



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Biomonitoreo del impacto de plaguicidas usados en cultivos extensivos sobre anuros adultos de la región pampeana

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

María Jimena Damonte

Directora: Dra. Celine Marie Julie Brodeur

Consejera de estudios: Dra. Laura López

Lugar de trabajo: Instituto de Recursos Biológicos – CNIA – INTA

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 05/07/19

Biomonitoreo del impacto de plaguicidas usados en cultivos extensivos sobre anuros adultos de la región pampeana

RESUMEN

Los efectos directos e indirectos de la exposición a plaguicidas usados en cultivos extensivos fueron evaluados en tres especies de anuros adultos (*Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus latinasus* y *Boana pulchella*) de la región pampeana de Argentina. Los efectos indirectos fueron determinados caracterizando la disponibilidad y el consumo de alimentos, mientras que la determinación de biomarcadores, condición corporal e índices somáticos sirvió para evaluar efectos directos. Los parámetros analizados fueron comparados entre sitios con alta intensificación agrícola y un sitio de referencia localizado en un área geográfica protegida; antes y después de la aplicación de plaguicidas; y entre individuos con y sin presencia de plaguicidas en sus órganos. Los resultados mostraron que más del 40% de los ejemplares analizados presentaron residuos de plaguicidas en sus órganos. La presencia de plaguicidas en los órganos de los anfibios adultos se correlacionó con un menor consumo de alimento, menor condición corporal y alteraciones en biomarcadores en dos de las tres especies evaluadas. Este estudio demuestra que los anuros adultos están expuestos y acumulan plaguicidas en sus órganos generando efectos negativos directos e indirectos que podría afectar la salud de las especies expuestas en particular, y la de la biota en general.

Palabras Claves: anuros adultos, agroecosistemas, plaguicidas, efectos directos, efectos indirectos

Biomonitoring the impacts of pesticides used in extensive crops on adult anurans of the Pampa Region

ABSTRACT

Direct and indirect effects of pesticides used in extensive crops were evaluated in three adult anuran species (*Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus latinasus* and *Boana pulchella*) from the Pampean region of Argentina. Indirect effects were evaluated based on food availability and consumption, whereas biomarkers, body condition and somatic indices were determined to evaluate direct effects. Determined parameters were compared within an agricultural intensification gradient and with a reference site located in a protected area; before and after the application of pesticides; and between individuals with and without the presence of pesticides in their tissues. More than 40% of the frogs evaluated presented pesticide residues in their tissues. Pesticide presence in frogs was related to lower food consumption, lower body condition and biomarkers alterations in two of the three evaluated species. This study shows that anurans living in are exposed and accumulate pesticides in their tissues leading to direct and indirect negative effects that may impair their health.

Keywords: adult anurans, agroecosystems, pesticides, direct effects, indirect effects

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Buenos Aires**, que por ser **pública** me permitió estudiar la Licenciatura y luego completar mis estudios de Postgrado de forma gratuita.

Al **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)** por haberme dado la posibilidad de trabajar en lo que me gusta, acunándome como investigadora de la institución y brindándome el apoyo financiero para realizar las diferentes etapas de esta tesis.

Todo mi agradecimiento a mi directora **Julie Brodeur**, por ser la impulsora de este proyecto y por enseñarme con muuuucha paciencia día a día a aprender. No solo la considero una gran mentora sino una bella persona. Gracias totales Julie!!!

A **Laura López**, mi consejera de estudios que me aconsejó y guió cuando la necesite.

A los chicos de INTA Pergamino: **Fabio, Adrián y Diego**, que me ayudaron a buscar los sitios y los contactos con los productores.

A todos los productores que dejaron que ingresemos a sus campos a muestrear y especialmente a **Fabián Magariños** por su hospitalidad.

Un agradecimiento muy especial a mis acompañantes en las campañas, **Julie, Poli y Flor**, hicieron muy divertida la aventura de muestrear. Por más trabajos en conjunto!

A los chicos del Instituto de Alimentos: **Diego** por prestarme los equipos y los estándares para medir los plaguicidas y en especial a **Dante** que me ayudó a pesar de las adversidades, de los equipos rotos, de la falta de señal en las muestras. No sólo no se dio por vencido, sino que siguió hasta el cansancio pasando las muestras, guiándome y enseñándome a identificar los compuestos.

Qué decir de mis compañeros de área, **Poli, Brenda, Juan, Lau M., Dani G., Yani, Lau S., Juli, Romi, Andro, Grego, Flor y Dani F.**, toda la buena onda que brindan es infinita, no me imagino la vida laboral y la vida personal sin uds. Son lo más!!

A **Brenda** por ayudarme a pasar planillas y más planillas, y hacer de momentos triviales un descostilleo de risas. A **Juan** por su constancia y dedicación en la identificación de artrópodos. A **Poli** por sus mates, sus críticas siempre constructivas, su compañía, y lo más importante su amistad.

A mis amigos de la facultad, **Juaju, Ana, Vir, Mari, Anabella, Javi, Fer, Flaco, Martín, Nico, Mario, Caro y Trini**, que aunque hace mucho que no nos vemos, hicieron que mis días de estudiante sean inolvidables y que hoy me cueste entrar a la facu en especial a la biblioteca si uds no están.

A mi amiga del alma, **Carmen**, que nos acompañamos desde tan solo una vida.

A mi INMENSA familia, no sólo por el número de integrantes sino por el gran corazón que tienen todos. En especial, mis padres, **Doli y Andrés**, que siempre me acompañaron y sintieron orgullo sin a veces entender de qué se trataba lo que estaba haciendo. A los lolos, **Walter, Doli y Stella** por ayudarme siempre y en este último tiempo más en los quehaceres cotidianos de la crianza de sus nietos. A mis hermanos, **Adri, Fabi y Juampa**, por apoyarme siempre y por darme los mejores sobrinos, **Zequi, Joaco, Nacho, Jero, Yami y Guada**. A mis cuñados, **Juan, Celi, Meri, Flopi y Fede** por estar en todos los momentos de mi vida.

A los amores de mi vida, **Gabriel, Victoria y Valentín** por esos “abrazos de la pasión” reparadores en los momentos de agobio. Por enseñarme que el fin de amar es sentirse más vivo!! Los amo fuerte!!!

“Para el que mira sin ver, la tierra es tierra nomas.

Nada le dice la pampa, el arroyo, el sauzal”

Atahualpa Yupanqui

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1.1 Hipótesis y predicciones.....	24
1.2 Objetivos.....	25
2. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE PLAGUICIDAS EN CULTIVOS DE SOJA SOBRE TRES ESPECIES DE ANFIBIOS ANUROS.....	26
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y métodos.....	30
2.3 Resultados.....	48
2.4 Discusión	82
3. OPTIMIZACIÓN DEL USO DE TRAMPAS DE CAÍDAS DE ARTRÓPODOS PARA EVALUAR LA DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO PARA ANUROS	87
3.1 Introducción.....	88
3.2 Materiales y métodos.....	89
3.3 Resultados.....	94
3.4 Discusión	100
3.5 Conclusiones.....	101
4. DETECCIONES DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ÓRGANOS DE ANUROS Y SU RELACIÓN CON ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y ENERGÉTICAS.....	102
4.1 Introducción.....	103
4.2 Materiales y métodos.....	104
4.3 Resultados.....	122
4.4 Discusión	158
5. DISCUSIÓN GENERAL	163
BIBLIOGRAFÍA	171

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Pérdida de biodiversidad y declinación de los anfibios

En la actualidad, la pérdida de biodiversidad se encuentra aproximadamente mil veces por encima del nivel base estimado a partir de los registros fósiles (Barnosky et al., 2011; Williams et al., 2015). Según la lista roja de especies amenazadas confeccionada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), los anfibios representan el grupo de vertebrados más amenazados a nivel mundial con 32% de las especies en peligro de extinción y 43% en situación de declive (Stuart et al., 2004). Asimismo, se estableció que la tasa actual de extinción de los anfibios es 200 veces más alta que la tasa histórica (Roelants et al., 2007). Un estudio reciente realizado en Norte América encontró que las poblaciones de anfibios disminuyen en promedio casi un 4% anual, lo cual significa que en 19 años las poblaciones de esa región del planeta se habrán reducido en un 50% (Grant et al., 2016). Respecto a las posibles causas de la desaparición de los anfibios, se han encontrado evidencias sobre la interacción de algunos factores tales como la pérdida o modificación del hábitat, asociados con otros componentes como las enfermedades, el cambio climático y la contaminación ambiental (Blaustein & Kiesecker, 2002; Collins & Storfer, 2003; Stuart et al., 2004; Sodhi, 2008; Hayes et al., 2010). Asimismo, Grant et al., (2016) identificaron cuatro causas principales que se relacionan con la declinación de las poblaciones de anfibios, siendo las amenazas más frecuentes la pérdida de hábitat y la sequía y las más peligrosas, las enfermedades y la contaminación por plaguicidas; dos factores que varían localmente y llevan a declinaciones poblacionales a nivel regional y la consecuente pérdida de diversidad biológica.

Estudios basados en experimentos de laboratorio y mesocosmos, mostraron que la contaminación por plaguicidas puede afectar los estadios embrionarios y larvales (Mann et al., 2009; Piha, 2006). Por ejemplo, a través de la disrupción endocrina en el caso atrazina (Hayes et al., 2003; Brodeur et al., 2013) o el incremento de la mortalidad de juveniles en ambientes conteniendo glifosato (Relyea, 2005). Además, se evidenció a través de estudios de campo realizados principalmente en los Estados Unidos y Canadá, que los plaguicidas pueden alterar varios aspectos de la fisiología y del comportamiento de los anfibios adultos. Las principales alteraciones encontradas incluyen: anomalías gonadales (Hayes et al., 2003; McDaniel et al., 2008; McCoy et al., 2008, Papoulias et al., 2013), supresión del sistema inmunológico y disminución de la resistencia a parásitos y patógenos (Rohr et al., 2008; Marcogliese et al., 2009,) alteración del metabolismo de los retinoides (Berubé et al., 2005; Boily et al., 2009),

alteración de la elección del sitio de oviposición (Vonesh y Buck, 2007) y por último, reducción de la edad media de la población y disminución del peso y tamaño de los adultos (Berubé et al., 2005; Spear et al., 2009). Particularmente para Argentina, se ha encontrado que ciertos plaguicidas tales como los carbamatos y los organofosforados pueden inducir una disminución de la actividad enzimática en las colinesterasas (Lajmanovich et al., 2004; Lajmanovich et al., 2015) y más recientemente se ha reportado la disminución de la condición corporal y alteraciones enzimáticas (Brodeur et al., 2011).

A pesar del uso extenso de los agroquímicos en la agricultura moderna y de su posible rol en el declive de las poblaciones de anfibios, se conoce relativamente poco respecto a la toxicidad y el efecto de los plaguicidas sobre este grupo de animales. Efectivamente, la cantidad de estudios de toxicidad realizados en anfibios a nivel internacional ha sido históricamente inferior a los realizados en otros organismos acuáticos (Mann et al., 2009). Asimismo, tanto en Argentina como en el resto del mundo, la mayoría de la información disponible respecto al impacto de los agroquímicos sobre las poblaciones de anfibios se origina principalmente a través de bioensayos de toxicidad, tanto agudos como crónicos, y especialmente empleando estadios larvales (Hayes et al., 2010). Sin embargo, no se logrará comprender el impacto de los plaguicidas sobre las poblaciones de anfibios hasta que no se conozca su efecto en los estadios adultos responsables de la reproducción y de la incorporación de juveniles a la población (Hayes et al., 2010). Considerando la importancia de la agricultura en la economía argentina, las amplias extensiones rurales y sabiendo que el principal periodo de aplicación de plaguicidas en la región pampeana generalmente coincide con el periodo reproductivo de los anfibios (Lorenzatti et al., 2004, Peltzer et al., 2007), resulta claro que el análisis de la situación de las especies locales de anfibios es fundamental para cualquier estrategia de preservación de la biodiversidad biológica.

Intensificación agrícola y evolución del área sembrada en la región pampeana

En el último siglo, la expansión e intensificación de la agricultura han sido el motor principal del desmonte de grandes extensiones de bosques y arbustales. Las tierras para uso agrícola se han convertido en uno de los biomas más importantes en términos de su extensión, ocupando más del 40% de la superficie terrestre (Foley et al., 2005). Con el inicio de la Revolución Verde, las prácticas agrícolas se volvieron cada vez más dependientes de las tecnologías modernas. Como ejemplo podemos mencionar

que el control de los cultivos se viene realizando mediante la introducción de diversas modificaciones genéticas al igual que el uso de fertilizantes tanto orgánicos como inorgánicos. Por otra parte, el control de plagas asociadas a los mismos (malezas, insectos y patógenos) emplea diferentes tipos de plaguicidas químicos y biológicos, (Tilman, 1999; Bindraban et al., 2009). Estas prácticas generalmente asociadas a una simplificación y perturbación de los ambientes agrícolas conlleva a una contaminación ambiental a través, por ejemplo, de la eutrofización o contaminación por plaguicidas de los sistemas acuáticos o la emisión de gases de efecto invernadero (Carpenter et al., 1998; Foley et al., 2005; Tilman et al., 2002).

En la República Argentina, el área sembrada se duplicó de 14 a 33 millones de hectáreas en los últimos 40 años, mientras que la producción de trigo, maíz, girasol, soja y sorgo aumentó sustancialmente de 21 a 115 millones de toneladas (SIIA, 2017). El cambio de la actividad agrícola vivido por la Argentina no fue el mismo para todos los cultivos, sino que se concentró en la productividad de la soja, ya que fue el primer cultivo genéticamente modificado (GM) tolerante al glifosato introducido en Argentina. Se aprobó su uso en 1996 y desde ese momento el área sembrada con cultivos GM ha crecido en forma sostenida. Según un informe del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), a fines de los '90, la siembra de soja alcanzaba los 9 millones de hectáreas, con una producción de 20,2 millones de toneladas. Al 2012 el área sembrada se había duplicado y la producción alcanzaba los 49,3 millones de toneladas (INTA 2015). Este aumento en la producción de granos de soja se debió no sólo a una mayor área sembrada sino, también, a más altos rendimientos por hectárea, logrados mediante el uso de plaguicidas y fertilizantes (Satorre, 2005; INTA 2015). Hoy en día, la Argentina, es el tercer productor mundial de este tipo de cultivo, después de Estados Unidos y Brasil (www.argenbio.org, INTA 2015).

La actividad agrícola en la provincia de Buenos Aires al igual que el resto del país viene experimentando un crecimiento importante. La introducción de tecnología de punta, junto con un contexto internacional favorable marcado por un fuerte aumento de los precios (especialmente de la soja), favorecieron la expansión de la actividad agropecuaria que generó un aumento del área sembrada de 41,3% entre 2003 y 2012. Concretamente, la superficie destinada al sector agrícola en la provincia de Buenos Aires pasó de 9,1 millones de hectáreas de superficie sembrada durante la campaña 2003/04 a 12,9 millones durante el ciclo 2012/13. El 80% de la superficie cultivada se destina a la implantación de cuatro cultivos: trigo, maíz, soja y girasol (Ministerio de

Economía, 2013). No obstante, y tal como sucede a nivel nacional, la estructura agraria se encuentra cada vez más concentrada en torno a la actividad sojera (**Fig. 1**). Si bien se trata de un fenómeno de larga data, tendió a intensificarse durante la última década (Ministerio de Economía, 2013). Concretamente, la superficie destinada a este cultivo pasó de 3,2 millones de hectáreas en 2003 a 6,7 millones en 2012, lo que equivale a un crecimiento de 110%. El área destinada a la soja, representa más del 50% de la superficie cultivable de la provincia. El avance del cultivo de soja tuvo como contrapartida la reducción del área destinada a otros cultivos históricamente más tradicionales como el trigo y el girasol. Así, y pese a la expansión de la frontera agrícola provincial, la superficie sembrada con trigo se contrajo 60,7% entre 2003 y 2012 mientras que la de girasol registró una disminución del 28,6%. Actualmente, el trigo y el girasol concentran el 9,6% y el 5,4% de la superficie cultivable de la provincia de Buenos Aires, respectivamente (Ministerio de Economía, 2013).

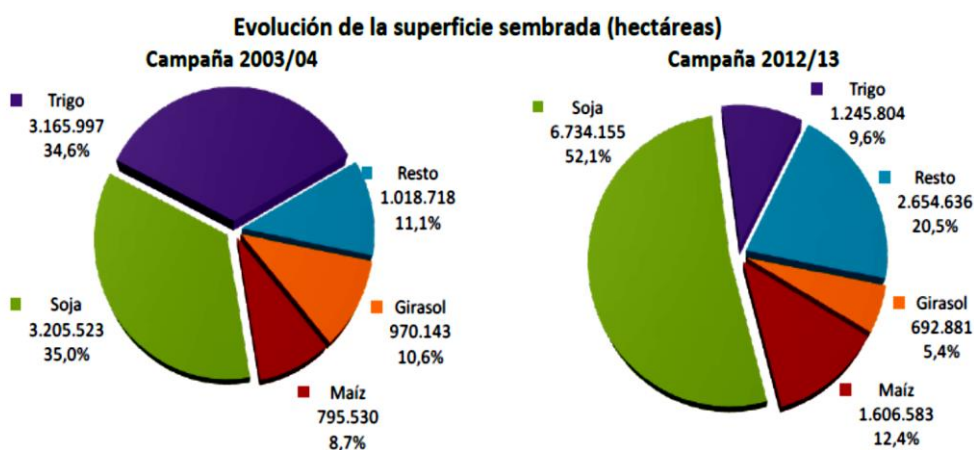


Figura 1. Superficie cultivada en la provincia de Buenos Aires. Fuente: Panorama productivo de la provincia de Buenos Aires, Ministerio de Economía, 2013

Plaguicidas utilizados en cultivos extensivos de la región pampeana y evidencias de contaminación ambiental

Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), en 2012 se utilizaron 186 millones de kg de plaguicidas en Argentina, de los cuales el 75% fueron herbicidas, cuyo principio activo más usado fue el glifosato (CASAFE, 2012). El glifosato es un herbicida ampliamente utilizado en el mundo en la producción de cultivos de soja, maíz y algodón que han sido genéticamente modificados (GM) para ser tolerantes a este herbicida (Bonny, 2008). La extensa siembra de cultivos GM ha producido un amplio incremento del uso de glifosato en la Argentina, de 26 a 252

millones de kilogramos/litros entre 1993 y 2011 (CASAFE, 2012). Durante la campaña 2010/2011, junto al uso incremental de glifosato, se incrementaron el uso de otros herbicidas como metsulfuron, 2-4 D, acetoclor, atrazina, y clorimuron (RETAA, 2013). Asimismo, los fungicidas carbendazim y tebuconazol fueron los más utilizados en la zona núcleo pampeana. Con respecto a los insecticidas, se usaron principalmente clorpirifos y cipermetrina, además de otros insecticidas piretroides y reguladores de crecimiento como el metoxifenocida (RETAA, 2013). Mientras que es muy discutido el uso intensivo de glifosato en cultivos GM, es menos mencionado que estos cultivos reciben, además aplicaciones de insecticidas, fungicidas y otros herbicidas distintos al glifosato. Por otra parte, es bien conocido que estos agroquímicos pueden ser aplicados individual o más comúnmente de manera combinada en forma de mezclas que pueden ser binarias o ternarias (Rennella & Quirós, 2000; Perez Leiva y Anastasio, 2003; Bindraban et al., 2009). En la **Tabla 1**, se muestran los productos más utilizados durante la campaña 2010-11 a nivel país para los cuatro cultivos principales.

Tabla 1. Plaguicidas más utilizados a nivel país para los principales cultivos. Fuente: RETAA 2010-11

HERBICIDAS	Soja	Trigo	Maíz	Girasol
Glifosato (48%)	X	X	X	X
Glifosato concentrado (>62%)	X	X	X	X
2,4-D	X	X	X	X
Dicamba	X	X	X	X
Metsulfuron		X	X	
Clorimuron	X			
Imazetapir	X			
Acetoclor			X	X
Atrazina			X	
Flurocloridona				X
Herbicida Organoclorados			X	X
INSECTICIDAS				
Cipermetrina	X	X	X	X
Clorpirifos	X	X	X	X
Piretroides	X	X	X	X
Reguladores del crecimiento	X		X	X
Imidacloprid		X		
FUNGICIDAS				

Tabla 1. Continuación

Carbendazim	X		X	X
Tebuconazole		X		
Strobilurinas+Triazoles	X	X	X	X

Es ampliamente conocido que los plaguicidas pueden constituir una fuente de contaminación grave en las zonas donde se emplean durante tiempos más o menos prolongados. No son estáticos, por lo que su movilidad puede darse tanto a través del aire como del, suelo y agua. El escurrimiento superficial, el drenaje hacia las aguas subterráneas y la deriva durante el proceso de pulverización son las principales vías de contaminación difusa por las cuales los agroquímicos llegan a los cuerpos de aguas naturales o artificiales. Los agroquímicos que alcanzan los suelos pueden ser escurridos hacia los cuerpos de agua superficial luego de irrigaciones o lluvias (Schäfer et al., 2011) o permanecer en el lugar por mucho más tiempo (Castro Jimenez, 2002). El resultado del transporte y de la distribución de los plaguicidas es la presencia de niveles detectables de agroquímicos en las aguas superficiales que, al encontrarse disponibles, pueden interactuar con los componentes bióticos y abióticos del ecosistema (Suarez et al., 2013). En Argentina, en distintos sitios de la región pampeana, se detectó la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas al igual que en sedimentos, suelos y en agua de lluvia (Peruzzo et al., 2008, Aparicio et al., 2013; Bonansea et al., 2013; De Gerónimo et al., 2014; Lupi et al., 2015; Caprile et al., 2016; Hunt et al., 2016; Ronco et al., 2016; Etchegoyen et al., 2017; Pérez et al., 2017; Primost et al., 2017; Castro Berman et al., 2018, Alonso et al., 2018; Milesi Delaye et al., 2018).

Impactos de la contaminación sobre los organismos no blanco: efectos directos vs efectos indirectos

Es difícil predecir el impacto que los agroquímicos pueden tener sobre la biodiversidad simplemente midiendo las concentraciones del producto en el ambiente o por medio de ensayos de exposición realizados con una especie en el laboratorio. Varios factores ambientales influyen en la biodisponibilidad de los plaguicidas y así regulan su capacidad de producir algún efecto nocivo sobre los organismos no-blanco. Entre estos factores pueden mencionarse, las fluctuaciones en la temperatura, las interacciones con otras moléculas químicas en el ambiente, el tipo de suelo y sedimento, las precipitaciones, el pH y la salinidad, entre otros. Aún más complejo es el problema

cuando existen mezclas de contaminantes en el ambiente (De March, 1987; Letcher et al., 2010).

