvieron siempre por encima del valor LOC inclusive desde la exposición aguda.

	96 h			168 h			336 h		
	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2
<b>i.a</b>	10	0,4	4*	5	0,8	8*	<0,005	800*	8000*
<b>FC</b>	1	4*	40*	0,5	8*	80*	<0,005	800*	8000*

**Tabla 4.2** Valores NOEC para efectos letales (mg CY/L) y cocientes de peligrosidad (HQ) para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h), y crónico (336 h) al ingrediente activo (i.a) y al formulado comercial (FC) de cipermetrina (CY). \*HQ>1, significa que existe riesgo de que se produzcan efectos adversos debido a la exposición a la CY.

### 4.5 Discusión

Los resultados de este estudio destacan la toxicidad de la CY, tanto para el ingrediente activo (i.a) como para el formulado comercial (FC) sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*. El FC presentó una mayor toxicidad que el i.a, tanto para efectos letales como subletales, un hecho muy relevante considerando que es el compuesto que efectivamente se aplica en los cultivos. Esta diferencia en la sensibilidad entre el i.a y el FC fue informada para muchos plaguicidas, y puede deberse a los coadyuvantes que contienen las formulaciones (Mann y Bidwell, 1999; Relyea, 2009), produciendo una toxicidad adicional del i.a por efectos sinérgicos. Un estudio de toxicidad en mesocosmos, mostró una tasa de letalidad del 98% en larvas de *Bufo americanus* expuestas por 49 días a 0,009 mg/L de un FC de permetrina (insecticida sintético con el mismo modo de acción que CY), lo que estaría indicando

que los efectos directos sobre organismos en sistemas acuáticos pueden llegar a ser muy severos (Boone, 2008).

La toxicidad del FC sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum* indicó que las larvas son más sensibles que los embriones, observándose un patrón distinto de toxicidad para estos estadios. Si bien, durante la exposición aguda los embriones presentaron una sensibilidad ligeramente mayor que las larvas, a partir del periodo crónico corto las larvas fueron significativamente más sensibles al FC que los embriones. Debido a que los piretroides actúan principalmente sobre los canales de sodio y calcio en los tejidos nerviosos, la mayor sensibilidad de los estadios tardíos probablemente esté reflejando una maduración en la diferenciación del sistema nervioso. Así, las CL 50-240 y 336 h para los embriones fueron de 3,50 y 1,85 mg CY/L respectivamente mientras que para el E25 fueron tan bajas como 1,82 (0,68-2,73) mg CY/L y 0,00065 (0-0,00325) mg CY/L respectivamente, obteniéndose una toxicidad a la CY de hasta 2.800 veces mayor para las larvas. Este mismo patrón se observó en los tratamientos por 24 h, en donde los estadios tempranos presentaron una mayor sensibilidad al insecticida al comienzo del tratamiento, siendo el estadio de respuesta muscular (E18) el más sensible, mientras que luego del periodo crónico la toxicidad fue mayor en los últimos estadios. Esta misma sensibilidad estadio-dependiente fue observada en otros estudios con anfibios expuestos a CY, en los que los estadios larvales fueron más sensibles que los embrionarios (Berrill y col., 1993; Biga y Blaustein, 2013). Así también, la recuperación observada en este trabajo en las exposiciones por pulso al insecticida fue informada por Berrill y colaboradores (1993). En dicho estudio, larvas de *Rana clamitans* expuestas a CY por 96 h presentaron una talla significativamente menor que la de los controles y alteraciones en el comportamiento, que se revirtieron luego de 25 días de suspendida la exposición. Cabe destacar que esta recuperación fue mayor a 20°C que a 15°C, demostrando que si bien los organismos se pueden recuperar de los efectos tóxicos, aún pocas horas de

CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de  
*Rhinella arenarum*

---

una gran vulnerabilidad puede ser crítica, y más severa aún cuando la recuperación es más lenta.

Los valores de letalidad aguda obtenidos en este estudio presentan diferencias con los resultados obtenidos para otras especies (tabla 4.5). En este estudio, si bien la CY resultó letal para exposiciones agudas a concentraciones que exceden el rango ambientalmente relevante, fueron los datos de letalidad crónica los que resultaron alarmantes, destacando la importancia de extender el tiempo de exposición de los bioensayos. En larvas de *Rana arvalis* se observó que al extenderse el tiempo de exposición a CY, el proceso metamórfico tardó más tiempo en completarse (Greulich y Pflugmacher, 2003). Estas larvas se distinguían de las larvas control por ser mucho más compactas físicamente (talla y peso significativamente reducidos). Este hecho también fue observado por exposición a otros plaguicidas (Hayes, 2000; Brodeur y col., 2009; Svartz y col., 2012).

Especie	Efectos Letales	Efectos Subletales		Referencia
		Comportamiento	Morfología	
<i>Rhinella arenarum</i>	<b>i.a</b> CL 50-96h= 28,07mg/L	Hiperquinesia, contracciones espasmódicas, nado errático, temblores, ausencia de movimiento	Subdesarrollo general, hidropesía, incurvación y ondulación en aleta.	Presente estudio (datos publicados en Svartz y Pérez-Coll, 2013)
	CL 50-336h =0,0048 mg/L			
	<b>FC</b> CL 50-96h= 11,20 mg/L			
	CL 50-336h =0,00065 mg/l			

CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

<b><i>Hypsiboas pulchellus</i></b>	<b>i.a</b> CL 50-96h= 0,48 mg/l	Nado lento, inmovilidad.	Incurvación en el eje, malformaciones en ojos, cabeza e intestinos.	Agostini y col., 2010
	<b>FC</b> CL 50-96h= 0,18 mg/l			
<b><i>Rana temporaria</i></b>	CL 50-48h= 0,0065 mg/l	-	Inhibición del desarrollo, crecimiento y metamorfosis.	Paulov, 1990
<b><i>Bufo melanostictus</i></b>	CL 50-96h= 0,006 mg/l	-	-	Saha y Kaviraj, 2008
<b><i>Physalaemus biligonigerus</i></b>	CL 50-96h= 0,129 mg/l	-	Apopstosis en el SNC	Izaguirre y col., 2000
<b><i>Duttaphrynus melanostictus</i></b>	CL 50-96h= 0,00334 mg/l	Torsiones, natación no coordinada, debilidad de movimientos, parálisis	Deformaciones en el eje y en la cola, desespiralamiento del intestino	David y col., 2012

**Tabla 4.5** Datos publicados de toxicidad de CY sobre el desarrollo larval de diferentes anfibios.

Las alteraciones morfológicas observadas en el presente trabajo fueron similares a aquellas informadas en otros estudios con anfibios, como así también los efectos en el comportamiento los cuales representan signos típicos de intoxicación con ciano piretroides (tabla 4.5). Las alteraciones en el comportamiento pueden ser explicadas por la apoptosis inducida por la CY en el sistema nervioso central (Izaguirre y col., 2000; Casco y col., 2006). Así, en larvas premetamórficas de *R. arenarum* se observó que la susceptibilidad celular a la apoptosis (CAS) aumentaba al comenzar la exposición, sugiriendo un efecto proliferativo o regenerativo, pero decrecía cuando la concentración y/o el tiempo de exposición aumentaba, sugiriendo que el control del ciclo celular estaba alterado activándose una ola apoptótica (Izaguirre y col., 2006). Las contracciones espasmódicas y los temblores que son causados por este

insecticida son tan obvios y anormales que podrían ser utilizados como “indicadores de comportamiento” (Little y col., 1990) en estudios toxicológicos del comportamiento a campo.

Como se mencionó anteriormente, los piretroides son particularmente tóxicos para los organismos acuáticos en comparación con mamíferos y aves, debido a la menor eficiencia de los sistemas de detoxificación de los primeros. En peces se observó una baja tasa de biotransformación de los piretroides (Haya, 1989), siendo la principal vía de eliminación la bilis (Glickman y col., 1982; Edwards y col., 1987). En anfibios expuestos a CY y butóxido de piperonilo (inhibidor del sistema de detoxificación CYP450) no se observó el efecto sinérgico típico de este compuesto sobre la acción tóxica del insecticida, indicando una deficiencia en la hidrólisis del piretroide (Berrill y col., 1993). Asimismo, la CY como compuesto lipofílico, puede penetrar en la bicapa lipídica de los tejidos, alterando la orientación de los fosfolípidos y causando cambios en la fluidez de la membrana (Vaalavirta y Taht, 1995). La alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes causada por la CY fue informada como uno de los mecanismos de toxicidad en larvas de *Duttaphrynus melanostictus* como así también la peroxidación lipídica que puede conducir a la apoptosis (David y col., 2012). La metabolización de la CY y de otros piretroides libera cianohidrinas las cuales son inestables en condiciones fisiológicas y descompuestas a cianidos y aldehídos. Estos metabolitos producen radicales libres y causan estrés oxidativo, produciendo condiciones perjudiciales (Grajeda y col., 2004).

Teniendo en cuenta los resultados de la evaluación de peligrosidad, los HQ 2 (exposición por aplicaciones directas, considerando el peor escenario) para el FC resultaron en valores más altos que 1 (valor LOC), aún para la exposición aguda. Basándonos en los resultados de HQ 1 (exposición por deriva, esorrentía y lavado, escenario normal), para el FC estuvieron por encima del valor LOC a partir de la exposición aguda, mientras que para el i.a estos cocientes superaron el valor LOC

solo a partir de exposiciones crónicas. Estos resultados indican que tanto el i.a como el FC representan un potencial de peligro para *R. arenarum* a partir de exposiciones crónicas, pero el FC representa un peligro ya desde la exposición aguda (para un escenario normal). Cabe señalar que estos resultados fueron obtenidos con el cálculo de la CEA, el cual para estas sustancias es muy alto y ambientalmente no relevante debido a las altas dosis de aplicación informadas. En cambio, si se calculan los HQ con valores medidos, también se obtienen valores mayores a 1 para exposiciones crónicas, indicando un potencial de peligrosidad en caso de exposiciones prolongadas.

Considerando los resultados obtenidos y contemplando la evaluación de peligrosidad basada en los valores estimados de HQ, la contaminación de los cuerpos de agua con CY podría resultar en severos efectos adversos para el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum*, poniendo en riesgo las poblaciones de este anfibio nativo.

## 4.6 Conclusiones

- 1) La exposición a CY causó toxicidad sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, la cual se manifestó mediante efectos letales y subletales.
- 2) La toxicidad de CY sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum* fue estadio-dependiente.
- 3) Los estadios embrionarios tardíos presentaron una susceptibilidad mayor a la CY, siendo el periodo larval el más susceptible, como consecuencia de la maduración del sistema nervioso, *blanco* de la CY.
- 4) La CY causó severos efectos subletales como disociación celular, retraso en el desarrollo, superficie irregular, tapón vitelino persistente., subdesarrollo de branquias, microcefalia, incurvación del eje, ondulaciones en la aleta e hidropesía. Pero principalmente se vio afectado el comportamiento (hiperquinesia,

CAPÍTULO 4: Toxicidad de la cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

---

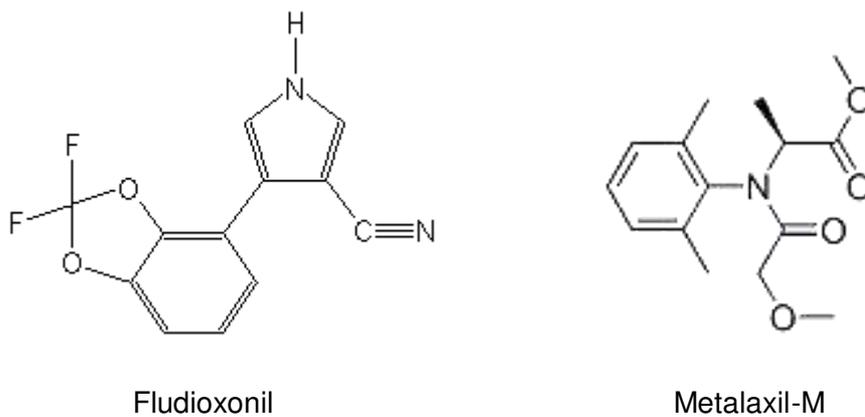
contracciones espasmódicas, nado errático, incurvaciones temporales y finalmente parálisis), como consecuencia del desarrollo del sistema nervioso.

- 5) El FC causó mayor toxicidad que el i.a, hecho muy relevante debido a que es el compuesto formulado el que efectivamente se aplica en zonas agrícolas.
- 6) De acuerdo a los niveles de CY que se han encontrado en aguas superficiales próximas a áreas agrícolas, y teniendo en cuenta los valores de HQ obtenidos por la evaluación de peligrosidad, este insecticida podría poner en riesgo la continuidad de las poblaciones de esta especie.

**CAPÍTULO 5:**  
**TOXICIDAD DEL MAXIM® XL**  
**SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-**  
**LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM***

## 5.1 Introducción

El Maxim® XL es un fungicida utilizado para proteger la semilla y la plántula en los primeros estadios de desarrollo, de amplio espectro, sistémico y que actúa por contacto (Syngenta, 2004). Controla hongos de las semillas de algodón, arveja, girasol, maní, maíz, soja y sorgo. Según el tipo de patógeno, las dosis de uso son de hasta 400 ml/100 kg de semillas. Maxim® XL es una mezcla de dos principios activos: Fludioxonil y Metalaxil-M (Fig. 5.1, Anexo 4).



**Figura 5.1** Estructura química de los principios activos del formulado comercial del fungicida Maxim® XL.

Según datos del mercado argentino de productos fitosanitarios de 2008-2009, el formulado con 2,5% de Fludioxonil + 1% de Metalaxil-M es el curasemilla más utilizado en Argentina con una aplicación anual de 290.400 litros (CASAFE, 2010). A pesar de la intensa utilización en el país, hay pocos estudios que informen de los niveles ambientales de estos dos principios activos en aguas. En Estados Unidos se informó una alta frecuencia en la ocurrencia del metalaxil en cuerpos de agua, detectándose concentraciones de 0,000067 mg/L (Battaglin y col., 2011), y

detectándose mayormente en aguas que reciben descargas urbanas más que de zonas agrícolas (Robinson, 2004).

El Fludioxonil, 4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il) 1H-pirrol-3-carbonitrilo, pertenece al grupo de los fenilpirroles, tiene una estructura química estrechamente relacionada a un compuesto bio-activo natural producido por un microorganismo del suelo del género *Pseudomonas* spp. El Fludioxonil inhibe el desarrollo del micelio del hongo. Actúa por contacto y penetración parcial, altera el intercambio intercelular del hongo a nivel membrana e induce una reducción en la absorción de los aminoácidos y azúcares, inhibiendo así su crecimiento. Posee un amplio rango de acción sobre patógenos de los grupos Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes, con actividad fungistática o fungicida según el tipo de patógeno. Su toxicidad según la OMS es de clase III, moderadamente peligroso, y según la clasificación europea 67/548/EEC o 1999/45/EC es considerado muy tóxico para los organismos acuáticos, pudiendo producir efectos adversos a largo plazo. Es ligeramente persistente en el suelo y degradado por la actividad microbiana en condiciones aerobias, sin embargo persiste en condiciones anaerobias y en ausencia de luz. Se demostró una alta resistencia a la hidrólisis, encontrándose residuos de este compuesto en ambientes acuáticos cercanos a regiones de cultivo vitivinícolas (NRAAVC, 2000). Es muy escasa la información de la toxicidad de estos fungicidas en especies *no blanco*. Se ha informado por ejemplo la toxicidad del Fludioxonil en *Scenedesmus acutus* obteniéndose una CL 50-48h de 4,54 (Verdisson y col., 2001) y en algas de la especie *Scenedesmus obliquus* expuestas a concentraciones de 1 a 3 mg/l se observó aumento de la actividad de enzimas asociadas a estrés oxidativo (catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión S-transferasa) (Dewez y col., 2005). Asimismo, el fludioxonil es considerado un potencial disruptor endócrino en humanos, informándose actividad antiestrogénica en células cancerígenas mamarias (Orton y col., 2011; Teng y col., 2013).

El Metalaxil-M, N-(2,6-dimetilfenil)-N-(2'-metoxiacetil)-D-alanina metil éster, pertenece al grupo de las acilalaninas y es el isómero biológicamente más activo del metalaxil, de acción sistémica y de contacto. Este compuesto es conocido por su actividad contra los hongos de la clase Oomicetes, como *Phytophthora* spp., *Plasmopora* spp., *Peronospora* spp. y *Pythium* spp. El metalaxil es utilizado no solo en la agricultura sino que también se lo utiliza en césped y en cultivos no alimenticios. El metalaxil inhibe el crecimiento del micelio y la formación de las esporas. El ingrediente activo penetra en la semilla cuando se inicia la germinación, y se difunde por la plántula en forma acropétala. El Metalaxil-M actúa por inhibición de los mecanismos de síntesis del ácido ribonucleico, interactuando con el complejo ARN-polimerasa I, inhibiendo la incorporación del ribonucleótidos trifosfato al ARN ribosomal (Hassall, 1990). El metalaxil se filtra muy fácilmente en suelos arenosos, es muy baja la absorción en el suelo y altamente soluble en agua. Presenta una alta persistencia, siendo su vida media de 19,5-113 días en suelo y de 47,5 días en agua. Estas propiedades lo manifiestan como un potencial contaminante en los cuerpos de agua. El Metalaxil es una mezcla racémica (*rac*) de dos enantiómeros (R y S), pero debido a que el R-enantiómero posee entre 3-10 veces más actividad fungística (Fisher y Hayes, 1985) que el S, se lo reemplazó por el Metalaxil-M (Nuninger y col., 1996) que está compuesto por 97,5% de R y 2,5% de S-enantiómero, con la misma actividad biológica que el Metalaxil-*rac* a 50% de la tasa de aplicación (Buser y col., 2002). La toxicidad de éstos compuestos fue analizada en invertebrados terrestres como la lombriz (*Eisenia foetida*), obteniéndose una CL 50-48 h de 0,052 y 0,022 mg/cm<sup>2</sup> para *rac*-metalaxyl y R-metalaxyl respectivamente (Xu y col., 2011). En el mismo estudio se analizó la bioconcentración, observándose que la incorporación es baja y disminuye al poco tiempo de la exposición (24 h), dando cuenta de su baja lipofilicidad (log Kow = 1,65). En anfibios, se informaron efectos letales y subletales del metalaxil solo en larvas de *Rana pipiens*, las cuales presentaron alteración en el crecimiento (talla y

peso reducidos), con un valor NOEC de 0,00016 mg/L (Hutchinson y Czyska, 1975), y se observó una mortalidad del 35% en las larvas expuestas a 0,0001 mg/L al comenzar la metamorfosis (Hayes y col., 2006). En el pez cebra (*Danio rerio*) también se presentaron diferencias de toxicidad en ambos compuestos, observándose inducción de la actividad de Na(+),K(+)-ATPasa (Yao y col., 2009). En ratas, el Metalaxil puede inducir bradicardia (Naidu y col., 1988), afectando la actividad de monoamina oxidasas en el corazón (Naidu y col., 1989). Algunos datos sugieren que el Metalaxil presenta actividad como una cotoxina o cocarcinógeno (Paolini y col., 1996), y puede causar cambios cromosómicos en humanos y animales (Hrelia y col., 1996).

Según asegura Syngenta, la compañía que comercializa este producto, el Maxim® XL es “altamente tóxico para organismos acuáticos” y recomienda “tener especial cuidado a fin de evitar que el producto entre en contacto con ambientes acuáticos manteniéndolo alejado de cursos de agua, fuentes o estanques”. Los que siguen son datos proporcionados por Syngenta, por lo que deberían tomarse con precaución. En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) la CL 50-96h es 20 mg/L. En algas verdes (*Selenastrum capricornutum*) se observó inhibición del crecimiento (CL 50-72h de 24,9 mg/L). Para invertebrados acuáticos la toxicidad fue menor, así para la pulga de agua (*Daphnia magna*) se informó una CE 50-48h de 63 mg/L, y en invertebrados terrestres como la lombriz (*Eisenia foetida*) una CL 50-14 días de 1000 mg/Kg (Syngenta, 2004).

Considerando la creciente utilización de este producto en la Argentina para el control de hongos en la soja y la modalidad cercana al monocultivo que se está imprimiendo a nuestros agroecosistemas, es de suma importancia evaluar la toxicidad de este producto en especies autóctonas clave como el caso de los anfibios en su etapa del ciclo de vida más sensible, el desarrollo embrio-larval.

## 5.2 Objetivos e Hipótesis

### Objetivos

- ✓ Obtener los perfiles de toxicidad (TOPs, curvas de isotoxicidad) del Maxim® XL para embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a partir de los resultados de letalidad.
- ✓ Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente al Maxim® XL, en seis estadios comprendidos entre la segmentación temprana y la finalización del desarrollo embrionario.
- ✓ Dentro del rango de concentraciones subletales, evaluar los efectos teratogénicos, sobre el crecimiento, progreso del desarrollo, tiempo medio en completar la metamorfosis, y alteraciones en el comportamiento por exposición a dichas sustancias mediante bioensayos con organismos en distintas etapas de su desarrollo.
- ✓ Evaluar el posible efecto del fungicida sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de *R. arenarum*, analizando la proporción de sexos y las posibles alteraciones en el desarrollo y citología de la gónadas.
- ✓ Evaluar el potencial de peligrosidad de las poblaciones de *R. arenarum* expuestas a Maxim® XL.

Estos objetivos fueron planteados con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis:

### Hipótesis

- ✓ El Maxim® XL produce efectos tóxicos sobre los embriones y larvas de *R.arenarum* y se manifiesta mediante efectos letales y subletales, entre estas últimas malformaciones, alteraciones en el comportamiento y en la metamorfosis.

- ✓ El Maxim® XL tiene una toxicidad dependiente del estadio embrionario/larval en que se expone a los organismos, registrándose estadios del desarrollo más susceptibles que otros.
- ✓ El Maxim® XL afecta el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de *R. arenarum*, alterando así también la proporción de sexos.
- ✓ El Maxim® XL presenta un potencial de peligrosidad para las poblaciones de *R. arenarum*.

## 5.3 Materiales y métodos

### 5.3.1 Preparación de las soluciones de exposición

Los bioensayos de toxicidad se realizaron utilizando el formulado comercial Maxim® XL. La composición del formulado es: 2,5 g/100 ml de Fludioxonil (CAS N° 131341-86-1) y 1 g/100 ml de Metalaxil-M (CAS N° 70630-17-0). Las soluciones de exposición fueron preparadas en SA. Las concentraciones de las soluciones de exposición fueron expresadas como la sumatoria de la concentración de ambos i.a en el FC (de acuerdo a lo indicado en el marbete).

### 5.3.2 Condiciones de los bioensayos

Se realizaron 3 tipos de bioensayos:

- 1) Exposición continua a Maxim® XL a partir del estadio de blástula temprana (E4) hasta completar la metamorfosis. El rango de concentraciones fue: 0,25-80 mg/L. Una vez completada la metamorfosis se realizaron bioensayos post-metamorfosis de los individuos que sobrevivieron a las concentraciones de 0,25; 0,5; 1, 2 y 3 mg Maxim/L (ver metodología más adelante).

2) Exposición continua a Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25) hasta completar la metamorfosis. El rango de concentraciones fue: 0,25-60 mg/L.

3) Exposición por pulsos de 24 h a Maxim® XL en determinados estadios del desarrollo: blástula temprana (E4), gástrula (E8), placa neural (E13), respuesta muscular (E18), circulación branquial (E20), pliegue opercular (E23) y opérculo completo (E25), a fin de evaluar la toxicidad estadio-dependiente. El rango de concentraciones fue: 0,25-60 mg/L.

#### **Condiciones de los bioensayos con juveniles 60 días post–metamorfosis:**

Una vez finalizada la metamorfosis de las larvas control y de las larvas expuestas a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las concentraciones 0,25, 0,5, 1, 2 y 3 mg Maxim/L, los individuos fueron mantenidos sin exposición durante 60 días hasta alcanzar la diferenciación sexual. Los juveniles recién metamorfoseados (reabsorción completa de la cola) fueron transferidos a frascos de vidrio de 1,5 L acondicionados con 100 g de arena húmeda en SA (Fig. 5.2). Los frascos fueron rociados día por medio con SA para mantener el medio humedecido. Los juveniles fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que los embriones y larvas, y alimentados a base de microgrillos de la especie *Acheta domestica* (~3mm, 2-3 semanas de vida).



**Figura 5.2** Bioensayos post-metamorfosis. (A y B) frascos donde se ubicaron a los juveniles una vez completada la metamorfosis; (C) juvenil recién metamorfoseado.

Los individuos muertos se registraron y descartaron. Al alcanzar los 60 días post-metamorfosis, momento en que los individuos se pueden sexar por observación de sus gónadas bajo microscopio estereoscópico, fueron anestesiados con una solución de benzocaína, medidos (SVL: longitud desde el hocico hasta la abertura cloacal) y posteriormente decapitados.

Para el procesamiento histológico, se extrajo el complejo riñón-gónada de cada ejemplar, se lo fijó en líquido Bouin por 24 h y posteriormente se almacenaron las muestras en etanol 70°. Las gónadas fueron observadas y medidas bajo microscopio estereoscópico, pudiéndose realizar un primer registro de la proporción de sexos y alteraciones macroscópicas gonadales.

Las muestras seleccionadas para realizar los cortes histológicos fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espesor, los

cuales fueron coloreados con hematoxilina-eosina, observados y fotografiados bajo un microscopio Nikon Microphot FX.