Dado el carácter integrado de los procesos de acumulación de reservas energéticas, crecimiento y reproducción existen varias maneras a través de las cuales estos pueden ser alterados por la presencia de contaminantes, estas sean directas (alteración de procesos bioquímicos y/o fisiológicos) o indirectas (disponibilidad de alimento o hábitat). En todos los organismos, la energía asimilada a través de la alimentación es utilizada con dos finalidades, el mantenimiento y la producción (Congdon et al., 1982; McNab, 2002). El mantenimiento representa los gastos energéticos esenciales para la vida e incluyen: energía mínima para el funcionamiento del organismo, forrajeo y desplazamientos obligatorios y energía necesaria para la digestión, absorción y transformación de los alimentos. Por su parte, dentro de los gastos energéticos de producción se incluye la formación de tejidos, ya sea para el crecimiento, la acumulación de reservas energéticas o para la reproducción (Congdon et al., 1982). Ante un factor de estrés ambiental, el crecimiento y la reproducción pueden ser detenidos temporalmente sin poner en riesgo la supervivencia de la especie. Los organismos normalmente dan prioridad a los gastos de mantenimiento en momentos de recursos energéticos limitados (McNab, 2002). Tales redistribuciones de los recursos energéticos desde las funciones de producción (crecimiento y reproducción) hacia el mantenimiento de las funciones básicas han sido descritas en diferentes tipos de organismos expuestos a contaminantes ambientales y representan el “costo energético de la exposición a contaminantes” (Brodeur et al., 2001; Durant et al., 2007). La elevación del metabolismo basal observado en estos casos se debe generalmente a la activación de procesos fisiológicos asociados a la excreción de los xenobióticos y la reparación del daño generado (Koehn & Bayne, 1989).

Los plaguicidas, al igual que cualquier otro contaminante ambiental pueden tener efectos tanto directos como indirectos sobre los organismos no blanco. Los efectos indirectos consisten en restricciones que sufre un organismo en relación al impacto que genera el contaminante sobre su entorno, por ejemplo una reducción en la disponibilidad del alimento o del hábitat. En contraposición, los efectos directos de los contaminantes sobre los organismos son aquellos que la sustancia química ejerce directamente sobre los procesos fisiológicos o bioquímicos (**Fig. 2**).

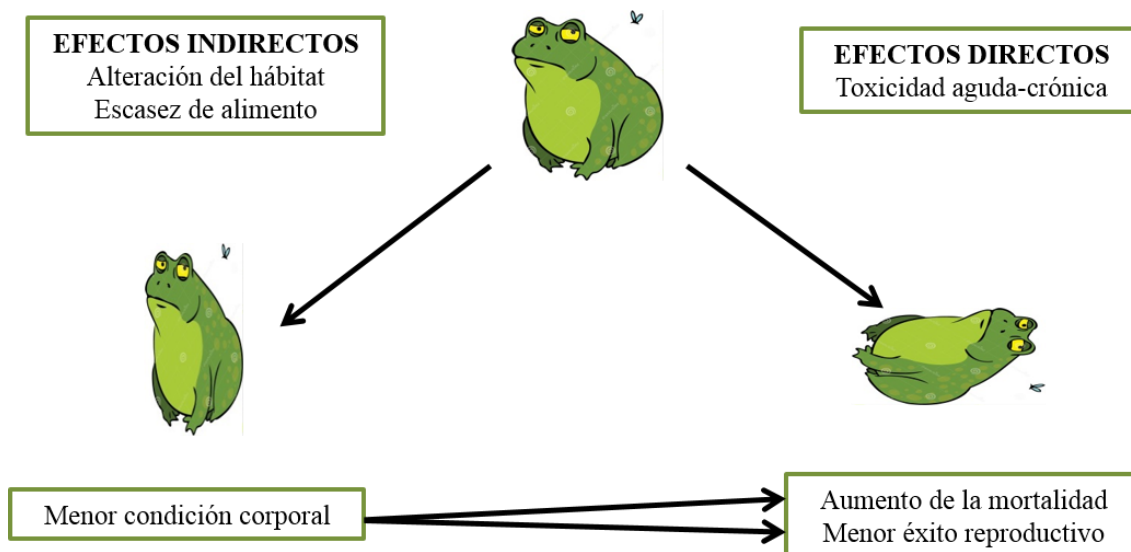


Figura 2. Efectos de los plaguicidas sobre los anuros en ambientes agrícolas

Algunas sustancias ejercen un efecto indirecto a través de su impacto en la cadena trófica (Ortiz-Santaliestra y Egea-Serrano, 2013) (Fig. 3). Por ejemplo, la aplicación de herbicidas produce alteraciones severas en el hábitat al eliminar la vegetación natural, que termina por modificar completamente las condiciones del ecosistema (Sotherton 1982). Se eliminan plantas que se utilizan como hábitat o como fuente de alimento para los insectos, los cuales, a su vez, son alimento para los anfibios (Moreby 1997). De un modo similar, los insecticidas también generan efectos indirectos para los anfibios ya que disminuyen la diversidad de invertebrados. En general, los efectos indirectos de los plaguicidas, ya sea mediante la alteración del hábitat o la reducción de alimento disponible (artrópodos terrestres, etc.) son más importantes a nivel ecológico que la toxicidad directa sobre los individuos (Relyea, 2005). Existen evidencias de la reducción de la biodiversidad de especies de mamíferos o aves como consecuencia de la pérdida de recursos tróficos en medios tratados con plaguicidas (Sotherton, 1998, Wilson et al., 1999).

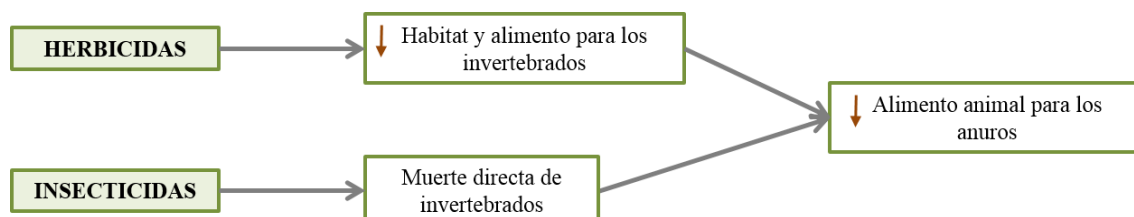


Figura 3. Efectos indirectos de los plaguicidas sobre los anfibios

Por su parte, los efectos directos de los plaguicidas son el resultado de su acción directa sobre la bioquímica y la fisiología del organismo. Los efectos observados dependerán principalmente de la concentración de los plaguicidas en el ambiente (relación dosis-respuesta), del tiempo de exposición, de la biomagnificación, de la densidad poblacional y de la propia historia de la comunidad que en última instancia, influyen en la presencia y en la magnitud de los efectos adversos observados (Schäfer, 2011). Si bien la mortalidad es el efecto directo más extremo observado, los agroquímicos pueden tener una variedad de efectos subletales en los distintos tejidos, órganos o sistemas del organismo. Estos efectos a nivel de sub-organismo pueden derivar en efectos a nivel de individuo como alteraciones en la morfología, el crecimiento, la reproducción, el comportamiento y la susceptibilidad a infecciones (Safe, 2004). Si el efecto es aún más severo, se propagará a toda la población generando cambios en la estructura poblacional o en las tasas de crecimiento y mortalidad. Finalmente, si el contaminante persiste generando daños mayores, una población particular pueden extinguirse liberando nichos ecológicos que podrán ser ocupados por otras especies, por lo que se observarán modificaciones significativas en la estructura de la comunidad y del ecosistema (Schäfer, 2011).

Sin embargo, estas complejidades pueden analizarse mediante un monitoreo biológico que consiste en estudiar parámetros de las poblaciones naturales de organismos expuestos a niveles reales de agroquímicos alcanzados en un sitio determinado y durante un período de tiempo establecido para detectar y predecir el impacto ecotoxicológico sobre los mismos (Van der Oost et al., 2003).

Biomonitoreo, bioindicadores y biomarcadores

El monitoreo biológico se focaliza en especies bioindicadoras o centinelas. Un bioindicador o centinela es una especie o un conjunto de especies cuya abundancia o salud reflejan las variaciones en el nivel de contaminación del medio en que se desarrollan (Paoletti, 1999; Conti y Cecchetti, 2001). Existen criterios para seleccionar especies indicadoras tales como el poseer una historia de vida bien conocida, utilizar con preferencia un tipo de ecosistema dentro del paisaje, ser fácilmente capturable e identificable, que sus poblaciones fluctúen poco en presencia de estrés antropogénico, que sean sensibles a los cambios antropogénicos en el ambiente, que sean sensibles a la mayor cantidad de tóxicos que puedan existir en el ambiente y que sean importantes para el funcionamiento del ecosistema (Suarez et al., 2013).

Un componente esencial de los monitoreos biológicos es el uso de biomarcadores. Un biomarcador es una respuesta biológica temprana ante la exposición a un xenobiótico a nivel individual que muestra una desviación desde el estado normal. Las mediciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y de comportamiento se consideran biomarcadores que pueden ser utilizados en la evaluación de la exposición o de los efectos de factores estresantes (Sparling et al., 2010; Roméo & Giambérini, 2013; Walker, 2014). El concepto de biomarcador se basa en el hecho que un contaminante debe primero interactuar con las biomoléculas y ejercer una respuesta a nivel bioquímico antes de poder producir un efecto mensurable a un nivel de organización biológico mayor. La ventaja de la evaluación bioquímica y de los parámetros fisiológicos en organismos expuestos a los contaminantes es que las variaciones que se producen pueden ser relacionadas por la influencia de factores estresantes y se utilizan como un alerta temprana de los efectos sobre la población (Sibley & Hanson, 2011). También se pueden comparar los valores de biomarcadores de una población de referencia por ejemplo de un sitio control con otras poblaciones expuestas a posibles contaminantes y así analizar el estado general de salud de los organismos (Brodeur et al., 2009; Linder et al., 2010; Brodeur et al., 2012; Brodeur et al., 2017). Las alteraciones generadas a nivel molecular y bioquímico ocurren más rápidamente y son más específicas y sensibles que las alteraciones que se pueden llegar a observar en niveles de organización superior (Hagger et al., 2006; Sarkar et al., 2006).

Los biomarcadores se clasifican en dos grupos: los biomarcadores de exposición y los biomarcadores de efecto. Los biomarcadores de exposición indican que la exposición a un xenobiótico ha ocurrido y que el compuesto está biodisponible. Puede ser la identificación de un compuesto exógeno en el organismo o el resultado de la interacción entre el compuesto exógeno y componentes endógenos (Van Gestel & Van Brummelen, 1996). Los biomarcadores de efecto son parámetros que pueden estar correlacionados a eventuales deterioros de la salud o a enfermedades (Van Gestel & Van Brummelen, 1996). Los biomarcadores de efecto se relacionan específicamente con los mecanismos de acción del tóxico, por lo que puede relacionarse el grado de cambio del biomarcador con el de los efectos adversos (Chambers et al., 2002). Por lo tanto, este tipo de biomarcadores pueden ofrecer respuestas cuantitativas de identificación del peligro, demostrando así que existe y sus posibles mecanismos de acción (Hagger et al., 2006).

Son cualidades deseables en un biomarcador su medición sencilla y a costos razonables, la especificidad para un contaminante o clase de contaminante, la existencia de una interacción dosis-respuesta entre el contaminante y el biomarcador, que sea aplicable en varias especies, que la detección preceda a la aparición de daños irreversibles (alerta temprana) y que la respuesta del biomarcador sea lo suficientemente conocida para que parámetros tales como la edad, el sexo y la temperatura puedan ser tomados en cuenta (Shugart et al, 1992).

Biomarcadores evaluados

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron como organismos bioindicadores, tres especies de anfibios con diversos hábitos de vida en los cuales se analizó un conjunto de biomarcadores (efectos directos e indirectos) para evaluar el impacto negativo de los agroquímicos utilizados en cultivos extensivos. Los efectos indirectos se evaluaron midiendo la disponibilidad de alimento y tipo de dieta. Los efectos directos se estudiaron realizando mediciones sobre parámetros morfológicos como la condición corporal e índices corporales, más la cuantificación de parámetros de estrés oxidativo como la determinación de glutatión reductasa y la actividad de las enzimas catalasa, glutatión-S-transferasa y de las colinesterasas.

La condición corporal es un método fiable y no destructivo para estimar la cantidad de reservas energéticas de un animal (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al., 2005; Scott et al., 2007). En las últimas décadas, dos principales métodos fueron empleados para estimar la condición corporal de los organismos, generando un debate en el cual distintos autores opinaron en favor de un método o del otro (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al., 2005; Peig & Green, 2009). El primer método consiste en comparar los residuos de la regresión entre la masa corporal y el largo hocico-cloaca (LHC) (MacCracken 2002; Lowe et al., 2006). Un individuo con un residuo positivo es considerado en buen estado, mientras que un individuo con un residuo negativo es considerado con bajas reservas energéticas (Schulte-Hostedde et al., 2005). El segundo método es el índice de masa escalado (S), el cual estandariza a todos los individuos al mismo valor de LHC, ajustando su masa corporal con la que tendría a este nuevo valor de L de acuerdo con la tendencia de escala entre M y LHC (Peig & Green, 2009). En otras palabras, se estandariza a todos los individuos a la misma fase de crecimiento. Una alta condición corporal indica mayores reservas energéticas que pueden asignarse para mantenimiento, crecimiento o reproducción. Los animales con mayores reservas de

energía generalmente presentarán mejor resistencia en ayunas, supervivencia y producción reproductiva que los individuos con reservas menores (Dobson 1992, Dobson & Michener 1995, Bachman & Widemo 1999). La condición corporal es un parámetro de relevancia ecológica para el éxito reproductivo y la supervivencia. En aves la condición corporal fue relacionada con un mayor nivel de actividad, mientras que en anfibios se la ha asociado con una mayor supervivencia (Lowe, 2003; Lowe et al., 2006; Morrison et al., 2007; Scott et al., 2007; Tsvey et al., 2007) y en mamíferos con una mayor fecundidad (MacDonald et al., 2002). El estrés ambiental como el cambio climático pueden traducirse en una disminución de la condición corporal antes que estos cambios sean detectados a niveles demográficos (MacCracken, 2005). La relación entre el peso de un órgano dado y el tamaño corporal es un parámetro que se usa para determinar cambios en la morfología ontogenética y proporciona información importante sobre el estado reproductivo y/o nutricional de los individuos en una población (Satake et al., 2009). La interpretación de la relación entre el peso de órganos tales como el hígado, el tejido adiposo y las gónadas puede proporcionar información crítica sobre la dinámica energética y el estado reproductivo de los anfibios (Huang et al., 1997, Oliveira & Zieri 2005, Ebert et al. 2011, Franco-Belussi et al. 2012).

El glutatión en su forma reducida es el principal antioxidante de las células y las protege de los radicales libres (los derivados activos del oxígeno). Esa reducción es posible gracias a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una enzima de la ruta de las pentosas fosfato. De hecho, una deficiencia en esta enzima puede tener efectos similares a la deficiencia de glutatión en términos de protección contra los radicales libres. El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción ($H^+ + e^-$) a otras moléculas inestables, tales como las especies reactivas del oxígeno. En la donación de un electrón, el glutatión mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG).

El glutatión es un sustrato tanto en reacciones de conjugación como de reducción, catalizadas por enzimas glutatión S-transferasas en el citosol, los microsomas y las mitocondrias. Sin embargo, también es capaz de participar en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos. En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG). Un aumento de la proporción GSSG/GSH se considera una señal de estrés oxidativo.

La enzima catalasa es un componente principal del sistema de defensa natural desarrollado por los organismos aerobios para resistir al estrés oxidativo. Radicales libres tales como O_2^- y OH^- son normalmente producidos en la cadena de transporte de electrones presente en las mitocondrias y responsable de la respiración aeróbica. Los radicales libres son oxidantes altamente potentes, capaces de reaccionar con lípidos de las membranas celulares y con aquellos que deberían ser incorporados en el metabolismo (Hermes-Lima, 2004). Pueden inducir alteraciones en la conformación de las uniones entre las dos cadenas que conforman la doble hélice del ADN o romper la unión fosfodiéster que mantiene la integridad de la célula. Si la acción de los radicales libres es continua, provoca inactivación enzimática, disminución de las funciones metabólicas y muerte celular (Winston & Di Giulio, 1991). Los xenobióticos como los pesticidas y otros contaminantes también pueden generar daños oxidativos: indirectamente, interfiriendo con los mecanismos de defensa natural, o directamente formando alcoxiradicales (RO^-) o peroxiradicales (ROO^-) (Abdollahi et al., 2004; Martínez-Alvarez et al., 2005). La función antioxidante de la enzima catalasa consiste en degradar al peróxido de hidrógeno (un precursor de radicales libres) en agua y oxígeno, inofensivos para el organismo. El aumento de la actividad enzimática de la catalasa es entonces un índice de la inducción de procesos de estrés oxidativo en el organismo y su determinación en animales de campo es biomarcador de este proceso oxidativo (Nwani et al., 2010).

La enzima glutatión-S-transferasa pertenece a una super-familia multigénica de enzimas multifuncionales (Van der Oost et al., 2003). Son enzimas dimericas que se distribuyen ampliamente y comprenden aproximadamente del 2 al 4% de las proteínas citosólicas totales del hígado. Su papel fisiológico fundamental es el rol clave que cumple en la segunda fase de los procesos de biotransformación hepáticos. Conjuga los xenobióticos y los productos de estrés oxidativo (resultados de la oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) con glutatión reducido, facilitando así su disolución en los medios celular y extracelular acuosos y, por ende, su excreción fuera del organismo (Hayes & Pulford, 1995). La GST puede ser inducida por un amplio grupo de xenobióticos y es un biomarcador de exposición general (Van der Oost et al., 2003).

El término colinesterasas engloba a dos enzimas, la acetilcolinesterasa presente en el cerebro y el sistema nervioso y cuya función es la inactivación rápida por hidrólisis de la acetilcolina, uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central (Gómez Olivares, 2000) y la butirilcolinesterasa sintetizada en el

hígado y liberada en la sangre donde remueve los inhibidores de la acetilcolinesterasa antes de que estos lleguen al sistema nervioso. Los insecticidas carbamatos y organofosforados fueron diseñados para matar a los insectos plagas por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa es responsable de la eliminación de la acetilcolina en las sinapsis nerviosas (Reigart et al., 1999). Cuando los organofosforados y carbamatos se unen a la acetilcolinesterasa y la desactivan, se acumula la acetilcolina en las sinapsis nerviosas lo que altera el funcionamiento normal del sistema nervioso y genera movimientos descontrolados y parálisis (Hoffman et al., 2003). La unión entre los carbamatos y las colinesterasas es reversible mientras que la unión entre los organofosforados y las colinesterasas es irreversible. La inhibición de la actividad de las colinesterasas en animales no-blanco es comúnmente utilizada como un biomarcador de efecto de los pesticidas organofosforados o carbamatos (Badii et al., 2005). Aunque, recientemente se ha demostrado que la cipermetrina, un insecticida piretroide también obstaculiza el correcto funcionamiento de la enzima Acetilcolina (David et al., 2009; Kumar et al., 2009; Marigoudar et al., 2009).

Especies de anfibios estudiadas

Las especies de anuros seleccionadas para realizar el trabajo son representantes de los agroecosistemas de la región y fueron las más abundantes encontradas (Fig. 4). Además, presentan distintos hábitos de vida, son fácilmente identificables a nivel específico y se encuentran en la categoría de no amenazadas (Vaira et al., 2012).

Leptodactylus latrans (Linnaeus, 1758): Semiacuática. Dorso verdoso o pardo amarillento, con varias cadenas glandulares longitudinales y manchas grandes oscuras con bordes claros. Tamaño 9-14 cm. Mancha triangular entre los ojos. Macho más grande que la hembra con brazos muy desarrollados y 2 espinas en el 1er dedo de la mano. Se reproduce de septiembre a febrero. Su alimento es variado desde escarabajos a anuros. La hembra forma un nido de espuma que cuida situándose en la parte interna del mismo (Achaval & Olmos, 2003).

Leptodactylus latinasus (Jimenez de la Espada, 1875): terrestre. Dorso gris a castaño con reticulado negro y una mancha color beige a anaranjada en el dorso. Tamaño de 3-4 cm. Cadena glandular blanquecina. Macho con manchas gulares bilaterales oscuras y un saco vocal. Se reproduce de octubre a febrero. Se alimenta de

varios invertebrados. Los machos vocalizan en cuevas de tierra cavadas por ellos y allí pone los huevos la pareja en un nido de espuma (Achaval & Olmos, 2003).

Boana pulchella (Dumeril y Bibron, 1841): arborícola. Coloración dorsal variable de verde a marrón. Tamaño de 2-5 cm. Saco vocal único y anaranjado. Discos adhesivos en el extremo de sus dedos. Se reproduce durante todo el año. Se alimenta de dípteros preferentemente (Achaval & Olmos, 2003).



Figura 4. Especies de ranas estudiadas. A) *Leptodactylus latrans* B) *Leptodactylus latinasus* C) *Boana pulchella*. Fotos: Silvina Enrietti

1.1 HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis

Los plaguicidas usados en los cultivos extensivos de la región pampeana afectan a las poblaciones de anfibios adultos tanto de manera directa, alterando los procesos fisiológicos y bioquímicos, y de manera indirecta, reduciendo la disponibilidad y el consumo de alimento.

Predicciones

La disponibilidad y el consumo de alimento de los anuros es menor en sitios cultivados que en sitios naturales, y después de la aplicación de plaguicidas.

Los índices de condición y grasa corporal escalado son los más adecuados para estimar la acumulación de reservas energéticas en anuros adultos.

Los anuros que habitan sitios cultivados presentan una condición corporal e índices somáticos inferiores a los que habitan sitios naturales.

El efecto directo de los plaguicidas en los anfibios puede ser denotado por la activación de biomarcadores de exposición y efectos en anuros que viven en zonas cultivadas.

Los anuros con hábitos terrestres presentan mayores alteraciones bioquímicas y energéticas que las especies con otros hábitos (arborícolas, semiacuáticas) al estar más expuestos a las aplicaciones de plaguicidas.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el impacto negativo de los plaguicidas usados en cultivos extensivos de la región pampeana sobre el estado fisiológico y energético de tres especies de anuros adultos provenientes de diferentes zonas agrícolas.

Objetivos específicos

1. Establecer una metodología de muestreo que permita determinar con mayor precisión la riqueza y abundancia de artrópodos terrestres (alimento para los anuros) para favorecer la detección de diferencias entre los distintos sitios.
2. Determinar cuál metodología es la más adecuada para expresar la condición corporal y el índice de grasa corporal en las especies de anfibios estudiadas.
3. Caracterizar el impacto indirecto de los plaguicidas asociados a los cultivos extensivos sobre tres especies de anuros de la región pampeana, comparando la disponibilidad y el consumo de alimento entre sitios cultivados vs sitios naturales, y antes y después de una aplicación con plaguicidas.
4. Caracterizar el impacto directo de los plaguicidas asociados a los cultivos extensivos sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos de tres especies de anuros de la región pampeana comparando biomarcadores enzimáticos, condición corporal e índices somáticos en adultos provenientes de sitios cultivados vs sitios naturales, y ejemplares capturados en sitios cultivados antes vs después de una aplicación de plaguicidas.
5. Comparar la sensibilidad de anuros con distintos hábitos de vida a los plaguicidas utilizados en los cultivos extensivos de la región pampeana.

**2. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE
PLAGUICIDAS EN CULTIVOS DE SOJA SOBRE TRES
ESPECIES DE ANFIBIOS ANUROS**

2.1 INTRODUCCIÓN

Aunque la pampa Argentina ha sido históricamente agrícola, desde mediados de los años 70 ha sufrido un proceso de acelerada transformación (Pengue, 2008). Durante este período, las actividades agrícolas-ganaderas se convirtieron en un sistema de monocultivo principalmente de maíz, girasol y trigo, y que en las décadas siguientes se centraron principalmente en la producción de soja (Pengue, 2000). Se amplió la superficie cultivada y se intensificó la producción, con el uso de variedades de cultivos de alto rendimiento, fertilizantes químicos, plaguicidas y mecanización (Paruelo & Guerschman, 2003; Satorre, 2005). La soja fue el cultivo que tuvo mayor incremento, por ser el primer cultivo GM que se comercializó en Argentina (ArgenBio, 2013). El área sembrada de soja resistente al glifosato creció desde entonces de 6 a 20 millones de hectáreas (SIIA, 2015). Hoy, se comercializan en el país numerosas variedades de soja y de maíz GM resistentes a herbicidas y a insectos. Argentina es el tercer mayor productor mundial de cultivos transgénicos, después de Estados Unidos y Brasil en términos de producción (ArgenBio, 2013).

Los campos productivos característicos de la región pampeana realizan doble cultivo y utilizan diversos plaguicidas. En la campaña 2010/2011, los principales insecticidas utilizados en los cultivos de cereales incluyeron los piretroides (cipermetrina y lambdacialotrina) y el organofosforado clorpirifos (RETAA, 2013). Los fungicidas más usados fueron carbendazim y tebuconazol, mientras que los principales herbicidas, alternativos al glifosato, incluyeron atrazina, acetoclor y metolaclor, 2,4-D, clorimuron y metsulfuron (RETAA, 2013). Estos plaguicidas pueden aplicarse solos o, más comúnmente, en diferentes tipos de combinaciones (Rennella & Quirós, 2000; Bindraban et al., 2009).

La agricultura moderna está cada vez más implicada en el declive de los anfibios, a través de la fragmentación de su hábitat, de la expansión de la superficie cultivada, o por efectos de la contaminación generada por el uso de plaguicidas (Mann et al., 2009; Grant et al., 2016; Suarez et al., 2016). Se han reportado diversas alteraciones morfológicas, fisiológicas, histológicas y bioquímicas en anfibios que habitan sitios agrícolas (Hayes et al., 2003; Berubé et al. 2005; Murphy et al. 2006; Lajmanovich et al., 2008; McDaniel et al. 2008; McCoy et al., 2008; Rohr et al., 2008;

Boily et al., 2009; Marcogliese et al., 2009; Spear et al., 2009, Brodeur et al., 2011; Peltzer et al., 2011; Brodeur et al., 2012; Agostini et al., 2013; Sanchez et al., 2014).

En varios sitios de la región pampeana, se ha detectado la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales, subterráneas, o de lluvia; en sedimentos y suelos, y también en la biota (Peruzzo et al., 2008, Aparicio et al., 2013; Bonansea et al., 2013; De Gerónimo et al., 2014; Lupi et al., 2015; Hunt et al., 2016; Ronco et al., 2016; Etchegoyen et al., 2017; Pérez et al., 2017; Primost et al., 2017; Caprile et al., 2016; Brodeur et al., 2017; Castro Berman et al., 2018, Alonso et al., 2018; Milesi Delaye et al., 2018). La mayoría de la información disponible respecto al impacto de los plaguicidas sobre los anfibios se origina principalmente de bioensayos de toxicidad realizados en condiciones de laboratorio y empleando diferentes estadios larvales (Hayes et al., 2010). Salvo excepciones, lo más habitual es que los niveles de contaminación por plaguicidas encontrados en el ambiente no generan una mortalidad directa de los individuos, sino que ejercen su impacto negativo mediante diferentes efectos subletales (Saaristo et al., 2018). En su etapa de vida terrestre, los anfibios adultos están potencialmente expuestos de manera aguda y crónica a los plaguicidas cuando se alimentan y migran dentro de los agroecosistemas, pero pocos trabajos se han dedicado a determinar posibles efectos adversos en esta etapa de su ciclo de vida (Swanson et al., 2018).

Los plaguicidas, al igual que cualquier otro contaminante ambiental pueden tener efectos nocivos, tanto directos como indirectos, sobre los organismos no-blanco. Los efectos indirectos consisten en restricciones que sufren un organismo en relación al impacto que genera el contaminante sobre su entorno, por ejemplo, una reducción en la disponibilidad del alimento o del hábitat. En contraposición, los efectos directos de los contaminantes son los efectos que la sustancia química ejerce directamente sobre los procesos fisiológicos o bioquímicos.

La condición corporal es una medida de las reservas energéticas del animal y está asociado con la capacidad reproductiva, la supervivencia, la competencia y la resistencia a las enfermedades (Hayes & Shonkwiler, 2001; Lowe et al., 2006; Tsvey et al., 2007). La condición corporal se estima utilizando un índice que se calcula a partir de las variables de peso y longitud. Las más utilizadas son las de regresiones de Tipo I (cuadrados mínimos), que comúnmente se emplean como índices de condición corporal (Schulte-Hostedde et al., 2005; Brodeur et al., 2011; Brodeur et al., 2012). Un índice de condición corporal ideal debe ser preciso e imparcial con respecto al tamaño y no debe

correlacionar con la masa corporal o con la longitud (Falk et al., 2017). Muchos animales tienen un crecimiento alométrico, lo que significa que experimentan cambios en la forma a medida que su masa aumenta o disminuye en proporción a la longitud. La técnica descrita por Peig y Green (2009) propuso una solución al problema de la alometría: el índice de masa escalado. El índice de masa escalado estandariza a todos los individuos al mismo valor de longitud, ajustando su masa corporal con la que tendría a este nuevo valor de longitud de acuerdo con la tendencia de escala entre peso y longitud. El requisito que el índice corporal sea imparcial con respecto al tamaño es importante para la prueba de hipótesis, ya que la falta de correlación con el tamaño permite comparar las estimaciones de los índices de condición corporal entre individuos de diferentes rangos de tamaño (Falk et al., 2017).

Por otro lado, el peso de grasa corporal seca y húmeda ha sido utilizado para aproximarse a la verdadera condición corporal (Falk et al., 2017). Algunas medidas que se utilizan incluyen el peso de la grasa corporal o su porcentaje (masa grasa total / masa corporal total) (Schulte-Hostedde et al., 2005; Brodeur et al., 2011; Brodeur et al., 2012). Si un animal muestra alometría en la acumulación de grasa corporal, entonces las mediciones de grasa estarán sesgadas con respecto al tamaño del animal. Por lo que se debe utilizar el índice de grasa escalada, donde el peso de la grasa se escala a la longitud utilizando la ecuación de escalado (Peig & Green 2009).

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral consistió en evaluar los efectos directos e indirectos de una aplicación de plaguicidas en cultivos de soja sobre parámetros fisiológicos y energéticos de tres especies de anfibios anuros presentes en las cercanías de los lotes cultivados y al momento de la aplicación. Para alcanzar ese objetivo, se determinaron la disponibilidad y el consumo de alimento, la condición corporal y otros índices corporales, además de una serie de biomarcadores bioquímicos, antes y después de la aplicación de una mezcla de plaguicidas que incluía los insecticidas tiametoxam y lamdacialotrina, y el herbicida glifosato o el fungicida tetraconazole. Esta secuencia de muestreo se realizó en tres sitios de las cercanías del partido de Chivilcoy, provincia de Buenos Aires, en los cuales se realizó una aplicación similar de plaguicidas en el intervalo de 1 semana. En las mismas fechas, se muestreó además, un sitio en donde no se aplicaron plaguicidas, la reserva “El Destino”, en el partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires. Las especies muestreadas en los 4 sitios fueron *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus latinasus* y *Boana pulchella*. El nivel de la contaminación generado por la aplicación de plaguicidas se caracterizó

determinando en muestras de suelo y de agua la presencia de los insecticidas tiametoxam y lambdacialotrina, y del herbicida glifosato y su producto de metabolización el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Los biomarcadores de exposición a contaminantes examinados incluyeron el contenido hepático de glutatión reducido (GSH) y las actividades de las enzimas catalasa (CAT), glutatión-S-transferasas (GST) y colinesterasas (ChE). Estos últimos cuatro parámetros sirvieron, respectivamente, como biomarcadores de estrés oxidativo (CAT y GSH), activación de la biotransformación de plaguicidas (GST y GSH) y exposición a insecticidas organofosforados y carbamatos (ChE) (Lajmnovich et al., 2008; Brodeur et al., 2011; Colin et al., 2016).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Los anuros adultos de las especies A, B y C fueron capturados en las cercanías de campos cultivados con soja ubicados en el partido de Chivilcoy, provincia de Buenos Aires (**Fig. 1**). Los campos fueron muestreados antes y después de una aplicación de plaguicidas conteniendo los insecticidas tiametoxam y lambdacialotrina y, en algunos casos, el herbicida glifosato o el fungicida tetraconazole (**Tabla 1**). Paralelamente, se muestreó la reserva “El Destino”, ubicada en el partido de Magdalena, en donde no se aplicaron plaguicidas. En todos los sitios, los ejemplares de anfibios adultos fueron capturados en los márgenes de cuerpos de agua poco profundos, localizados en las cercanías inmediatas de los lotes de cultivos.

Tabla 1. Detalle de las aplicaciones de plaguicidas realizadas en los sitios muestreados. A: 15 días antes de la aplicación, D2: 2 días después de la aplicación y D4: 4 días después de la aplicación.

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
Localización	35° 08' 20" S 57°23' 27" O	34° 53' 22" S 59° 52' 43" O	34° 44' 59" S 59° 55' 28" O	34°55'41" S 59° 46'30" O
Fecha de aplicación	ninguna	06/03/2010	10/03/2010	06/03/2010
Modo de aplicación	ninguna	Avión	Mosquito	Avión
Productos aplicados				
Lambdacialotrina 10,6% y Tiametoxam 14,1% (Engeo®)	No	200 cm ³ /ha	200 cm ³ /ha	200 cm ³ /ha
Glifosato	No	No	2 L	No
Aceite Agrícola Común (Base Soja)	No	2 L/ha	2 L/ha	2 L/ha
Tetraconazole 10% (Dormak)	No	500 cm ³ /ha	No	500 cm ³ /ha
Precipitaciones (mm)				
Durante el muestreo previo a la aplicación	38	0,1	54,4	90,3
Periodo desde la aplicación hasta D2	0	0	0	0
Periodo D2-D4	1	7,3	0	7,3

El Sitio 1 fue ubicado en la Reserva “El Destino”, partido de Magdalena, Buenos Aires (**Fig. 1**). La reserva “El Destino” tiene 1854 ha y está ubicada dentro del parque Costero del Sur, Reserva de Biósfera de la UNESCO de unas 30 mil ha. La Reserva presenta un mosaico de pastizales, pantanos de agua dulce, talares y otros bosques que ocupan diferentes sustratos geológicos y edáficos (Goya et al. 1992) con ausencia total de agricultura, pero sí con el desarrollo de actividad ganadera. Ahí, los anfibios adultos fueron capturados en los márgenes del arroyo Primera Estancia cerca de su desembocadura en el Río de la Plata. Por su parte, los Sitios 2, 3 y 4, fueron ubicados en el partido de Chivilcoy, Buenos Aires (**Fig. 1**). Los sitios 2 y 4 contenían lagunas internas originadas por bajos inundados. El Sitio 3, por otro lado, se ubicó en la naciente del arroyo Las Saladas, un curso de agua intermitente formado por una serie de lagunas que se conectan en épocas de mucha lluvia. Los lotes muestreados en Chivilcoy eran manejados por el mismo ingeniero agrónomo, el cual nos facilitó información respecto a los momentos y a las formas de aplicación de plaguicidas.

Los muestreos se llevaron a cabo durante el verano de 2010. Durante el muestreo previo a la aplicación (A), la temperatura del aire fue en promedio de 22,2°C y

cayeron 134.4 mm de agua de lluvia en los sitios 2, 3 y 4; mientras que en el sitio 1 las condiciones de temperatura fueron similares $24,64^{\circ}\text{C}$, pero las precipitaciones promedio fueron menos de la mitad a la de los otros sitios (62 mm). Durante los muestreos posteriores a la aplicación (D2 y D4), las condiciones de temperatura y precipitaciones fueron similares en todos los sitios: $21,28^{\circ}\text{C}$ y $21,47^{\circ}\text{C}$, y 1 mm y 7,3 mm para el sitio 1 y los sitios 2, 3 y 4, respectivamente.

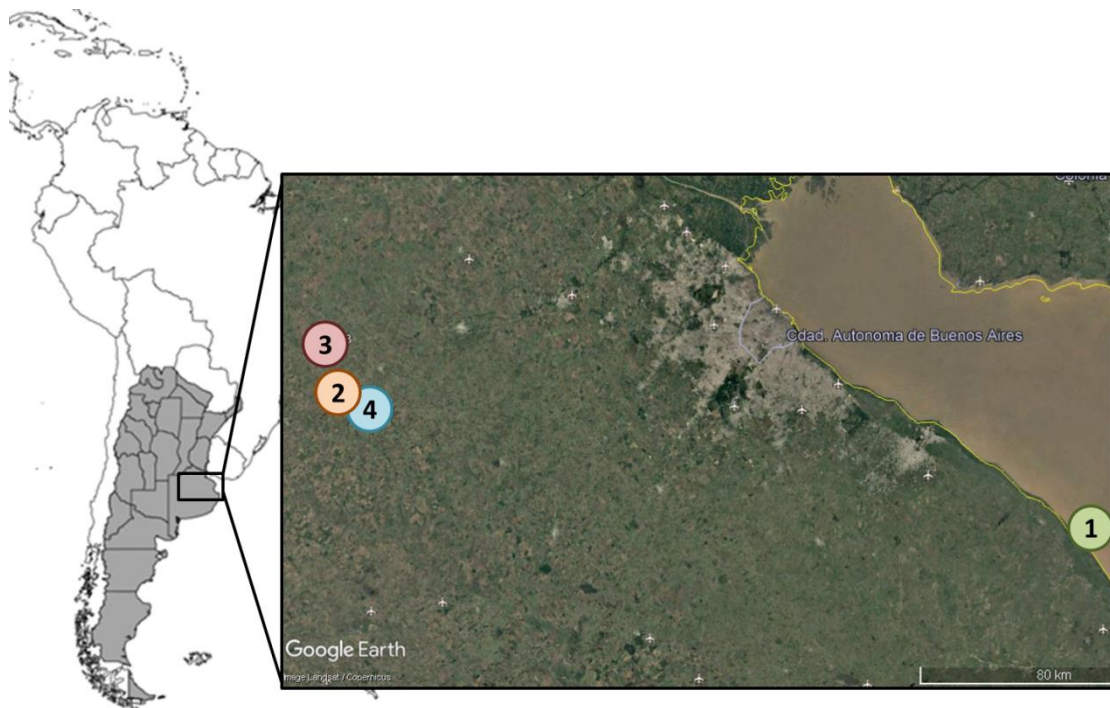


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en la pampa ondulada, provincia de Buenos Aires



Figura 2. Imágenes satelitales de los cuatro sitios de muestreo. Las estrellas rojas ubican a los puntos de muestreos

Muestreo de agua y suelo

En cada sitio, se tomaron muestras de suelo y agua antes y 2 días después de la aplicación de plaguicidas para medir las concentraciones de lambdacialotrina y tiametoxam presente en estas matrices. También se determinó la presencia del herbicida glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico AMPA en las muestras de suelo. Las muestras de agua se tomaron en botellas de vidrio color caramelo de 1L previamente lavadas con una secuencia de detergente no iónico, ácido clorhídrico, acetona y agua destilada. Al momento de tomar la muestra de agua, primero se enjuagó la botella tres veces con el agua del sitio a muestrear y luego se llenó la botella sumergiéndola 10 cm por debajo de la superficie, para asegurar de no captar las partículas flotando en superficie, y cuidando de no mover los sedimentos. Por su parte, las muestras de suelo se tomaron en frascos de vidrios de 3L previamente lavados con una secuencia de detergente no iónico, ácido clorhídrico, acetona y agua destilada. Para cada muestra se juntó, con una pala de jardín el suelo en 3 puntos distintos dentro de cada lote de cultivo, cuidando de antes remover los primeros 5 cm de suelo superficial. Todas las muestras fueron preservadas en hielo hasta llegar al laboratorio, en donde fueron luego colocadas en un freezer a -20°C hasta su posterior análisis.

Las determinaciones químicas se realizaron en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIM), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La

Plata. La extracción de las muestras de agua se efectuó por medio de columnas de extracción SPE C18 con posterior desorción con metanol, concentración en corriente de nitrógeno y resuspensión en metanol:agua (50:50). En el caso de las muestras de suelo, la extracción se realizó sonicando 10 g de muestra durante 10 minutos con acetonitrilo y sulfato de sodio. Las muestras fueron luego centrifugadas y concentradas bajo corriente de nitrógeno antes de ser resuspendidas en una mezcla 50:50 de metanol:agua. Los sobrenadantes resultantes se analizaron en busca de las cuatro moléculas arriba mencionadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y detección de masa.

Los análisis de cromatografía líquida se realizaron con un equipo HPLC Agilent 1100 con detector de masas cuadrupolar con una fuente de ionización por electropulverización (ESI Agilent Technologies Inc., Miami, FL, USA). Para la separación cromatografica se utilizó una columna CSH Waters de C18 de tamaño de poro 50x4.6 mm, con ACN:NH4Ac 10 mM a pH=4 con gradiente de metanol-agua (con fases móviles previamente acondicionadas con acetato de amonio 5 mM) a un caudal de 0,5 ml / min.

Las configuraciones de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ESI positivo (Tabla 2), el tiempo de retención y la abundancia del ion de confirmación (Ion C) relativo al del ion de cuantificación (Ion Q) se usaron como criterios de identificación.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas de análisis de plaguicidas. Tiempo de retención (TR), abundancia del ion de confirmación (Ion C) y ion de cuantificación (Ion Q) usados como criterios de identificación. En todos los casos, el límite de detección fue de 1 mg / L y el límite de cuantificación fue 4 mg / L. ESI = ionización por electrospray

HERBICIDAS	ESI (+)	TR (min)	Ion Q (m/z)	Ion C (m/z)			Grupo químico
Glifosato		1,40	394	88	179	214	Herbicida
AMPA		1,59	334	156	179	112	Herbicida
INSECTICIDAS							
Tiametoxam		1,6	292	294			Neonicotinoide
Lambdacialotrina		7,7	467				Piretroide

Muestreo de artrópodos: disponibilidad de alimento

Con el objetivo de estimar la abundancia de artrópodos disponibles como alimento para los anfibios, se colocaron trampas de caída para artrópodos. Las mismas se ubicaron a lo largo de los cuerpos de agua donde se capturaron a los anuros. Se instalaron 4 estaciones de muestreo en transectas de 200 m, separadas en promedio por 50 m (**Fig. 3**). En cada estación de muestreo se dispusieron dos trampas, cada una rellenas con una solución al 2% de ácido acético y 2% de formol para matar y conservar los artrópodos, con, además, unas gotas de detergente para romper la tensión superficial. A cada trampa se le colocó un techo metálico para proteger su contenido del sol y de la lluvia (**Fig. 4**). Las trampas se dejaron activas durante 4 días y luego se colocaron los organismos capturados en bolsas con solución conservante. Una vez en el laboratorio se procedió a las limpiar el contenido de las trampas de la tierra y de los restos vegetales presentes y luego se colocaron los ejemplares capturados en vasos de plástico con alcohol al 70% para preservarlos hasta su identificación taxonómica. Las variables analizadas por sitio y fecha de muestreo fueron: riqueza, abundancia y volumen de los artrópodos capturados. Para calcular el volumen los artrópodos, se midió su largo y ancho con escala milimétrica. Con estas dimensiones se calculó el volumen con la fórmula para cuerpos elipsoides de Colli & Zamboni (1999):

$$\text{Volumen} = 4/3\pi (\text{largo}/2)(\text{ancho}/2)^2$$

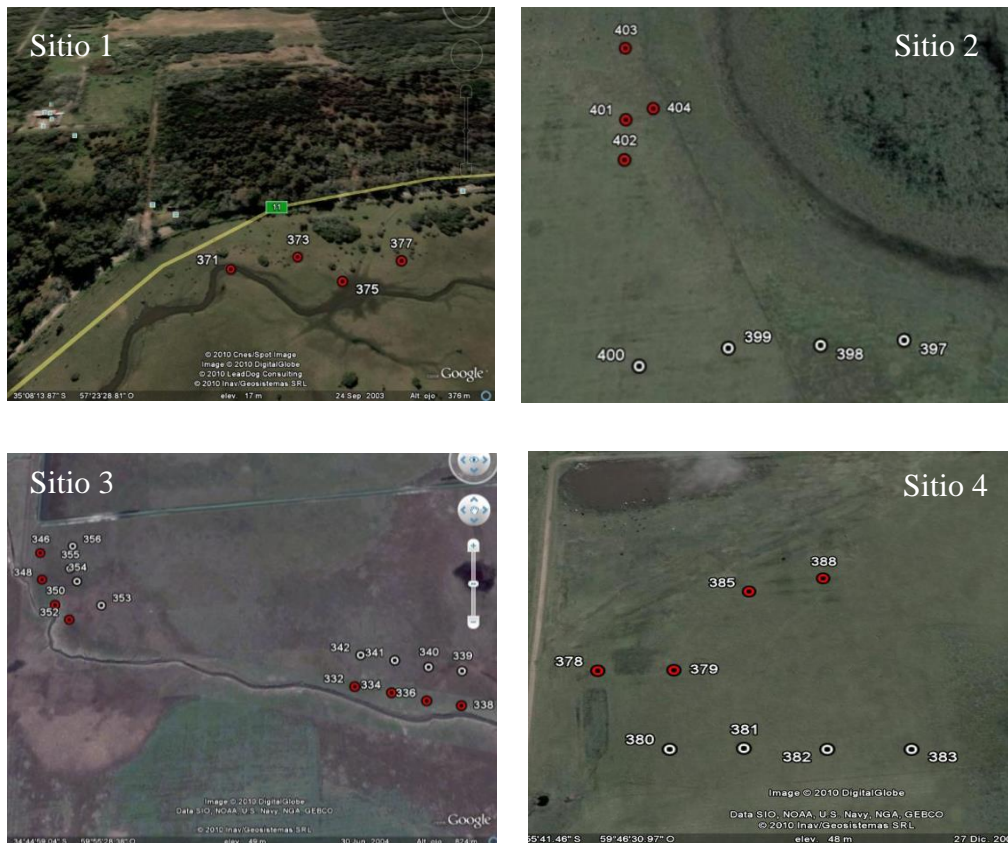


Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo de artrópodos en cada sitio. Las marcas corresponden a las estaciones con 2 trampas de caída en cada una. Las marcas blancas corresponden a las estaciones ubicadas dentro del lote de soja. Las marcas rojas se ubican en los bajos cercanos al agua.