### **5.3.3 Análisis de los datos de los bioensayos post-metamorfosis**

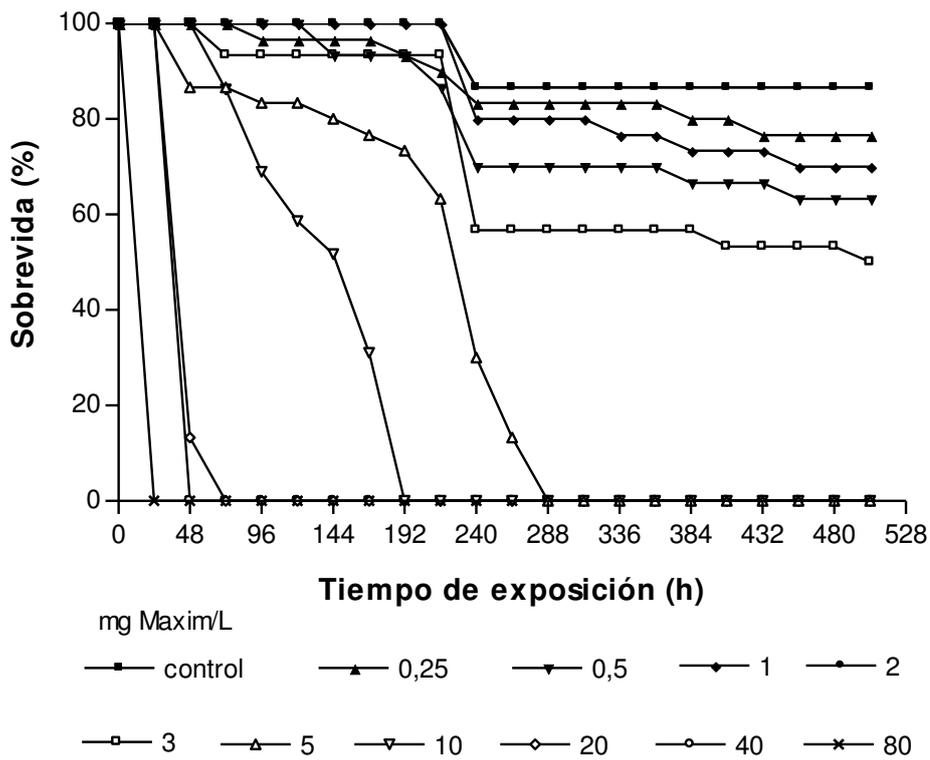
Los valores medios de talla de los juveniles y de las gónadas fueron comparadas estadísticamente mediante un ANOVA de dos factores ( $p < 0,05$ ).

La proporción de sexos se analizaron estadísticamente entre tratamientos y con el control mediante pruebas exactas de Fischer ( $p < 0,05$ ).

## **5.4 Resultados**

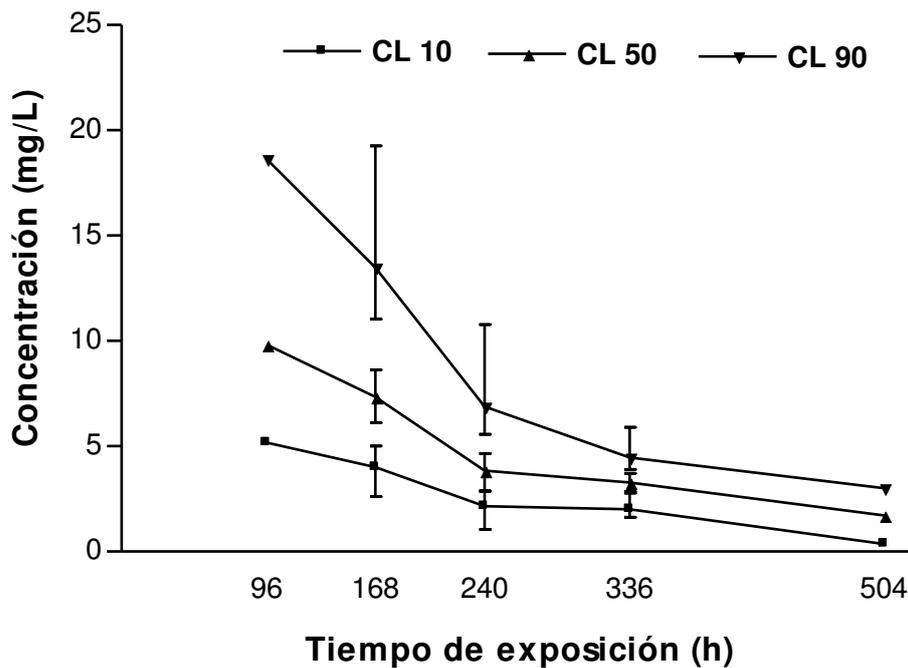
### **5.4.1 Exposición continua crónica a Maxim® XL a partir del estadio de blástula temprana (E4)**

El tratamiento continuo a partir de blástula mostró un importante efecto letal agudo expresado desde las primeras horas en las concentraciones a partir de 10 mg/L. Asimismo, el valor NOEC-504h para los embriones expuestos a partir del inicio del desarrollo embrionario fue de solo 1 mg/L (Fig. 5.3).



**Figura 5.3** Curvas de sobrevivida de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a Maxim® XL a partir del estadio de blástula temprana (E4).

En la Figura 5.4 se observan las CL 10, 50 y 90 para las exposiciones aguda, crónico-corta y crónica. Puede observarse que el Maxim® XL posee un importante efecto letal progresivo cuando se aplica a partir de este estadio temprano, por ejemplo la CL 50 desciende de 10,85 mg/L a las 96 h a 2,89 (2,75-3,72) mg/L a las 336 h.



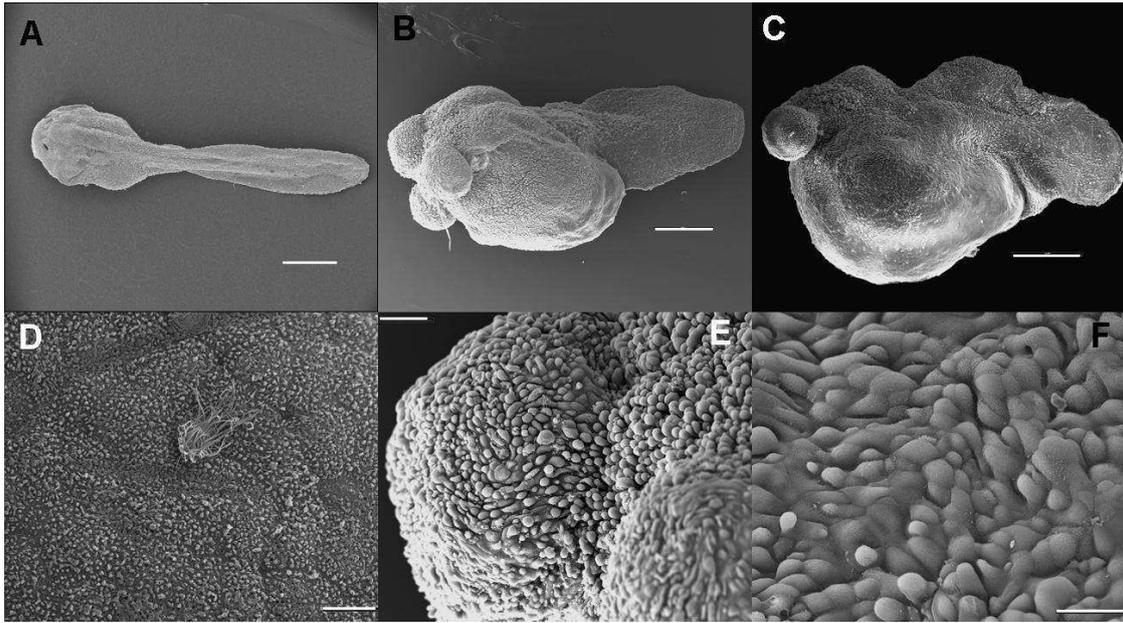
**Figura 5.4** Perfil de toxicidad (curvas TOP) con sus intervalos de confianza del Maxim® XL para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir de estadio de blástula temprana (E4).

El fungicida también causó un importante efecto subletal teratogénico ya desde las primeras horas de exposición. Las Figuras 5.5 y 5.6 muestran embriones con las malformaciones producidas por la exposición continua a partir de la blástula. Desde las primeras horas (exposición aguda), cuando los controles se encontraban en el estadio de pliegue opercular (E23), se observó en las concentraciones intermedias (5 y 10 mg/L) que los mismos estaban significativamente retrasados (aspecto de E21), con una marcada incurvación del eje, subdesarrollo general, microcefalia, disociación celular, despigmentación y subdesarrollo de branquias. El valor NOEC a las 96 h para efectos letales fue 5 y para efectos subletales fue 2 mg/L, por lo tanto el IT para las 96 h fue 2,5. Durante la exposición crónico-corta (240 h), cuando los controles estaban en E25, los tratados con 5 mg/L sumaron a las malformaciones ya descritas, una marcada hidropesía y ondulaciones en la cola. Los embriones expuestos al fungicida

también presentaron un comportamiento anormal: contracciones espasmódicas, movimientos de desplazamiento débiles, nado errático e inanición.

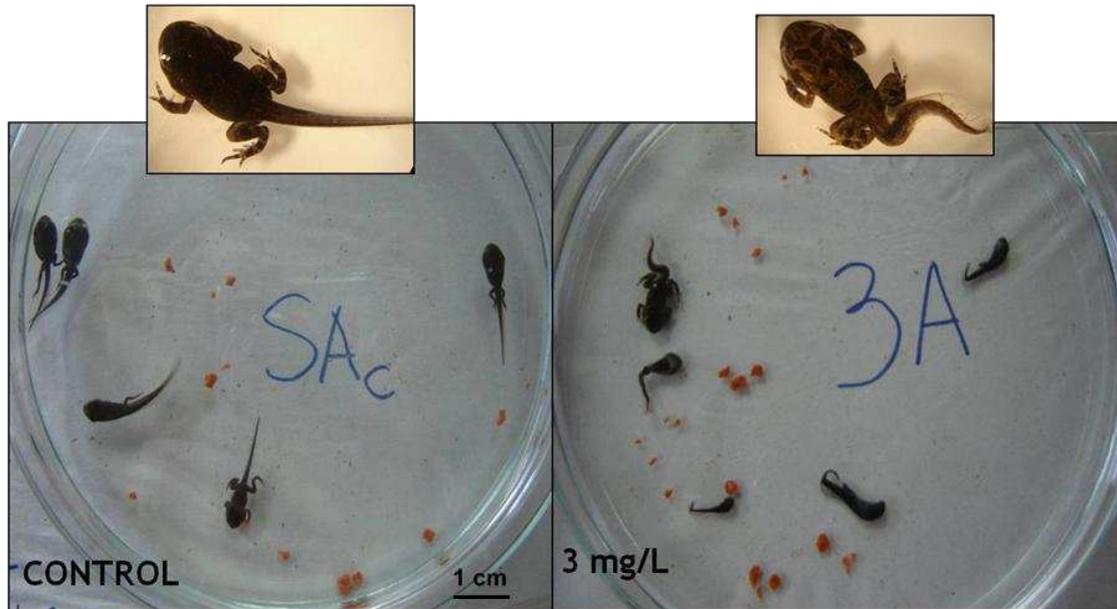


**Figura 5.5** Imágenes de microscopía estereoscópica de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a Maxim® XL a partir de blástula (E4): (A) embrión control (E23), a las 96 h; (B) embrión expuesto a 5 mg/L, a las 96 h, subdesarrollo general, microcefalia, marcada hidropesía, incurvación de la cola; (C) embrión expuesto a 10 mg/L, a las 96 h, subdesarrollo general, microcefalia, marcada hidropesía, incurvación de la cola; (D) larva control (E25), a las 216 h ; (E, F) embriones expuestos a 5 mg/L, a las 216 h, subdesarrollo general, microcefalia, marcada hidropesía, ondulaciones en la cola.



**Figura 5.6** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Maxim® XL a partir de blástula (E4), a las 240 h: (A) larva control (E25); (B, C) larvas expuestas a 5 mg/L, presentando subdesarrollo general, microcefalia, ondulaciones en la cola e hidropesía,; (D) detalle de la superficie celular de la cabeza de la larva control donde se observa una célula ciliada; (E, F) detalle de la superficie celular de la cabeza de la larva expuesta a 5 mg/L mostrando la importante disociación celular, células deformadas e hidrópicas. Escala (en  $\mu\text{m}$ ): (A): 1000; (B, C): 500; (D): 10; (E): 100; (F): 50. Aumentos: (A): 18x; (B): 34x; (C): 41x (D): 200x; (E): 200x; (F): 500x.

Al avanzar el tiempo de exposición, los efectos subletales se fueron acentuando. Las larvas prometamórficas presentaron una marcada ondulación e incurvación de la cola, subdesarrollo general, retraso en el desarrollo, como así también pérdida total de movimiento e inanición en las concentraciones más altas (Fig. 5.8 y 5.9).

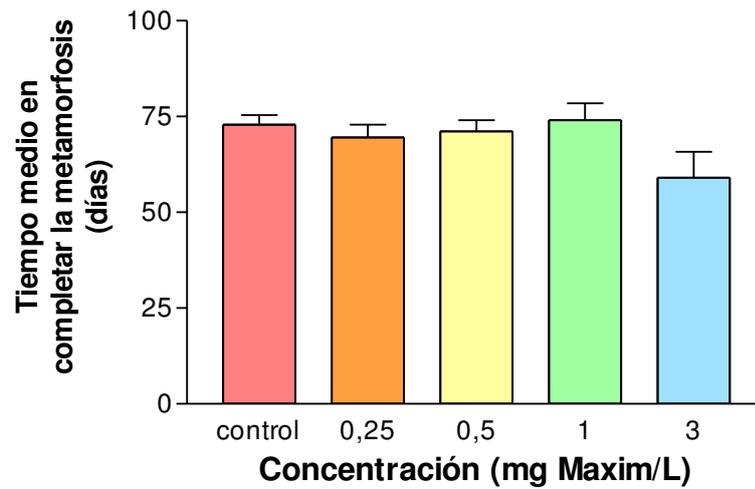


**Figura 5.8** Larvas prometamórficas y metamórficas control y expuestas en forma continua a 3 mg/L de Maxim® XL a partir del estadio de blástula (E4), a los 57 días de tratamiento.



**Figura 5.9** Larvas metamórficas expuestas en forma continua a partir del estadio de blástula (E4), a los 57 días de exposición al fungicida Maxim® XL: (A) control; (B) 0.5mg/L, ausencia de un miembro posterior (amelia); (C) 0.5 mg/L, talla y peso reducidos.

Solo un bajo porcentaje de las larvas expuestas a las concentraciones más bajas sobrevivió y logró completar el proceso metamórfico. En el análisis estadístico en el tiempo medio en completar la metamorfosis de las larvas expuestas a Maxim® no se observaron DS (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ) con respecto a los controles (Fig. 5.7).



**Figura 5.7** Las barras representan el tiempo medio y el desvío estándar en completar la metamorfosis de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua al Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25). Dentro de cada ensayo, no se registraron DS entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

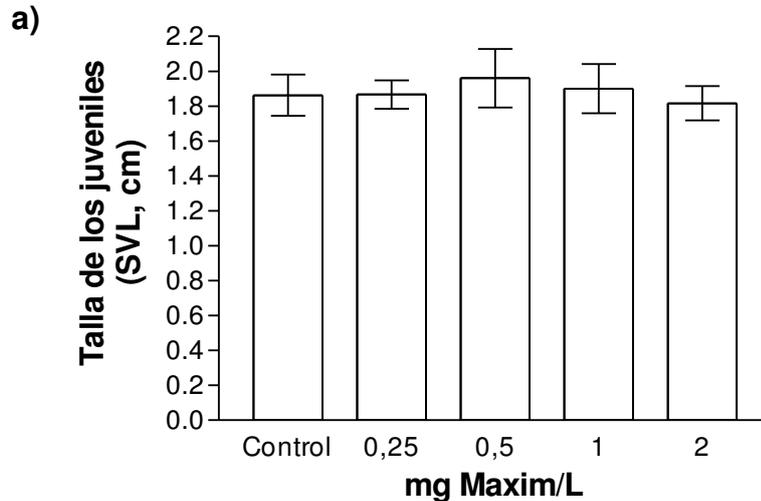
Es importante destacar que la letalidad entre los individuos una vez completada la metamorfosis fue alta tanto para los controles como para los expuestos al fungicida (tabla 5.1) debido a las condiciones de cautiverio. Asimismo, el bioensayo (60 días post-metamorfosis) se realizó con una sola camada de individuos, por lo que los siguientes resultados deben considerarse como preeliminarios.

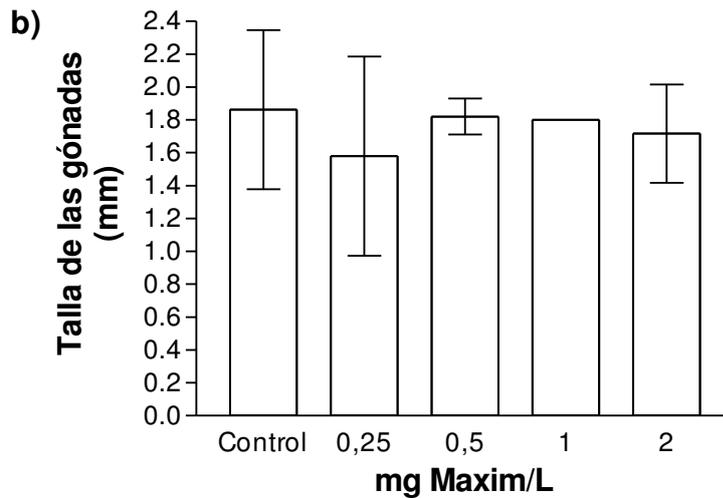
Tratamiento (mg Maxim/L)	N inicial (nº de individuos metamorfoseados)	% muertos	N final analizado
Control	20	20	16
0,25	16	31,25	11
0,5	14	50	7
1	12	50	6
2	21	52,38	10
3	4	25	3

**Tabla 5.1** Tamaño de la muestra (N) inicial de los individuos metamorfoseados y final que fue analizado, y mortalidad durante el periodo post-metamórfico.

Luego de 60 días post-metamorfosis las gónadas se encuentran de a pares, ventrales al riñón. Por delante se ubica el órgano de Bidder, característico de Bufónidos, y los cuerpos grasos (Fig. 5.11). El órgano de Bidder contiene folículos formados por oocitos “bidderianos” y células foliculares circundantes. Los ovarios y los testículos se distinguen fácilmente, pudiéndose realizar un sexado por simple observación de las gónadas dentro de la cavidad abdominal. El ovario es un órgano de mayor grosor que el testículo, con bordes más irregulares y se repliega marcadamente presentando sucesivos lóbulos ováricos y ensanchándose.

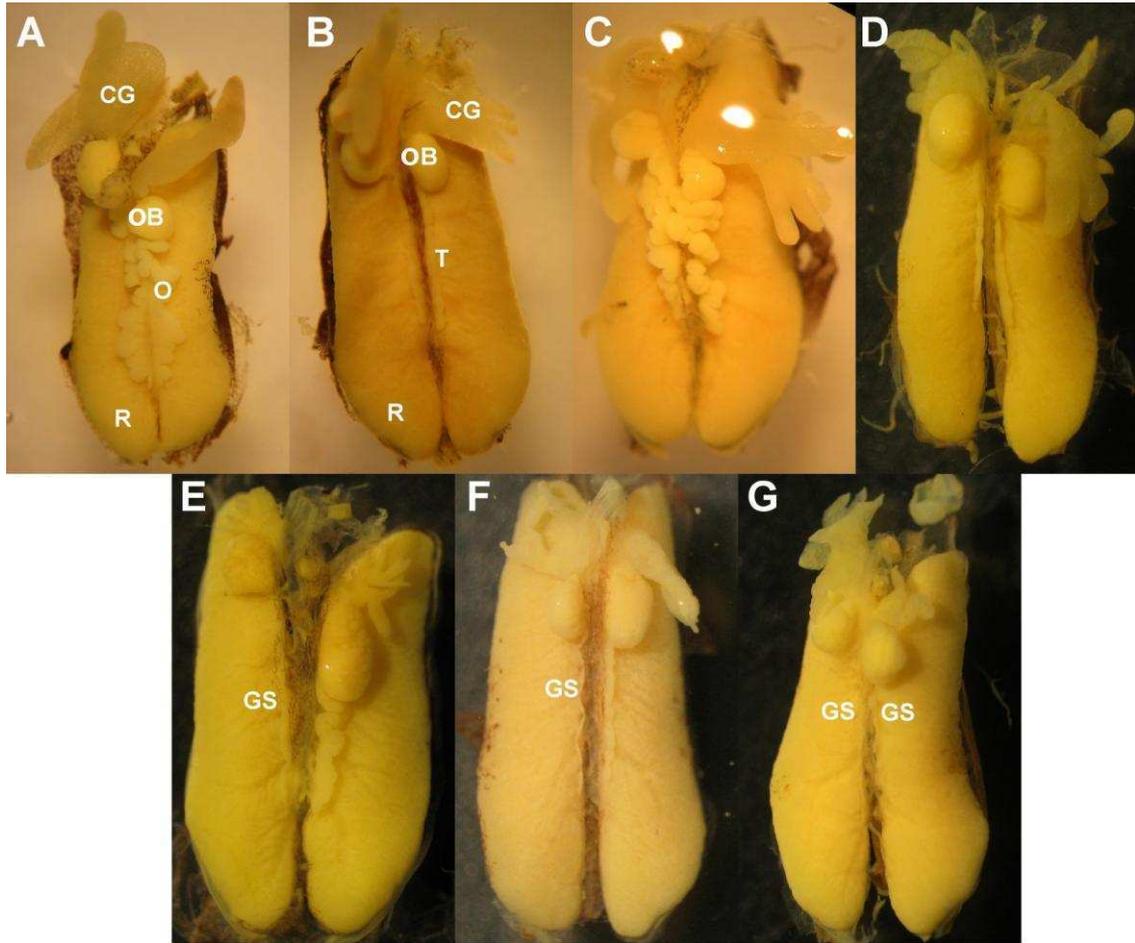
En el análisis de proporción de machos y hembras de los juveniles no se registraron DS (prueba exacta de Fischer,  $p > 0,05$ ) entre los expuestos a distintas concentraciones del fungicida y los controles. Asimismo, el tamaño de los juveniles expuestos al fungicida no presentó DS (ANOVA,  $p > 0,05$ ) con respecto a los controles, como así tampoco el tamaño de las gónadas (Fig. 5.10).





**Figura 5.10** Talla de los juveniles (a) y talla de las gónadas de los juveniles (b) de *Rhinella arenarum* al alcanzar los 60 días post-metamorfosis. Las barras representan el valor medio y el desvío estándar. Los datos de los juveniles expuestos a 3 mg Maxim/L no están graficados debido al bajo número de muestras. Las barras representan el valor medio y el desvío estándar. No se registraron DS entre tratamientos (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

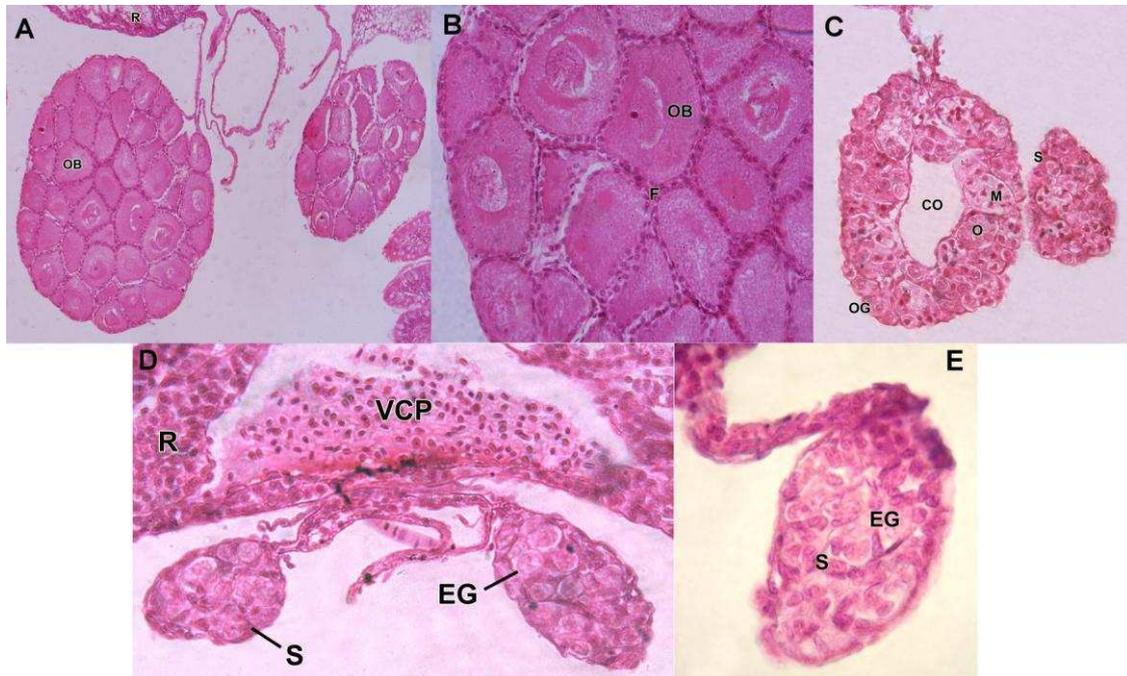
En el análisis macroscópico, una proporción relativamente elevada de los individuos expuestos al fungicida presentó subdesarrollo de una o ambas gónadas (Fig. 5.11). Estas gónadas se observaron más delgadas que las de los controles.