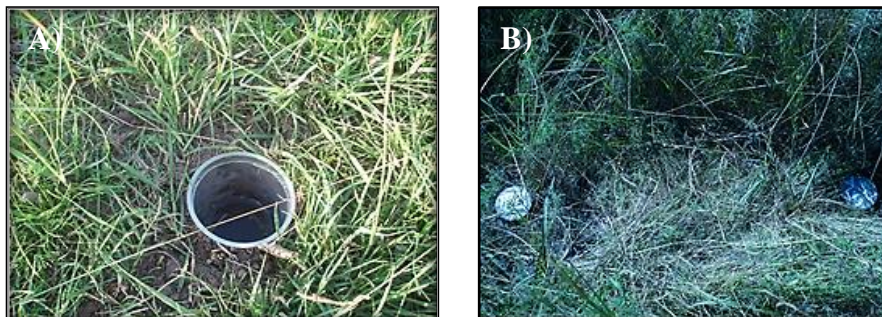


Figura 4. Trampas de caída de artrópodos. **A)** se colocan debajo de la tierra dejando la apertura del envase nivelada con la superficie del suelo de manera que caigan y queden atrapados los artrópodos caminadores. **B)** Pitfall cubiertas con techos de chapa para evitar el ingreso de agua de lluvia durante el estudio.

Especies de anuros estudiadas

Las especies de anuros estudiadas fueron *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus latinasus* y *Boana pulchella* para realizar el trabajo. Estas especies de anfibios son representativas de los agroecosistemas de la región y fueron las más abundantes encontradas (**Fig. 5**). Además, presentan distintos hábitos de vida, son fácilmente identificables a nivel específico y se encuentran en la categoría de especies no amenazadas (Veira et al., 2012).

A) *Leptodactylus latrans* (Linnaeus, 1758): Semiacuática. Dorso verdoso o pardo amarillento, con varias cadenas glandulares longitudinales y manchas grandes oscuras con bordes claros. Tamaño 9-14 cm. Mancha triangular entre los ojos. Dimorfismo sexual, donde el macho es más grande que la hembra con brazos muy desarrollados y 2 espinas en el 1er dedo de la mano. Se reproduce de septiembre a febrero. Su alimentación es variada de escarabajos a anuros. La hembra forma un nido de espuma que cuida situándose en la parte interna del mismo (Achaval & Olmos, 2003).

B) *Leptodactylus latinasus* (Jimenez de la Espada, 1875): Terrestre. Dorso gris a castaño con reticulado negro y una mancha color beige a anaranjada en el dorso. Tamaño de 3-4 cm. Cadena glandular blanquesina. Dimorfismo sexual con machos que presentan manchas gulares bilaterales oscuras y un saco vocal. Se reproduce de octubre a febrero. Se alimenta de varios invertebrados. Terrestre. Los machos vocalizan en cuevas de tierra cavadas por ellos (Achaval & Olmos, 2003).

C) *Boana pulchella* (Duméril y Bibron, 1841): Arborícola. Coloración dorsal variable. Tamaño de 2-5 cm. Saco vocal único y anaranjado. Se reproduce durante todo el año. Se alimenta de dípteros preferentemente (Achaval & Olmos, 2003).

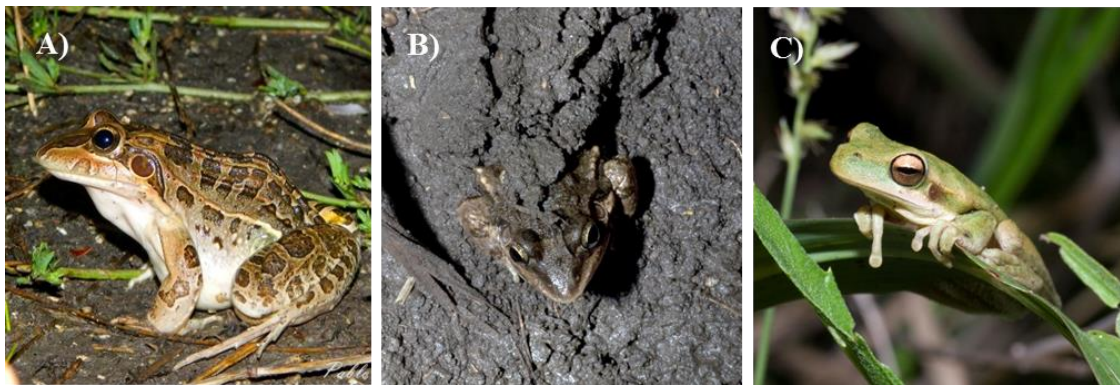


Figura 5. Especies de ranas A) *Leptodactylus latrans* B) *Leptodactylus latinasus* C) *Boana pulchella*. Fotos: Silvina Enrietti.

Captura de anuros

Los ejemplares de anfibios adultos fueron capturados de forma manual al anochecer y colocados en jaulas húmedas para ser trasladados a laboratorios temporarios establecidos en las cercanías de los sitios de muestreo. A la mañana siguiente, los ejemplares de anfibios adultos fueron anestesiados individualmente por inmersión en una solución de 100 mg/L tricaina de metanosulfonato. Se midió su peso con una balanza digital Sartorius 412 (0.01g de precisión) y el largo hocico-cloaca (LHC) con un calibre digital Essex (0.01mm de precisión). De cada individuo, se

extrajeron los siguientes órganos y tejidos: el hígado, el aparato digestivo, las gónadas, los riñones y un trozo de músculo del muslo de la pierna derecha de aproximadamente 1 cm³. El hígado, el aparato digestivo y las gónadas fueron pesados con 0.01g de precisión para calcular los distintos índices corporales. Todos los tejidos, salvo los aparatos digestivos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio, estas muestras fueron colocadas en un freezer de -80°C hasta su procesamiento. Los aparatos digestivos se fijaron en formol al 10% para utilizarse en la determinación del contenido estomacal y el análisis de dieta. Las capturas de anfibios en Chivilcoy fueron realizadas bajo permiso de la Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires, mientras que las capturas en la Reserva El Destino contaban con el permiso de Áreas Naturales Protegidas del Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) de la provincia de Buenos Aires. Todos los procedimientos que implican anuros vivos se realizaron de acuerdo con las pautas de referencia para la investigación con animales de laboratorio, de granja y salvajes del Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica de Argentina (CONICET, 2005). La cantidad de individuos para las distintas especies en los diferentes sitios y muestreos se encuentra expresada en la **Tabla 3**. Se consideraron para los análisis estadísticos solamente los grupos que tenían un número de ranas igual o superior a 5 individuos.

Tabla 3. Número de individuos capturados en los diferentes sitios y muestreos. a) *Leptodactylus latrans*, b) *Leptodactylus latinus* y c) *Boana pulchella*. **A:** Antes de la aplicación, **D2:** Dos días después de la aplicación y **D4:** Cuatro días después de la aplicación. **H:** Hembra, **M:** Macho, **I:** Indeterminado.

		a) <i>L. latrans</i>				b) <i>L. latinus</i>				c) <i>B. pulchella</i>			
Sitio	Muestreo	Sexo			Total	Sexo			Total	Sexo			Total
		H	M	I		H	M	I		H	M	I	
1	A	13	13		26	-	-		0	8	14		22
	D2	-	-		0	-	-		0	-	-		0
	D4	10	14		24	3	5		8	14	7		21
2	A	5	11		16	3	5		8	-	-		0
	D2	11	15		26	3	6		9	2	5		7
	D4	11	10		21	8	3		11	-	-		0
3	A	10	10		20	2	9		11	1	12		13
	D2	10	11		21	4	3	2	9	-	10		10
	D4	10	10		20	12	3		15	2	12		14
4	A	4	8		12	1	9		10	-	9		9
	D2	-	-		0	-	-		0	-	-		0
	D4	7	9	1	17	5	10	1	16	1	15		16
	Total	91	111	1	203	41	53	3	97	28	84	0	112

Análisis de dieta

El consumo de alimento se evaluó analizando el tipo y las cantidades de artrópodos presentes en los estómagos de los ejemplares capturados. Las presas de artrópodos fueron identificadas a nivel de orden y/o familia. Los contenidos gastrointestinales se analizaron cuantitativamente (número de individuos) y cualitativamente (identificados por taxas). Cuando fue posible, los ítems alimenticios hallados fueron medidos (largo y ancho) utilizando un calibre milimétrico. Con estas dimensiones, se calculó el volumen de las presas por la fórmula para cuerpos elipsoides de Colli & Zamboni (1999):

$$V = 4/3\pi (\text{largo}/2)(\text{ancho}/2)^2.$$

Con los datos relativos a los distintos taxa de presas consumidos, se calculó el índice de importancia relativa (IRI), el cual informa sobre la contribución respectiva de cada categoría de presas en la dieta del animal (Pinkas, 1971; Dietl et al., 2009):

$$\text{IRI} = \%FO (\%N + \%V)$$

donde %FO es el porcentaje de ocurrencia (100 x número de estómagos que contienen el ítem “t”/ número total de estómagos), %N es el porcentaje de individuos (100 x número total de ítems “t” en todos los estómagos / número total de todos los ítems en todos los estómagos), y %V es el porcentaje de volumen (100 x el volumen total de los ítem “t” en todos los estómagos / volumen total de todos los taxa en todos los estómagos).

Finalmente, se calculó también el índice de selectividad de Jacob (1974), el cual compara la proporción relativa de los artrópodos encontrados en el ambiente con los hallados en los contenidos estomacales de los anuros. Este índice se calculó usando la siguiente ecuación:

$$D = dk - fk / dk+fk-2dkfk$$

Donde dk es la proporción de la presa “k” en el estómago y fk es la proporción de la presa k en el ambiente. El índice varía desde +1 (indica preferencia por una presa) a través de 0 (las presas se encuentra en las misma proporción en el ambiente como en la dieta) a -1 (la presa está ausente en la dieta y presente en el ambiente).

Para el cálculo de D, utilizamos los valores de captura de artrópodos del ambiente de bajos, ya que fue en ese lugar donde mayoritariamente se atrapó a los anuros. Además, solo lo calculamos para los muestreos, antes de la aplicación (A) y cuatro días después (D4), debido a que las trampas tenían que estar activas por lo menos 4 días.

Condición corporal e índices somáticos

En un primer lugar, se examinó el tipo de relación presente entre el peso y el LHC de los individuos muestreados en cada especie. Cuando la relación era claramente alométrica (curva exponencial), la condición corporal de las ranas fue calculada por el índice de masa escalado descrito por Peig y Green (2009). Al contrario, cuando la relación era isométrica (curva linear), más probablemente porque se muestreo un rango limitado de tamaños de ranas, se usó el método de los residuos de Schulte-Hostedde et

al. (2005), para expresar la condición corporal, debido a la imposibilidad de calcular correctamente el exponente de escalamiento.

1. Índice de masa escalado

El índice de masa escalado estandariza a todos los individuos al mismo valor de LHC, ajustando su masa corporal con la que tendría a este nuevo valor de LHC de acuerdo con la tendencia de escala entre su masa (M) y LHC. En otras palabras, se estandariza a todos los individuos a la misma fase de crecimiento. Al comparar la condición entre individuos, los fenómenos de variación del crecimiento corporal ligados a la morfogénesis (por ejemplo, la ontogenia o el dimorfismo del tamaño sexual) son descritos por el exponente de escalamiento, bSMA (Warton et al., 2006).

El índice S se calculó de la manera siguiente:

$$S = M_i(L_0/L_i)^{b_{SMA}}$$

Donde:

- Mi y Li son el peso corporal y el largo de un individuo i, respectivamente.
- bSMA es el exponente estimado por una regresión entre el Ln peso y Ln de LHC.
- L0 es el valor promedio de LHC para la población estudiada.
- S es el peso corporal predicho para un individuo i cuando su largo es estandarizado a un valor L0.

Primero, se calcula el valor promedio de largo hocico-cloaca (LHC) de los individuos de todos los sitios. Se transforman los valores de LHC y peso en logaritmo en base e para cada variable. Se realizó una regresión del LnPeso vs LnLHC, aquí se tomó el valor de la pendiente (m) y el coeficiente de correlación R², así se obtuvo el bSMA=m/R² (**Fig. 6**)

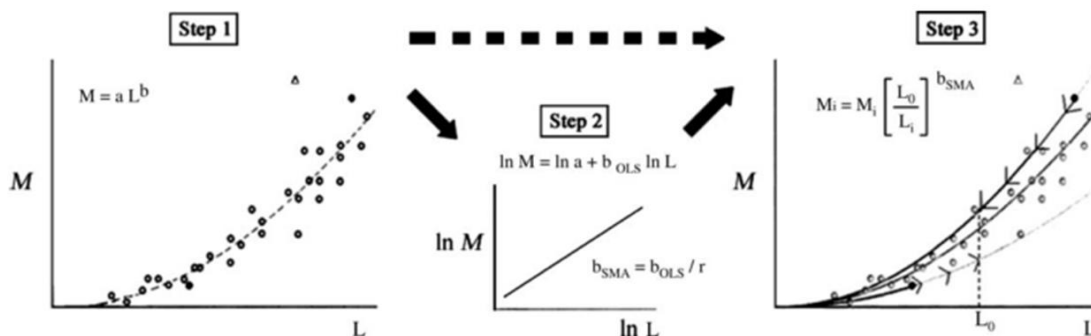


Figura 6. Pasos para obtener el Índice de Masa Escalada (S). Fuente: Peig y Grenn 2009.

2. *Índice de masa utilizando residuos*

Mientras que si la relación entre el peso corporal y el largo (LHC) era lineal, la condición corporal se evaluó mediante la comparación de los residuos de la regresión entre la masa corporal y el largo hocico-cloaca (LHC). En este método, la línea de regresión establece el peso corporal promedio para una longitud dada. Tal es así que, un individuo con un residuo positivo es considerado en buen estado, mientras que un individuo con un residuo negativo, se lo considera con bajas reservas energéticas (Schulte-Hostedde *et al.*, 2005). Sólo los datos de los anuros del sitio control, se utilizaron para realizar la regresión entre la masa corporal y el LHC; de modo que la recta de regresión resultante es representativa de individuos expuestos a menos contaminación (Brodeur *et al.* 2011, 2012, 2013). El valor teórico del peso corporal de los ejemplares en cada sitio (que se obtiene mediante la introducción de la longitud del animal en la ecuación de la recta de regresión), se restó al valor del peso corporal medido para cada individuo, con el fin de obtener el llamado valor "residual". Por lo tanto los residuos, son una expresión de la diferencia entre el peso medido del animal y el de un individuo "sano" promedio con el mismo LHC.

3. *Índice de Grasa Corporal*

Además de la condición corporal, se calculó el índice de grasa corporal (IGC) como otro indicador de la cantidad de reservas energéticas contenidas en los individuos. Al igual que para la condición corporal, se examinó primero el patrón de distribución de los valores de grasa en gramos en función el LHC del animal para decidir sobre el índice más adecuado a utilizar considerando el conjunto de datos disponible. Así como para la condición corporal, cuando la relación era claramente alométrica (curva exponencial), el índice de grasa corporal de los ejemplares se calculaba como un índice escalado (GCE), mientras que cuando la relación era isométrica (curva lineal) o que había una ausencia de relación, y que era entonces imposible de calcular correctamente el exponente de escalamiento, se utilizaba un índice correspondiente al porcentaje del peso de grasa respecto al valor del peso corporal al que se le restó el peso de las gónadas y del aparato digestivo.

4. *Índices hepatosomático, gonadosomático y de contenido estomacal*

El índice hepatosomático (IHS), el índice gonadosomático (IGS) y el índice de contenido estomacal (ICE) se calcularon como un porcentaje del peso de cada uno de

estos órganos/tejidos respecto al valor del peso corporal al que se le restó el peso de las gónadas y del aparato digestivo (Brodeur et al., 2012).

Biomarcadores

Cuatro biomarcadores hepáticos fueron determinados: el contenido en glutatión reducido (GSH) y la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y colinesterasas (ChE).

El hígado de cada individuo fue homogeneizado en frío en una solución tampón de 50 mM tris (hydroxymethyl) aminometano (pH 7,4) conteniendo 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y 0,25 M de sucrosa utilizando un homogeneizador teflón-vidrio tipo Potter-Elvehjem. Los homogeneizados obtenidos fueron centrifugados a 12.500 rpm y 4°C durante 5 minutos de manera a precipitar los residuos sólidos. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a -80°C hasta medir los biomarcadores.

1. Contenido de glutatión reducido

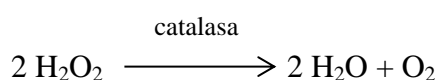
Los contenidos hepáticos de GSH se determinaron mediante una modificación del método descrito por Tietze (1969) en el cual se cuantifica colorimétricamente la cantidad de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) resultante de la interacción de GSH con el cromógeno 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). En primer lugar, se precipitaron las proteínas de los homogeneizados de hígado mezclando 60 µL de estos con 120 µL de acetonitrilo en replicado. Para cada muestra analizada, se prepararon, además, dos blancos a los cuales se agregaron 10 µL de N-etilmaleimida (NEM) 16 M (i.e. 60 µL del homogeneizado, 10 µL de NEM y 110 µL de acetonitrilo. NEM evita que GSH participe en la reacción colorimétrica uniéndose al tiol libre de GSH (Guntherberg & Rost 1966). Fue necesario preparar blancos para cada muestra analizada ya que cada uno de los extractos de hígado poseía un color amarillento de diferente intensidad que interfería con la lectura de la reacción colorimétrica. Las muestras diluidas en acetonitrilo fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 10 min a 4 ° C para precipitar y remover las proteínas, y el sobrenadante se utilizó para la determinación de contenido de GSH.

Las determinaciones de GSH se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C. Las mezclas de reacción contenían: 200 µL de tampón fosfato (100 mM, pH 7.5), 160 µL de homogeneizado de hígado en acetonitrilo y 10 µL de solución de DTNB. Luego de 30

minutos de incubación, se registró la absorbancia a 412 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. Las concentraciones de GSH presentes en las muestras se calcularon restando la absorbancia promedio de los blanco a la absorbancia promedio de las muestras, y comparando el valor obtenido a una curva estándar que se procesó en paralelo con las muestras usando varias diluciones de una solución de GSH de 76 mM preparada en tampón de homogeneización.

2. Actividad de la enzima catalasa

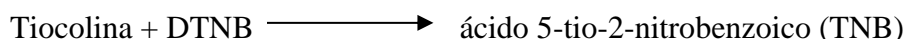
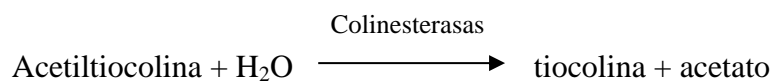
La actividad hepática de la enzima catalasa se determinó utilizando la técnica de Baudhin et al. (1964). La técnica se basa en la detección de la disminución de absorbancia resultando de la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2); una especie oxidante que se reduce a agua y oxígeno en la reacción catalizada por la enzima catalasa.



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción contenían: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0), 10 µl de homogeneizado de hígado de anuro (diluido 1/100 en el caso de *L. latinasus* y 1/200 para *L. latrans*) y 10 µl de solución de H_2O_2 al 5%. El cambio en la absorbancia se registró durante 2 min por espectrofotometría UV a 240 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de H_2O_2 degradado por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

3. Actividad de las enzimas colinesterasas

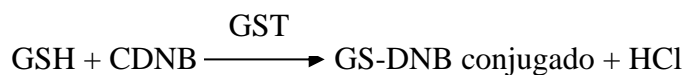
La actividad de las enzimas colinesterasas (butiril y acetil colinesterasas) se determinó mediante el método colorimétrico de Ellman et al., (1961). En este método, la actividad de las colinesterasas se determina indirectamente cuantificando la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico luego de la reacción entre el ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB o reactivo de Ellman) y la tiocolina, la cual resulta de la hidrólisis de la acetiltiocolina por las colinesterasas (Sinko et al., 2007).



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción conteniendo: 200 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 8.0), 50 µl de homogeneizado de hígado de anuro diluido 1/10, 10 µl de una solución de 2.5 mM de ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoato) y 10 µl de una solución de 5 mM de acetilcolina iodada. El cambio en la absorbancia se registró durante 3 min por espectrofotometría a 412 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de 2-nitro-5-mercaptobenzoato producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 14 150 M⁻¹ cm⁻¹.

4. Actividad de la enzima glutatión-S-transferasa

La actividad de la GST se cuantificó utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) como sustrato.



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción conteniendo: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0), 10 µl de homogenato de hígado de rana diluido 1/100 para *L. latinasus* o 1/200 para *L. latrans* y 10 µl de una solución de 20 mM de 1-cloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB). El cambio en la absorbancia se registró durante 4 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de GS-DNB conjugado producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹.

5. Concentración de proteínas totales

Como las actividades enzimáticas arriba mencionadas se expresan en términos de la cantidad total de proteínas presentes en el homogenato, se determinaron éstas por el método colorimétrico de Lowry et al., (1951). En esta técnica las proteínas reaccionan

con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que genera un complejo proteína-cobre de color azulado. La intensidad del color depende de la cantidad de tirosina y triptófano presentes en las proteínas. La coloración presenta un máximo de absorbancia a 700 nm. Para las determinaciones, se incubaba a temperatura ambiente y durante 10 minutos, 50 µl del homogeneizado de hígado con 100 µl de del reactivo de Lowry, cuya solución se prepara en el momento y consta de (96.5% de Na₂CO₃, 1% de KNaC₄H₄O₆·4H₂O, 2% de CuSO₄ y 0.5% de NaOH al 1 M). Posteriormente se agregan 50 µl de solución de Folin-Ciocalteu fenol 2N diluido 1/10 y se incubaba a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de leer la absorbancia a 700 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG.

Análisis estadístico

1. Disponibilidad y consumo de alimento

Se comparó la disponibilidad de alimento en las zonas de bajos y cultivos de soja, analizando las variables de riqueza, abundancia y volumen total de artrópodos. Los datos presentados para cada sitio y fecha de muestreo representan el promedio de las capturas obtenidas en las estaciones de muestreo activadas en cada sitio. Las distintas variables fueron comparadas entre sitios y fecha con un ANOVA de dos factores seguido por un análisis de contrastes de Holm-Sidack cuando una diferencia significativa existía entre los grupos. Cuando los supuestos de normalidad e homocedacia asociados a la ANOVA de dos factores no se cumplían, se comparaban sitios y fechas de muestreo de manera separada por medio de una ANOVA de un factor seguida por una prueba de contraste de Holm-Sidack, o por una prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de contraste de Dunn's, según si se lograba o no respetar los supuestos de normalidad e homocedacia asociados a la ANOVA de un factor.

2. Índices corporales y biomarcadores

La influencia del LHC y sexo de los individuos sobre las distintas variables determinadas en estos animales fue examinada usando un modelo lineal generalizado (GLM). El modelo inicial era: variable de interés = LHC + Sexo + Sitio + Fecha + Sex*LHC + LHC*Sitio + LHC*Fecha + Sexo*Sitio +Sexo*Fecha + Sitio*Fecha. La significancia de los factores e interacciones de la ecuación fue testada con un test de F. Luego, las interacciones no significativas fueron removidas del modelo y los términos

significativos dejados en el nuevo modelo y vueltas a examinar con el mismo test. Esta secuencia de remoción de los términos no significativos siguió hasta quedarse solo con los términos significativos en el modelo final. Cuando alguna variable se encontraba influenciada por el LHC, se ajustó esta variable a un LHC promedio para todos los animales y se compararon los cuadrados mínimos de esta variable entre sitios y fechas de muestreo con el GLM, seguido por un test de Tukey para las comparaciones *a posteriori*. Los análisis de GLM se realizaron con el software Systat 1, la validez de los modelos evaluándose analizando la normalidad y la dispersión de los residuos del modelo final. El criterio de significancia fue de $p < 0.05$ en todos los casos.

Los parámetros que no eran influenciados por el largo corporal fueron analizados entre sitios y fechas de muestreo con ANOVA de dos factores seguido por un análisis de contrastes de Holm-Sidack cuando una diferencia significativa existía entre los grupos. Cuando los supuestos de normalidad e homocedacia asociados a la ANOVA de dos factores no se cumplían, se comparaban sitios y fechas de muestreo de manera separada por medio de una ANOVA de un factor seguida por una prueba de contraste de Holm-Sidack, o por una prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de contraste de Dunn's, según si se lograba o no respetar los supuestos de normalidad e homocedacia asociados a la ANOVA de un factor (**Fig. 7**). Cuando la comparación incluía solamente dos sitios o dos momentos de muestreo se utilizó una prueba de *t*. Si los supuestos de normalidad y homocedacia fallaban, se utilizaba la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples Dunn's, o la prueba de U de Mann-Whitney en los casos con solamente dos grupos a comparar. Estas pruebas estadísticas, se realizaron usando el software estadístico SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA). El criterio de significancia fue de $p < 0.05$ en todos los casos.

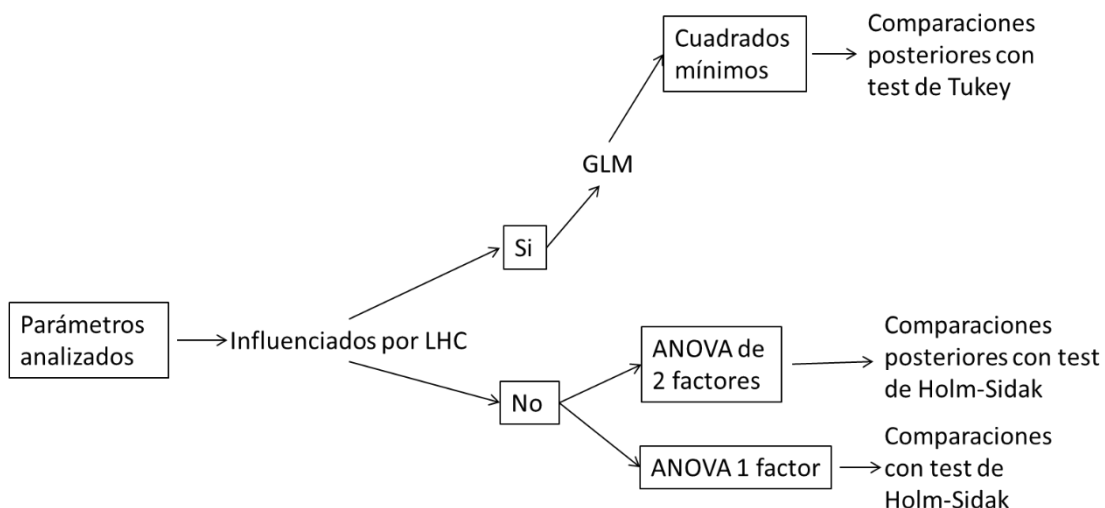


Figura 7. Esquema del análisis estadístico desarrollado para el estudio de los parámetros evaluados.

2.3 RESULTADOS

Determinación de plaguicidas en las muestras ambientales

Aunque se trabajó con un límite de detección muy bajo de $0.01\mu\text{g/L}$, no se detectó la presencia de tiametoxam o de lambdacialotrina en ninguna de las muestras de agua analizadas, ya sean provenientes de los muestreos realizados antes o 2 días después de la aplicación de plaguicidas.

En las muestras de suelo tomadas antes de la aplicación, se detectó la presencia de glifosato y de su metabolito AMPA en los sitios 2 y 4, pero no se encontraron evidencias de la presencia de tiametoxam o lambdacialotrina en ninguno de los sitios (**Tabla 4**). Con respecto a los suelos muestreados después de la aplicación, los sitios 2 y 4 siguieron presentando niveles de glifosato y AMPA similares a los detectados antes de la aplicación; un resultado esperable considerando que no se aplicó glifosato en estos dos sitios (**Tabla 4**). En términos de glifosato y AMPA, el cambio que se observó luego de la aplicación fue la aparición de detección de estas moléculas en el suelo del sitio 3 (**Tabla 4**), el único sitio en donde la mezcla de plaguicidas aplicada incluía glifosato (**Tabla 1**). Finalmente, en cuanto a tiametoxam o lambdacialotrina, si bien estos insecticidas fueron aplicados en todos los sitios (**Tabla 1**), después de la aplicación se encontraron estas moléculas solamente en las muestras de suelo del sitio 3 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Concentración de plaguicidas hallados en las muestras de suelo, antes de la aplicación (A) y luego de la aplicación de los plaguicidas (D4). SD: Sin detección. Los valores están expresados en µg/Kg

	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4	
	A	D4	A	D4	A	D4	A	D4
Tiametoxam	SD	SD	SD	SD	SD	190	SD	SD
Lambdacialotrina	SD	SD	SD	SD	SD	231	SD	SD
Glifosato	SD	SD	SD	35	SD	452,8	46	37,5
AMPA	SD	SD	532	1500	SD	370,6	1695,7	2025,5

Disponibilidad de alimento

En los lotes de soja, antes de la aplicación (A) se identificaron 44 familias, pertenecientes a 13 órdenes de artrópodos. En los sitios 1 y 4 los individuos más abundantes fueron los Hymenoptera (Formicidae) y en el 3 los coleóptera, salvo en el sitio 2 donde fue Collembola. En términos de volumen, los ítems de mayor tamaño varían según el sitio. En el sitio 1 los ítems de mayor tamaño fueron los Orthoptera, en el sitio 2 Anura y Coleoptera, en el sitio 3 Coleoptera, e Hymenoptera en el sitio 4 (**Tabla 5**). Cuatro días después de la aplicación (D4) se hallaron 37 familias, pertenecientes a 12 órdenes, disminuyendo en términos de riqueza familiar un 16% con respecto al muestreo previo a la aplicación. Los artrópodos que se encontraron en mayor cantidad siguieron siendo los Collembola en el sitio 2 y los Hymenoptera (Formicidae) en los sitios 1 y 4, aunque en menor cantidad que en el primer muestreo en el sitio 4 donde se aplicaron los plaguicidas y Arachnida en el sitio 3. Siguieron siendo abundantes en el sitio 1 los Homoptera, en el sitio 2 Díptera y Orthoptera en el sitio 4. Las presas de mayor volumen encontradas fueron los anuros en los sitios 2 y 4, pero evaluando estrictamente a los artrópodos lo fueron los Orthoptera en los sitios 1 y 3, Araneae en el sitio 2 y Coleoptera en el sitio 4 (**Tabla 6**).

En los bajos lindantes a los lotes de soja, antes de la aplicación (A) se encontraron 40 familias, lo que representa un nivel de riqueza de artrópodos equivalente al encontrado en los lotes de soja en la misma fecha. Al igual que en los lotes de soja, los individuos más abundantes pertenecían generalmente al orden de los Collembola en el sitio 2 y a los Hymenoptera (Formicidae), en el resto de los sitios. Los Coleoptera fueron los artrópodos más grandes encontrados en todos los sitios, salvo en el sitio 1, en donde los artrópodos de mayor tamaño pertenecían a orden de los Orthoptera (**Tabla 7**). En oposición a lo observado en los lotes de soja, donde bajo la riqueza de artrópodos

luego de la aplicación (D4), en los bajos cercanos la riqueza no fue disminuida por la aplicación de plaguicidas, identificándose 49 familias de artrópodos. Aumentó la abundancia de los dípteros con respecto al muestreo anterior, aunque con una leve disminución de Coleoptera, pero siguieron siendo abundantes los Collembola y los Hymenoptera (Formicidae). Con respecto al volumen, los especímenes más grandes corresponden a vertebrados del grupo Anura en los sitios 2 y 3, pero teniendo en cuenta a los artrópodos estrictamente lo fueron los Orthoptera en todos los sitios (**Tabla 8**).

Para expresar los resultados se emplearon gráficos de abundancia y volumen incluyendo a todas las familias, menos las tres más abundantes (Formicidae, Actaletidae y Poduridae), ya que los valores de abundancia tan grandes de estas familias en algunos sitios enmascararían el comportamiento de las familias importantes para la alimentación de los anuros. Las especies de anuros caídos en las trampas no se tuvieron en cuenta para los análisis de riqueza, abundancia y volumen, debido a que el muestreo se diseñó para la captura de artrópodos.

Tabla 5. Órdenes y familias de animales capturados en lotes de soja antes de la aplicación de plaguicidas en los cuatro sitios de muestreo en términos del número y del volumen de ejemplares capturados.

Antes Soja			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		
Clase	Orden	Familia	Nº Ejemp	Vol (mm3)	Nº Ejemp	Vol (mm3)	Nº Ejemp	Vol (mm3)	Nº Ejemp	Vol (mm3)	
Anfibia	Anura	R. arenarum			1	1308,33					
		R. fernandezae	1	487,22							
		Total	1	487,22	1	1308,33					
Anelida	Oligochaeta	Oligochaeta	1	104,67					2	209,33	
Arachnida	Acari	Acari	9	15,70							
		Araneae									
		Anyphaenidae							1	1,57	
		Araneidae			1	1,05					
		Gnaphosidae	1	0,79					1	1,05	
		Hahnidae	1	1,05					20	20,93	
		Indeterminado	1	1,05							
		Lycosidae	6	536,94	57	105,71	13	758,96	3	133,97	
		Tetragnathidae	1	1,57					1	1,05	
		Theraphosidae	1	16,35							
		Thomisidae	1	8,37							
		Total	12,00	566,12	58,00	106,76	13,00	758,96	26,00	158,57	
		Opilionida	Caddidae	1	8,37						
Crustacea	Isopoda	Oniscidae	9	295,16					2	216,66	
Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	1	14,65							
Insecta	Coleoptera	Carabidae			1	769,30	26	1420,33			
		Cerambycidae					2	47,10			
		Chrysomelidae	4	4,19							
		Curculionidae	1	37,68			3	92,37			
		Elateridae					1	37,68			
		Scarabaeidae	2	265,85	1	12,56					
		Staphilinidae	2	0,92	1	3,14			1	3,14	
		Total	9,00	308,64	3,00	785,00	32,00	1597,48	1,00	3,14	
		Collembola	Actaletidae	3	0,20			3	0,79	4	3,93
			Poduridae			1002	67,84	6	0,39		
	Total		3,00	0,20	1002,00	67,84	9,00	1,18	4,00	3,93	
	Dermaptera					1	1,83				
	Diptera	Cecidomyiidae					1	0,33	2	3,01	
		Chironomidae							1	0,46	
		Culicidae			1	5,89					
		Delichapodidae					1	1,57			
		Indeterminado			1	1,05	2	2,09			
		Heleomyzidae	5	17,01	21	22,77			9	9,42	
		Phoridae			1	1,05					
		Sphaeroceridae					1	1,05			
		Tipulidae	1	2,62							
		Trichoceridae	1	0,52							
		Total	7,00	20,15	24,00	30,76	5,00	5,04	12,00	12,89	
Heteroptera		Piesmatidae	2	26,17							
Homoptera		Cercopoidea	3	4,71			6	7,33			
	Jassoidea	22	67,77								
	Total	25,00	72,48			6,00	7,33				
Hymenoptera	Ampulicidae					1	1,57				
	Chalcididae	1	1,57								
	Formicidae	79	93,02	30	37,42	23	62,41	422	684,59		
	Vespidae	1	75,36								
	Total	81,00	169,95	30,00	37,42	24,00	63,98	422,00	684,59		
Lepidoptera	Nuctulidae			1	14,65						
Orthoptera	Acrididae	2	81,12			1	98,91				
	Gryllidae	4	598,69					5	35,71		
	Grillitalpidae					1	47,10				
	Total	6,00	679,81			2,00	146,01	5,00	35,71		
Total			167,00	2769,28	1119,00	2350,76	92,00	2581,80	474,00	1324,81	

Tabla 6. Órdenes y familias de animales capturados en lotes de soja después de la aplicación de plaguicidas en los cuatro sitios de muestreo en términos del número y el volumen de ejemplares capturados.

Después Soja			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		
Clase	Orden	Familia	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	
Anfibia	Anura	O. americanus			2	2093,33			1	1465,33	
		R. arenarum			1	942,00			1	1465,33	
		Total			3	3035,33			2	2930,67	
Anelida	Oligochaeta	Oligochaeta						1	104,67		
Arachnida	Acari	Araneidae	4	3,66							
		Araneae	1	0,20			1	1,05	1	0,20	
		Gnaphosidae							1	2,94	
		Hahniidae	6	4,97							
		Lycosidae	6	244,79	6	472,44	19	450,33	3	765,51	
		Theraphosidae	1	137,77							
		Theridiidae					2	11,51			
		Total	14,00	387,72	6,00	472,44	22,00	462,89	5,00	768,65	
		Opiliona	Caddidae	1	8,37						
		Crustacea	Isopoda	Oniscidae	2	94,99				10	274,36
Insecta	Coleoptera	Carabidae							1	1413,00	
		Cerambycidae	1	2,36	1	5,89	2	63,85			
		Curculionidae					1	37,68			
		Scarabaeidae			1	2,94					
		Total	1,00	2,36	2,00	8,83	3,00	101,53	1,00	1413,00	
		Collembola	Actaletidae	20	9,42					5	5,23
			Poduridae			3636	237,85				
			Sminthuridae	1	0,13						
			Total	21,00	9,55	3636,00	237,85			5,00	5,23
			Diptera	Asilidae			1	300,92			
		Cecidomyiidae		2	2,94			1	0,26	1	2,09
		Chironomidae						1	3,93		
		Culicidae				1	5,89				
		Delichapodidae		1	1,83	1	1,83				
		Indeterminado		1	2,09					2	3,14
		Heleomyzidae				11	12,30			2	2,09
		Muscidae		1	2,09						
		Phoridae		1	0,26	3	1,44	4	1,83		
		Sphaeroceridae		1	0,13					1	1,05
		Trichoceridae								1	2,09
Xylophagidae				1	32,71						
Total	7,00	9,35		18,00	355,09	6,00	6,02	7,00	10,47		
Heteroptera	Lygaeidae	1		21,26							
Homoptera	Cercopoidea	Fulgoroidea		4	25,12				2	4,25	
		Jassoidea	13	26,95	1	10,47	1	4,12			
		Total	17,00	52,07	1,00	10,47	3,00	8,37			
		Hymenoptera	Formicidae	97	122,34	1	0,92	10	20,93	65	153,27
	Sphecidae	1	25,12			1	0,20				
Total	98,00	147,46	1,00	0,92	11,00	21,13	65,00	153,27			
Lepidoptera	Larva	Nuctuidae	1	122,46	1	2,09	1	3,66			
		Total	1,00	122,46	1,00	2,09	1,00	3,66			
		Orthoptera	Acrididae	1	70,65	1	94,20	1	497,17	1	314,00
	Gryllidae	3	902,49	2	177,41	3	229,09	7	238,12		
Total	4,00	973,14	3,00	271,61	4,00	726,26	8,00	552,12			
Molusca	Gasteropoda			1	1,57						
Total			171,00	1832,40	3672,00	4396,20	52,00	1334,11	104,00	6212,42	

Tabla 7. Órdenes y familias de animales capturados en bajos lindantes a los lotes de soja antes de la aplicación de plaguicidas en los cuatro sitios de muestreo en términos del número y el volumen de ejemplares capturados.

Antes Bajos			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4				
Clase	Orden	Familia	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)			
Anfibia	Anura	R. fernandezae	1	487,22									
		O. americanus			2	228,70							
		Total	1,00	487,22	2,00	228,70							
Anelida	Oligochaeta	Oligochaeta	1	104,67	2	8,77	4	418,67					
Arachnida	Acari	Acari	9	15,70			2	7,07	2	1,31			
		Araneae	Araneidae					5	76,55				
			Gnaphosidae	1	0,79	1	4,71			1	1,31		
			Hahnidae	1	1,05					23	24,07		
			Indeterminado	1	1,05			3	3,14	1	1,05		
			Lycosidae	6	536,94	14	317,14	57	933,39	13	321,07		
			Salticidae					1	1,57				
			Tetragnathidae	1	1,57					2	11,91		
			Theraphosidae	1	16,35								
			Thomisidae	1	8,37								
			Total	12,00	566,12	15,00	321,85	66,00	1014,64	40,00	359,40		
			Crustacea	Opilionida	Caddidae	1	8,37						
					Isopoda	9	295,16					7	200,96
Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	1	14,65									
Insecta	Coleoptera	Carabidae			1	2,62	30	1909,12	3	549,50			
		Chrysomelidae	4	4,19									
		Curculionidae	1	37,68			4	146,01	1	37,68			
		Elateridae							1	42,39			
		Scarabaeidae	2	265,85	1	847,80	3	3297,52	1	1048,24			
		Staphilinidae	2	0,92			1	0,65					
		Total	9,00	308,64	2,00	850,42	38,00	5363,31	6,00	1677,81			
		Collembola	Actaletidae	3	0,20			4	0,85	5	1,83		
			Poduridae			3000	200,83	15	0,98				
		Total	3,00	0,20	3000,00	200,83	19,00	1,83	5,00	1,83			
		Diptera	Cecidomyiidae	Chironomidae			1	2,62					
				Heleomyzidae	5	17,01			1	1,05	7	7,85	
				Sciaridae					1	0,26			
	Tipulidae			1	2,62								
	Trichoceridae			1	0,52								
	Total			7,00	20,15	1,00	2,62	2,00	1,31	8,00	8,24		
	Heteroptera			Corixidae			1	12,56					
				Lygaeidae					1	1,57			
		Miridae							1	2,09			
		Piesmatidae	2	26,17									
	Total	2,00	26,17	1,00	12,56	1,00	1,57	1,00	2,09				
	Homoptera	Aphidoidea	Cercopoidea	3	4,71	2	3,14			7	8,37		
			Jassoidea	22	67,77			6	36,19	3	6,28		
			Total	25,00	72,48	5,00	5,76	5,62	36,19	10,00	14,65		
	Hymenoptera	Chalcididae	Formicidae	1	1,57			108	75,95	558	297,58		
			Vespidae	79	93,02	83	173,22						
				1	75,36								
Total			81,00	169,95	83,00	173,22	108,00	75,95	558,00	297,58			
Lepidoptera	Larva	Nuctidae					3	339,12					
								3,00	339,12	1,00	80,07		
		Total											
Orthoptera	Acrididae	Gryllidae	2	81,12									
			4	598,69	1	433,32	3	943,57	5	403,62			
		Total	6,00	679,81	1,00	433,32	3,00	943,57	5,00	403,62			
Molusca	Gasteropoda					1	18,84						
Diplopoda	Julida							1	7,85				
Total			167,00	2769,28	3112,00	2238,05	252,62	8212,06	644,00	3055,42			

Tabla 8. Órdenes y familias de animales capturados en bajos lindantes a los lotes de soja después de la aplicación de plaguicidas en los cuatro sitios de muestreo en términos del número y el volumen de ejemplares capturados.

Después Bajos			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		
Clase	Orden	Familia	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	N° Ejemp	Vol (mm3)	
Anfibia	Anura	R. fernandezae			1	143,92					
		L. latinasus			1	130,83	2	3244,67			
		O. americanus			3	2983,00					
		Total			5,00	3257,75	2,00	3244,67			
Arachnida	Acari	Acari	4	3,66			5	6,28			
		Araneae									
		Araneidae	1	0,20	2	2,09	9	49,52			
		Hahniidae	6	4,97	1	1,05			14	14,65	
		Lycosidae	6	244,79	17	963,46	14	447,58	11	215,61	
		Salticidae					2	2,36			
		Tetragnathidae							1	1,05	
		Theraphosidae	1	137,77							
		Total	14,00	387,72	20,00	966,60	25,00	499,46	26,00	231,31	
		Oplionida	Caddidae	1	8,37						
	Parasitiformes	Oxididae					1	0,13			
Crustacea	Isopoda	Oniscidae	2	94,99					2	43,44	
Insecta	Coleoptera	Carabidae			2	299,35	1	47,10			
		Cerambycidae	1	2,36			1	32,97	1	89,75	
		Chrysomelidae							1	1,57	
		Curculionidae					3	81,51			
		Dyctiscidae			1	66,99					
		Meloidae					1	117,23			
		Scarabaeidae			2	5,89	3	84,78	3	5,63	
		Staphilinidae					4	1,05			
			Total	1,00	2,36	5,00	372,23	13,00	364,63	5,00	96,95
			Collembola	Actaletidae	20	9,42					3
			Poduridae			5250	343,44				
			Sminthuridae	1	0,13						
		Total	21,00	9,55	5250,00	343,44			3,00	3,14	
		Dermaptera				1	217,71				
		Diptera	Cecidomyiidae	2	2,94			1	0,39		
			Chloropidae						2	2,09	
			Chironomidae			1	2,09				
			Culicidae			1	2,62				
			Delichapodidae	1	1,83						
			Indeterminado	1	2,09			2	2,09	1	1,05
		Heleomyzidae			6	6,28			9	9,42	
		Muscidae	1	2,09							
		Phoridae	1	0,26	1	1,05			3	2,36	
		Sciaridae					1	12,56			
		Sphaeroceridae	1	0,13	1	0,20	2	2,09	2	2,62	
		Trichoceridae					4	9,42	2	4,19	
		Xylophagidae					1	1,57	1	14,65	
		Total	7,00	9,35	10,00	12,24	11,00	28,13	20,00	36,37	
	Heteroptera	Lygaeidae	1	21,26			3	7,85	1	14,65	
		Piesmatidae					1	13,08			
		Total	1,00	21,26			4,00	20,93	1,00	14,65	
	Homoptera	Cercopoidea			37	43,18	5	7,85	4	5,50	
		Fulgoroidea	4	25,12	2	12,04	1	2,09			
		Jassoidea	13	26,95	18	71,17	16	33,10	1	1,05	
		Total	17,00	52,07	57,00	126,39	22,00	43,04	5,00	6,54	
	Hymenoptera	Ampulicidae					1	83,34			
		Chalcididae					1	0,13			
		Formicidae	97	122,34	7	11,19	42	68,30	98	66,53	
		Pompilidae			1	20,93					
		Sphecidae	1	25,12							
		Total	98,00	147,46	8,00	32,12	44,00	151,77	98,00	66,53	
	Lepidoptera	Larva			1	3,14					
		Nuctuidae	1	122,46	5	79,55					
		Total	1,00	122,46	6,00	82,69					
	Orthoptera	Acrididae	1	70,65	3	509,50	2	17,79			
		Gryllidae	3	902,49	2	1375,32	9	2748,02	1	261,67	
		Grillitalpidae							1	70,65	
		Total	4,00	973,14	5,00	1884,82	11,00	2765,82	2,00	332,32	
	Thysanoptera				1	0,20					
	Total	Total	171,00	1832,40	5368,00	7296,17	138,00	7124,86	162,00	831,25	

Antes de la aplicación (A) en los cultivos de soja, la riqueza, la abundancia y el volumen de los invertebrados caídos en las trampas no demostraron diferencias significativas entre los sitios. Cuatro días después de la aplicación (D4), la riqueza fue significativamente menor en todos los sitios donde hubo una aplicación respecto al sitio 1, donde no se aplicaron plaguicidas (**Fig. 8a**). Con respecto a la abundancia de artrópodos expresada en términos de número de individuos capturados, los sitios 3 y 4 presentaron un número de capturas significativamente menor al sitio 1 (**Fig 8b**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el volumen total de artrópodos capturados en los cuatro sitios muestreados (**Fig. 8c**), y tampoco se notó una diferencia significativa en la riqueza, abundancia o volumen de artrópodos capturados dentro de un mismo sitio antes y después de la aplicación (**Fig. 8**).