**Figura 5.11** Imágenes obtenidas por microscopía estereoscópica del complejo riñón-gónada de juveniles de *Rhinella arenarum*, a los 60 días post-metamorfosis, expuestos durante el desarrollo embrio-larval a distintas concentraciones del fungicida: (A) control, hembra; (B) control, macho; (C) 3 mg/L, hembra; (D) 1 mg/L, macho; (E) 0.25 mg/L, hembra con subdesarrollo de la gónada derecha; (F) 2 mg/L, macho con subdesarrollo de la gónada derecha; (G) 0,25 mg/L, juvenil con subdesarrollo de ambas gónadas. Aumento: 25X. CG: cuerpo graso; GS: gónada subdesarrollada; O: ovario; OB: órgano de Bidder; R: riñón; T: testículo.

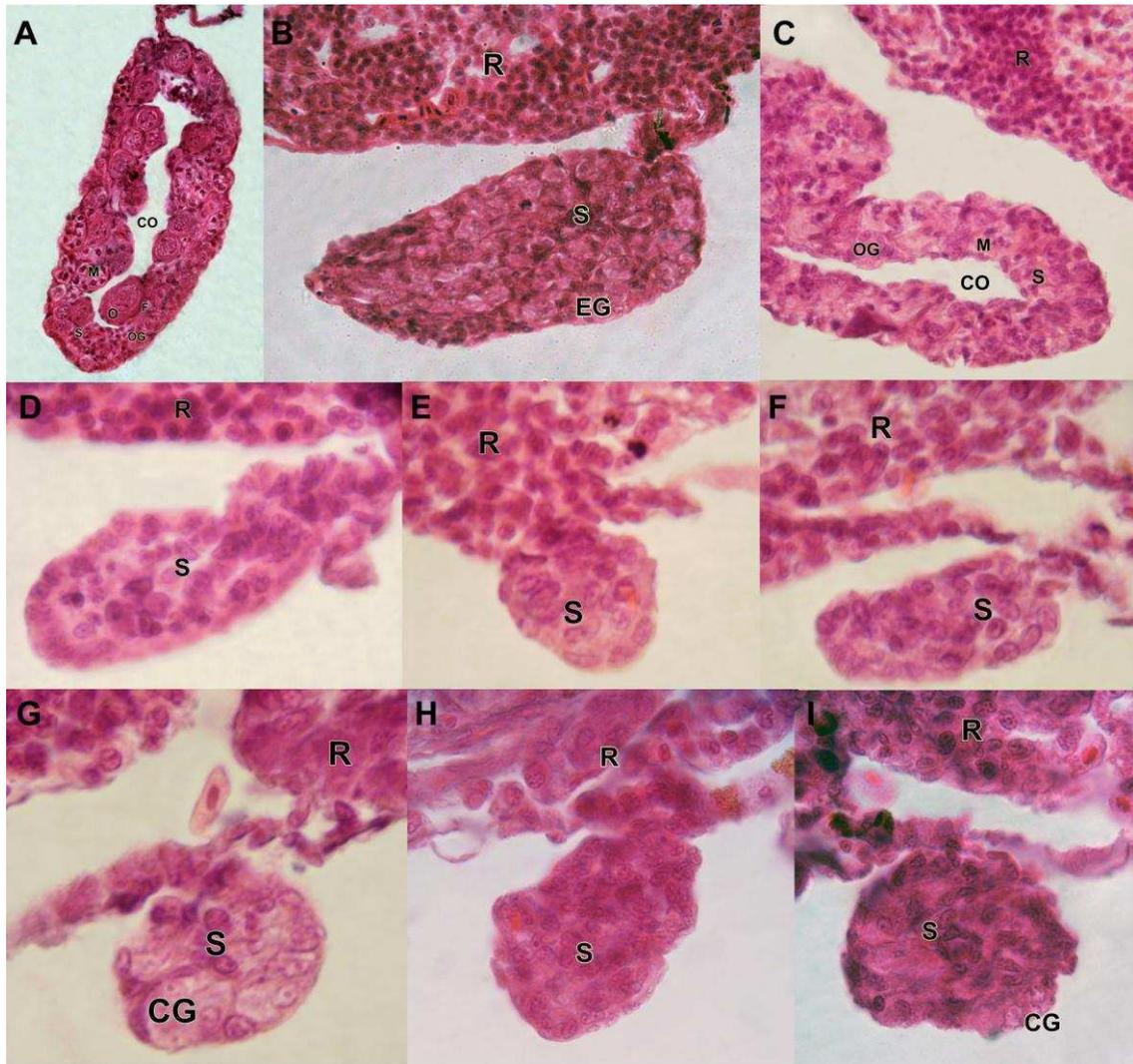
Se realizó el análisis histológico de las gónadas de los individuos control (Fig. 5.12) y de los expuestos al fungicida (Fig. 5.13). El ovario se distingue del testículo por la presencia de la cavidad ovárica. Asimismo, en el ovario recientemente diferenciado se observan oogonias asociadas a células somáticas de sostén (prefoliculares), figuras mitóticas correspondientes a la proliferación de las oogonias, y oocitos que indican el

inicio de la meiosis. En el testículo sólo se observan espermatogonias rodeadas por células somáticas de sostén (preSertoli).



**Figura 5.12** Imágenes obtenidas por microscopía óptica del órgano de Bidder y las gónadas de los juveniles control de *Rhinella arenarum*: (A) Órgano de Bidder; (B) Detalle de A mostrando los folículos bidderianos; (C) Ovario; (D y E) Testículo. CO: cavidad ovárica; EG: espermatogonias; M: figuras mitóticas; O: oocitos en meiosis temprana; OB: órgano de Bidder; OG: oogonias; R: riñón; S: células somáticas de sostén; VCP: vena cava posterior.

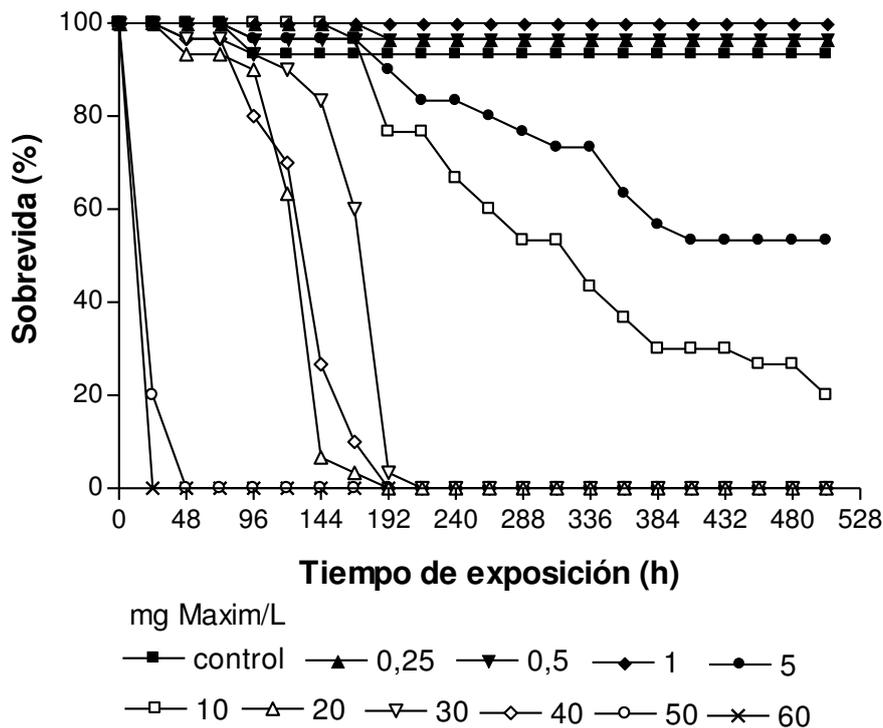
En el análisis histológico se confirmaron las alteraciones observadas a lupa. En el 18% de los individuos expuestos a 0,25 mg/L (la concentración más baja ensayada) y en el 10% de aquellos expuestos a 2 mg/L se observó una o ambas gónadas indiferenciadas, caracterizadas por la ausencia casi completa de células germinales. En la mayor parte de las secciones histológicas, las gónadas contenían células somáticas únicamente, mientras que las células germinales aparecían muy ocasionalmente. El resto de los individuos presentaba gónadas de aspecto normal. El órgano de Bidder presentó un aspecto morfológico normal.



**Figura 5.13** Imágenes obtenidas por microscopía óptica de las gónadas y el órgano de Bidder de los juveniles de *Rhinella arenarum* expuestos durante el desarrollo embrio-larval a Maxim® XL: (A y B) Individuos expuestos a 3 mg/L con desarrollo normal: (A) Ovario; (B) Testículo. (C y D) individuo expuesto a 0,25 mg/L: (C) Ovario derecho con desarrollo normal; (D) Gónada izquierda sin células germinales, solo con células somáticas. (E-G) Individuo expuesto a 0,25 mg/L: (E y F) Secciones en las que en la gónada solo se observan células somáticas; (G) Sección en la que la gónada muestra un aspecto indiferenciado, con escasas células germinales. (H-I) Individuo expuesto a 2 mg/L: (H) Sección en la que en la gónada solo se observan células somáticas; (I) Sección en la que se observan escasas células germinales. CG: células germinales; CO: cavidad ovárica; EG: espermatogonias; F: células foliculares; M: figuras mitóticas; O: oocitos en meiosis temprana; OG: oogonias; R: riñón; S: células somáticas de sostén

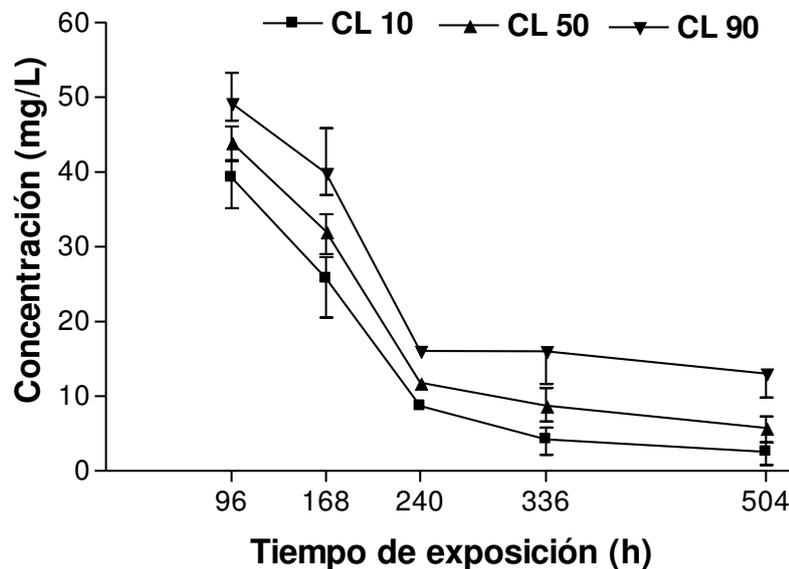
### 5.4.2 Exposición continua crónica a Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25)

El tratamiento continuo a partir del E25 mostró una alta resistencia de los embriones durante la exposición aguda, registrándose 100% de letalidad antes de las 48 h solo a concentraciones por encima de 50 mg/L pero con una abrupta caída de la sobrevivida en las concentraciones entre 20 y 40 mg/L, llegando al 100% de letalidad a las 192 h. A partir de ese momento comenzó a caer la sobrevivida de las larvas expuestas a las concentraciones de 10 y 5 mg/L. Las concentraciones menores que 1 mg/L no presentaron DS (ANOVA,  $p > 0,05$ ) en la sobrevivida con respecto al control, ni aún al finalizar la exposición crónica de 504 h (Fig. 5.14).



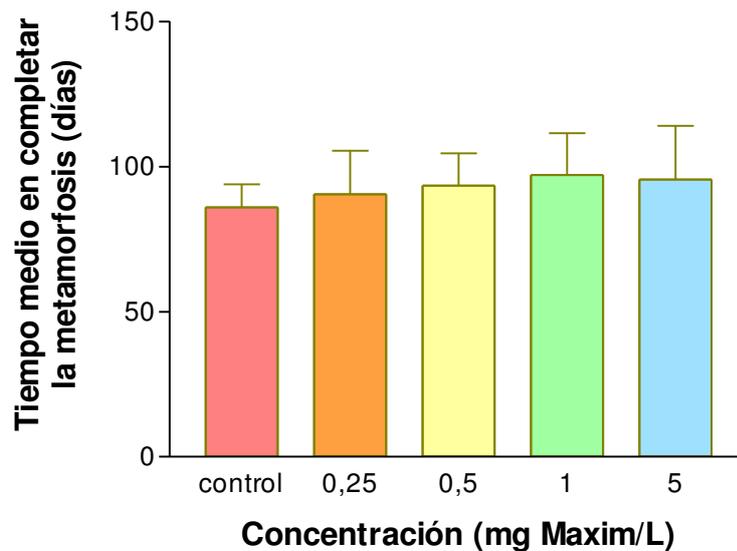
**Figura 5.14** Curvas de sobrevivida de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25).

La Figura 5.15 muestra las curvas TOP para el Maxim® XL. Puede observarse que las larvas exhiben una alta resistencia al fungicida durante la exposición aguda, obteniéndose una CL 50-96h de 43,94 (41,46-46,05) mg/L, pero al aumentar el tiempo de exposición, la toxicidad aumenta significativamente hasta las 240 h, obteniéndose una CL 50-240h de 11,79 mg/L, incrementándose 4 veces la toxicidad en 6 días. Al extender otros 10 días la exposición, la CL 50-504h fue de 5,76 (3,8-7,3) mg/L, aumentando al doble la toxicidad.



**Figura 5.15** Perfil de toxicidad (curvas TOP) con sus intervalos de confianza del Maxim® XL para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de opérculo completo (E25).

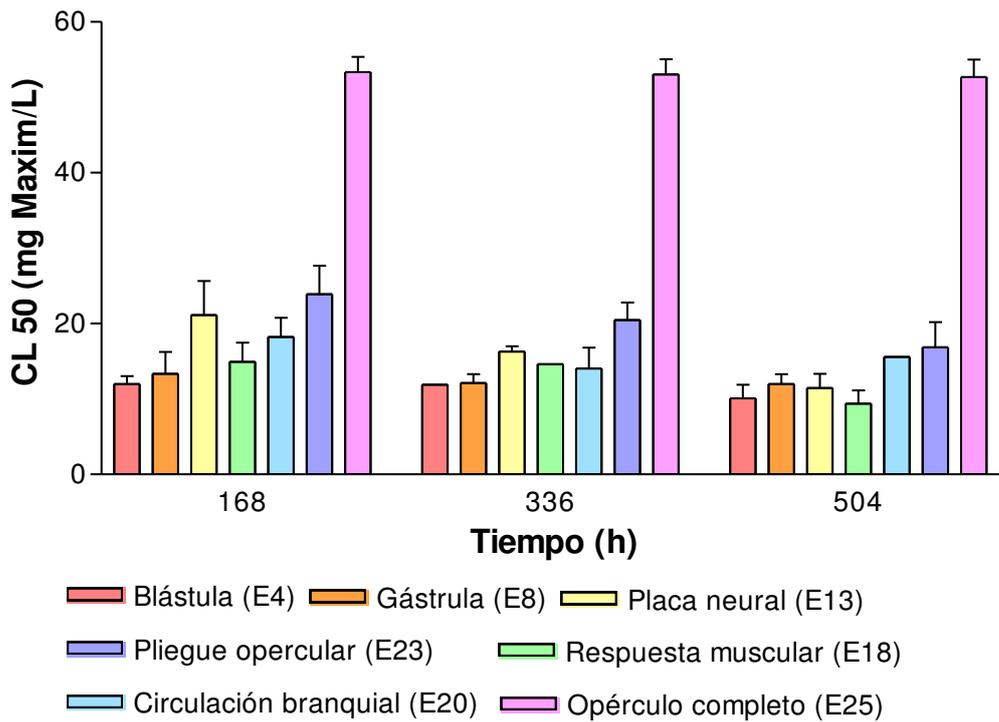
Solo un bajo porcentaje de las larvas expuestas a las concentraciones más bajas sobrevivió y logró completar el proceso metamórfico. En el análisis estadístico en el tiempo medio en completar la metamorfosis de las larvas expuestas a Maxim® no se observaron DS (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ) con respecto a los controles (Fig. 5.16).



**Figura 5.16** Las barras respresentan el tiempo medio y el desvío estándar en completar la metamorfosis de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua al Maxim® XL a partir del estadio de opérculo completo (E25). No se registraron DS entre tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

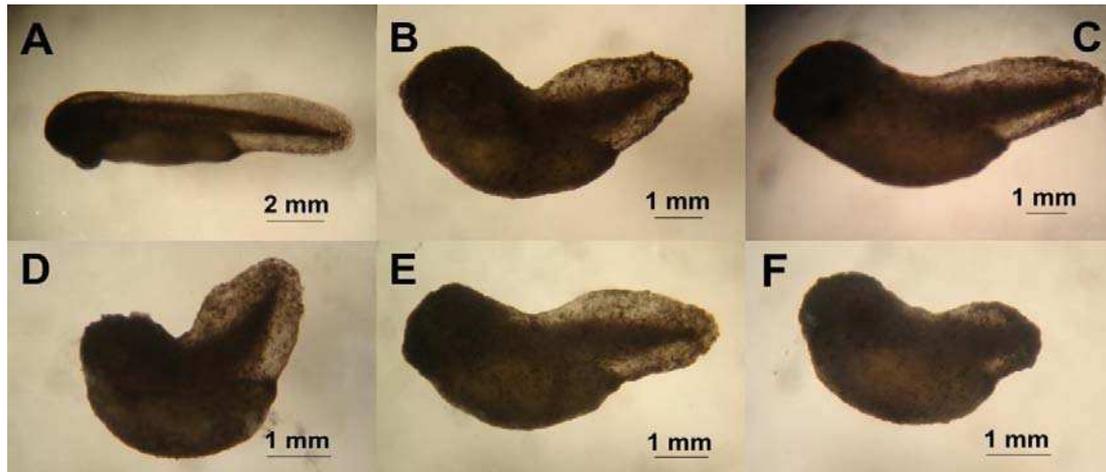
### 5.4.3 Exposición a Maxim® XL por pulsos de 24 h a partir de diferentes estadios embrionarios

Se observó que en las primeras horas post exposición los estadios embrionarios tempranos (blástula y gástrula) fueron los más sensibles, presentando letalidad en concentraciones que no produjeron efecto en el resto de los estadios. En la figura 5.17 se observa un patrón general de resistencia creciente al fungicida cuando los embriones fueron expuestos a partir de estadios embrionarios más tardíos. Asimismo, no se detectó una profundización importante del efecto letal del Maxim® XL al extender el tiempo de evaluación hasta los 21 días. El final del desarrollo embrionario (E25) resultó ser el más resistente, entre 5 y 6 veces más que la blástula.



**Figura 5.17** Comparación de las CLs 50 con sus intervalos de confianza de los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a Maxim® XL por pulsos de 24 h en diferentes estadios del desarrollo embrionario, a distintos tiempos post-exposición.

Se registraron severas malformaciones en los embriones expuestos al fungicida en los primeros estadios del desarrollo, tales como microcefalia, incurvaciones en el eje, abdomen prominente y subdesarrollo general (Fig. 5.18). A partir del estadio de respuesta muscular (E18) se observaron alteraciones en el comportamiento, contracciones espasmódicas y debilitamiento general. A diferencia de los efectos letales, sí hubo una profundización de los efectos subletales ya que aún luego de interrumpida la exposición al fungicida continuaron apareciendo alteraciones tanto morfológicas como etológicas.



**Figura 5.18** Embriones expuestos a distintas concentraciones del fungicida Maxim® XL por pulsos de 24 h a partir del estadio de blástula (E4), a las 72 h post exposición: (A) embrión control (E20); (B) embrión expuesto a 10 mg/L; (C, D) embrión expuesto a 15 mg/L; (E) embrión expuesto a 20 mg/L; (F) embrión expuesto a 30 mg/L.

#### 5.4.4 Evaluación de peligrosidad

Se realizó una evaluación de peligrosidad del Maxim® XL para las exposiciones continuas a partir del estadio de blástula y de opérculo completo. La concentración esperada en el ambiente (CEA) para el fungicida fue calculada como el 10 y el 100% de la tasa de aplicación máxima sugerida (175 g IA/L/ha) (Syngenta, 2004), con lo cual las CEA calculadas fueron de 1,75 y 17,5 mg/L/m<sup>2</sup> respectivamente. Usando estos valores se estimaron los cocientes de peligrosidad ( $HQ = CEA/NOEC$ ) para ambos tratamientos. La tabla 5.2 resume los valores de HQ obtenidos a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos destacan que para el estadio de blástula (E4) los valores de HQ 2 para todos los tiempos de exposición estuvieron por encima del valor LOC, mientras que para el estadio de opérculo completo (E25) estuvieron por encima del valor LOC solo a partir de la exposición crónico-corta (168 h). Los valores de HQ 1 superaron el valor LOC para ambos estadios a partir de la exposición crónica (336h).

CAPÍTULO 5: Toxicidad del Maxim®XL sobre el desarrollo embrio-larval de  
*Rhinella arenarum*

	Tiempo de exposición (h)											
	96			168			336			504		
Estadio	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2	NOEC	HQ1	HQ2
Blástula (E4)	3	0,58	5,8*	3	0,58	5,8*	0,25	7*	70*	0,25	7*	70*
Opérculo completo (E25)	30	0,058	0,58	10	0,175	1,75*	1	1,75*	17,5*	1	1,75*	17,5*

**Tabla 5.2** Valores NOEC para efectos letales (mg Maxim/L) y cocientes de de peligrosidad (HQ) del Maxim® XL para el desarrollo embrionario a partir del estadio de blástula (E4) y larval a partir del estadio de opérculo completo (E25) de *Rhinella arenarum* expuestos por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h), y crónico (336 y 504 h). \*HQ>1, significa que existe riesgo de que se produzcan efectos adversos debido a la exposición al Maxim® XL.

## 5.5 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el Maxim® XL causa efectos letales y subletales sobre los distintos estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum*. Asimismo, se demostró que la sensibilidad al fungicida es mayor en los estadios embrionarios más tempranos y va disminuyendo en los tardíos. Comparando los valores NOEC, la sensibilidad de los embriones fue hasta 10 veces mayor que la de las larvas en el periodo agudo. Las exposiciones por pulsos de 24 h confirmaron esta tendencia, siendo los estadios tempranos los más sensibles y el E25 el estadio el más resistente, presentando un valor de CL 50-504h=52,69 (50,01-55,01) mg Maxim/L.

La mayor toxicidad observada en los estadios tempranos estaría asociada a los mecanismos de acción de los ingredientes activos del Maxim® XL. Por ejemplo, el Metalaxil-M interfiere con la síntesis de ARN por inhibición de la ARN polimerasa, mientras que el Fludioxonil interfiere con la formación de membranas, ambos procesos fundamentales para la segmentación y la gastrulación, etapas caracterizadas por la

intensa actividad mitótica y transcripción necesaria para el desarrollo subsiguiente del embrión. Se conoce que la superficie celular del embrión juega un rol importante en el desarrollo del mismo, como así también los cambios en las propiedades de la superficie que producen la formación de una fuerte adhesión intercelular, necesaria para la morfogénesis embrionaria (Bellairs, y col., 1978; Ede y Agerbak, 1968; Gustafson y Wolpert, 1967; Johnson, 1970). Asimismo, existen especificidades de las capas y de los tejidos sobre la superficie celular (Gottlieb y col., 1976; Marchase y col., 1976; Moscona, 1968; Moscona y Moscona, 1952; Steinberg, 1970; Tickle y col., 1978; Townes y Holtfreter, 1955). Así, las células embrionarias también poseen sobre su superficie receptores de lectina que reconocen sustancias, y ligandos específicos (Ben-Shaul y col., 1979; Boucant y col., 1979; Goldschneider y Moscona, 1972; Hausman y Moscona, 1976; Kleinschuster y Moscona, 1972; Krach y col., 1974; McClay y col., 1977; Morriss y Solursh, 1978; Moscona, 1974; Nosek, 1978; O'Dell y col., 1974; Shur, 1977a, b). Esta información sugiere que la superficie celular embrionaria posee un rol fundamental en la adhesividad celular durante la morfogénesis y la diferenciación celular, por lo cual la exposición de los embriones a este fungicida, que produce una fuerte disociación celular durante los primeros estadios del ciclo de vida, podría perjudicar severamente el desarrollo subsiguiente del embrión.

El Maxim® XL presentó un alto potencial teratogénico, con un IT-96h para embriones de 2,5. Los efectos subletales en los embriones estuvieron representados por subdesarrollo general, microcefalia, incurvaciones en el eje, y en el periodo larval observaron alteraciones en el comportamiento como contracciones espasmódicas y debilitamiento general. Estos efectos se continuaron profundizando aún interrumpida la exposición (exposición por pulsos). Asimismo, el fungicida no causó alteraciones en el tiempo en completar la metamorfosis. En la evaluación del efecto del fungicida en juveniles de *R. arenarum* expuestos durante el periodo embrio-larval, no se observaron

DS en las tallas de los juveniles ni de las gónadas con respecto a los controles, ni se afectó la proporción de sexos. A nivel macroscópico se observó en algunos de los individuos expuestos al fungicida una o ambas gónadas subdesarrolladas, lo cual fue confirmado por el análisis histológico, el cual mostró indiferenciación de una o ambas gónadas con escasa o ausencia total de células germinales. Se debe tener en cuenta que el tamaño de las muestras fue pequeño y que este estudio se realizó una sola vez por lo que estos resultados solo deben tomarse como preeliminares. Asimismo, es importante continuar con la evaluación de los efectos sobre el sistema endócrino, debido a que un estudio reciente ha determinado una gran cantidad de pesticidas con efecto de disrupción endócrina de los cuales la mayoría son fungicidas (Orton, 2011).