En los bajos, la única diferencia encontrada en cuanto a la riqueza, abundancia o volumen de artrópodos encontrados dentro de un mismo sitio antes y después de la aplicación, fue un aumento significativo de la riqueza de artrópodos que se registró después de la aplicación de los plaguicidas en el sitio 2 ($p=0.029$) (**Fig 9a**). No se observó ninguna diferencia significativa entre sitios en los parámetros determinados (**Fig 9**).

De manera general, la riqueza, cantidad y volumen de artrópodos tendían a ser superior en los bajos que en los lotes de soja tanto antes como después de la aplicación de plaguicidas. Antes de la aplicación, esta tendencia era significativa para la riqueza de invertebrados en todos los sitios (**Fig. 10**) y en el sitio 3 en términos de volumen (**Fig. 12**). Después de la aplicación (D4), la tendencia era significativa cuando fue expresada en términos de abundancia de artrópodos donde los bajos tuvieron más que los cultivos de soja (**Fig. 11**).

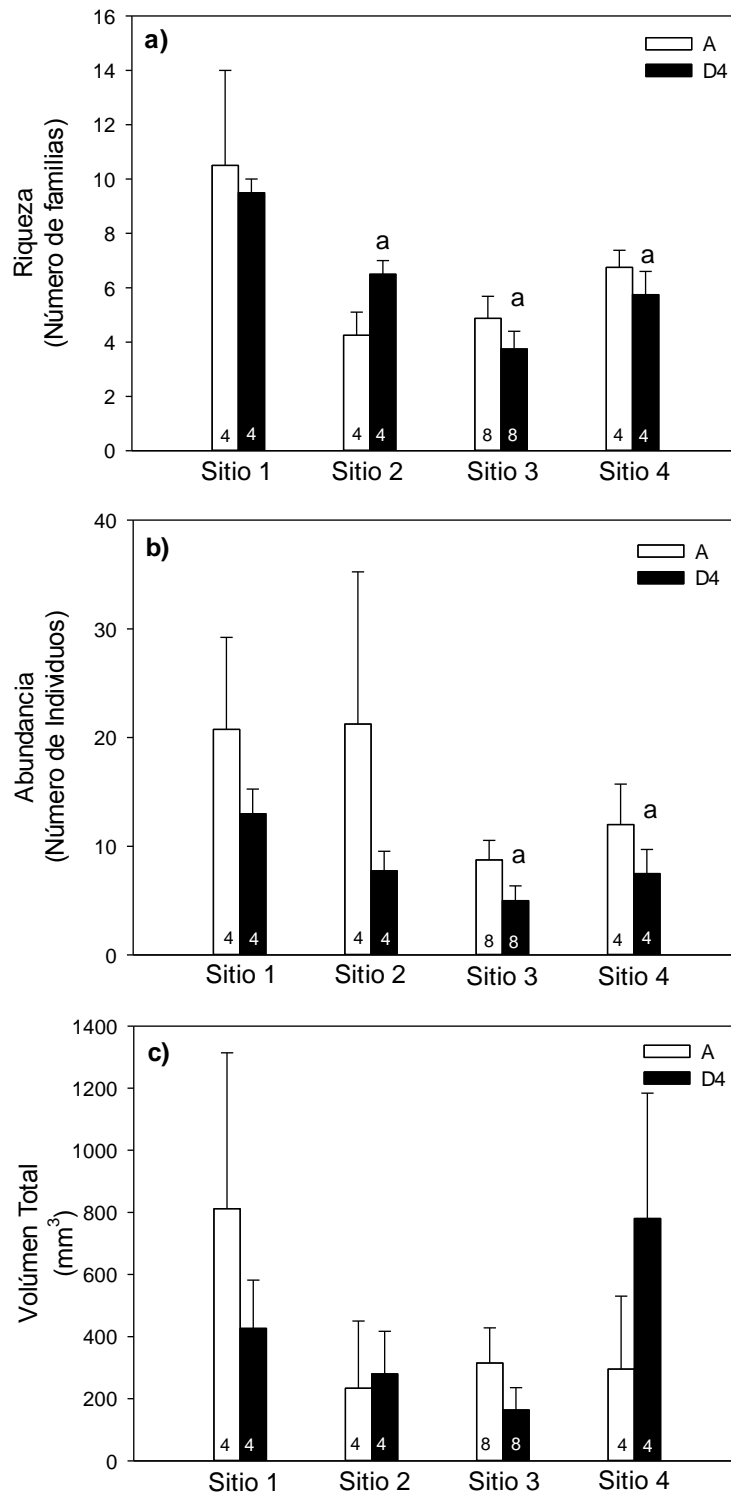


Figura 8. Artrópodos capturados (media \pm error estándar) en las trampas de caída desplegadas en los lotes de soja. **a)** Riqueza **b)** Abundancia y **c)** Volumen total de los artrópodos capturados. a Significativamente diferente al sitio 1 en D4 ($p < 0.001$). El valor dentro de las barras corresponde al número de estaciones de muestreo.

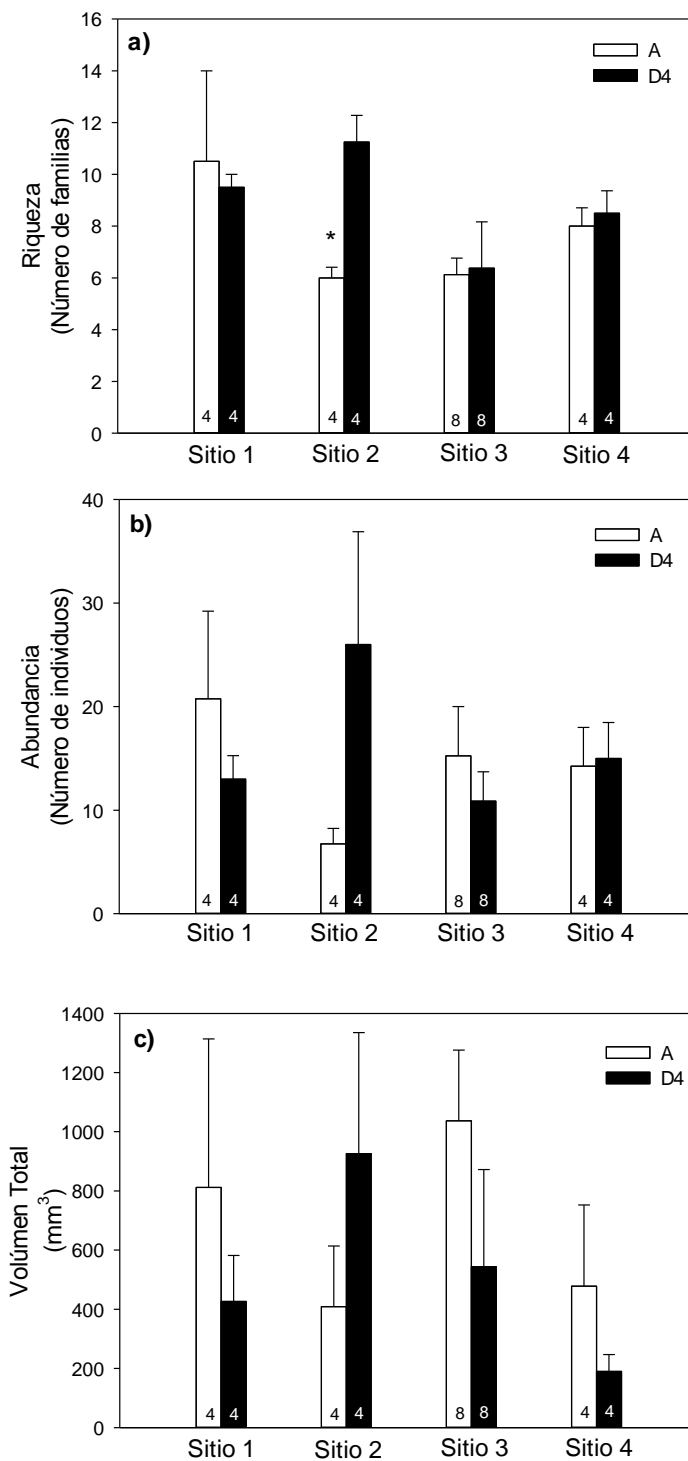


Figura 9. Artrópodos capturados (media \pm error estándar) en las trampas de caída desplegadas en los bajos lindantes a los lotes de soja. **a)** Riqueza **b)** Abundancia y **c)** Volumen total de los artrópodos capturados. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de estaciones de muestreo.

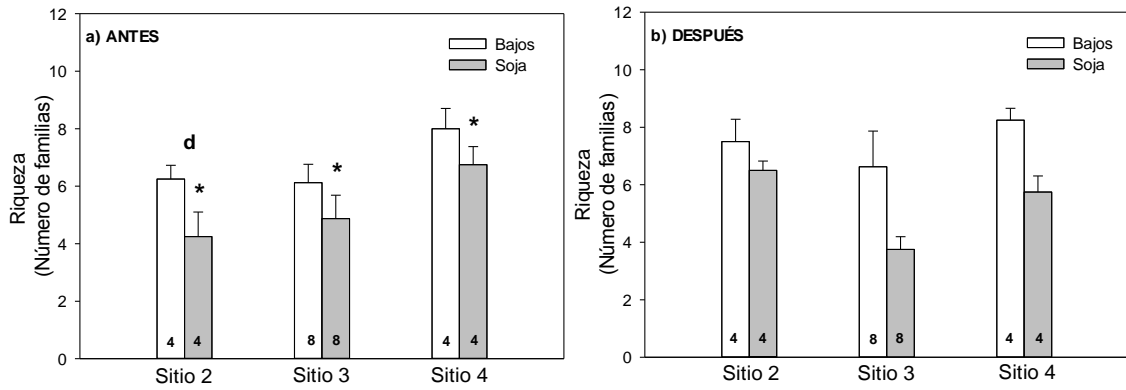


Figura 10. Riqueza de artrópodos capturados en las trampas de caída (media \pm error estándar) en los ambientes de soja y bajos. El valor dentro de las barras corresponde al número de estaciones de muestreo. d Diferencias significativas con el sitio 4. * Diferencias entre los bajos y la soja en cada sitio.

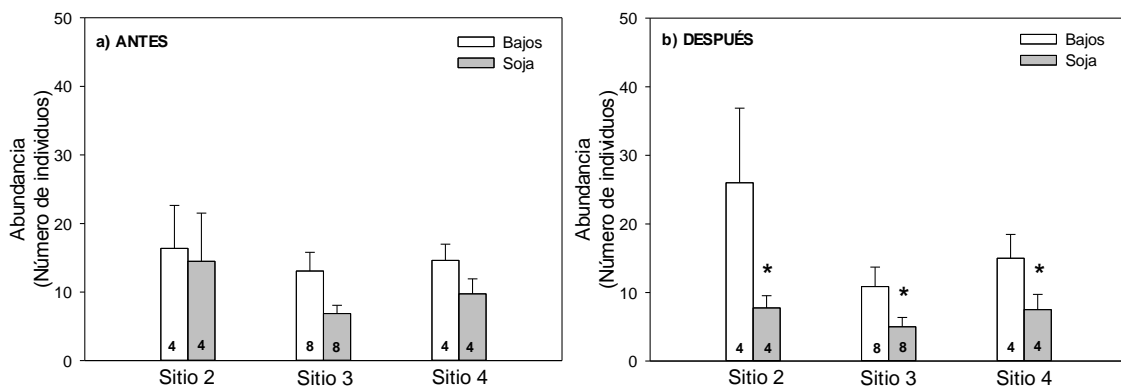


Figura 11. Abundancia de artrópodos capturados en las trampas de caída (media \pm error estándar) en los ambientes de soja y bajos. El valor dentro de las barras corresponde al número de estaciones de muestreo. * Diferencias entre los bajos y la soja en cada sitio.

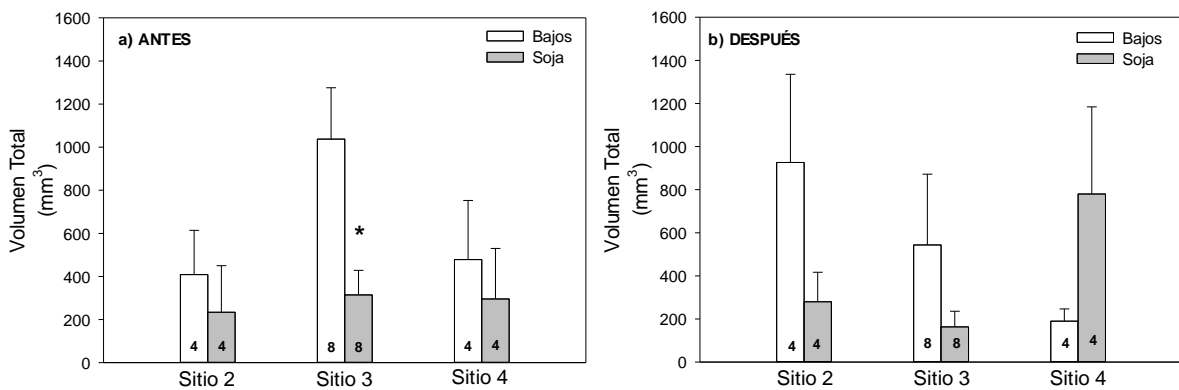


Figura 12. Volumen total (mm^3) de artrópodos capturados en las trampas de caída (media \pm error estándar) en los ambientes de soja y bajos. El valor dentro de las barras corresponde al número de estaciones de muestreo

Dieta

A) *Leptodactylus latrans*

En el muestreo antes de la aplicación (A) se analizaron 74 aparatos digestivos (estómagos + intestinos) de los cuales, 62 tenían contenido. Se identificaron 309 ejemplares de 13 taxa, que correspondieron a 16707 mm³. La contribución de cada presa a la dieta de la especie según el índice de importancia relativa IRI ordenados de mayor a menor, fue la siguiente: Coleóptera en todos los sitios, seguido por larvas de Lepidóptera y Hemiptera en los sitios 1 y 2, respectivamente. El índice de selectividad (D) de Jacob (1974) también presentó valores positivos para los ítems nombrados, por lo que *Leptodactylus latrans* selecciona estas presas (**Tabla 9 y 10**).

Dos días después de la aplicación (D2), se analizaron 47 aparatos digestivos de los cuales 38 tuvieron algún tipo de contenido. Se identificaron 88 ejemplares de 17 taxa que representaron 5511 mm³. En el índice de importancia relativa (IRI) Coleóptera fue el principal ítem para ambos sitios, seguidos por Hemiptera y Homoptera en los sitios 2 y 3 respectivamente. En este muestreo no se analizó, el índice de selectividad (D), debido a que no tuvimos datos de disponibilidad de alimento porque las trampas debían estar activas por lo menos 4 días (**Tabla 9 y 10**).

Se analizaron en el muestreo cuatro días después de la aplicación (D4), 82 aparatos digestivos de los cuales 62 tenían contenido. Se identificaron 155 ejemplares de 19 taxa que representaron 24951 mm³ de volumen. Según el IRI, la contribución de cada presa a la dieta fue la siguiente: Coleóptera en casi todos los sitios, salvo en el 2, donde el ítem más importante fue Anura. Le siguieron los Homoptera en los sitios 1 y 3, Coleoptera en el sitio 2 y Hemiptera en el sitio 4. El índice de selectividad (D) mostró valores positivos en todos los ítems. Igualmente el número de anuros capturados en las trampas de caída, pudo estar sesgado debido a que las trampas no eran del tamaño adecuado para este grupo de animales (**Tabla 9 y 10**).

Con respecto al número de presas consumidas por los anuros adultos en los diferentes sitios y muestreos; antes de la aplicación (A), los anuros del sitio 4 capturaron menos presas que las del sitio 1 y 3. Cuatro días después de la aplicación (D4), los anuros de los sitios 1 y 4 presentaron valores menores de consumo al sitio 3. Y además, los sitios 1 y 3 variaron significativamente entre los distintos muestreos. Los anuros del sitio 1 tuvieron menor consumo de presas 4 días después de la aplicación. Y los anuros del sitio 2 también consumieron menos presas 2 días después de la aplicación en comparación con el muestreo previo (**Fig. 13a**).

Entre los muestreos realizados antes (A) y después de la aplicación (D2 y D4), los anuros consumieron un menor número y volumen de presas en los sitios 1, donde no hubo aplicaciones, y en 3; lo que indicaría que esta baja en el consumo se debió a algún factor natural (**Fig. 13a y 13b**).

Antes de la aplicación (A), las ranas del sitio 3 capturaron mayores cantidades y volúmenes de presas en comparación con las de los sitios 1, 2 y 4; el 50% las ranas del sitio 4 no presentó ningún tipo de contenido, lo que se observó en las diferencias significativas con los sitios 1 y 3 (**Fig. 13a y 13b**).

Cuatro días después de la aplicación (D4), el 34% de las ranas del sitio 2 se alimentaron de otros anuros por eso se observa ese importante error, algo que el muestreo previo ocurrió solo en un 7% (**Fig. 13b**).

Tabla 9. Contenido estomacal de *Leptodactylus latrans* en los diferentes muestreos: Antes de la aplicación (A), dos días después de la aplicación (D2) y cuatro días después de la aplicación (D4). %N= porcentaje de la categoría en el total de las presas; %V= porcentaje del volumen de la categoría en el volumen total. Los valores entre paréntesis corresponden a los aparatos digestivos con algún ítem alimenticio en su interior.

Item alimenticios		Sitio 1				Sitio 2						Sitio 3						Sitio 4			
		A (21)		D4 (16)		A (13)		D2 (18)		D4 (16)		A (20)		D2 (20)		D4 (20)		A (8)		D4 (10)	
Orden	Familia	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V
Anfibia	Anura	--	--	--	--	3.13	31.43	1.79	15.48	36.67	88.79	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Araneae		0.75	2.37	--	--	6.25	1.53	--	--	3.33	0.21	3.82	0.77	--	--	4.48	3.94	--	--	--	--
	Lycosidae	--	--	--	--	6.25	1.53	--	--	3.33	0.21	1.53	0.34	--	--	4.48	3.94	--	--	--	--
Isopoda	Oniscidae	--	--	--	--	--	--	5.36	5.80	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Blatodea		--	--	--	--	--	--	1.79	4.53	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Coleoptera		42.54	33.76	48.28	36.92	59.4	17.3	32.14	29.54	40.00	8.08	77.86	92.20	59.38	47.17	34.33	10.59	100.00	100.00	51.72	15.53
	Bruchinidae	5.97	7.62	--	--	3.13	0.90	14.29	2.71	--	--	--	--	--	--	1.49	0.39	--	--	13.79	4.26
	Carabidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	42.75	50.57	--	--	--	--	--	--	--	--
	Chrysomelidae	1.49	2.67	--	--	12.50	3.64	1.79	8.71	16.67	2.31	0.76	0.14	3.13	5.98	--	--	--	--	--	--
	Coccinellidae	--	--	3.45	3.19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3.45	3.04
	Curculionidae	11.94	16.59	17.24	15.58	9.38	3.08	--	--	3.33	5.34	13.74	8.56	--	--	16.42	5.40	16.67	23.31	13.79	3.65
	Elatерidae	0.75	0.44	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	8.33	14.24	6.90	1.22	--	--
	Scarabaeidae	0.75	0.59	--	--	--	--	--	3.33	0.06	6.87	28.60	--	--	--	8.33	14.16	--	--	--	--
Dermaptera		--	--	--	--	--	--	5.36	2.76	--	--	--	--	--	--	1.49	0.89	--	--	3.45	0.15
Diptera		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2.99	0.06	--	--	--	--
Hemiptera		0.75	2.06	6.90	21.25	12.50	32.98	25.00	28.09	10.00	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	41.38	82.80
	Pentatomidae	0.75	2.06	--	--	6.25	20.01	17.86	21.73	10.00	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	41.38	82.80
Heteroptera	Belestomatidae	--	--	--	--	--	--	--	--	3.33	1.71	0.76	1.45	6.25	8.32	--	--	--	--	--	--
Homoptera		--	--	31.03	24.70	3.13	2.40	--	--	--	--	--	--	15.63	34.17	17.91	26.58	--	--	--	--
	Aphidae	--	--	3.45	0.03	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.49	0.00	--	--	--	--
	Cicadoidea	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	13.43	26.28	--	--	--	--
Hymenoptera		--	--	3.45	0.71	9.38	0.65	--	--	--	--	--	--	9.38	0.40	20.90	7.88	--	--	--	--
	Formicidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9.38	0.40	10.45	0.39	--	--	--	--
	Vespididae	--	--	--	--	3.13	0.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Larva		48.51	52.46	--	--	--	--	--	--	--	--	16.79	3.30	--	--	4.48	0.12	--	--	--	--
Odonata		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.49	0.03	--	--	--	--
Orthoptera		7.46	9.35	10.34	16.41	6.25	13.72	28.57	13.80	6.67	0.20	0.76	2.27	9.38	9.95	11.94	49.91	--	--	3.45	1.52
	Grillidae	--	--	--	--	--	--	1.79	0.48	--	--	--	--	--	--	2.99	14.88	--	--	--	--
	Grillotalpidae	--	--	--	--	3.13	12.83	--	--	--	--	--	--	--	--	2.99	32.14	--	--	--	--
		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 10. Contenido estomacal de *Leptodactylus latrans* en los diferentes muestreos: Antes de la aplicación (A) y cuatro días después de la aplicación (D4). IRI= Índice de importancia relativa de cada categoría; D= índice de selectividad. Los valores entre paréntesis corresponden a los aparatos digestivos con algún ítem alimenticio en su interior.

Item alimenticios		Sitio 1				Sitio 2					Sitio 3					Sitio 4								
		A (21)		D4 (16)		A (13)		D2 (18)			D4 (16)			A (20)		D2 (20)			D4 (20)		A (8)		D4 (10)	
Orden	Familia	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	IRI	D	IRI	D	IRI	IRI	D	IRI	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D
Anfibia	Anura	--	--	--	--	265,77	0,27	95,91	6272,92	0,75	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Araneae		14,84	-0,81	--	--	119,71	-0,35	--	22,17	-1,00	91,77	-0,77	--	84,21	-1,00	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Lycosidae	--	--	--	--	119,71	-0,35	--	22,17	-0,65	18,67	-0,88	--	84,21	-0,40	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Isopoda	Oniscidae	--	--	--	--	--	--	62,01	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Blatodea		--	--	--	--	--	--	35,11	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Coleoptera		5813,23	0,73	6922,52	0,97	7665,91	0,92	4112,22	2103,68	0,76	15305,94	0,44	7990,61	2470,34	0,50	20000,00	0,73	5379,95	0,86					
	Bruchinidae	194,16	1,00	--	--	30,93	1,00	472,06	--	--	--	--	--	9,40	1,00	--	--	541,65	1,00					
	Carabidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4666,05	0,46	--	--	--	--	--	--	--					
	Chrysomelidae	39,61	-0,23	--	--	496,60	1,00	58,29	237,15	1,00	4,53	1,00	45,52	--	--	--	--	--						
	Coccinellidae	--	--	82,95	1,00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	64,92	1,00					
	Curculionidae	1494,58	0,90	820,64	1,00	191,59	1,00	--	21,23	1,00	1226,71	0,79	--	654,58	0,76	999,40	0,87	523,38	1,00					
	Elateridae	5,67	1,00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	282,22	0,75	162,28	1,00					
	Scarabaeidea	6,38	-0,23	--	--	--	--	--	54,18	0,30	532,04	0,70	--	--	--	281,19	0,75	--	--					
Derm aptera		--	--	--	--	--	--	90,16	--	--	--	--	--	11,93	1,00	--	--	36,00	1,00					
Diptera		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	15,21	-0,46	--	--	--	--					
Hemiptera		13,35	1,00	175,93	1,00	1049,55	1,00	2064,59	137,51	1,00	--	--	145,65	--	--	--	--	4967,21	1,00					
	Pentatomidae	13,35	1,00	--	--	403,99	1,00	879,70	137,51	1,00	--	--	--	--	--	--	--	4967,21	1,00					
Heteroptera	Belestomatidae	--	--	--	--	--	--	--	31,51	1,00	11,08	0,32	--	--	--	--	--	--	--					
Homoptera		--	--	1741,85	0,45	42,54	-0,18	--	--	--	--	--	497,93	1334,68	0,00	--	--	--	--					
	Aphidae	--	--	21,74	1,00	--	--	--	--	--	--	--	--	7,48	1,00	--	--	--	--					
	Cicadoidea	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	794,21	1,00	--	--	--	--					
Hymenoptera		--	--	25,98	-0,93	231,33	-0,91	--	--	--	--	--	--	1007,23	-0,34	--	--	--	--					
	Formicidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	48,87	108,35	-0,55	--	--	--	--					
	Vespidae	--	--	--	--	24,72	1,00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--					
Larva		4327,22	1,00	--	--	--	--	--	--	--	502,44	1,00	--	23,00	1,00	--	--	--	--					
Odonata		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7,61	1,00	--	--	--	--					
Orthoptera		800,59	0,34	501,67	0,63	307,30	0,75	1883,03	85,87	0,19	15,16	-0,22	289,90	1236,93	0,18	--	--	49,70	0,47					
	Grillidae	--	--	--	--	--	--	1883,03	--	--	--	--	--	178,65	-0,38	--	--	--	--					
	Grillotalpidae	--	--	--	--	122,70	1,00	--	--	--	--	--	--	175,63	1,00	--	--	--	--					

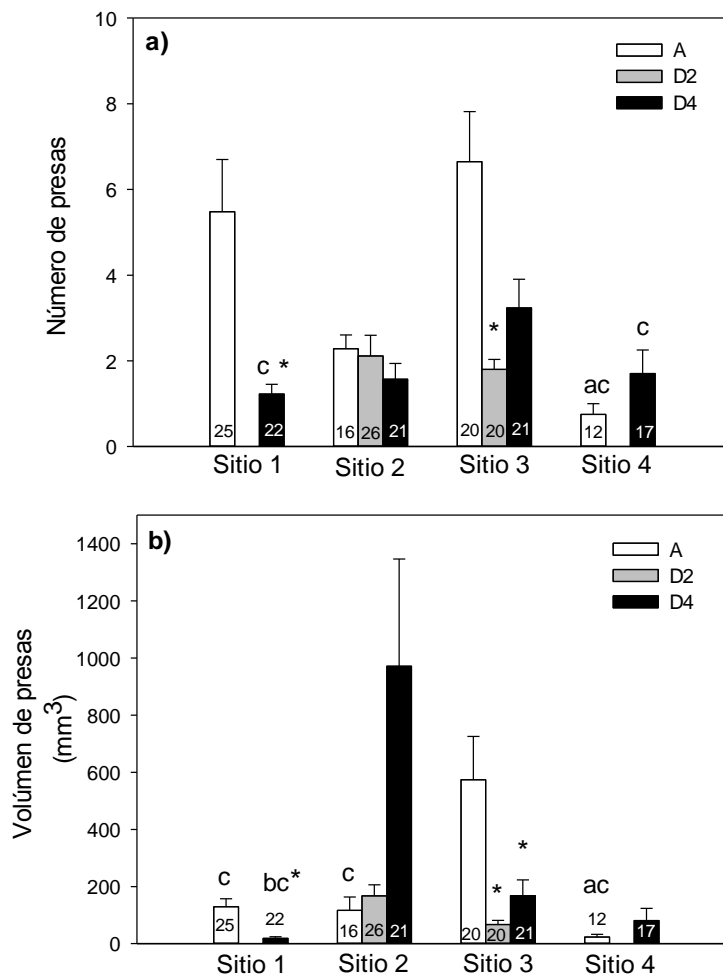


Figura 13. Presas consumidas (media \pm error estándar) por *Leptodactylus latrans* en los sitios de captura. a) Número de presas b) Volumen total de las presas consumidas. a Significativamente diferente al sitio 1. b significativamente diferente al sitio 2. c Significativamente diferente al sitio 3 ($p < 0.05$). * Diferencias antes de la aplicación (A). Los valores dentro, y sobre las barras corresponden al número de individuos analizados.

Anfibios: condición corporal, índices somáticos y biomarcadores

A) *Leptodactylus latrans*

La cantidad de hembras y machos muestreados fue generalmente equivalente en todos los sitios y para todas las fechas de muestreo, salvo en el sitio 4 donde la captura de hembras fue menor que en el resto de los sitios (**Fig. 14**). En esta especie de gran tamaño, tanto la relación peso corporal- LHC como la relación grasa corporal-LHC eran exponenciales, ilustrando que la alometría rige el crecimiento en *L. latrans* confirmando la necesidad de utilizar, para esta especie, índices escalados para comparar la condición corporal y la grasa corporal entre sitios y fechas de muestreo (**Fig. 15a y 15b**).

El análisis de GLM demostró que, en *L. latrans*, el ICE y la actividad de GST son las dos únicas variables que no dependen de manera significativa del LHC. La condición corporal (**Fig. 16**) y los biomarcadores GSH, CAT y ChE disminuyen sus valores con el aumento de LHC, mientras que IHS, GCE e IGS aumentan con el largo del animal (datos no ilustrados). Además, los índices IGS y GCE son significativamente influenciados por el sexo de los individuos; las hembras presentan valores superiores a los machos (datos no ilustrados; $p < 0.0001$ y $p = 0.024$, respectivamente). Por esta razón, las comparaciones de estos índices entre sitios y fechas de muestreo se realizaron de manera separada para los machos y las hembras.

En todos los sitios, la condición corporal aumento significativamente entre los muestreos realizados antes (A) y después (D2 y D4) de la aplicación de plaguicidas; ilustrando el crecimiento de los animales de esta especie a medida que pasan los días de verano (**Fig. 17**). Sin embargo, este aumento generalizado de la condición corporal se vio asociado a un aumento de la cantidad de grasa corporal únicamente en los machos del sitio 1 (**Fig. 18b**), la GCE de las hembras y de los otros grupos de machos, fueron equivalente entre las distintas fechas y sitio de muestreo (**Fig.18**). El rol limitado de la grasa corporal en la condición corporal de *L. latrans* es ilustrado por la regresión entre la condición corporal escalada y la grasa corporal escalada que demuestra que la masa de grasa del animal explica solamente el 19% de su condición corporal. Dichos resultados sugieren que otros tipos de reservas energéticas también son implicados en la condición corporal de *L. latrans* (**Fig. 19**).

Si bien el índice hepatosomático (IHS) presentó una tendencia hacia la disminución a los 4 días después de aplicar (D4) en los sitios 1, 3 y 4, esta tendencia era estadísticamente significativa solamente en el sitio 1. De manera general, los anfibios del sitio 2 presentaban un IHS superiores a las de los otros sitios, especialmente en (D4) (**Fig. 20a**). Llamativamente, el índice de contenido estomacal (ICE) varió de manera similar al IHS, los anuros del sitio 2 presentaron valores generalmente más altos que la de los otros sitios, especialmente en D4, y los anfibios del sitio 1 presentando un ICE significativamente inferior en D4 que antes de la aplicación de plaguicidas (**Fig.20b**).

El índice gonadosomático (IGS) presentó generalmente pocas variaciones entre los sitios y las fechas de muestreo, la única diferencia significativa observada fue en machos, los anuros del sitio 1 presentaron un GSI inferior a la de los sitios 2 y 3 antes de la aplicación (A) (**Fig. 21**).

Con respecto a los biomarcadores, muy pocas diferencias se observaron entre los sitios y las fechas de muestreo y en ningún momento se observó una diferencia significativa dentro de un mismo sitio entre las determinaciones realizadas antes y 2 o 4 días después de la aplicación de plaguicidas (**Fig. 22**).

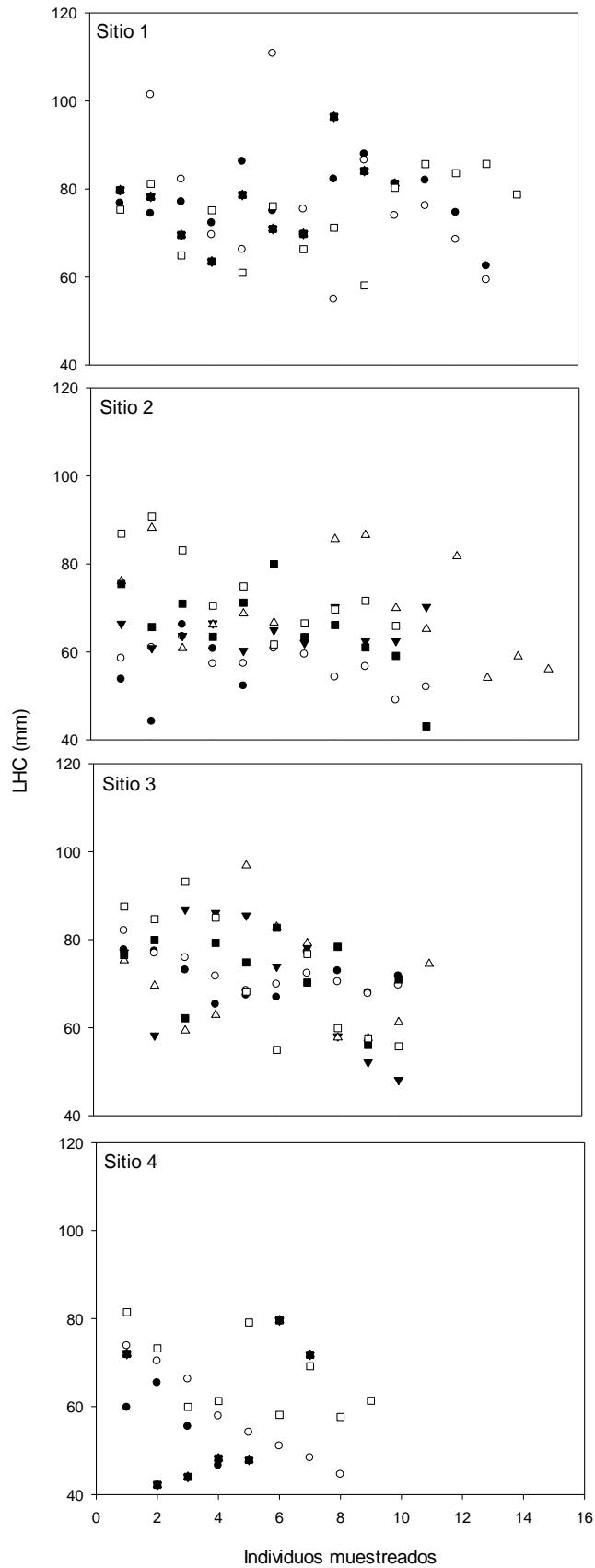


Figura 14. Largo hocico-cloaca (LHC) de las ranas capturadas en los diferentes sitios de muestreo para la especie *Leptodactylus latrans*. Antes de la aplicación: Machos \diamond , Hembras \blacklozenge ; 2 días después de la aplicación: Machos \triangle , Hembras \blacktriangledown ; Cuatro días después de la aplicación: Machos \square , Hembras \blacksquare

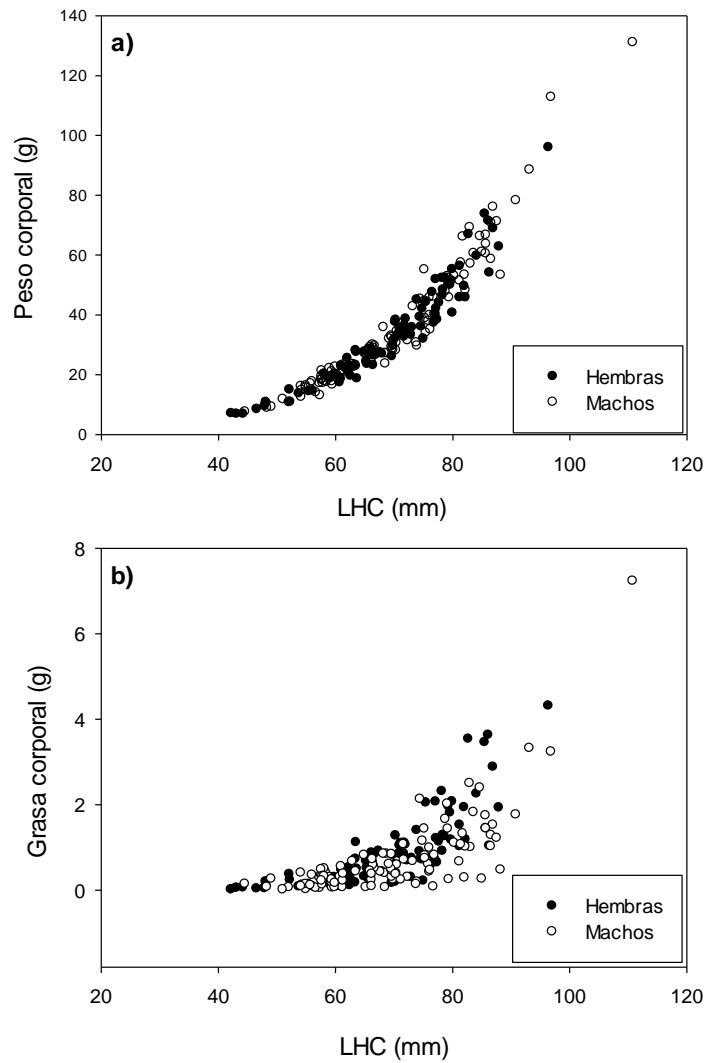


Figura 15. Relación entre a) peso corporal y b) grasa corporal y el largo (LHC) de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans*.

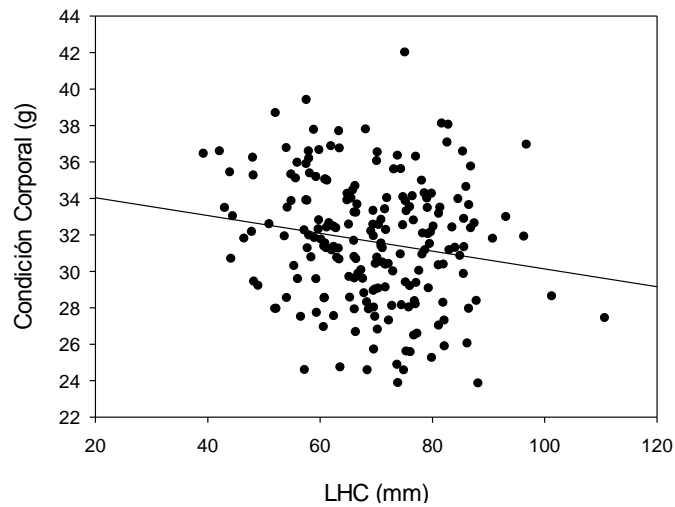


Figura 16. Relación entre la condición corporal escalada y el largo hocico-cloaca (LHC) de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans*.

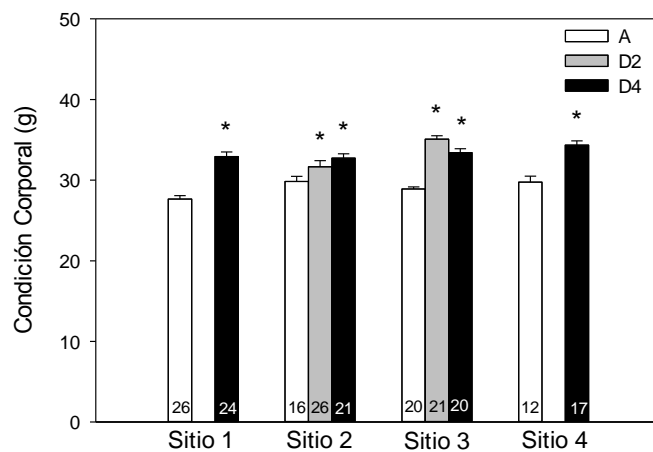


Figura 17. Condición corporal escalada de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans* (media \pm error estándar). * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

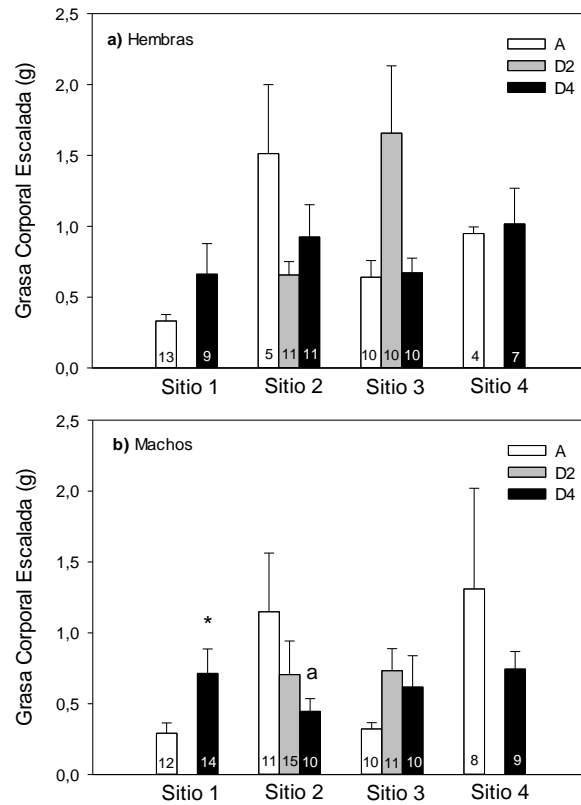


Figura 18. Grasa corporal escalada (media \pm error estándar) de los individuos a) hembras y b) machos de la especie *Leptodactylus latrans*. a Significativamente diferente del sitio 1 en la misma fecha de muestreo. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

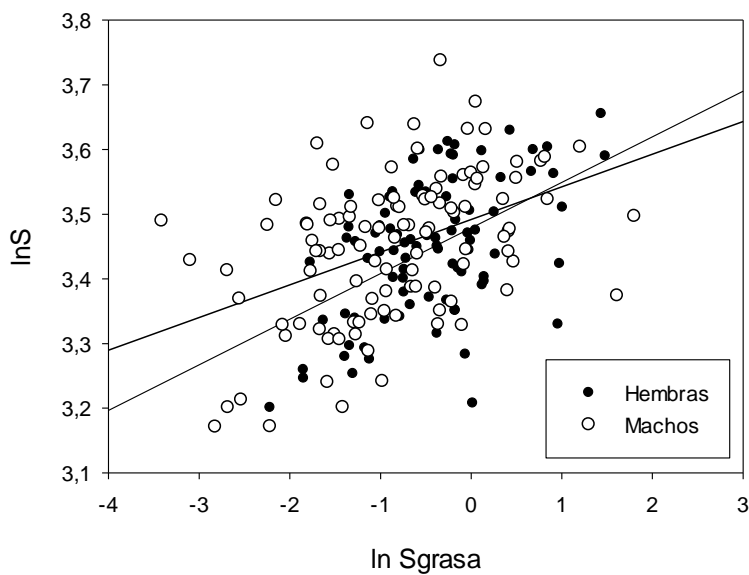


Figura 19. Relación entre la condición corporal escalada y la grasa corporal escalada de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans*.