Cabe destacar que en la evaluación de peligrosidad para los estadios evaluados, los HQ 2 calculados (basados en sobreaplicaciones) resultaron en valores mayores que 1 (valor LOC) aún para la exposición aguda al fungicida a partir del estadio de blástula.. Basados en los resultados de HQ 1 (escenario normal), los valores exceden el nivel de preocupación a partir de la exposición crónica (336h). Sin embargo, aunque el fungicida no produzca efectos letales significativos, el mismo produce severos efectos subletales, los cuales podrían afectar el *fitness* de los individuos, produciendo un riesgo indirecto sobre las poblaciones de esta especie.

## 5.6 Conclusiones

- 1) El Maxim® XL causó toxicidad sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* la cual se manifiesta mediante efectos letales y subletales.
- 2) Se registró una susceptibilidad estadio-dependiente al Maxim® XL sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum*.

- 3) Los estadios embrionarios tempranos presentaron una susceptibilidad mayor al Maxim® XL, la cual fue disminuyendo en los tardíos, siendo el estadio de blástula temprana (E4) el más susceptible.
- 4) La mayor toxicidad observada en los estadios tempranos podría estar asociada a los mecanismos de acción de los ingredientes activos del FC: el Metalaxil-M interfiere la síntesis de ARN por inhibición de la ARN polimerasa, mientras que el fludioxonil interfiere la formación de membranas. Ambos procesos son fundamentales para la segmentación y la gastrulación, etapas caracterizadas por la intensa actividad mitótica y transcripción necesaria para el desarrollo subsiguiente del embrión.
- 5) El Maxim® XL causó severos efectos subletales durante los primeros estadios, como subdesarrollo general, incurvaciones en el eje, microcefalia, disociación celular, despigmentación, subdesarrollo de branquias, marcada hidropesía y ondulaciones en la cola. Al avanzar en el desarrollo también presentaron alteraciones en el comportamiento como contracciones espasmódicas, debilitamiento general e inanición.
- 6) El fungicida continuó produciendo efectos subletales en los embriones post-exposición, en los tratamientos por pulsos.
- 7) El tiempo en completar la metamorfosis no se vio afectado por la exposición al fungicida.
- 8) La exposición al Maxim® XL no afectó la proporción de sexos, pero sí afectó el desarrollo y la diferenciación gonadal en *R. arenarum*. Estos resultados deben tomarse como preliminares debido al bajo número de muestras.
- 9) Teniendo en cuenta los valores de HQ obtenidos por la evaluación de peligrosidad, este fungicida podría poner en riesgo la continuidad de las poblaciones de esta especie en escenarios de exposición prolongada.

**CAPÍTULO 6:**  
**TOXICIDAD DE MEZCLAS DE**  
**ENDOSULFÁN Y CIPERMETRINA**  
**SOBRE EL DESARROLLO EMBRIO-**  
**LARVAL DE *RHINELLA ARENARUM***

## 6.1 Introducción

En los ambientes rurales es frecuente la presencia simultánea de diferentes tipos de sustancias que pueden constituir peligrosos “cockteles”, en los que las interacciones, por ejemplo sinergismos, no suelen ser estudiados. La presencia de estas sustancias en el medio se debe a su aplicación a fin de incrementar el rendimiento de los cultivos, en la mayoría de los casos sin conocimiento de los posibles efectos sinérgicos cuando se hacen aplicaciones simultáneas. Para ahorrar tiempo y recursos, muchas veces en un mismo tanque de aplicación se mezclan varios plaguicidas con distintos principios activos, aditivos y para distintos organismos *blanco*, cuando las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente disueltas en agua. En estas mezclas se desestiman las posibles interacciones no sólo entre los principios activos, sino también entre los aditivos de las distintas formulaciones. Burton y Nordstrom (2004) indican la importancia de identificar el grupo químico crítico en una mezcla de contaminantes en el medio acuático, y establecer cuál es el compuesto químico que más contribuye a la toxicidad de una muestra ambiental. Sin embargo, muchas veces la toxicidad de un plaguicida en una mezcla, en términos de CL 50, no necesariamente coincide con la toxicidad del mismo plaguicida analizado individualmente debido a que los plaguicidas en mezclas pueden presentar diferentes patrones de interacción (aditivos, sinérgicos o antagónicos) (Mitchell y col., 2002).

La investigación del efecto ecotoxicológico de mezclas otorga peso y solidez a la evaluación de la calidad de agua, debido a la gran variedad de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos que habitualmente contienen tales mezclas (Wong y Pak, 2004). Asimismo, la exposición a plaguicidas se da en forma de mezclas complejas que son afectadas por distintos factores ambientales, siendo poco factible caracterizar la exposición (Merletti y col., 1998). Por esta razón, la evaluación mediante bioensayos de los efectos de las sustancias químicas combinadas en

mezclas resulta extremadamente importante. A partir de los resultados de estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática, así como los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Burton y Nordstrom, 2004). Por lo tanto, en los últimos años ha aumentado la cantidad de trabajos de investigación que tratan de entender y evaluar las posibles consecuencias de la exposición a plaguicidas sobre el ambiente y la biota acuática, analizando la interacción entre las diferentes sustancias (Relyea, 2004; Pérez-Coll y Herkovits, 2006; Scholz y col., 2006; Ginebreda y col., 2014). El estudio de los efectos de interacción de las sustancias químicas, específicamente plaguicidas, no es nuevo, existiendo investigaciones desde hace más de 50 años (Gowing, 1960; Tammes, 1964; Sprague y Ramsay, 1965; Colby, 1967; Kungolos y col., 1997). Aunque el número de este tipo de publicaciones fue aumentando con el tiempo, la mayor parte de los estudios publicados son sobre efectos de sustancias particulares y no como parte de mezclas (Cox y Surgan, 2006). En el caso de la evaluación de efectos de formulaciones de plaguicidas hay que considerar, por un lado, que éste ya es una mezcla en sí, entonces el primer paso debería ser poder evaluar y comparar la toxicidad de los ingredientes activos (i.a) y sus formulaciones. La investigación de los efectos diferenciales sobre organismos *no blanco* indica en algunos casos una mayor toxicidad de las formulaciones de plaguicidas respecto a sus correspondientes i.a (Martin y Ronco, 2006; Sobrero y col., 2007; Aronzon y col., 2011; Svartz y Pérez-Coll, 2013).

Existen varios modelos para obtener una predicción de la interacción y así poder contrastar con lo observado en la experimentación. Ejemplo de lo citado en la literatura científica actual es el modelo de los isobogramas (Tammes, 1964), el modelo de las unidades tóxicas (Sprague y Ramsay, 1965) y modelos matemáticos basados en la teoría de probabilidades (Kungolos y col., 1997, 1999). Asimismo, la gran cantidad de terminología utilizada para describir la toxicidad de las mezclas es confusa y dificulta su estudio. Calamari y Alabaster (1980), Marking (1985), y

Calabrese (1991) argumentaron que solo hay 3 tipos básicos de interacciones. Éstas son aditividad, sinergismo y antagonismo y se definen como:

- Aditividad: la toxicidad de la mezcla es igual a la esperada por la suma de las toxicidades de las sustancias presentes en la mezcla. Hay dos tipos de aditividad: concentración o respuesta aditiva.

- Sinergismo: la toxicidad de la mezcla es mayor que la esperada si la mezcla fuera aditiva.

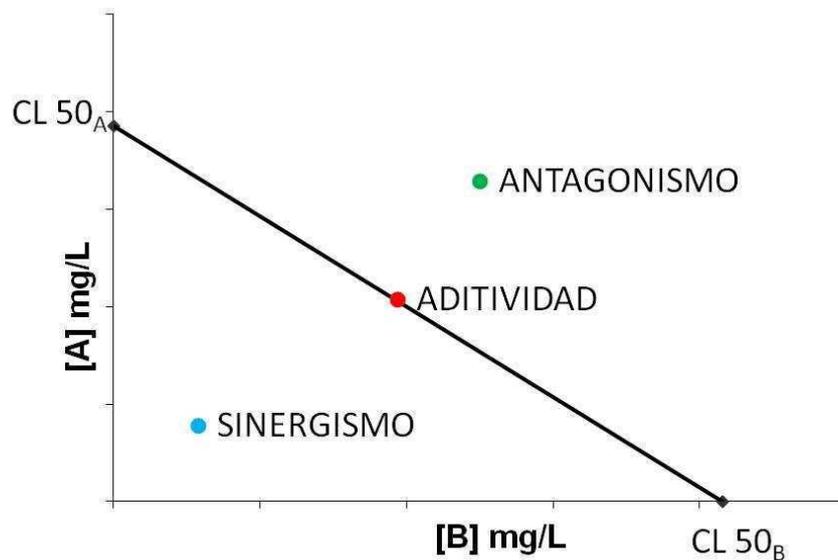
- Antagonismo: la toxicidad de la mezcla es menor que la esperada si la mezcla fuera aditiva

En los bioensayos de toxicidad de mezclas, el primer paso es conocer la toxicidad de cada sustancia por separado (Ej: obtener las CL 50 de cada sustancia). Luego, para determinar los efectos de una mezcla se utiliza el concepto de Unidad Tóxica (UT) (Sprague, 1970), en la que la concentración del compuesto en la mezcla es expresada como fracción de su CL 50. Así, la toxicidad conjunta de la mezcla es evaluada comparando la CL 50 de la mezcla con la suma de las UT. Si la suma de las unidades tóxicas es igual a la unidad que produce el 50% de los efectos en la mezcla la acción conjunta se define como adición. Una desviación significativa de la misma podría, dar una respuesta antagónica en caso de ser menor que uno o sinérgica en caso de que sea mayor que uno.

Las mezclas realizadas artificialmente utilizadas en experimentos de laboratorio pueden ser equitóxicas o no equitóxicas. Las mezclas equitóxicas son aquellas en las que cada componente en la mezcla está presente en la misma fracción de su propia toxicidad individual. Mientras que en las mezclas no equitóxicas los componentes no están en la misma fracción.

Los isobogramas (Fig. 6.1) son gráficos de dos dimensiones, en los que el eje x está representado por la concentración de una de las sustancias presentes en la

mezcla, y en el eje  $y$  se representa la concentración de la otra sustancia. En el isoblograma una o más líneas (isobolas) conectan diferentes combinaciones de las sustancias que causan el mismo efecto (Ej: CL 50). Las isobolas diagonales que unen los valores de los ejes  $x$  e  $y$  con valores de 1UT son las que corresponden a las isobolas de adición. Si los valores que causan el efecto tóxico seleccionado caen por arriba y a la derecha de la línea de aditividad entonces la mezcla es antagónica, en cambio si cae por debajo y a la izquierda la mezcla es sinérgica.



**Figura 6.1** Isoblograma de respuesta modelo para mezclas binarias, con comportamientos aditivo, sinérgico o antagónico

Estudios han reportado la presencia simultánea de Endosulfán (ES) y Cipermetrina (CY) en cuerpos de agua cercanos a cultivos (Sangchan y col., 2013). Asimismo, se informó una alta incidencia de malformaciones (en ojos, en miembros superiores e inferiores) en anfibios presentes en agroecosistemas del noreste de Buenos Aires donde a su vez se han encontrado niveles de ES y CY (Agostini y col., 2013). También se informaron efectos de incorporación de estos dos insecticidas en la

biota acuática (Grant y col., 2013). Sin embargo, estos estudios evaluaron el efecto de las sustancias por separado sin evaluar el efecto de interacción entre ellas.

## 6.2 Objetivos e Hipótesis

### Objetivos

- ✓ Obtener los perfiles de toxicidad (TOPs, curvas de isotoxicidad) de las mezclas de endosulfán y un formulado comercial de cipermetrina (Glextrin 25%) para embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a partir de los resultados de letalidad.
- ✓ Dentro del rango de concentraciones subletales, evaluar los efectos teratogénicos, sobre el crecimiento, progreso del desarrollo, y comportamiento por exposición a diluciones de la mezcla de endosulfán y cipermetrina.
- ✓ Determinar si las mezclas binarias equitóxicas de ES y CY tienen efectos aditivos, antagónicos o sinérgicos sobre los embriones y larvas de *R. arenarum*.

Estos objetivos fueron planteados con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis:

### Hipótesis

- ✓ Las mezclas binarias equitóxicas de ES y CY producen efectos tóxicos sobre los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* y se manifiestan mediante efectos letales y subletales.
- ✓ Las mezclas binarias equitóxicas de ES y CY presentan una interacción tóxica en embriones y larvas de *R. arenarum*.

## 6.3 Materiales y métodos

### 6.3.1 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron 2 tipos de bioensayos para la evaluación de la toxicidad de las mezclas de ES y CY:

1) Exposición continua de embriones a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las mezclas de ES y CY por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (240 h).

2) Exposición continua de larvas tempranas a partir del estadio de opérculo completo (E25) a las mezclas de ES y CY por periodos agudo (96 h), crónico corto (168 h) y crónico (240 h).

Asimismo, se realizaron en simultáneo los bioensayos de exposición individuales a ES y CY para los dos tratamientos.

Las concentraciones de las soluciones de exposición de las mezclas están expresadas como la sumatoria de las concentraciones de ambos compuestos.

### 6.3.2 Preparación de las soluciones de exposición

Los bioensayos de toxicidad fueron realizados utilizando mezclas binarias equitoxicas de ES grado técnico (PS81, Supelco) con una pureza del 99%, y un formulado comercial de CY con 25% de i.a (Glextrin 25®, Gleba S.A.). Para la solución madre de las mezclas del tratamiento a partir de blástula se utilizó 30 mg ES/L y 15 mg CY/L, con lo cual la concentración de la solución madre fue de 45 mg/L, siendo 0,67 y 0,33 las proporciones de ES y CY en las mezclas, respectivamente. Mientras que para el tratamiento a partir del opérculo completo se utilizó una mezcla de 2 mg ES/L y 30 mg CY/L, resultando una solución madre de 32 mg/L, siendo 0,06 y 0,94 las proporciones de ES y CY en las mezclas respectivamente. Las concentraciones de las

sustancias en las mezclas fueron elegidas por representar aproximadamente el doble de la CL 50 obtenida para cada sustancia a las 96 h, como valores de referencia.

Las soluciones utilizadas en los bioensayos se obtuvieron por diluciones de la solución madre con SA, y fueron: 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100%. Asimismo, las soluciones de los bioensayos individuales de ES y CY se prepararon según se indicó en las secciones 3.3.1 y 4.3.1, para poder obtener los valores de CL 50 de referencia de cada sustancia por separado.

### 6.3.3 Análisis de datos

Las proporciones de cada sustancia en las mezclas se calcularon y se expresaron como fracción de su respectiva CL 50. Con tal fin se utilizó el concepto de Unidad Tóxica (UT), que está representada como la concentración de un tóxico X, expresada como fracción de su respectiva CL 50:

$$UT = [X]/CL\ 50_x \quad (\text{Ecuación 6.1}).$$

Con los valores de CL 50 de cada sustancia y de la mezcla para los distintos tiempos, obtenidos por el método Probit, se graficaron los isobogramas. La evaluación de las interacciones de las mezclas se realizó según el método descrito por Marking y Dawson (1975) y Marking L.L. (1977). Asimismo, se calculó el índice S (suma de las actividades biológicas), para cada mezcla ensayada:

$$S = [A]_m/CL\ 50_A + [B]_m/CL\ 50_B \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

$[X]_m$ : concentración del tóxico X en la mezcla.

$CL\ 50_x$ : concentración letal 50 del tóxico X en el tiempo evaluado.

El valor de S es siempre positivo, por lo que valores de  $S=1$  implican aditividad (equivalente a colocar 1UT de cualquiera de los tóxicos de la mezcla), valores de  $S>1$  implican antagonismo (se necesita mayor concentración de los tóxicos para lograr el

mismo efecto), mientras que valores de  $S < 1$  implican sinergismo. A los fines de trabajar con una escala lineal, se define el índice de aditividad (IA):

$IA = S - 1$ , para un valor de  $S = 1$ . Entonces  $IA = 0$ , aditividad.

$IA = (-1)S + 1$ , para valores de  $S > 1$ . Entonces  $IA < 0$ , antagonismo.

$IA = (1/S) - 1$ , para valores de  $S < 1$ . Entonces  $IA > 0$ , sinergismo.

Para el cálculo de la dispersión del IA, se estimaron los intervalos de confianza (IC) al 95% del índice S, de acuerdo con el siguiente algoritmo (LS: límite superior del IC; LI: límite inferior del IC):

$$LS(S) = (LS[A]_m/LI(CL\ 50_A)) + (LS[B]_m/LI(CL\ 50_B)) \quad (\text{Ecuación 6.3})$$

$$LI(S) = (LI[A]_m/LS(CL\ 50_A)) + (LI[B]_m/LS(CL\ 50_B)) \quad (\text{Ecuación 6.4})$$

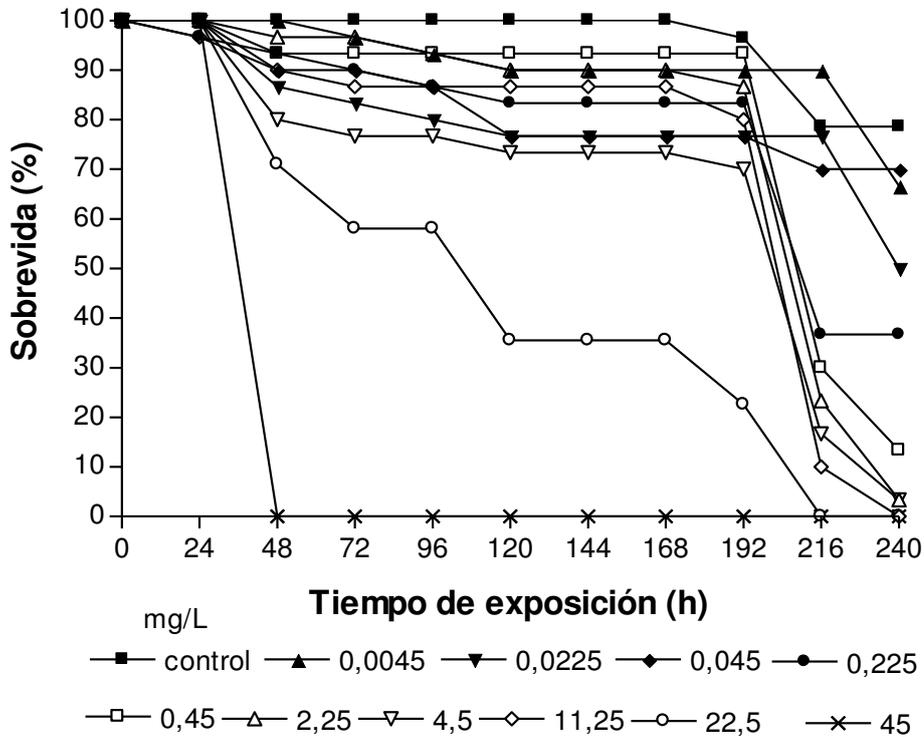
Y finalmente los LS y LI del índice IA se calcularon de acuerdo con las equivalencias entre IA y S arriba mencionados. Los límites de IA permiten establecer una regla de decisión en base a un criterio estadístico. Si el cero está comprendido dentro de ese intervalo es un caso de aditividad, si el cero está por encima de esos valores es un caso de antagonismo, y si está por debajo de esos valores es un caso de sinergismo.

## 6.4 Resultados

### 6.4.1 Exposición continua crónica de embriones a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las mezclas de ES y CY

La mortalidad de los embriones expuestos a las mezclas de ES y CY a partir de la concentración de 22,5 mg/L resultó significativa a las 48 h llegando al 100% de mortalidad en la concentración más alta de 45 mg/L. Si bien entre las 48 y las 192 h la mortalidad de los embriones se mantuvo relativamente constante, coincidente con el

desarrollo del periodo embrionario, hubo un importante aumento en la mortalidad desde las 216 h (ya larvas) a partir de 0,225 mg/L, siendo el valor NOEC-240 h tan bajo como 0,045 mg/L (Fig. 6.2).

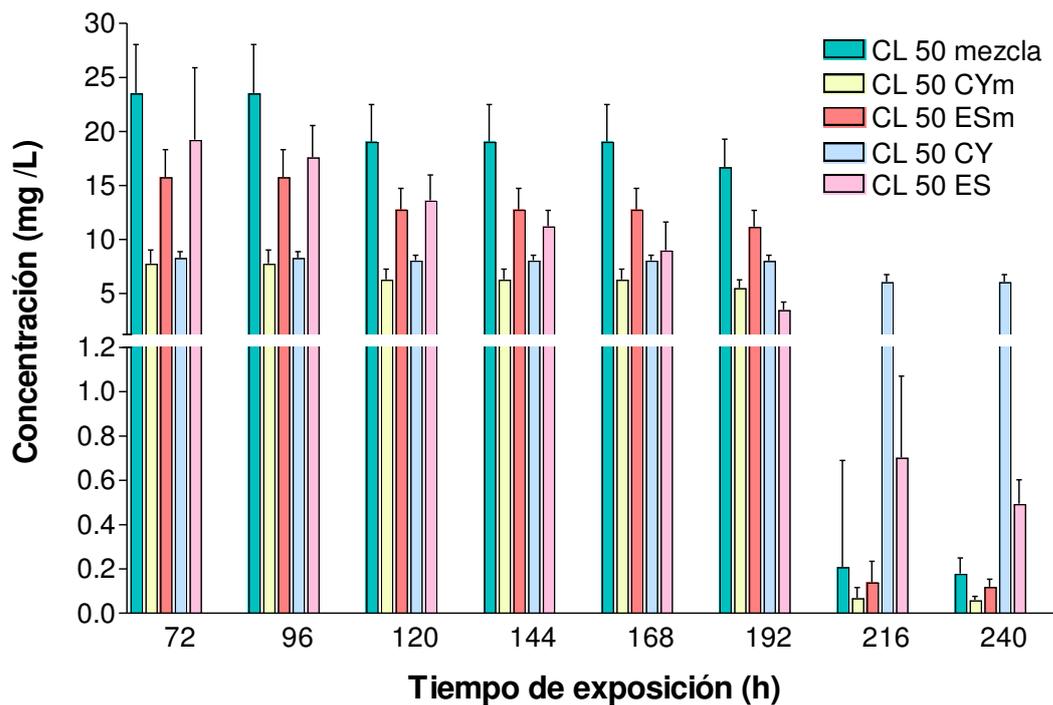


**Figura 6.2** Sobrevivida de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula temprana (E4) a las mezclas de ES y CY por 240 h.

En la figura 6.3 y la tabla 6.1 se observa que las CLs 50 de las mezclas se mantuvieron relativamente altas y constantes durante los periodos agudo y crónico corto, siendo la CL 50-168h=19,06 (16,14-22,05) mg/L, y siempre superiores a las CLs 50 de ES y CY por separado y de ES y CY en las mezclas (CYm y ESm). Mientras que durante el periodo crónico la toxicidad aumentó marcadamente, llegando a ser la CL 50-240h=0,18 (0,13-0,25) mg/L, aumentando casi 100 veces la toxicidad en 48 h. Este aumento de la toxicidad de las mezclas con el tiempo se vió igualmente reflejado en la toxicidad de ES y CY en las mezclas.

Con respecto a la toxicidad de las sustancias en las mezclas versus en forma individual, no se observaron DS ( $p > 0,05$ ) entre el ESm y el individual (solo a las 240 h el ESm fue levemente más tóxico), mientras que la toxicidad de la CYm fue significativamente superior a la CY individual a partir del periodo crónico corto, llegando a ser a las 240 h 100 veces más tóxica.

Comparando la toxicidad entre las sustancias, en las mezclas se puede observar que la CYm causó aproximadamente siempre el doble de la toxicidad que el ESm, mientras que al observar las sustancias por separado, la CY durante el periodo agudo y crónico corto fue más tóxica que el ES, invirtiéndose este patrón de toxicidad durante el periodo crónico.



**Figura 6.3** Comparación de las CLs 50 con sus intervalos de confianza obtenidas de la mezcla de ES y CY con respecto a las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla (ESm, CYm) y de cada sustancia por separado, para embriones de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

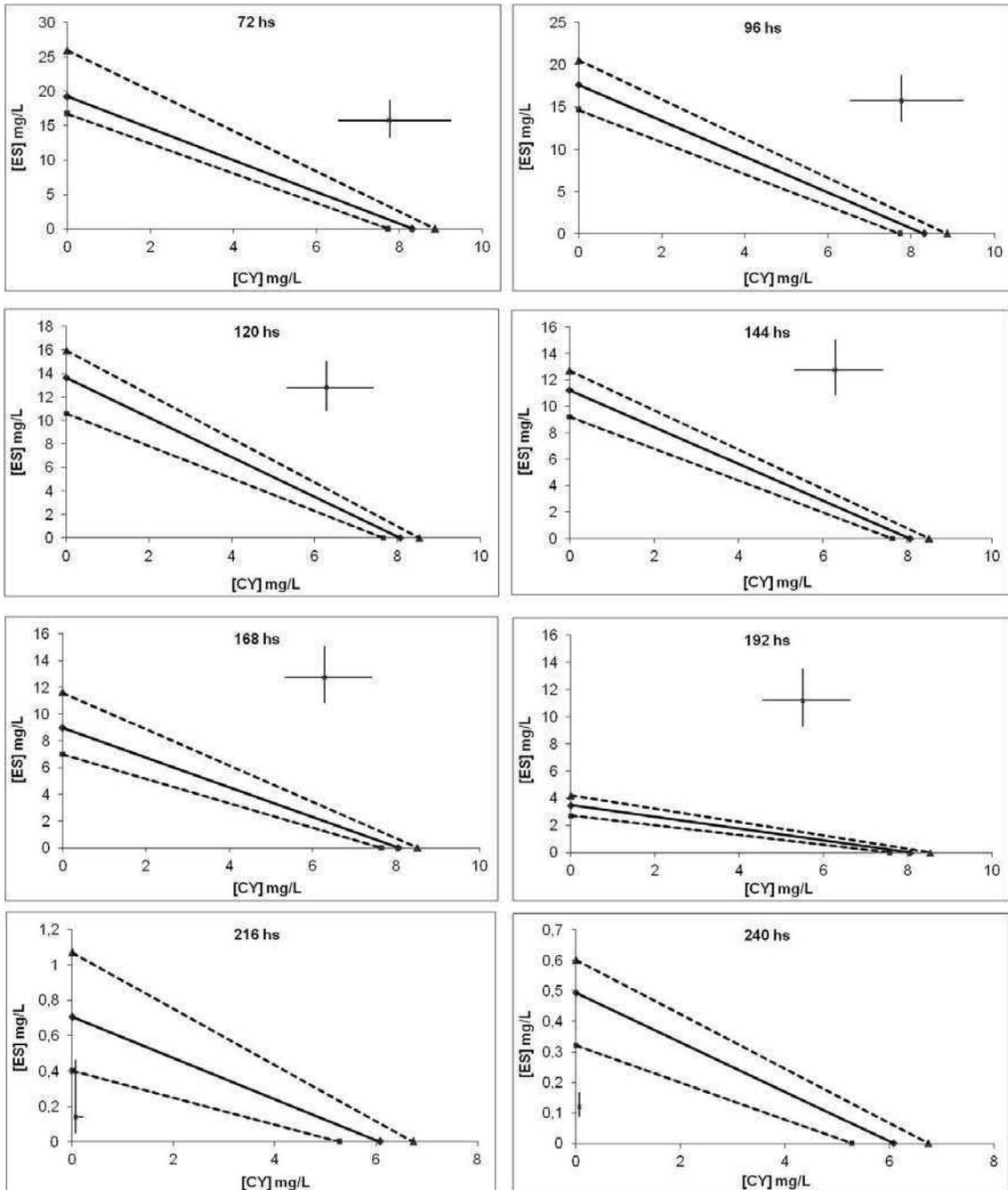
Tiempo (h)	CL 50 mezcla	CL 50 CYm	CL 50 ESm	CL 50 CY	CL 50 ES
72	23,55 (19,77-28,05)	7,77 (6,52-9,26)	15,78 (13,25-18,79)	8,32 (7,74-8,87)	19,25 (16,72-25,90)
96	23,55 (19,77-28,05)	7,77 (6,52-9,26)	15,78 (13,25-18,79)	8,32 (7,74-8,87)	17,62 (14,66-20,53)
120	19,06 (16,14-22,5)	6,29 (5,33-7,43)	12,77 (10,81-15,08)	8,07 (7,65-8,52)	13,61 (10,59-15,96)
144	19,06 (16,14-22,5)	6,29 (5,33-7,43)	12,77 (10,81-15,08)	8,07 (7,65-8,52)	11,24 (9,23-12,69)
168	19,06 (16,14-22,5)	6,29 (5,33-7,43)	12,77 (10,81-15,08)	8,07 (7,65-8,52)	8,99 (6,96-11,61)
192	16,71 (14,48-19,28)	5,51 (4,78-6,36)	11,20 (9,70-12,92)	8,06 (7,58-8,54)	3,48 (2,72-4,19)
216	0,21 (0,07-0,69)	0,07 (0,02-0,23)	0,14 (0,05-0,46)	6,08 (5,27-6,73)	0,70 (0,40-1,07)
240	0,18 (0,13-0,25)	0,06 (0,04-0,08)	0,12 (0,09-0,17)	6,08 (5,27-6,73)	0,49 (0,32-0,60)

**Tabla 6.1** Datos de las CLs 50 de la mezcla de ES y CY, y de las CLs 50 de cada sustancia en la mezcla (ESm y CYm) y de cada sustancia por separado, para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula temprana (E4) a distintos tiempos de exposición. Entre paréntesis están indicados los intervalos de confianza superiores e inferiores (95%).

Observando los isobogramas de la figura 6.4 y los datos informados en la tabla 6.2 se puede analizar la interacción de las mezclas de ES y CY para los distintos tiempos de exposición. Hasta las 192 h la interacción fue antagónica, es decir que ES y CY por separado fueron más tóxicos que en las mezclas, con lo que se necesitaría mayor concentración de los tóxicos para lograr el mismo efecto. Al extenderse el

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

tiempo de exposición, la toxicidad aumentó considerablemente, con lo cual a las 216 h la interacción fue aditiva, llegando a las 240 h a ser sinérgica.



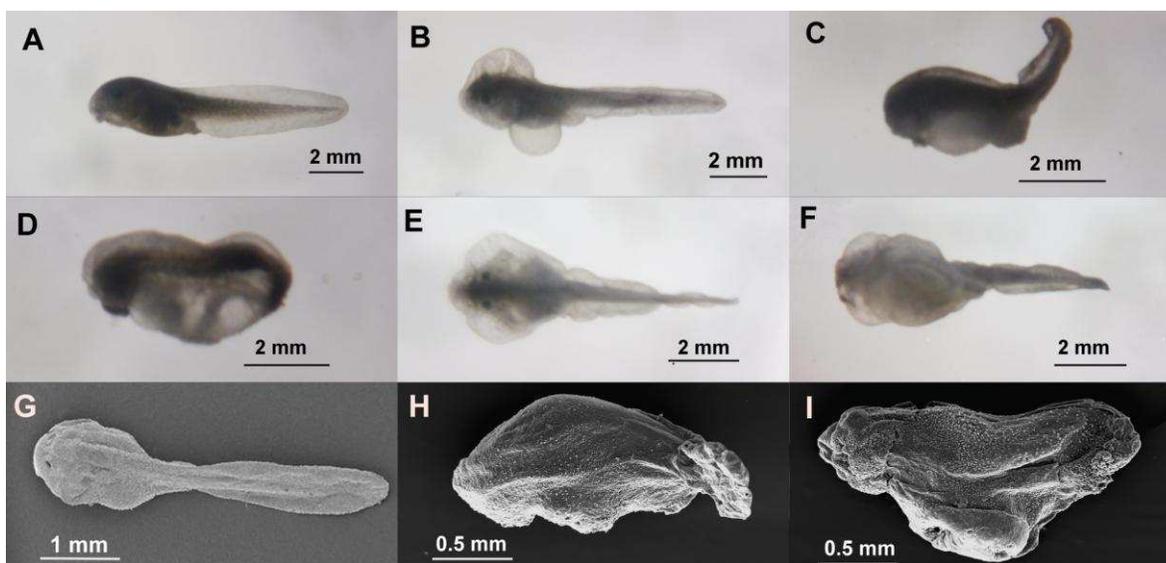
**Figura 6.4** Isobogramas para las CLs 50 (línea sólida) de las mezclas de ES y CY y a cada sustancia por separado, con sus intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas) para embriones de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

Tiempo de exposición (h)	S	LS(S)	LI(S)	IA(S=1)	IA(S>1)	IA(S<1)	LS(IA)(LS=1)	LS(IA)(LS>1)	LS(IA)(LS<1)	LI(IA)(LI=1)	LI(IA)(LI>1)	LI(IA)(LI<1)	INTERACCIÓN
72	1,75	2,32	1,25	0,75	-0,75	-0,43	1,32	-1,32	-0,57	0,25	-0,25	-0,20	ANTAGÓNICA
96	1,83	2,48	1,38	0,83	-0,83	-0,45	1,48	-1,48	-0,60	0,38	-0,38	-0,28	ANTAGÓNICA
120	1,72	2,39	1,30	0,72	-0,72	-0,42	1,39	-1,39	-0,58	0,30	-0,30	-0,23	ANTAGÓNICA
144	1,92	2,60	1,48	0,92	-0,92	-0,48	1,60	-1,60	-0,62	0,48	-0,48	-0,32	ANTAGÓNICA
168	2,20	3,14	1,56	1,20	-1,20	-0,55	2,14	-2,14	-0,68	0,56	-0,56	-0,36	ANTAGÓNICA
192	3,90	5,59	2,88	2,90	-2,90	-0,74	4,59	-4,59	-0,82	1,88	-1,88	-0,65	ANTAGÓNICA
216	0,21	1,20	0,05	-0,79	0,79	3,73	0,20	-0,20	-0,17	-0,95	0,95	20,16	ADITIVA
240	0,25	0,54	0,15	-0,75	0,75	2,94	-0,46	0,46	0,87	-0,85	0,85	5,62	SINÉRGICA

**Tabla 6.2** Valores de Índice S, Índices de aditividad (IA) y sus respectivos límites inferiores (LI) y superiores (LS), obtenidos mediante el análisis de los datos de la toxicidad de las mezclas de ES y CY en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula (E4) por 240 h. Los límites de IA permiten establecer una regla de decisión en base a un criterio estadístico. Si el cero está comprendido dentro de ese intervalo es un caso de aditividad, si el cero está por encima de esos valores es un caso de antagonismo, y si está por debajo de esos valores es un caso de sinergismo.

Los efectos subletales observados en los embriones expuestos a las mezclas fueron más severos que los que presentaron los embriones expuestos a las sustancias por separado. Durante las primeras horas los embriones exhibieron disociación celular, superficie irregular, tapón vitelino persistente y retraso en el desarrollo. Al avanzar el desarrollo, en las concentraciones a partir de 0,225 mg/L se observó talla reducida, subdesarrollo de branquias, microcefalia, incurvaciones del eje, cola ondulada e hidropesía muy marcada (Fig. 6.5). Al alcanzar el periodo larval, aún en las concentraciones más bajas las larvas presentaron alteraciones en el comportamiento como contracciones espasmódicas, temblores, disminución de los movimientos espontáneos, hasta una ausencia total de movimiento en la concentración de 22,5 mg/L a las 168 h. El valor NOEC a las 168 h para efectos subletales fue menor que 0,0045 mg/L (concentración más baja ensayada), mientras que para efectos letales fue de 2,25 mg/L, con lo que el IT-168 h de la mezcla fue superior a 500.

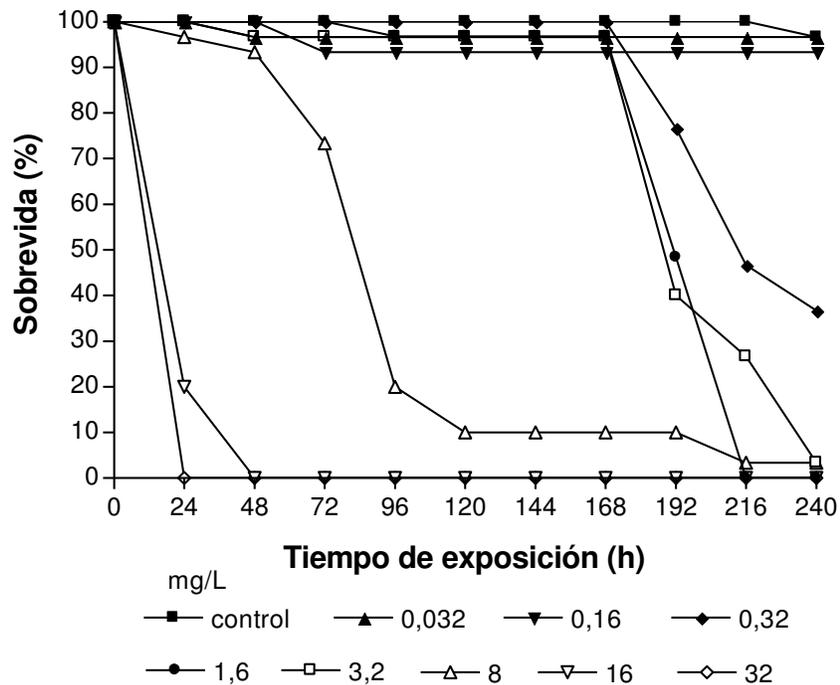


**Figura 6.5** Imágenes obtenidas por microscopía estereoscópica y MEB de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del estadio de blástula a las mezclas de ES y CY, a las 168 h: (A y G) larvas control, E25; (B, C, D, H, I) 5% de la mezcla (2,25 mg/L); (B) hidropesía; (C) retraso del desarrollo, incurvación dorsal del eje, hidropesía, bordes

superficiales irregulares y plegados; (D, H, I) subdesarrollo general, microcefalia, hidropesía; (E) 10 % de la mezcla (4,5 mg/L), hidropesía; (F) 25% de la mezcla (11,25 mg/L), hidropesía, ondulación de la aleta. Aumentos: (G): 18x; (H): 50x; (I): 46x.

### 6.4.2 Exposición continua crónica de larvas tempranas a partir del estadio de opérculo completo (E25) a las mezclas de ES y CY

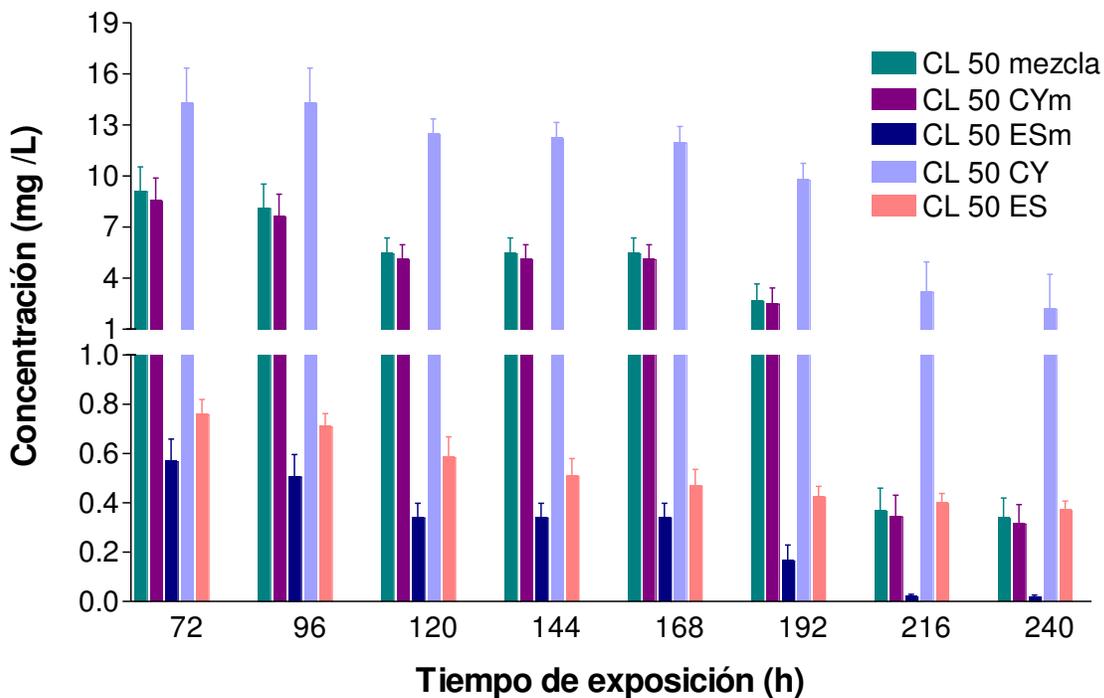
La mortalidad de las larvas expuestas a las mezclas de ES y CY durante el periodo agudo fue significativa a partir la concentración de 8 mg/L, llegando la mortalidad al 80% a las 96 h para esa concentración, y del 100% para las más altas. La mortalidad se mantuvo relativamente constante hasta el periodo crónico corto, siendo el valor NOEC-168h de 3,2 mg/L. A partir de las 192 h la mortalidad aumentó marcadamente en las larvas expuestas a partir de 0,32 mg/L, siendo el valor NOEC-240h de 0,16 mg/L.



**Figura 6.6** Supervivencia de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a las mezclas de ES y CY por 240 h.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

En la figura 6.7 y la tabla 6.3 se observa que la toxicidad de las mezclas aumentó lentamente hasta las 192 h, llegando a una diferencia máxima de 1,7 veces entre el periodo agudo, siendo la CL 50-72h=9,14 (7,93-10,55) mg/L, y crónico corto, siendo la CL 50-168h=5,49 (4,64-6,37) mg/L. Al completar el periodo crónico de exposición, a las 240 h, la toxicidad de las mezclas aumentó casi 8 veces en 48 h, siendo la CL 50-240h=0,34 (0,27-0,42) mg/L. Este aumento de la toxicidad de las mezclas con el tiempo se ve igualmente reflejado en la toxicidad de ES y CY en la mezcla (CYm y ESm). Asimismo, durante todo el periodo de exposición, no se presentaron DS ( $p>0,05$ ) entre la toxicidad de las mezclas y la de CYm, mientras que la toxicidad del ESm fue siempre aproximadamente 16 veces mayor que la toxicidad de la mezcla y de CYm.



**Figura 6.7** Comparación de las CLs 50 y sus intervalos de confianza obtenida de la mezcla de ES y CY, de las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla y para cada sustancia por separado, de larvas de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

Con respecto a la toxicidad de las sustancias en las mezclas versus en forma individual, se observa que no hubo DS entre la toxicidad del ESm y la del ES individual hasta el periodo crónico corto, siendo la toxicidad del ESm hasta 18.5 veces mayor que la de ES individual en el periodo crónico. La toxicidad de la CYm siempre fue mayor que la de la CY individual llegando a una diferencia de 7 veces en el periodo crónico.

Tiempo (h)	CL 50 mezcla	CL 50 CYm	CL 50 ESm	CL 50 CY	CL 50 ES
72	9,14 (7,93-10,55)	8,57 (7,43-9,89)	0,57 (0,50-0,66)	14,33 (10,41-16,35)	0,76 (0,71-0,82)
96	8,15 (6,96-9,54)	7,64 (6,53-8,94)	0,51 (0,44-0,60)	14,33 (10,41-16,35)	0,71 (0,67-0,76)
120	5,49 (4,64-6,37)	5,14 (4,35-5,97)	0,34 (0,29-0,40)	12,50 (11,62-13,37)	0,59 (0,48-0,67)
144	5,49 (4,64-6,37)	5,14 (4,35-5,97)	0,34 (0,29-0,40)	12,25 (11,40-13,16)	0,51 (0,40-0,58)
168	5,49 (4,64-6,37)	5,14 (4,35-5,97)	0,34 (0,29-0,40)	12 (11,22-12,91)	0,47 (0,35-0,54)
192	2,70 (1,34-3,66)	2,53 (1,26-3,43)	0,17 (0,08-0,23)	9,82 (8,29-10,75)	0,43 (0,39-0,47)
216	0,37 (0,29-0,46)	0,35 (0,27-0,43)	0,02 (0,02-0,03)	3,23 (2,10-4,96)	0,40 (0,37-0,44)
240	0,34 (0,27-0,42)	0,32 (0,25-0,39)	0,02 (0,02-0,03)	2,24 (1,60-3,00)	0,37 (0,34-0,41)

**Tabla 6.3** Datos de las CLs 50 de la mezcla de ES y CY, y de las CLs 50 de cada sustancia dentro de la mezcla (ESm y CYm) y de cada sustancia por separado, de larvas de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición. Entre paréntesis están indicados los intervalos de confianza superiores e inferiores (95%).

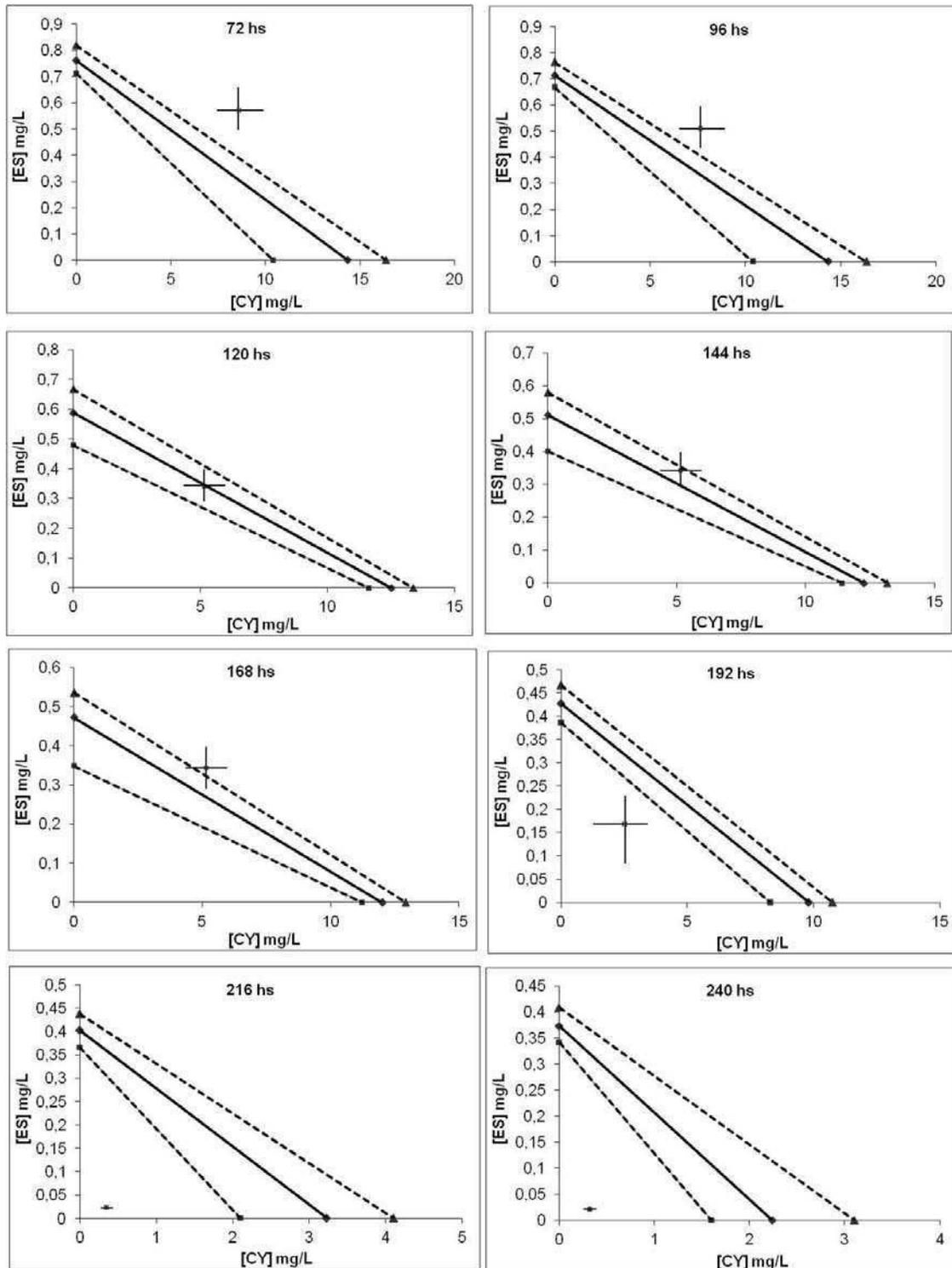
## CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

---

Comparando la toxicidad entre ambas sustancias, tanto en las mezclas como en forma individual se puede observar que el ES siempre fue más tóxico que la CY, siendo de aproximadamente 16 veces más tóxico en las mezclas, y de 25 veces en forma individual.

Observando los isobogramas de la figura 6.8 y los datos informados en la tabla 6.4 se puede analizar los efectos de la interacción de las mezclas de ES y CY para los distintos tiempos de exposición. Solo hasta las 72 h las mezclas presentaron una interacción antagónica, luego fue aditiva (a pesar que en el isobograma la interacción a las 96 h parece antagónica, el cero está comprendido entre los intervalos de confianza del IA), y a partir de las 216 h fue sinérgica.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*



**Figura 6.8** Isobogramas para las CLs 50 (línea sólida) con sus intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas) de las mezclas de ES y CY y de cada sustancia por separado, de larvas de *Rhinella arenarum* a distintos tiempos de exposición.

CAPÍTULO 6: Toxicidad de mezclas de endosulfán y cipermetrina sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

Tiempo de exposición (h)	S	LS(S)	LI(S)	IA(S=1)	IA(S>1)	IA(S<1)	LS(IA) (LS=1)	LS(IA) (LS>1)	LS(IA) (LS<1)	LI(IA) (LI=1)	LI(IA) (LI>1)	LI(IA) (LI<1)	INTERACCIÓN
72	1,35	1,88	1,06	0,35	-0,35	-0,26	0,88	-0,88	-0,47	0,06	-0,06	-0,06	ANTAGÓNICA
96	1,25	1,75	0,97	0,25	-0,25	-0,20	0,75	-0,75	-0,43	-0,03	0,03	0,03	ADITIVA
120	0,99	1,35	0,76	-0,01	0,01	0,01	0,35	-0,35	-0,26	-0,24	0,24	0,32	ADITIVA
144	1,09	1,52	0,83	0,09	-0,09	-0,08	0,52	-0,52	-0,34	-0,17	0,17	0,20	ADITIVA
168	1,16	1,68	0,88	0,16	-0,16	-0,13	0,68	-0,68	-0,40	-0,12	0,12	0,14	ADITIVA
192	0,65	1,01	0,30	-0,35	0,35	0,53	0,01	-0,01	-0,01	-0,70	0,70	2,37	ADITIVA
216	0,16	0,28	0,10	-0,84	0,84	5,06	-0,72	0,72	2,52	-0,90	0,90	9,40	SINÉRGICA
240	0,20	0,41	0,10	-0,80	0,80	4,02	-0,59	0,59	1,44	-0,90	0,90	8,88	SINÉRGICA

**Tabla 6.4** Valores de Índice S, Índices de aditividad (IA) y sus respectivos límites inferiores (LI) y superiores (LS), obtenidos mediante el análisis de los datos de la toxicidad de las mezclas de ES y CY en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del estadio de opérculo completo (E25) por 240 h. Los límites de IA permiten establecer una regla de decisión en base a un criterio estadístico. Si el cero está comprendido dentro de ese intervalo es un caso de aditividad, si el cero está por encima de esos valores es un caso de antagonismo, y si está por debajo de esos valores es un caso de sinergismo.

Los efectos subletales que causaron la mezcla de ES y CY a las larvas estuvieron principalmente representados por alteraciones en el comportamiento desde las primeras horas de exposición. Durante el periodo agudo y a partir de las concentraciones más bajas, las larvas presentaron contracciones espasmódicas, temblores, nado errático y desplazamientos breves, mientras que las larvas expuestas a las concentraciones más altas (> 3,2 mg/L) presentaron inmovilidad (narcosis) y una marcada hidropesía. A partir del periodo crónico las larvas exhibieron talla reducida, hidropesía, y alteraciones en el comportamiento como inanición, contracciones espasmódicas y a partir de 1,6 mg/L ausencia total de movimiento tanto en forma espontánea como inducida.

## 6.5 Discusión

La toxicidad de las mezclas de ES y CY resultó ser mayor para las larvas que para los embriones durante el periodo agudo y crónico corto, siendo las CL 50-96 y 168 h para los embriones de 23,55 (19,77-28,05) y 19,06 (16,14-22,5) mg/L respectivamente, mientras que para las larvas fue de solo 8,15 (6,96-9,54) y 5,49 (4,64-6,37) mg/L respectivamente. Al extenderse el tiempo de exposición hasta el periodo crónico, no hubo DS en la toxicidad para los embriones y las larvas, resultando la CL<sub>50-240h</sub> de 0,18 (0,13-0,25) y 0,34 (0,27-0,42) mg/L respectivamente. Análogamente, estas diferencias en la toxicidad para ambos estadios del desarrollo se ven reflejadas en el análisis de la interacción de las mezclas. Así, durante el periodo agudo y crónico corto, en las larvas que presentaron la mayor sensibilidad la interacción fue mayormente aditiva (solo fue antagónica a las 72 h) mientras que para los embriones fue siempre antagónica, y durante el periodo crónico para ambos estadios la interacción fue sinérgica (aumentando la toxicidad de las mezclas casi 100 veces en 48 h en los embriones). Asimismo, este aumento de la toxicidad de los

plaguicidas en los embriones durante el periodo crónico se observó en la exposición individual al ES (pero aumentando solo 7 veces en 48 h), mientras que no hubo diferencias en la toxicidad con el tiempo para la exposición individual a la CY. Por lo tanto, el efecto aditivo, llegando a sinérgico, de las mezclas sobre los embriones ocurre al alcanzar el estadio larval, periodo en el cual el ES y la CY atacan al SNC, órgano *blanco* de estos dos insecticidas neurotóxicos. Con respecto a los efectos subletales, los embriones expuestos a las mezclas presentaron malformaciones más severas que en la exposición a las sustancias por separado.

Existen otros modelos para el estudio de la interacción de mezclas de compuestos, entre ellos está el modelo de concentración de adición (Ra y col., 2006), que tiene la ventaja de ser de fácil aplicación al presentar solo tres niveles (antagónico, aditivo y sinérgico) como el método empleado en este estudio (Marking, 1977), pero tiene como desventaja que solo se puede emplear para tóxicos de acción similar y en algunas ocasiones sobrestima la toxicidad de la mezcla (Belden y col., 2007; Gaete y Chávez, 2008). En cambio existen otros modelos, como el modelo de Índice de Toxicidad de la Mezcla (ITM) que compara cuantitativamente los resultados de toxicidad de las mezclas, con la fórmula de Köneman (Köneman, 1981). Este segundo modelo, se considera un refinamiento del primero pero tiene cinco niveles (antagónico, no hay adición, adición parcial, concentración de adición y sinérgica) lo cual lo hace más complejo, pero permite determinar la toxicidad de sustancias de acción disimiles (Zhou y col., 2008).

La toxicidad y los efectos de interacción de sustancias presentes en mezclas fueron evaluados para distintos compuestos en organismos acuáticos. Por ejemplo, alevinos de la trucha *Oncorhynchus mykiss* expuestos a mezclas heterotóxicas del organofosforado Monofos® y del carbamato Furadán®, se observaron interacciones sinérgicas, mientras que las mezclas equitóxicas según el modelo empleado

presentaron interacciones antagónica, sinérgica o aditiva parcial (Iannacone y col., 2011).

Se han encontrado escasas referencias en la literatura acerca de la toxicidad de mezclas sobre organismos acuáticos en las que el ES o la CY sean uno de los componentes. En peces de *Mystus vittatus* expuestos a mezclas heterotóxicas de ES, diclorvos y carbofurano, se registraron efectos sinérgicos en mezclas terciarias cuando el ES y el diclorvos se mantuvieron constantes y el carbofurano variable; en cambio por exposición a mezclas binarias se observaron efectos antagónicos tanto cuando el diclorvos se mantuvo constante y el ES variable como cuando el carbofurano se mantuvo constante y el ES variable (Verma y col., 1980). Poletta y colaboradores (2011) evaluaron el efecto genotóxico de mezclas de plaguicidas usualmente utilizadas en el campo en huevos de caimán (*Caiman latirostris*). Los resultados mostraron que las mezclas de formulaciones de glifosato (Roundup), ES (Galgofan) y CY (Atanor) presentaron mayores índices de genotoxicidad (frecuencia de micronúcleos, daño al ADN y malformaciones), acompañados de alteraciones metabólicas, que la aplicación de la formulación Roundup sola.

Los resultados obtenidos destacan la importancia de la cronificación de los tratamientos y la realización de bioensayos en etapas de susceptibilidad diferencial para revelar la toxicidad de un compuesto y la acción sinérgica de una mezcla de compuestos. Asimismo, es importante remarcar la evaluación de los efectos subletales a diferencia de otros estudios que solo se basan en datos de toxicidad letal, cuando si bien datos de mortalidad que no producen sinergismo, si se muestra un agravamiento de los efectos subletales individuales

## 6.6 Conclusiones

- 1) Las mezclas de ES y CY causaron toxicidad sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* que se manifiesta por efectos letales subletales.
- 2) La toxicidad de las mezclas de ES y CY sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum* fue estadio-dependiente.
- 3) La sensibilidad de *R. arenarum* a las mezclas de ES y CY fue mayor en el periodo larval posiblemente como consecuencia de la maduración del sistema nervioso, órgano *blanco* de ambos insecticidas.
- 4) La interacción de las mezclas en la exposición de las larvas fue mayormente aditiva durante los periodos agudo y crónico corto mientras que para los embriones fue siempre antagónica, y durante el periodo crónico para ambos estadios la interacción fue sinérgica (aumentando la toxicidad de las mezclas casi 100 veces en 48 h en los embriones).
- 5) Las mezclas de ES y CY causaron malformaciones en los embriones, siendo más severas en las mezclas que en los compuestos por separado. En el periodo larval presentaron alteraciones en el comportamiento como contracciones espasmódicas, debilitamiento general e inanición.
- 6) Estos resultados apoyan la importancia de realizar ensayos que evalúen el efecto tóxico de las mezclas de plaguicidas, ya que, por lo general, tienen efectos distintos a los de los compuestos por separado.
- 7) De acuerdo a los resultados obtenidos y a la alta ocurrencia de niveles de ES y CY reportados en aguas superficiales próximas a áreas agrícolas, las mezclas de estos dos insecticidas podrían poner en riesgo la sobrevivencia de las poblaciones de esta especie.

# **CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES**

La evaluación de los efectos de dos insecticidas, endosulfán (ES) y cipermetrina (CY) y del fungicida Maxim® XL sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, mostró la mayor toxicidad de los insecticidas (el ES en periodos de exposición agudo, y la CY en periodos de exposición crónicos) frente al fungicida. Si bien el uso del ES ya está restringido, no es el caso de la CY, que asimismo integra el grupo de los plaguicidas de la “nueva generación”, propuesto como una alternativa para reemplazar a los organoclorados como el ES, por lo que es de esperar que la intensidad de aplicación aumente y los anfibios estén más expuestos a la CY. Este estudio demuestra que la CY constituiría un riesgo en exposiciones prolongadas.

La susceptibilidad a estos agroquímicos fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición causando efectos letales y subletales, que aumentaron significativamente durante el periodo crónico de exposición. Estos resultados indican la importancia de evaluar los efectos a largo plazo que incluyan etapas completas del ciclo de vida de los organismos, a concentraciones ambientalmente relevantes.

Las exposiciones por pulsos, a pesar de que las concentraciones ensayadas son generalmente altas, brindan información muy útil para evaluar la susceptibilidad diferencial durante el ciclo de vida de una especie y por ende la identificación de la etapa más sensible del desarrollo para fines regulatorios. Asimismo, estos diseños experimentales simulan emergencias ambientales como las que podrían sobrevenir de la sobreaplicación y derrames accidentales. Los resultados de las exposiciones por pulso a estos agroquímicos indicaron que hubo una susceptibilidad estadio-dependiente, encontrándose un patrón diferente para las sustancias analizadas de acuerdo al modo de acción de cada una de ellas. Así, los dos insecticidas causaron un aumento de toxicidad en los estadios embrionarios tardíos, posiblemente como consecuencia del mayor desarrollo del sistema nervioso, *blanco* de ambos plaguicidas, resultando ser el periodo larval el más sensible para ambas sustancias. La mayor toxicidad del Maxim® XL, por el contrario, se produjo en los estadios embrionarios

tempranos, siendo la blástula el más sensible, destacándose el severo efecto teratogénico del fungicida. Este patrón de toxicidad del fungicida estaría asociado a los mecanismos de acción de los ingredientes activos del FC: el Metalaxil-M, que interfiere en la síntesis de ARN por inhibición de la ARN polimerasa, y el fludioxonil, que interfiere en la formación de membranas, procesos fundamentales para la segmentación y la gastrulación.

Los dos insecticidas produjeron severas alteraciones en el comportamiento a muy bajas concentraciones, en concordancia con su acción neurotóxica, registrándose contracciones espasmódicas, nado errático, inanición, evolucionando hasta una pérdida total de movimiento. Cabe destacar que los marcadores etológicos tienen un importante potencial como sistemas de alarma temprana, cuando otros parámetros de toxicidad, como la mortalidad, están ausentes.

Asimismo, se comparó la toxicidad de la CY (ingrediente activo, i.a) con un formulado comercial (FC), presentando este último una toxicidad mayor en todos los tiempos de exposición, llegando a ser 7 veces más tóxico (para el FC,  $CL_{50-336h} = 0,00065$  ( $0-0,00325$ ) mg CY/L), un hecho muy relevante considerando que se trata del compuesto que efectivamente se aplica en los cultivos. Esto destaca la importancia de evaluar comparativamente la toxicidad de los i.a y FC.

Los resultados de la acumulación del ES destacan un patrón diferencial: los valores de acumulación para los embriones disminuyeron con el tiempo de exposición y la concentración, mientras que los valores de acumulación para las larvas aumentaron con el tiempo de exposición. Estos resultados indican un posible desarrollo de mecanismos/sistemas de detoxificación del ES durante el desarrollo embrionario, ya que la concentración del plaguicida estuvo relacionada positivamente con la tolerancia al insecticida. Asimismo, los valores de acumulación mayores en embriones que en larvas podría estar dado por la alta composición de lípidos presente

en el vitelo de los embriones lo que les permite la acumulación, que luego se va consumiendo a medida que avanza el desarrollo embrionario.

Concentraciones ambientalmente relevantes de ES y Maxim® XL no causaron alteraciones en el tiempo en completar la metamorfosis. Sin embargo, las larvas expuestas a ES presentaron una tendencia a comenzar antes a metamorfosear, pero lo hicieron con talla y peso reducido. En la evaluación del efecto del Maxim® XL sobre el desarrollo gonadal de juveniles de *R. arenarum* expuestos durante el periodo embrio-larval, se observaron alteraciones a nivel macroscópico, confirmadas por el análisis histológico de las gónadas. De todas maneras debe tenerse en cuenta que el tamaño de las muestras fue pequeño y por lo tanto este resultado debe tomarse como preliminar.

La sensibilidad de *R. arenarum* a las mezclas de ES y CY fue mayor en el periodo larval, tanto en la exposición aguda como crónica corta, mientras que en el periodo crónico no hubo DS en la toxicidad de las mezclas para los embriones y las larvas. La interacción de las mezclas en la exposición de las larvas fue mayormente aditiva durante los periodos agudo y crónico corto mientras que para los embriones fue siempre antagónica, y durante el periodo crónico para ambos estadios la interacción fue sinérgica (con una toxicidad de las mezclas casi 100 veces mayor en 48 h en los embriones). Asimismo, los embriones presentaron severas malformaciones resultando con una sensibilidad mayor que con los compuestos por separado. Los resultados obtenidos destacan la importancia de realizar ensayos que evalúen el efecto tóxico de las mezclas de plaguicidas, ya que, por lo general, tienen efectos distintos a los de los compuestos por separado, por lo que los presentes resultados abonan la evidencia científica respecto a la toxicidad de las mezclas, modulada por interacciones entre los compuestos. Esta información quedará disponible para los órganos legislativos de nuestro país, a fin de que se realicen los cambios reglamentarios necesarios, adecuando la normativa a la problemática real, desarrollando criterios de calidad de

agua y modificando los niveles permitidos para plaguicidas no solo para una sola sustancia, sino también en mezclas.

En general, los anfibios deben consumir energía en la detoxificación de los plaguicidas con el fin de recuperar el equilibrio fisiológico. Este hecho puede aumentar los efectos subletales producidos por los plaguicidas, influyendo sobre el *fitness* de los individuos (Semlitsch, 1990), haciéndolos más susceptibles a la predación, por ejemplo porque pierden la habilidad de escapar a tiempo de sus predadores (Ortiz-Santaliestra y col., 2010), o haciéndolos más vulnerables a estresores ambientales como agentes infecciosos, especies invasoras, cambios en los parámetros fisicoquímicos, etc. Los efectos tóxicos observados se expresan a nivel individual, pero a largo plazo podrían impactar negativamente a nivel de población (Sparling y col., 2001), produciendo cambios en la abundancia, estructura de edades, y dinámica, lo que lleva al riesgo de declinación poblacional. Más aún, debido a que los anfibios cumplen un rol muy importante en las redes tróficas, estos efectos podrían influir a otros niveles ecológicos y finalmente en los ecosistemas a los que pertenecen.

Con respecto a la evaluación de peligrosidad realizada para las 3 sustancias, la CY mostró el mayor potencial de peligro para producir efectos adversos sobre esta especie, seguida por el ES y por último el Maxim® XL. El i.a de la CY presenta peligrosidad para las larvas de *R. arenarum*, a partir de exposiciones crónico-cortas, pero el FC representa un peligro ya desde la exposición aguda (en un escenario normal). El ES presentó valores de HQ superiores al valor LOC durante la exposición crónica. Para el Maxim® XL, los HQ 2 calculados resultaron en valores mayores que 1 (valor LOC) aún para la exposición aguda al fungicida a partir del estadio de blástula, pero los valores de HQ 1 solo fueron superior al valor LOC en la exposición crónica. Si bien los valores de HQ fueron calculados con los valores CEA obtenidos a partir de las tasas máximas de aplicación del producto, sería ambientalmente más relevante para realizar una evaluación de peligrosidad utilizar los niveles del contaminante en

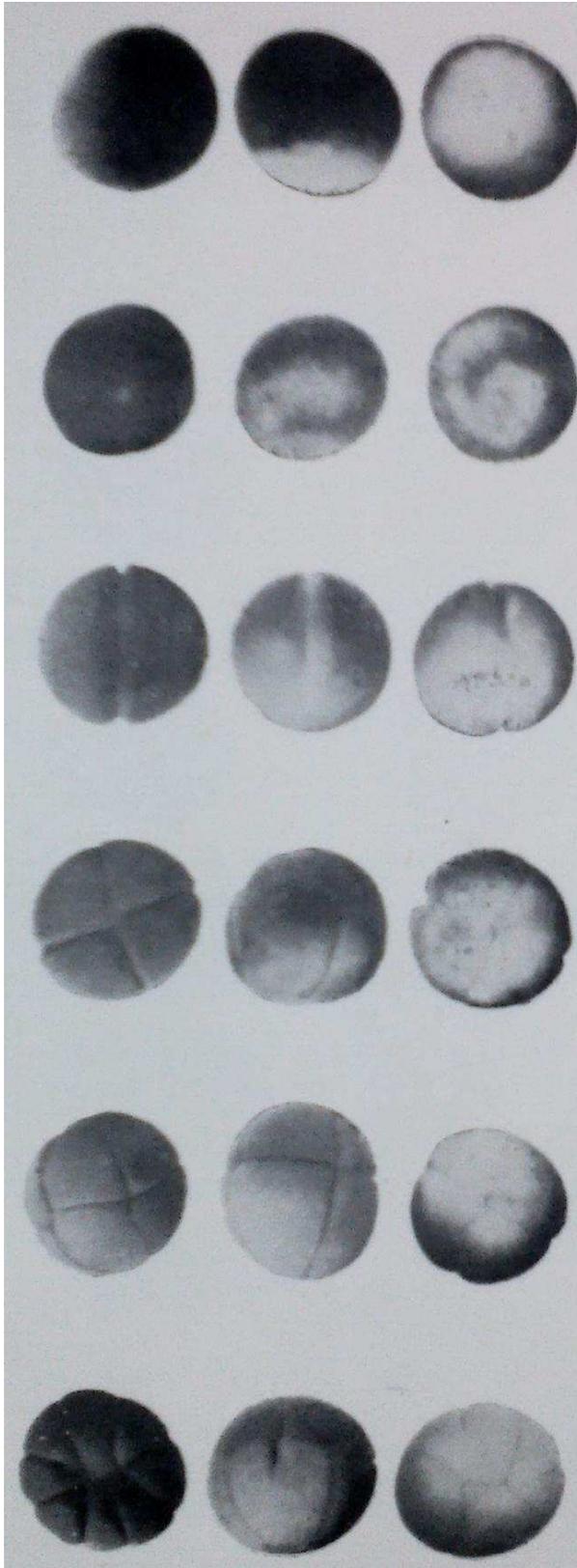
cuestión medidos en el ambiente. Asimismo, en el cálculo del HQ el valor de toxicidad de referencia utilizado fue el valor NOEC para efectos letales, sin embargo adoptando el peor escenario posible y basándose en el “principio precautorio”, se podría haber utilizado el valor NOEC para efectos subletales con lo cual los valores de HQ serían aún mayores y por lo tanto un mayor potencial de peligrosidad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los valores de HQ estimados en los análisis de evaluación de peligrosidad, estas tres sustancias habitualmente utilizadas a nivel mundial y en particular en nuestro país, podrían poner en riesgo la sobrevivencia de las poblaciones de esta especie.

# ANEXO

## Anexo 1:

### A) Los primeros estadios del desarrollo en *Bufo arenarum* (Del Conte y Sirlin, 1951)



Estadio 1      0 horas  
FECUNDACIÓN

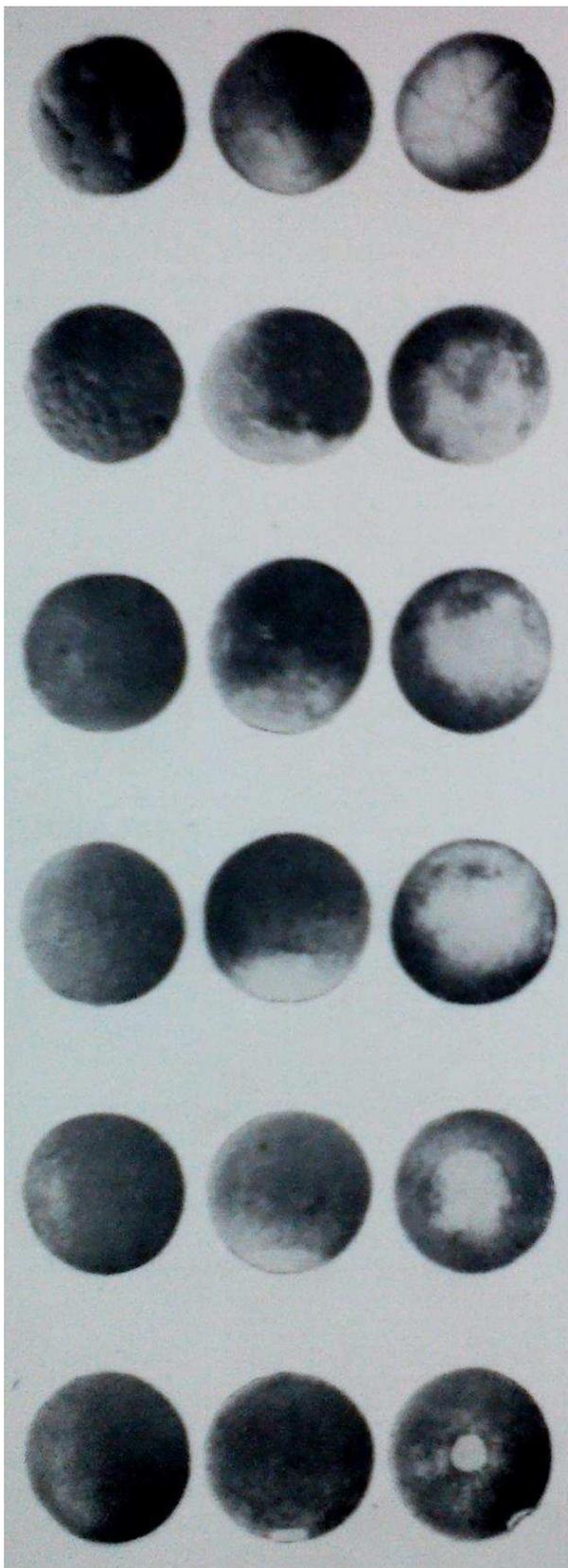
Estadio 2      1 hora  
MEDIA LUNA GRIS

Estadio 3      3 horas  
PRIMER HENDIMIENTO  
(1-2 blastómeros)

Estadio 4      4 horas  
SEGUNDO HENDIMIENTO  
(2-4 blastómeros)

Estadio 5      5 horas  
TERCER HENDIMIENTO  
(8 blastómeros)

Estadio 6      5 1/2 horas  
CUARTO HENDIMIENTO  
(12-16 blastómeros)



**Estadio 7      6 1/2 horas**  
**QUINTO HENDIMIENTO**  
**(24-32 blastómeros)**

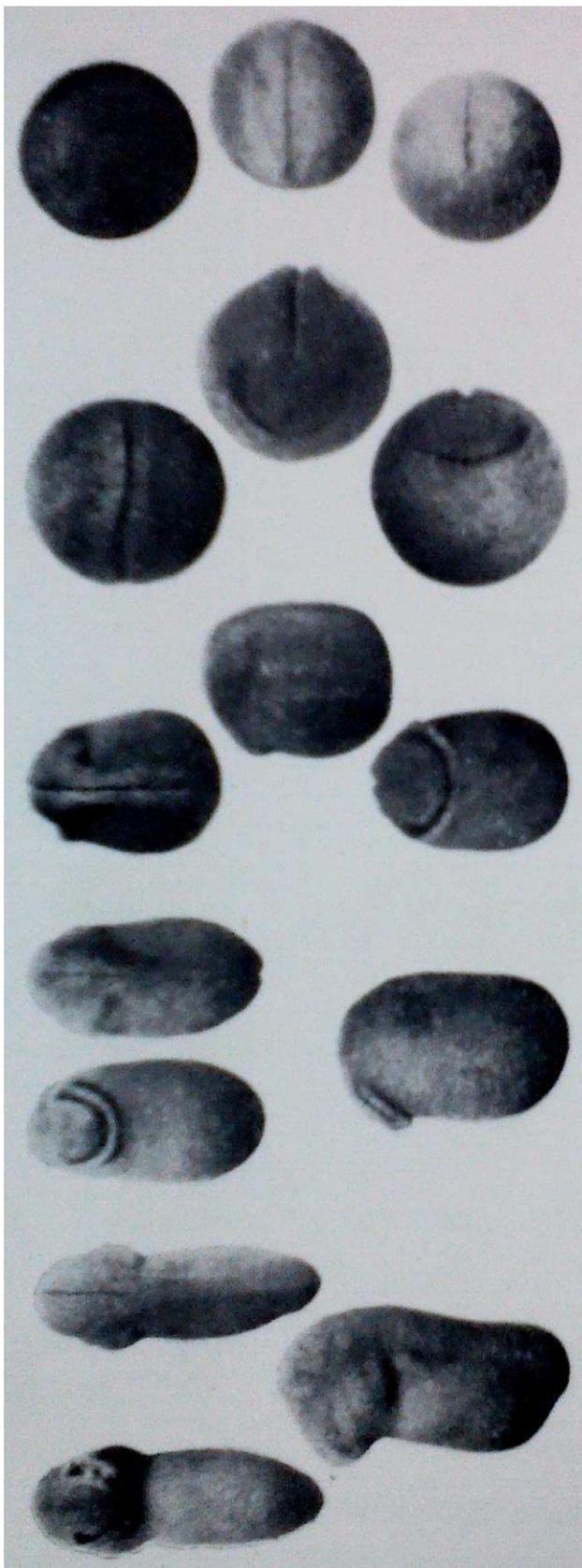
**Estadio 8      12 horas**  
**BLÁSTULA MEDIA**

**Estadio 9      18 horas**  
**BLÁSTULA TARDÍA**

**Estadio 10    22 horas**  
**LABIO DORSAL**  
**DEL BLASTOPORO**

**Estadio 11    27 horas**  
**GÁSTRULA MEDIA**

**Estadio 12    34 horas**  
**GÁSTRULA TARDÍA**



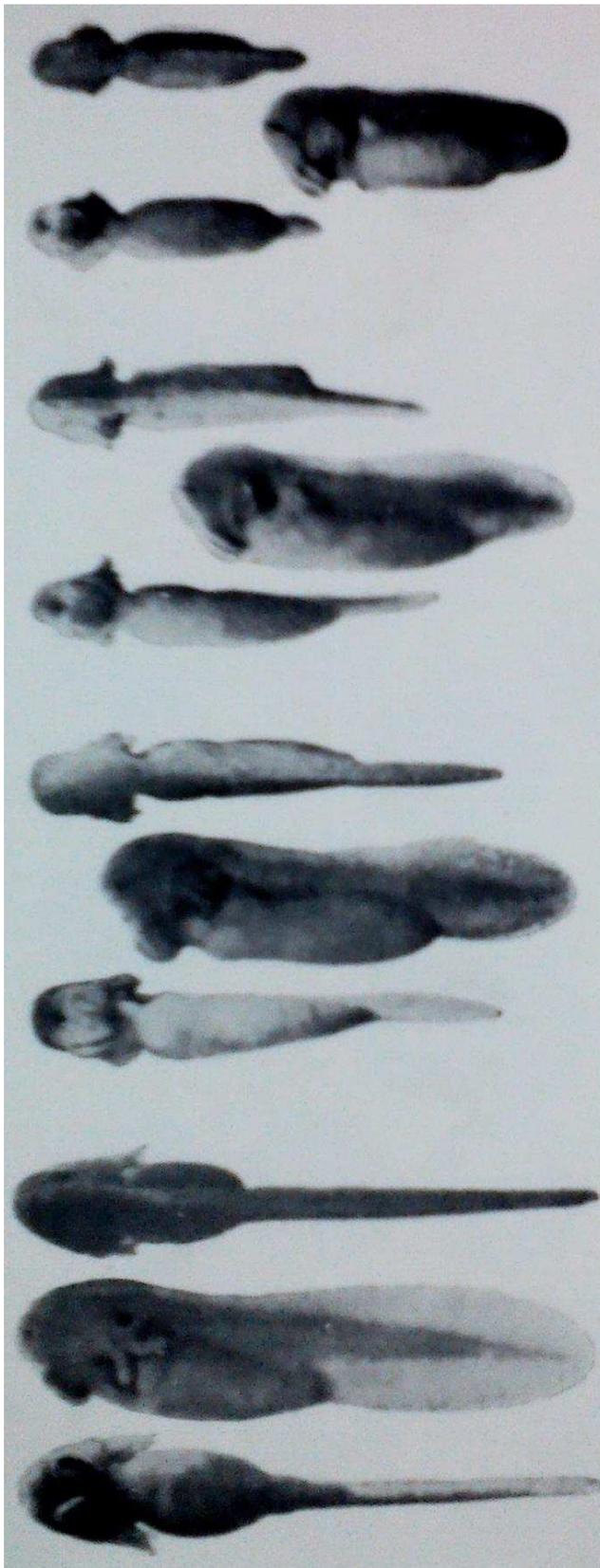
**Estadio 13      44 horas  
PLACA NEURAL**

**Estadio 14      54 horas  
SURCO NEURAL**

**Estadio 15      59 horas  
ROTACIÓN**

**Estadio 16      64 horas  
TUBO NEURAL**

**Estadio 17      70 horas  
BROTE CAUDAL**

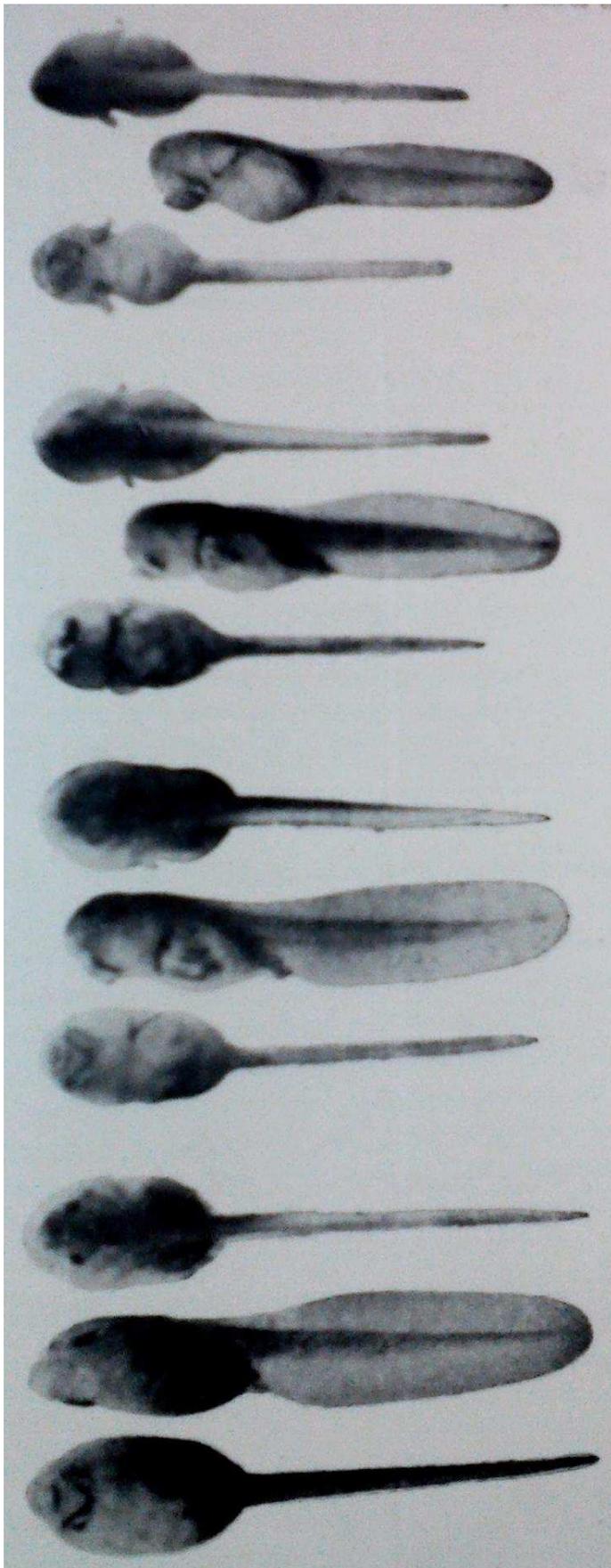


**Estadio 18      4 días**  
**RESPUESTA MUSCULAR**  
**(3,5 mm)**

**Estadio 19      5 días**  
**LATIDO CARDÍACO**  
**(5 mm)**

**Estadio 20      5 1/2 días**  
**CIRCULACIÓN BRANQUIAL**  
**(5,5 mm)**

**Estadio 21      6 1/2 días**  
**BOCA ABIERTA**  
**(7 mm)**



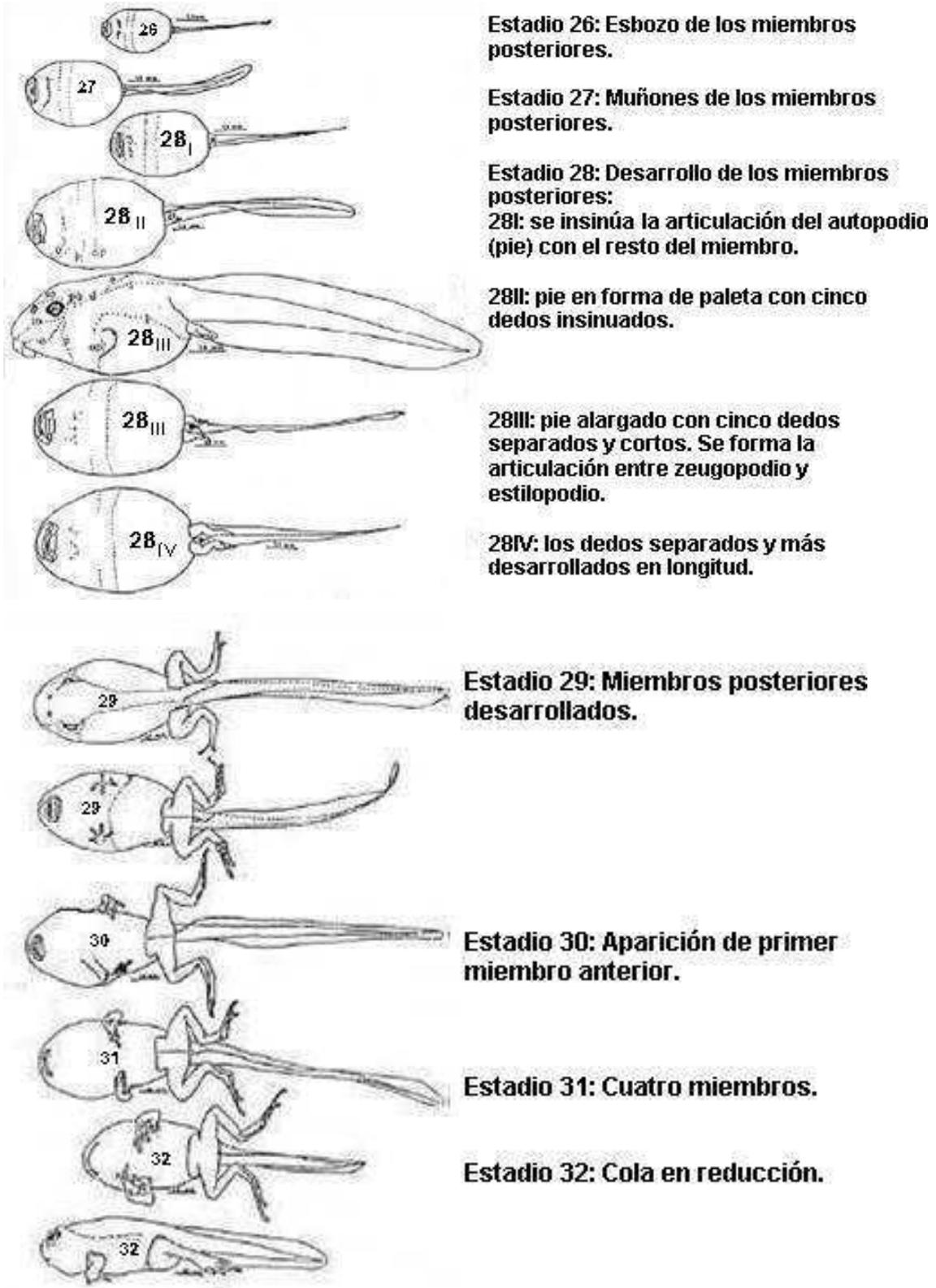
**Estadio 22**      7 1/2 días  
**CIRCULACIÓN**  
**EN LA ALETA DE LA COLA**  
**(7,5 mm)**

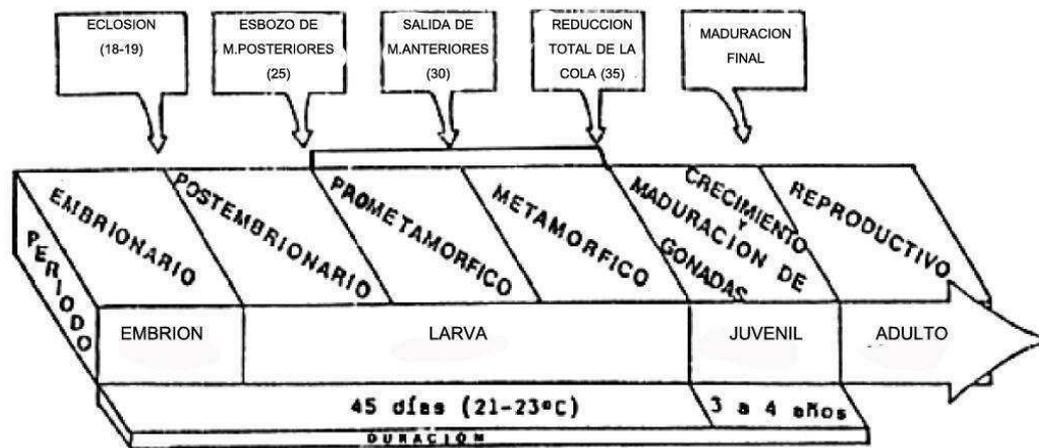
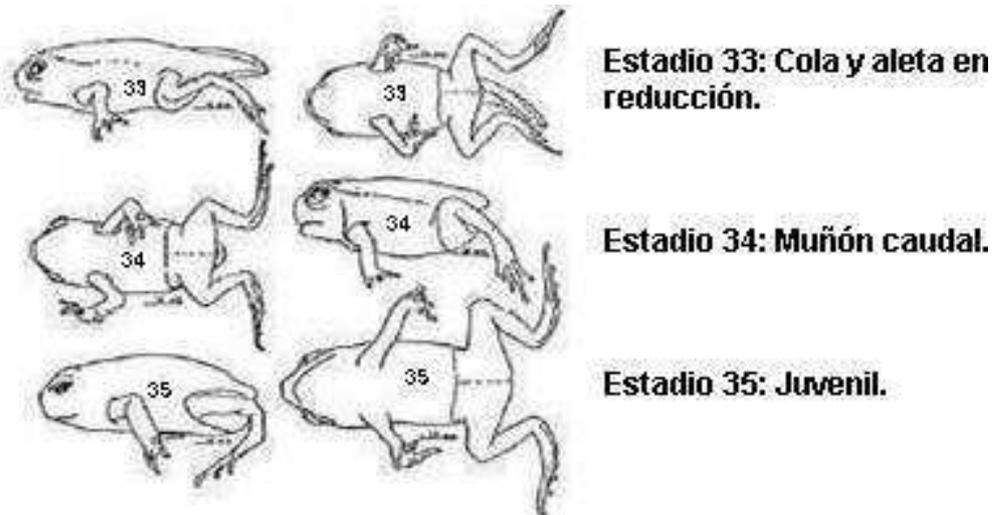
**Estadio 23**      8 días  
**PLIEGUE OPERCULAR**  
**(8 mm)**

**Estadio 24**      9 1/2 días  
**OPÉRCULO CERRADO**  
**EN LA DERECHA**  
**(9 mm)**

**Estadio 25**      11 días  
**OPÉRCULO COMPLETO**  
**(10 mm)**

**B) Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura)  
(Echeverría y Fiorito de Lopez, 1981)**





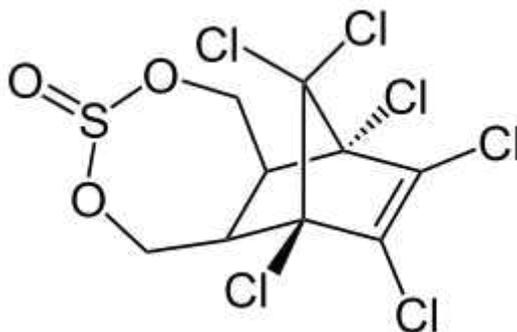
Esquema que muestra las diferentes etapas del ciclo de vida de *Rhinella arenarum*

## ANEXO 2. Características fisicoquímicas del endosulfán (EXTOXNET, 1996)

**Nombre químico:** 3-Oxido 6,7,8,9,10,10- hexacloro- 1,5,5a,6,9,9a- hexahidro-  
6,9-metano- 2,4,3- benzodioxatiepina.

**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S

**Estructura molecular:**



**Clase química:** organoclorado ciclodieno

**Número de CAS:** 115-29-7 (isómero alfa 959-98-8; isómero beta 33213-65-9)

**Peso molecular:** 406,96 g

**Punto de Fusión:** 70-100 °C

**Densidad:** 1,74 g/ml

**Solubilidad:** insoluble en agua: 0,32 mg/L a 22 °C; soluble en la mayoría de los solventes orgánicos como xileno, cloroformo, kerosene, etc.

**Presión de vapor:** 1200 mPa (a 80 °C)

**Coefficiente de partición:** 5

**Coefficiente de adsorción:** 12,400

**Tiempo de vida media:** Es moderadamente persistente en el ambiente, con una vida media de entre 35 y 150 días en suelo y agua respectivamente, dependiendo del

isómero y las condiciones de pH. En plantas es rápidamente metabolizado y el 50 % se pierde entre 3 y 7 días luego de la aplicación.

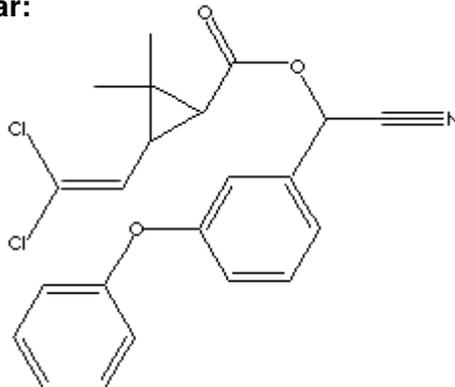
**Clasificación toxicológica:** Está clasificado como Pesticida de Uso Restringido (RUP, del inglés Restricted Use Pesticide), altamente tóxico, Clase Ib de EPA.

## ANEXO 3. Características fisicoquímicas de la cipermetrina (EXTOXNET, 1996)

**Nombre químico:** (1RS)-cis, trans-3- (2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (R,S) - ciano-3- fenoxibencilo (IUPAC).

**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>19</sub> Cl<sub>2</sub> NO<sub>3</sub>

**Estructura molecular:**



**Clase química:** piretroide de tipo II

**Número de CAS:** 52315-07-8

**Peso molecular:** 416,3 g

**Punto de fusión:** 60-80 °C (isómeros puros).

**Densidad:** 1,21-1,25 g/mL a 20 °C

**Solubilidad:** insoluble en agua: 0,01 mg/L a 20 °C. Soluble en la mayoría de los solventes orgánicos como metanol, acetona, xileno, ciclohexano.

**Presión de vapor:**  $5,1 \times 10^{-7}$  nPa a 70 °C

**Coefficiente de partición:** 6,602

**Coefficiente de adsorción:** 100,000

**Tiempo de vida media:** Moderadamente persistente en suelo, con una vida media de 4 a 56 días. En agua es relativamente estable con una vida media de entre 50 y 100

días. En plantas se metaboliza rápidamente hasta casi su totalidad entre una semana y un mes luego de ser aplicado.

**Clasificación toxicológica:** Muchos productos que contienen cipermetrina están clasificados como Pesticidas de Uso Restringido (RUP) por EPA, particularmente por su toxicidad en peces. La cipermetrina se clasifica como moderadamente tóxica, clase II; algunas formulaciones son levemente tóxicas, clase III.

## ANEXO 4. Características fisicoquímicas de MAXIM® XL (Syngenta, 2004)

**Empresa que lo produce:** Syngenta Agro S.A.

**Tipo de Formulación:** Concentrado floable para tratamiento de semillas

**Ingrediente(s) activo(s):** 1 % w/v metalaxyl-M CGA329351

2,5 % w/v fludioxonil CGA173506

### Componente(s) Riesgoso(s)

CAS	Nombre	% w/w	Símbolo de Riesgo
9004-98-2	poly(oxy-1,2-ethanediyl),alpha-9-octadecenyl-omega-hydroxy-(Z)	1 - 5	Xn (nocivo)
68411-31-4	benzenesulfonic acid, C10-13-alkyl derivs., compds. with triethanolamine	1 - 5	Xi (irritante)
131341-86-1	fludioxonil	2.4	N (peligroso para el medio ambiente)
70630-17-0	metalaxyl-M	0,96	Xn (nocivo)
57-55-6	1,2-propanediol	4 - 10	
99734-09-5	poly(oxy-1,2-ethanediyl),alpha-[tris(1-phenylethyl)phenyl]-omega-hydroxy	1 - 5	

**Aspecto:** líquido

**Color:** Rojo claro a rojo oscuro

**Estado Físico:** líquido

**Punto de Inflamación:** > 90 °C EEC A 9

**Densidad:** 1,02 – 1,06 g/cm<sup>3</sup> (20 °C) OECD 109

**Valor pH:** 5 - 9 (1 %; en agua dionizada)

**Miscibilidad con agua:** miscible

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Agostini MG, Natale GS, Ronco AE. 2009. Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *Int J Environ Health*. 3:379-389.
- Agostini MG, Natale GS, Ronco AE. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19(8):1545-1550.
- Agostini MG, Kacoliris F, Demetrio P, Natale GS, Bonetto C, Ronco AE. 2013. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in Northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Dis Aquat Organ*. 104(2):163-71.
- Alford RA, Harris RN. 1988. Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *Am Nat*. 131:91-106.
- APHA (American Public Health Association). 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 15th ed., Washington DC.
- Arias, S. 2005. Transformaciones en la estructura agraria de la región pampeana causadas por el proceso de agriculturización de la década del '90. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. UBA
- Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2011. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environ Toxicol*. 26:373-381.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1993. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX). In *Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. Philadelphia, PA, pp 1199–1209.

- ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry). 2000. Toxicological Profile for Endosulfan. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Bantle JA, Dumont JN, Finch RA, Linder G, Fort DJ. 1998. Atlas of abnormalities. A guide for the performance of FETAX, 2<sup>nd</sup> ed. Oklahoma State University, Stillwater.
- Barbash JE, Resek EA. 1996. Pesticides in ground water: Distribution, trends, and governing factors; En: Gilliom RJ (ed). Pesticides in the hydrologic system (v. 2): Chelsea, Mich., Ann Arbor Press, 588 p.
- Battaglin W, Fairchild J. 2002. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. *Water Sci Technol.* 45(9):95-103.
- Battaglin WA., Sandstrom MW, Kuivila KM, Kolpin DW, Meyer MT. 2011. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water, Air, & Soil Pollution* 218:307-322.
- Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ. 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?. *Integr Environ Assess Manag.* 3:364–372.
- Bellairs R, Curtis ASG, Sanders EJ. 1978. Cell adhesiveness and embryonic differentiation. *J Embryol Exp Morph.* 46:207-213.
- Ben-Shaul Y, Hausman RE, Moscona AA. 1979. Visualization of a cell surface glycoprotein, the retina cognin, on embryonic cells by immuno-latex labelling and scanning electron microscopy. *Devl Biol.* 72:89-101.
- Bernabó I, Brunelli E, Berg C, Bonacci A, Tripepi S. 2008. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquat Toxicol.* 86:447-456.

- Berrill M, Bertram S, Wilson A, Louis S, Brigham D, Stromberg C. 1993. Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environ Toxicol Chem.* 12:525–539.
- Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B. 1998 Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem.* 17:1738–1744.
- Biga LM, Blaustein AR. 2013. Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians. *Arch Environ Contam Toxicol.* 47(4):489-495.
- Boone MD. 2008. Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis. *Environ Toxicol Chem.* 27:1561–1568.
- Boucant JC, Bernard B, Aubery M, Bourrillion R, Honillion CH. 1979. Concanavalin A binding to amphibian embryo and effect on morphogenesis. *J Embryol Exp Morph.* 51:63-72.
- Boutin C, Freemark KE, Keddy CJ. 1993. Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: nontarget plant Testing and Evaluation. Technical Report Series 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Ottawa, 91p.
- Boutin C, Freemark KE, Keddy CJ. 1995. Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides. *Environ Toxicol Chem.* 14(9):1465-1475.
- Boyer R, Grue CE. 1995. The need for water quality criteria for frogs. *Environ Health Perspect.* 103:352-355.
- Brodeur JC, Svartz G, Perez-Coll CS, Marino DJG, Herkovits J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat Toxicol.* 91(2):161–170.

- Broomhall S, Shine R. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. Arch Environ Contam Toxicol. 45:221-226.
- Brown DD, Cai LQ. 2007. Amphibian metamorphosis. Dev Biol. 306:20-33.
- Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonacci A, Tripepi S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. Aquat Toxicol. 91:135-142.
- Burton G, Nordstrom JE. 2004. An *in situ* toxicity identification evaluation method Part I: Laboratory validation. Environ Toxicol Chem. 23:2844-2850.
- Buser HR, Mueller MD, Poiger T, Balmer ME. 2002. Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: enantioselective degradation and chiral stability in soil. Environ Sci Technol. 36:221–226.
- Cabagna M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo M, Ale E. 2006. Induction of micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. Toxicol Environ Chem. 88(4):729–737.
- Calabrese EJ. 1991. Multiple Chemical Interaction, Lewis Publishers, Chelsea, Mi., USA. p.13
- Calamari D, Alabaster JS. 1980. An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. Chemosphere 9:533-538.
- CASAFE (Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). 2010. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2010. Disponible en: <http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe%20Mercado%20Fitosanitarios%202010.pdf>

- CASAFE (Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). 2012. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2012. Disponible en: [http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe%20Mercado%20 Fitosanitario %202012.pdf](http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe%20Mercado%20Fitosanitario%202012.pdf). Consultado: 20/01/2014
- Casco VH, Marín L, Vergara MN, Lajmanovich RC, Izaguirre MF, Peralta Soler A. 2006. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biol Toxicol.* 22(3):199-211.
- Cei JM. 1980. Amphibians of Argentina. N.S. Monogr. 2. *Monitore Zoologico Italiano. Italian Journal of Zoology.* 609 pp.
- Colby SR. 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15(1):20-24.
- Collins JP, Storfer A. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity & Distributions* 9:89-98.
- Cox C, Surgan M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ Health Perspect.* 114(12):1803-1807.
- Croteau MC, Hogan N, Gibson JC, Lean D, Trudeau VL. 2008. Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. En: Mitchell JC, Jung Brown RE, Bartholomew B (eds) *Urban herpetology. Herpetological Conservation* 3. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, Utah, pp 197–209.
- Dalvie MA, Cairncross E, Solomon A, London L. 2003. Contamination of rural surface and groundwater by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. *Environ Health* 2(1):1.
- David M, Marigoudar SR, Patil VK, Halappa R. 2012. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal

- cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pestic Biochem Physiol.* 103:127–134.
- Davies J. 1990. Enfoque agromédico sobre manejo de plaguicidas. Organización Mundial de la salud. Washington, D.C. OPS, 404 p.
- De Bonis CJ. 2005. Foto ganadora del 3º premio del concurso "Ciencia en foco, Tecnología en foco", año 2005. Disponible en: [http://www.concursofotociencia.gov.ar/index.php?p=2005ganadores\\_tecnica](http://www.concursofotociencia.gov.ar/index.php?p=2005ganadores_tecnica) Consultado: 20/01/2014
- Del Conte E, Sirlin L. 1951. The first stages of *Bufo arenarum* development. *Acta Zool Lilloana*, 12:495-499.
- Demetrio, PM. 2012. Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis doctoral, UNLP.
- Denoël M, Libon S, Kestemont P, Brasseur C, Focant JF, De Pauw E. 2013. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere* 90:945-951.
- Denver RJ. 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Horm Behav.* 31:169-179.
- Dewez D, Geoffroy L, Vernet G, Popovic R. 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat Toxicol.* 74(2):150-159.
- Dossiê Abrasco. 2012. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio 2012. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Disponible en: <http://greco.ppgi.ufrj.br/DossieVirtual/>. Consultado: 20/01/2014
- Echeverría DD, Fiorito de López LE. 1981. Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura). *Physis (Bs. As.), Secc. B* 40 (98):15-23.

- Ede DA, Agerbak GS. 1968. Cell adhesion and movement in relation to the developing limb pattern in normal and talpid mutant chick embryo. *J Embryol Exp Morph.* 20:81-100.
- Edwards R, Millburn P, Huston DH. 1987. The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis-trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairneri*. *Xenobiotica* 17:1175-1193.
- Evans J, Fernández BA, Gavilán GA, Ize LI, Martínez CMA, Ramírez RP, Zuk M. 2003. Introducción al análisis de riesgos ambientales. Instituto Nacional de Ecología. (INE-SEMARNAT) México D.F
- EXTOXNET (The Extension Toxicology Network). 1996. Pesticide Information Profiles (PIPs). Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/pips/ghindex.html>. Consultado: 20/01/2014.
- Fisher DJ, Hayes AL. 1985. A comparison of the biochemical and physiological effects of the systemic fungicide cyprofluram with those of the related compounds metalaxyl and metolachlor. *Crop Prot.* 4:501–510.
- Formulagro S.R.L. 2012. Endosulfan 35 product manual. Disponible en: <http://www.formulagro.com.ar/pdf/ENDOSULFAN%2035%20FORMULAGRO%20-%2032.701.pdf>. Consultado: 20/01/2014.
- Fulladosa E, Murat JC, Martínez M, Villaescusa I. 2005. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 60:43–48.
- Gaete H, Chavez C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica* 27:1-10.
- Gallardo JM. 1987. Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Librería agropecuaria S.A. 1ra. edición. 98 pp.

- García Fernández JC, Casabella AN, Marzi AA, Astolfi E, Roses O, Donnewald H, Villaamil E. (1979). Organochlorinated pesticides in the Argentine Antarctic sector and Atlantic coastline waters. *Geogr Med.* 9:28-37.
- Garforth BM, Woodbridge AP. 1984. Spray drift from an aerial application of Fastac fate and biological effects in an adjacent freshwater ditch', *Shell Research Sittingbourne Vol. 84*, p.55.
- Gilbert SF. 2005. *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana, Madrid, España 881pp.
- Ginebreda A, Kuzmanovic M, Guasch H, de Alda ML, López-Doval JC, Muñoz I, Ricart M, Romaní AM, Sabater S, Barceló D. 2014. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *Sci Total Environ.* 468-469:715-723.
- Giusi G, Facciolo RM, Alo R, Carelli A, Madeo M, Brandmayr P, Canonaco M. 2005. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. *Environ Health Perspect.* 113:1522–1529.
- Gleba SA. 2012. *Glextrin 25® product manual*. Disponible en: [http://www.gleba.com.ar/Info/Image/ficha\\_tecnica/FT%20GLEXTRIN%2025.pdf](http://www.gleba.com.ar/Info/Image/ficha_tecnica/FT%20GLEXTRIN%2025.pdf) Consultado: 20/01/2014.
- Glickman AH, Weitman SD, Lech JJ. 1982. Differential toxicity of trans-permethrin in rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 66(2):153-161.
- Gobas FAPC, Morrison HA. 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. En: Boethling RS, Mackay D. (Eds.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-231

- Goldschneider I, Moscona AA. 1972. Tissue-specific cell surface antigens on embryonic cells. *J Cell Biol.* 53:435-449.
- Gottlieb D, Rock K, Glaser L. 1976. A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. *Proc Natn Acad Sci, U.S.A.* 73:410-414.
- Gowing DP. 1960. Comments on Tests of Herbicide Mixtures. *Weeds* 8(3):379-391.
- Grajeda CP, Ramirez MVM, Gonzalez ME. 2004. Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 18:13-19.
- Grant PB, Woudneh MB, Ross PS. 2013. Pesticides in blood from spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) downstream of banana plantations in Costa Rica. *Environ Toxicol Chem.* 32(11):2576-2583.
- Greulich K, Pflugmacher S. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquat Toxicol.* 65(3):329-336.
- Gustafson T, Wolpert L. 1967. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. *Devl Biol.* 42:442-498.
- Hamm JT, Wilson BW, Hinton DE. 2001. Increasing uptake and bioactivation with development positively modulate diazinon toxicity in early life stage Medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol Sci.* 61:304-313.
- Harris ML, Bishop CA, Struger J, Ripley B, Bogart JB. 1998. The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. I. Genetics, physiology, and biochemistry of breeding adults and young-of-the-year. *Environ Toxicol Chem.* 17:1338-1350.
- Harris ML, Chora L, Bishop CA, Bogart JP. 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:263-270.

- Hassall KA. 1990. The biochemistry and uses of pesticides: Structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. VCH, Cambridge 350-354.
- Hausman RE, Moscona AA. 1976. Isolation of retina-specific cell-aggregating factor from membranes of embryonic neural retina tissue. Proc Natn Acad Sci, U.S.A. 73:3594-3598.
- Haya, K. 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. Environ Toxicol Chem. 8:381-392.
- Hayes TB. 2000. Endocrine disruption in amphibians. In: Sparling DW, Linder G, Bishop, CA. (Eds.). Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 904.
- Hayes T, Case P, Chui S, Chung D, Haefele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tui M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption and amphibian declines: Are we underestimating the impact? Environ Health Perspect. 114:40–50.
- Herkovits J, Herkovits FD, Perez-Coll CS. 1997. Identification of aluminium toxicity and Al Zn interaction in amphibian *Bufo arenarum* embryos. Environm Sciences 5(1):57-64.
- Herkovits J, Perez-Coll CS. 1999. Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio (“Anfitox”). Ing. Sanitaria y Ambiental 42:24-30 y 43:50-55.
- Herkovits J, Perez-Coll CS, Herkovits F. 2002. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). Environ Pollut. 116:177-183.
- Herkovits J, Perez-Coll CS. 2003. AMPHITOX: A customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. “Symposium on multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations”, En “Multiple Stressor Effects in

- Relation to Declining Amphibian Populations ASTM International STP 1443, Linder GL, Crest S, Sparling D, Little EE (Eds), USA, pp 46-60.
- Herzog DC, Funderburk JE. 1986. Ecological bases for habitat management and pest cultural control. En: Kogan M (ed) Ecological theory and integrated pest management practice. Wiley, New York, pp 217–250.
- Hornsby AG, Wauchope RD, Herner AE. 1996. Pesticide properties in the environment. Springer-Verlag, New York.
- Hrelia P, Maffei F, Fimognari C, Vigagni F, Cantelli-Forti G. 1996. Cytogenetic effects of Metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutat Res.* 369(1-2):81-86.
- Hutchinson TC, Czyrska H. 1975. Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. *Verh Intern Verein Limnol.* 19:2102–2111.
- Iannacone J, Alvariano L, Mamani N. 2011. Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J Braz Soc Ecotoxicol.* 6(1):23-29.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2013. Criterios para la gestión de uso de plaguicidas con un marco de ordenamiento territorial. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/criterios-para-la-gestion-de-uso-de-plaguicidas-con-un-marco-de-ordenamiento-territorial>. Consultado: 20/01/2014.
- Isioma T, Lawrence E. 2013. Effects of endosulfan pesticide on toad. *Jpn J Vet Res.* 61:67-68.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Consultado: 20/05/2014.
- Izaguirre MF, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Peralta Soler A, Casco VH. 2000. Cypermethrin-Induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bull Environ Contam Toxicol.* 65(4):501-507.

- Izaguirre MF, Vergara MN, Casco VH. 2006. CAS role in the brain apoptosis of *Bufo arenarum* induced by cypermethrin. *Biocell* 30(2):309-320.
- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz, R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61(6):817-826.
- Johnson KE. 1970. The role of changes in cell contact behaviour in amphibian gastrulation. *J Exp Zool.* 175:391-428.
- Johnson LA, Welch B, Whitfield SM. 2013. Interactive effects of pesticide mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. *Environ Toxicol Chem.* 32(10):2379-86.
- Jones DK, Hammond JI, Relyea RA. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environ Toxicol Chem.* 28:1939-1945.
- Kang JH, Son MH, Hur SD, Hong S, Motoyama H, Fukui K, Chang YS. 2012. Deposition of organochlorine pesticides into the surface snow of East Antarctica. *Sci Total Environ.* 433:290-295.
- Khan MZ, Tabassum R, Naqvi SNH, Shah EZ, Tabassum F, Ahmad I, Fatima F, Khan MF. 2003. Effect of cypermethrin and permethrin on cholinesterase activity and protein contents in *Rana tigrina* (Amphibia). *Turk J Zool.* 27:243-246.
- Kleinschuster SJ, Moscona AA. 1972. Interactions of embryonic and fetal neural retina cells with carbohydrate binding phyto-agglutinins: cell surface changes with differentiation. *Expl Cell Res.* 70:397-410.
- Könemann H. 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19:229-238.

- Krach SW, Green A, Nicolson G, Oppenheimer S. 1974. Cell surface changes occurring during sea urchin embryonic development monitored by quantitative agglutination with plant lectins. *Expl Cell Res.* 84:191-198.
- Kungolos A, Samaras P, Sakellaropoulos GP. 1997. Evaluation of the interactive effect of chemicals on aquatic organisms, using a method based on the theory of probabilities. En: Brebbia C.A. (Ed), *Water Pollution IV, Modelling, Measuring and Prediction*, 1997, WIT Press, Southampton, UK, 107-113.
- Kungolos A, Samaras P, Kipopoulou AM, Zoumboulis A, Sakellaropoulos GP. 1999. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Sci Technol.* 40(1):357-364.
- Lavorato M, Bernabò I, Crescente A, Denoël M, Tripepi S, Brunelli E. 2013. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. *Arch Environ Contam Toxicol.* 64(2):253-62.
- Little EE, Archeski RD, Flerov BA, Kozlovskaya VI. 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol.* 19(3):380-385.
- Mann RM, Bidwell JR. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch Environ Contam Toxicol.* 36(2):193-199.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environ Pollut.* 157(11):2903-27.
- Marchase RB, Vosbeck K, Roth S. 1976. Intercellular adhesive specificity. *Biochem. Biophys. Acta* 457:385-416.
- Marino D, Ronco EA. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol.* 75(4):820-826.

- Marking LL. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. Aquatic toxicology and hazard evaluation (ASTM) American Society for Testing and Materials. F. L. y. H. Mayer, J.L.
- Marking LL. 1985. Toxicity of chemical mixtures. Fundamentals of aquatic toxicology., Rand G.M.-Petrocelli S.R. (Eds). Hemisphere Publishing, Washington D.C., USA. pp164-176
- Marking LL, Dawson VK. 1975. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals. Investigations in Fish Control, vol. 67. US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- Martin ML, Ronco AE. 2006. Effect of mixtures of pesticides used in the direct seeding technique on nontarget plant seeds. Bull Environ Contam Toxicol. 77(2):228-236.
- McClay DR, Chambers AF, Warren RW. 1977. Specificity of cell-cell interactions in sea urchin embryos. Appearance of new cell-surface determinants at gastrulation. Devl Biol. 56:343-355.
- Merletti M, Solkolne, CL, Vineis P. 1998. Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo. Epidemiología y estadística. Herramientas y enfoques. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Volumen I. Capítulo 28
- Mitchell JAK, Burgess JE, Stuetz RM. 2002. Developments in ecotoxicity testing. Rev Environ Sci Biotechnol. 1:169-198.
- Morgan MK, Scheuerman PR, Bishop CS, Pyles RA. 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. J Toxicol Environ Health. 48(2):151-168.
- Morriss GM, Solursh M. 1978. Regional differences in mesenchymal cell morphology and glycosaminoglycans in early neural-fold stage rat embryo. J Embryol Exp Morph. 46:37-52.

- Moscona AA, Moscona H. 1952. Dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat.* 86:283-301.
- Moscona AA. 1968. Cell aggregation: Properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. *Devi Biol.* 18:250-277.
- Moscona AA. 1974. Surface specification of embryonic cells: lectin receptors, cell recognition and specific cell ligands. En: *The Cell Surface in Development* (ed. Moscona AA.), New York: Wiley, p. 67.
- Naidu KA, Radhakrishnamurty R. 1988. Metalaxyl-induced bradycardia in rats: mediated by alpha-adrenoreceptors. *J Toxicol Environ Health.* 23(4):495-498.
- Naidu KA. 1989. Inhibition of monoamine oxidase by the fungicide metalaxyl. *J Toxicol Environ Health.* 27(3):395-398.
- Narahashi T. 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(1):1-26.
- NAS (National Academy of Sciences). 1983. *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process.* National Academy Press, Washington DC.
- Newman MC. 1998. *Fundamentals of Ecotoxicology.* Lewis Publisher. Boca Raton, Florida.
- Newman MC, Unger MA. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology, second ed.* Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Nosek J. 1978. Changes in the cell surface coat during the development of *Xenopus laevis* embryo; detected by lectins. *Wilhelm Roux' Arch Devl Biol.* 184:181-193.
- NRAAVC (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals). 2000. Evaluation of the new active Fludioxonil in the product Maxim 100 FS Fungicide Seed Treatment. Commonwealth of Australia, Canberra.

- Nuninger C, Watson G, Leadbitter N, Ellgehausen H. 1996. Proc Bri. Crop Prot Conf. 1:41–46.
- O'Dell DS, Tencer R, Monroy A, Brachet J. 1974. The pattern of concanavalin A-binding sites during the early development of *Xenopus laevis*. Cell Differ. 3:193-198.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). 2011. Stockholm convention on persistent organic pollutants. Adoption of an Amendment to Annex A. United Nations.
- Ortiz-Santaliestra ME, Fernández-Benítez MJ, Marco A, Lizana M. 2010. Influence of ammonium nitrate on larval anti-predatory responses of two amphibian species. Aquat Toxicol. 99(2):198-204.
- Orton F, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens. Environ Health Perspect. 119(6):794–800.
- Paolini M, Mesirca R, Pozzetti L, Sapone A, Cantelli-Forti G. 1996. Biomarkers of effect in evaluating metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. Mutat Res. 361(2):157-164.
- Papale S. 2003. Plaguicidas ¿Venenos útiles?. Disponible en: [http://www.ecoportat.net/Temas\\_Especiales/Biodiversidad/Plaguicidas\\_Venenos\\_utiles](http://www.ecoportat.net/Temas_Especiales/Biodiversidad/Plaguicidas_Venenos_utiles). Consultado: 20/01/2014.
- Paulov S. 1990. Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on the model amphibians (*Rana temporaria*). Biologia (Bratislava) 45:133-139.
- Pérez-Coll CS, Herkovits J. 2006. Synergistic effects of copper and butylic ester of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Esternon Ultra) on amphibian embryos. Int J Environ Res Public Health. 3(4):343-347.

- Pisanó A. 1956. Efficienza funzionale e struttura dell' ipofisi di anfibio. Arch Zool Ital. 42:221-227.
- Pisanó A. 1977. Tópicos de embriología. Buenos Aires: FECC editores.
- Poletta GL, Kleinsorge E, Paonessa A, Mudry MD, Larriera A, Siroski PA. 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in Caiman latirostris exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. Ecotoxicol Environ Saf. 74(4):852-859.
- Pough FH, Kamel S. 1984. Post-metamorphic change in activity metabolism of anurans. Oecologia 65:38-144.
- Ra JS, Lee BL, Chang, NI, Kim, SD. 2006. Estimating the combined toxicity by two-step prediction model on the complicated chemical mixtures from the wastewater treatment plant effluents. Environ Toxicol Chem. 25:2107-2113.
- Regerster KJ, Whiles MR, Lips KR. 2008. Variation in the trophic basis of production and energy flow associated with emergence of larval salamander assemblages from forest ponds. Freshwater Biol. 53:1754–1767.
- Relyea RA. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. Environ Toxicol Chem. 23(7):1737-1742.
- Relyea RA, Schoppner NM, Hoverman JT. 2005. Pesticides and amphibians: The importance of community context. Ecol Appl. 15:1125–1134.
- Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. Oecologia 159(2):363-376.
- Richards SM, Cole SE. 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. Ecotoxicology 15(8): 647-656.

- Robinson KW. 2004. Water quality in the New England coastal basins, Maine, New Hampshire, Massachusetts, and Rhode Island, 1999-2001. Geological Survey (U.S.). U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.
- Ruedel H. 1997. Volatilization of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 35:143-152.
- Saha S, Kaviraj A. 2008. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 80:49–52
- Sangchan W, Bannwarth M, Ingwersen J, Hugenschmidt C, Schwadorf K, Thavornyutikarn P, Pansombat K, Streck T. 2013. Monitoring and risk assessment of pesticides in a tropical river of an agricultural watershed in northern Thailand. *Environ Monit Assess*. DOI: 10.1007/s10661-013-3440-8
- Scholz NL, Truelove NK, Labenia JS, Baldwin DH, Collier TK. 2006. Dose-additive inhibition of chinook salmon acetylcholinesterase activity by mixtures of organophosphate and carbamate insecticides. *Environ Toxicol Chem*. 25(5):1200-1207.
- Schuphan I, Sajko B, Ballschmiter KZ. 1972. On chemical and photochemical breakdown of the cyclodieninsecticides, aldrin, dieldrin, endosulfan and other hexachlorobicyclo-(2.2.2)-hepten-derivatives. *Z. Naturforsch.*, 276:147-156. En IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental Health Criteria 40. Endosulfan. World Health Organization. Geneva.
- Semlitsch RD. 1990. Effects of body size, sibship, and tail injury on the susceptibility of tadpoles to dragonfly predation. *Can J Zool*. 68:1027–1030.
- SENASA. 2013. Resol 511/11 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1501&ino=1501&io=17737>. Consultado: 20/01/2014.

- Shi X, Gu A, Ji G, Li Y, Di J, Jin J, Hu F, Long Y, Xia Y, Lu C, Song L, Wang S, Wang X. 2011. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere* 85(6):1010-1016.
- Shur BD. 1977a. Cell-surface glycosyltransferase in gastrulating chick embryos. I. Temporally and spatially specific patterns of four endogeneous glycosyltransferase activities. *Devi Biol.* 58:23-39.
- Shur BD. 1977b. Cell-surface glycosyltransferase in gastrulating chick embryos. II. Biochemical evidence for a surface localization of endogeneous glycosyltransferase activities. *Devi Biol.* 58:40-55.
- Siegfried BD. 1993. Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. *Environ Toxicol Chem* 12(9):1683–1689
- Smies M, Evers RH, Peijnenburg FH, Koeman JH. 1980. Environmental aspects of field trials with pyrethroids to eradicate tsetse fly in Nigeria. *Ecotoxicol Environ Saf.* 4(2):114-128.
- Sobrero MC, Rimoldi F, Ronco AE. 2007. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bull Environ Contam Toxicol.* 79(5):537-543.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171(1):3-59.
- Souza Casadinho J. 2009. La problemática del uso de plaguicidas en argentina. Modelos productivos e impacto en el ambiente. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina RAPAL. Disponible en: [http://www.rapal.org/articulos\\_files/Plaguicidas\\_Argentina.pdf](http://www.rapal.org/articulos_files/Plaguicidas_Argentina.pdf). Consultado: 20/01/2014.
- Sparling DW, Fellers GM, McConnell LL. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ Toxicol Chem.* 20(7):1591-1595.

- Sprague, JB. 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*, 4, 3.
- Sprague JB, Ramsay BA. 1965. Lethal levels of mixed copper–zinc solutions for juvenile salmon. *J Fish Res Bd Canada* 22(2):425-432.
- Steel R, Torrie J. 1993. *Bioestadística: Principios y Procedimientos* (2da ed). Mc. Graw Hill. 188-226pp.
- Steinberg MS. 1970. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool*. 173:395-434.
- Svartz GV, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2012. Sublethal effects of atrazine on embryolarval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21(4):1251-1259.
- Svartz GV, Pérez-Coll CS. 2013. Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (ANURA: BUFONIDAE). *Int J Environ and Health*. 6(4):320-329.
- Svartz GV, Hutler Wolkowicz IR, Pérezc-Coll CS. 2014. Toxicity of endosulfan on embryolarval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environ Toxicol Chem*. 33(4):875-881.
- Syngenta. 2004. Hoja de Información de Seguridad de MAXIM® XL. Disponible en: [http://www.rizobacter.com/archivos/productos\\_rizobacter/hoja\\_seguridad\\_maxim\\_xl.pdf](http://www.rizobacter.com/archivos/productos_rizobacter/hoja_seguridad_maxim_xl.pdf). Consultado: 20/01/2014
- Tammes PML. 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Neth J Plant Path*. 70(3):73-80.
- Teng Y, Manavalan TT, Hu C, Medjakovic S, Jungbauer A, Klinge CM. 2013. Endocrine disruptors fludioxonil and fenhexamid stimulate miR-21 expression in breast cancer cells. *Toxicol Sci*. 131(1):71-83.

- Tickle C, Goodman M, Wolpert L. 1978. Cell contacts and sorting out in vitro: the behaviour of some embryonic tissues implanted into the developing chick wing. *J Embryol Exp Morph.* 48:225-238.
- Tombesi N, Pozo K, Harner, T. 2014. Persistent Organic Pollutants (POPs) in the atmosphere of agricultural and urban areas in the Province of Buenos Aires in Argentina using PUF disk passive air samplers. *Atmospheric Pollution Research* 5:170–17.
- Townes PL, Holtfreter J. 1955. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool.* 128:53-120.
- Tripathi PK, Singh A. 2004. Toxic effects of cypermethrin and alphamethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 58(2):227-235.
- UNEP/POPS/POPRC.5/10/Add.2 2009. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its fifth meeting: Risk profile on endosulfan. Disponible en: [http://www.meti.go.jp/committee/summary/0004475/pdf/127\\_01\\_01\\_02.pdf](http://www.meti.go.jp/committee/summary/0004475/pdf/127_01_01_02.pdf). Consultado: 20/01/2014
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1988. Users Guide for a Computer Program for PROBIT Analysis of Data from Acute and Short-Term Chronic Toxicity Test with Aquatic Organisms. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support, Laboratory, Cincinnati, OH, USA.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1991. Technical support document for water quality-based toxic control. EPA 505-2-90-001. Washington, DC: Environmental Protection Agency.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1992. Framework for Ecological Risk Assessment. Washington, D.C. Risk Assessment Forum. EPA/630/R-92/001.90/027F.

- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. US Environmental Protection Agency 4th Ed. EPA/600/4.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1998. Guidelines for ecological risk assessment. Ecological Risk Assessment Step 2. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC. Disponible en: <http://www.epa.gov/R5Super/ecology/html/erasteps/erastep2.html>.
- Vaalavirta L, Tahti H. 1995. Astrocyte membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> (+)-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase as targets of organic solvent impact. *Life Sci.* 57:2223–2230.
- Verdisson S, Couderchet M, Vernet G. 2001. Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. *Chemosphere* 44(3):467-474.
- Verma SR, Rani S, Bansai SK, Dalela RC. 1980. Effects of the pesticides thiothox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus*. *Water Air Soil Poll.* 13: 229-234.
- Villamil Lepori EC, Bovi Mitre G, Nassetta M. 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Rev Int Contam Ambie* 29:25-43.
- Wang ZH, Nie XP, Yue WJ, Li X. 2012. Physiological responses of three marine microalgae exposed to cypermethrin. *Environ Toxicol.* 27(10):563-572.
- Welsh HHJ, Ollivier LM. 1998. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's redwoods. *Ecol Appl.* 8:1118-1132.
- Wesseling C, Corriols M, Bravo V. 2005. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicol Appl Pharm.* 207:S697–S705.
- WHO (World Health Organization). 1989. Environmental Health Criteria 82: Cypermethrin. World Health Organization. Geneva, Switzerland. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm>. Consultado: 20/01/2014.

- 
- WHO (World Health Organization). 2000. Poisons Information Monograph 576. Chemical: Endosulfan. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva, Switzerland.
- Wong CK, Pak AP. 2004. Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. Bull Environ Contam Toxicol. 73:190-196.
- Xu P, Diao J, Liu D, Zhou Z. 2011. Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of metalaxyl in earthworm *Eisenia foetida*. Chemosphere 83(8):1074-1079
- Yao K, Zhu L, Duan Z, Chen Z, Li Y, Zhu X. 2009. Comparison of R-metalaxyl and rac-metalaxyl in acute, chronic, and sublethal effect on aquatic organisms: *Daphnia magna*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Danio rerio*. Environ Toxicol. 24(2):148-56.
- Zhang L, Dickhut R, Demaster D, Pohl K, Lohmann R. 2013. Organochlorine pollutants in Western antarctic peninsula sediments and benthic deposit feeders. Environ Sci Technol. 47(11):5643-5651.
- Zhou X, Okamura H, Nagata S. 2008. Remarkable synergistic effects in antifouling chemicals against *Vibrio fisheri* in a bioluminescent assay. J Health Sci. 52:243-251.