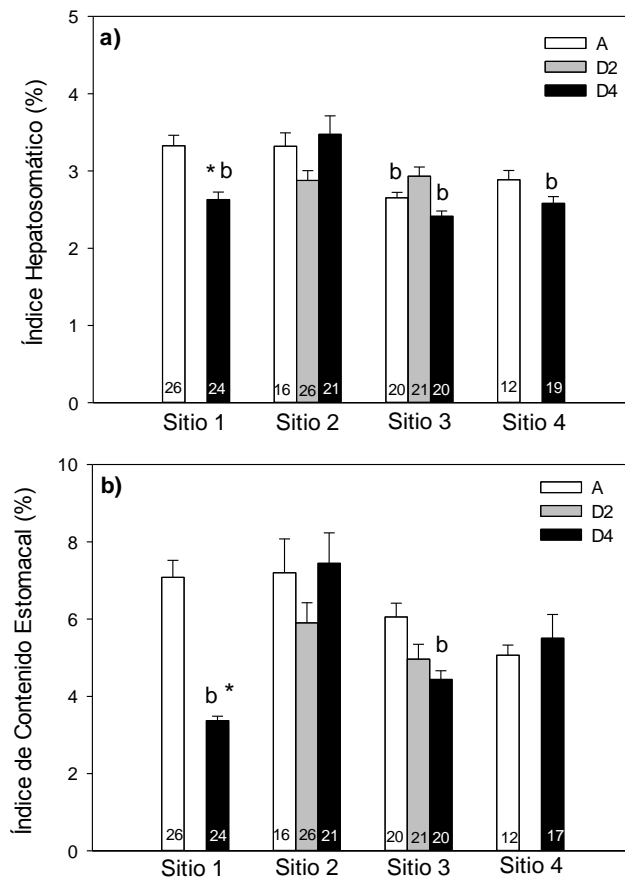


Figura 20. a) Índice hepatosomático y **b)** Índice de contenido estomacal (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans*. **b** significativamente diferente con el sitio 2 en la misma fecha de muestreo. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

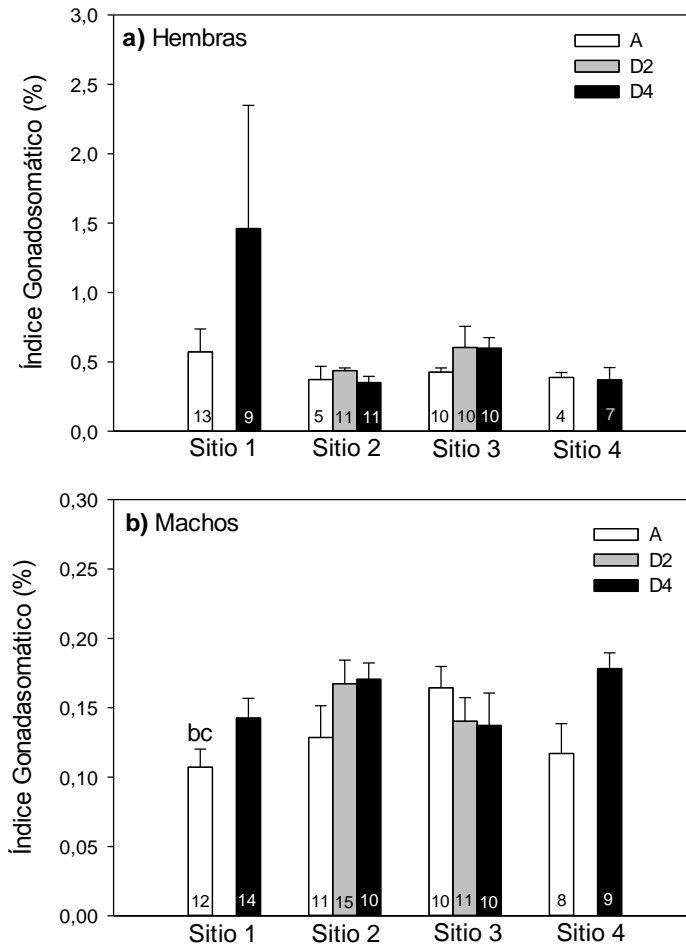


Figura 21. Índice gonadosomático **a)** hembras y **b)** machos (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *Leptodactylus latrans*. bc significativamente diferente a los sitios 2 y 3 en las mismas fechas de muestreo. El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

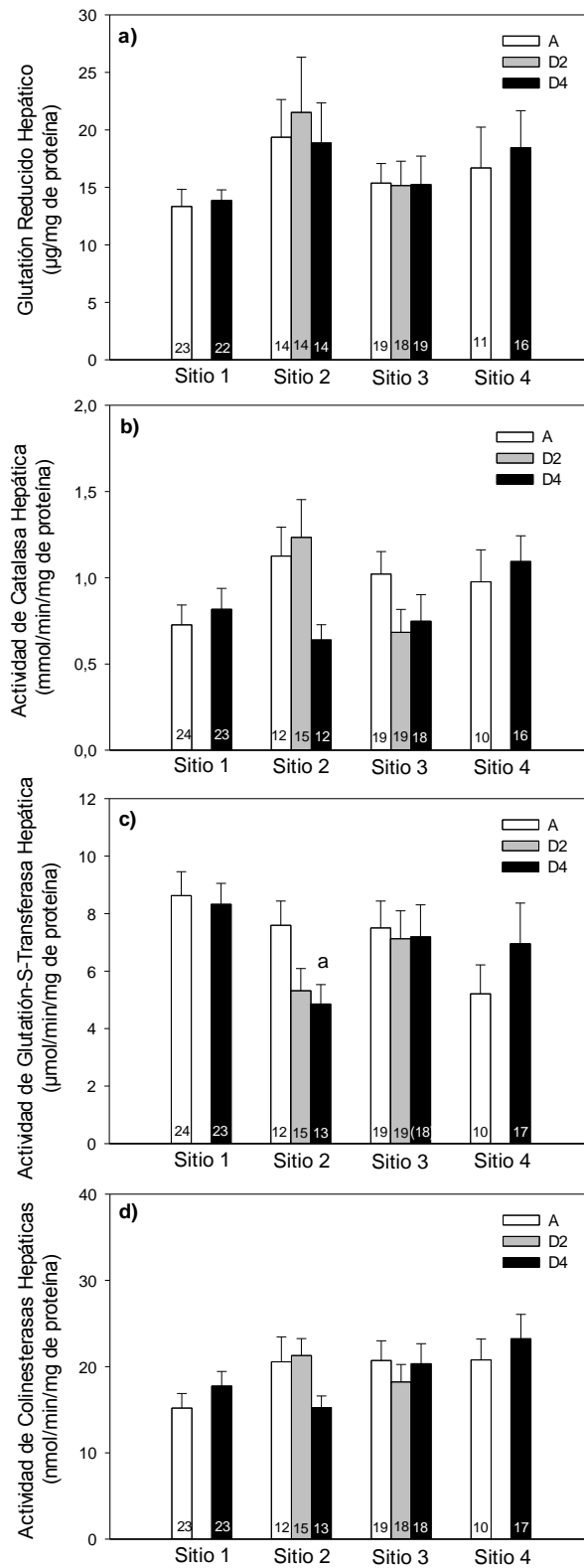


Figura 22. Biomarcadores (media \pm error estándar) determinados en individuos de la especie *Leptodactylus latrans* **a)** GSH, **b)** CAT, **c)** GST y **d)** ChE. **a)** Significativamente diferente al sitio 1 en la misma fecha de muestreo. El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

B) *Leptodactylus latinasus*

Para la especie *L. latinasus* también se consideró para los análisis estadísticos solamente los sitios que tenían un número de ranas igual o superior a 5 individuos. Es por ello, que el sitio 1 no presenta valores antes de la aplicación por no haberse hallado individuos en ese momento (**Fig. 23**).

A pesar de ser una especie de pequeño tamaño, la relación entre el peso corporal y el largo (LHC) fue exponencial, por lo tanto como en la especie *L. latrans*, la condición corporal se evaluó utilizando el método de masa corporal escalada para evaluar los distintos sitios y fechas de muestreo (**Fig. 24a**). En cambio, no hubo una relación alométrica entre el peso de la grasa y el largo (LHC), por lo que se calculó el contenido de reservas como un porcentaje del peso corporal (**Fig. 24b**). El análisis de GLM demostró que sólo las variables, condición corporal (**Fig. 25**) y el biomarcador GST están influenciados de manera significativa por el largo hocico-cloaca (LHC), disminuyendo sus valores con el aumento del largo del animal (dato no ilustrado). Además, el IGC está significativamente influenciado por el sexo de los individuos; las hembras presentando valores superiores a los machos (datos no ilustrados, $p = 0.036$). Por esta razón, la comparación entre sitios y muestreos de este índice se realizó de manera separada para machos y hembras.

La condición corporal de las ranas que habitaban los sitios 2 y 4 fue superior 4 días después (D4) de aplicar los plaguicidas en comparación al muestreo previo (A) (**Fig. 26**). Sin embargo, solo es claro que el aumento en D4 de la condición corporal en los machos del sitio 4 se debe a un incremento de la grasa corporal. No se puede confirmar lo mismo en el sitio 2, debido a que no existió un buen número de individuos muestreados para esa fecha (**Fig. 27a**).

Antes de la aplicación de los plaguicidas, las ranas del sitio 4 tenían valores de IHS inferiores a las de los sitios 2 y 3 (**Fig. 28a**). El IHS disminuyó 4 días después de la aplicación en las ranas del sitio 2 (**Fig. 28a**). En cuanto al ICE, los anfibios de los sitios 3 y 4 presentaron valores inferiores a los del sitio 2, antes de la aplicación de los plaguicidas (A). Luego, en D4, el sitio 4 tuvo valores superiores a las ranas de los sitios 1 y 3 (**Fig. 28b**).

El contenido de GSH y la actividad de CAT en los anuros del sitio 4 eran significativamente elevados en D4 en comparación a los valores que tenían en A. En ese mismo sitio, se observó la misma tendencia para la actividad de GST aunque no fue significativa (**Fig. 29a, 29b y 29c**). Además, la actividad de ChE de los anfibios del sitio 3 presento valores más altos en D4, pero en comparación a D2; y además tuvo valores superiores a los del sitio 1 (**Fig. 29d**). Igualmente, la actividad de este mismo biomarcador se encontró elevada en los anuros que habitaban los sitios 3 y 4 con respecto a los del sitio 2. (**Fig. 29d**).

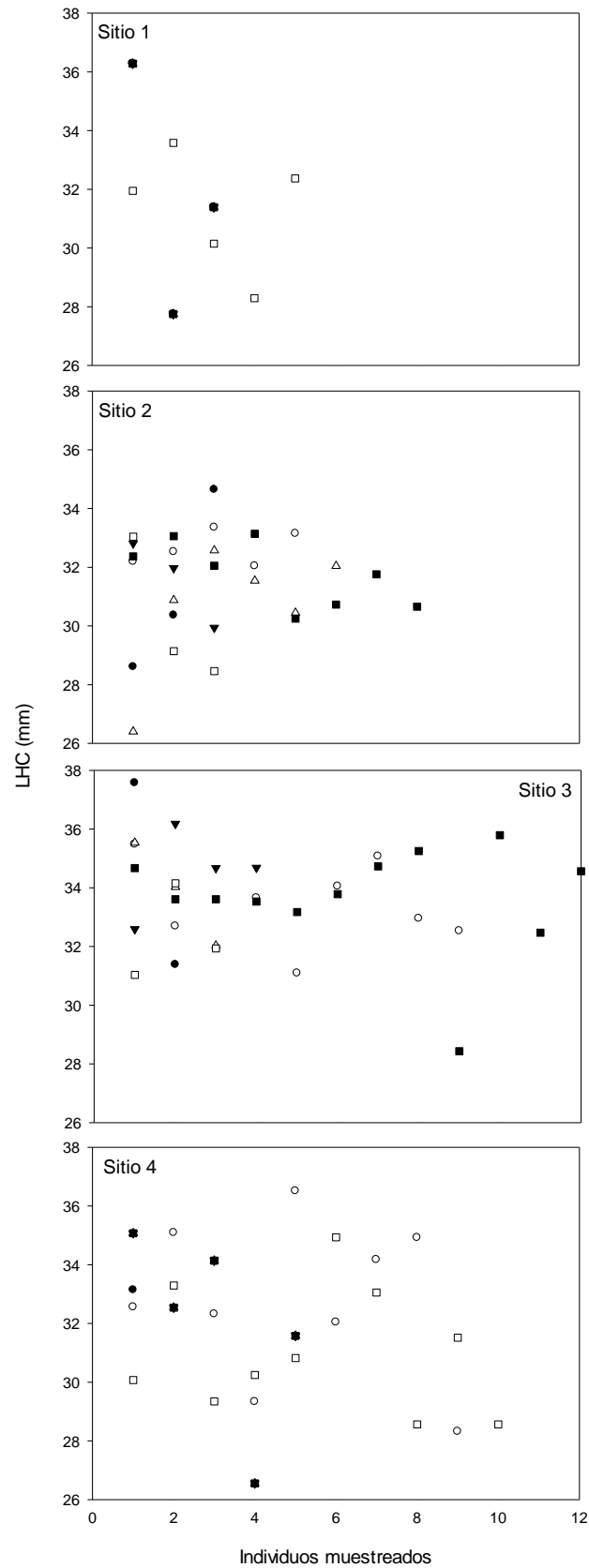


Figura 23. Largo hocico-cloaca (LHC) de las ranas capturadas en los diferentes sitios de muestreo para la especie *Leptodactylus latinasus*. Antes de la aplicación: Machos ◊, Hembras ◆; 2 días después de la aplicación: Machos △, Hembras ▼; Cuatro días después de la aplicación: Machos □, Hembras ■.

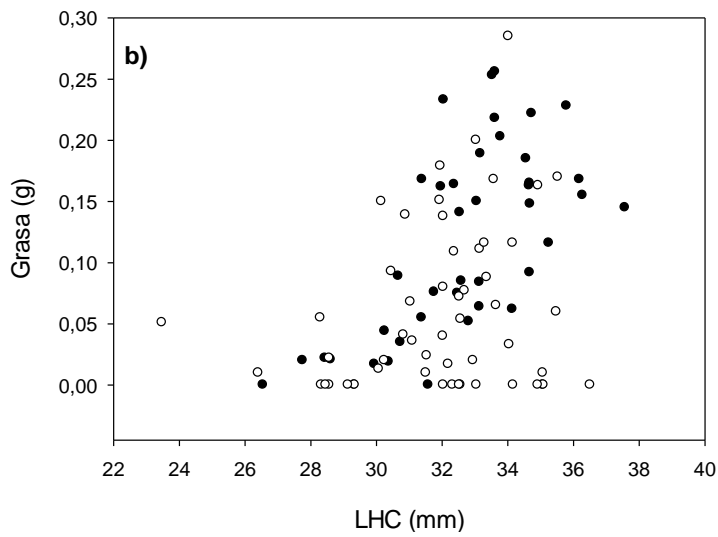
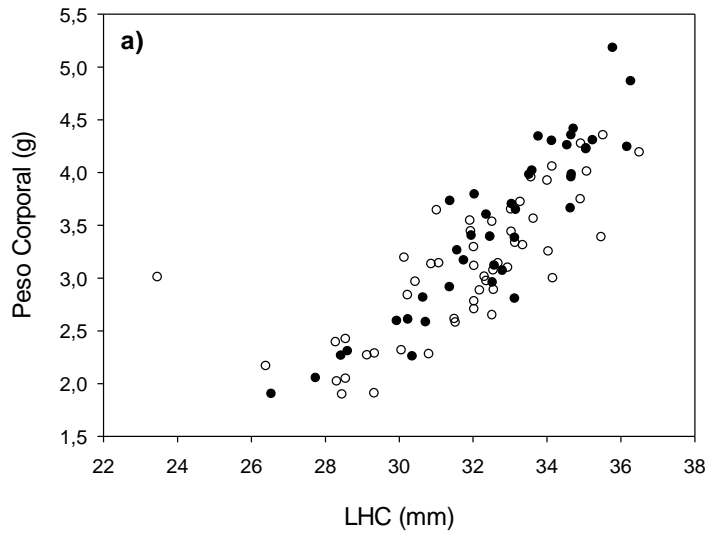


Figura 24. Relación entre a) Peso corporal y b) Grasa corporal) y el largo (LHC) de los individuos de la especie *Leptodactylus latinasus*. ●Hembras y ○ Machos.

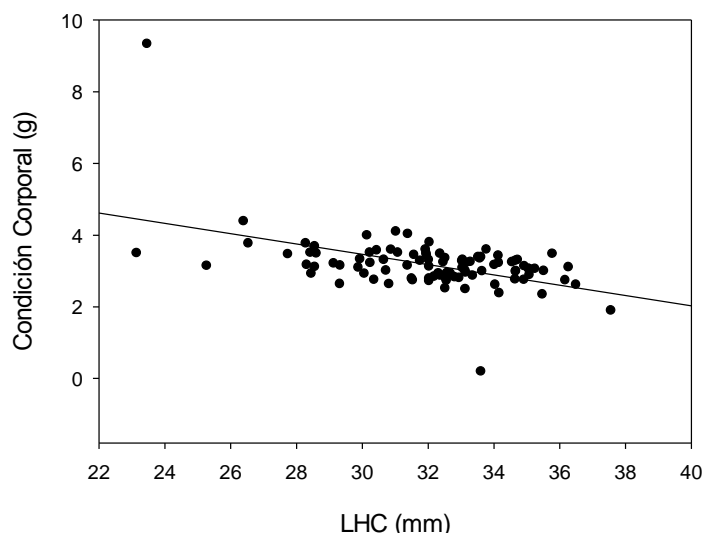


Figura 25. Relación entre la condición corporal escalada y el largo (LHC) de los individuos de la especie *Leptodactylus latinasus*

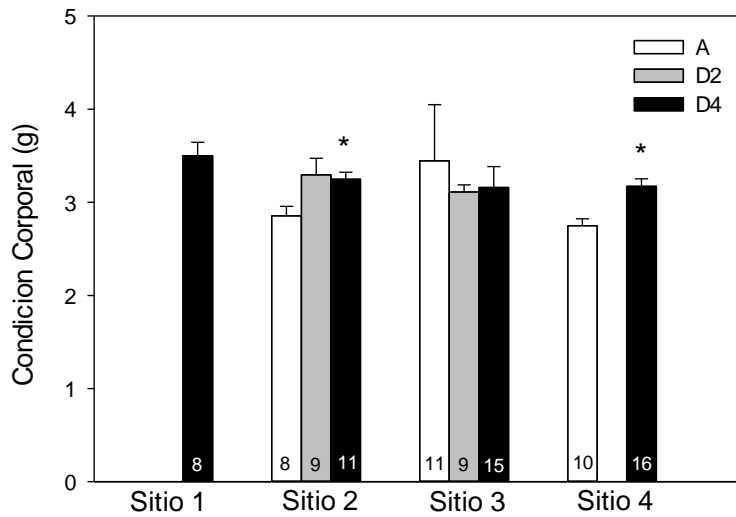


Figura 26. Condición corporal de las ranas de la especie *Leptodactylus latinasus* (media \pm error estándar). * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

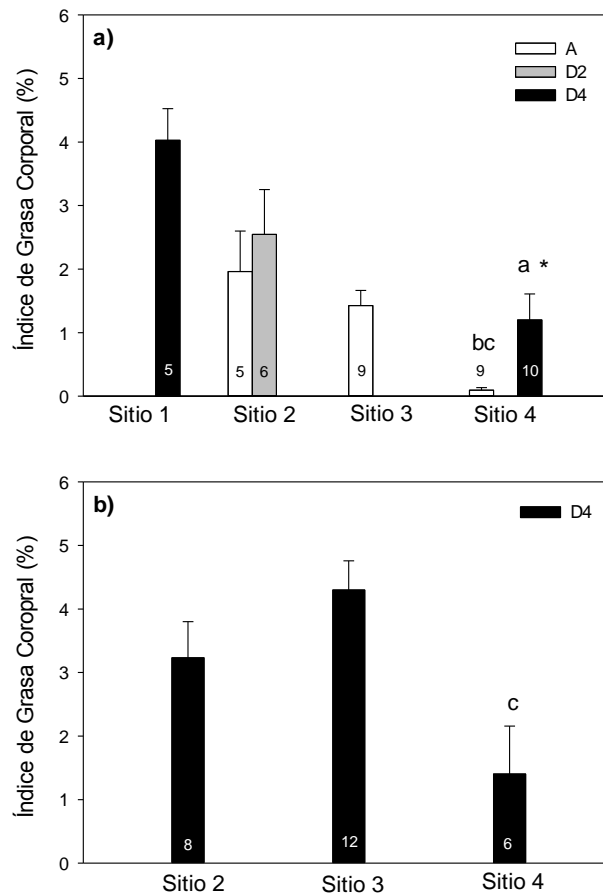


Figura 27. Índice de grasa corporal (media \pm error estándar) **a)** machos y **b)** hembras de los individuos de la especie *Leptodactylus latinasus*. **a)** Diferencias significativas con el sitio 1 en la misma fecha de muestreo. **b)** Diferencias significativas con el sitio 2 en la misma fecha de muestreo y **c)** Significativamente diferente del sitio 3 en la misma fecha de muestreo. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). Los valores dentro, y sobre las barras corresponden al número de individuos analizados.

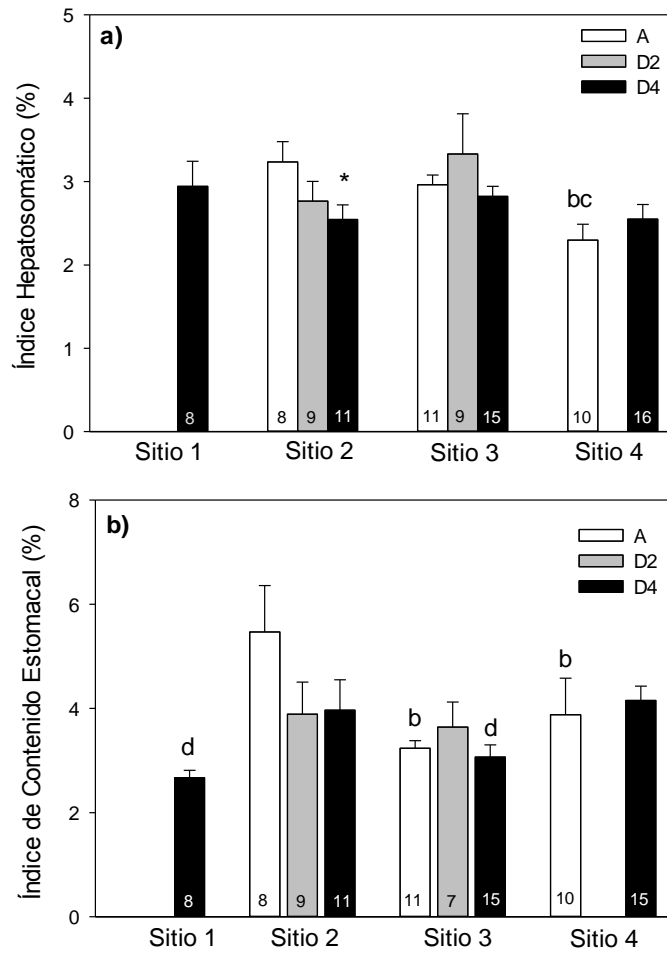


Figura 28. a) Índice hepatosomático y b) Índice de contenido estomacal (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *Leptodactylus latinaus*. b significativamente diferente las ranas del sitio 2 en la misma fecha de muestreo, c significativamente diferente a las del sitio 3 en la misma fecha de muestreo, d significativamente diferente a las del sitio 4 en la misma fecha de muestreo. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

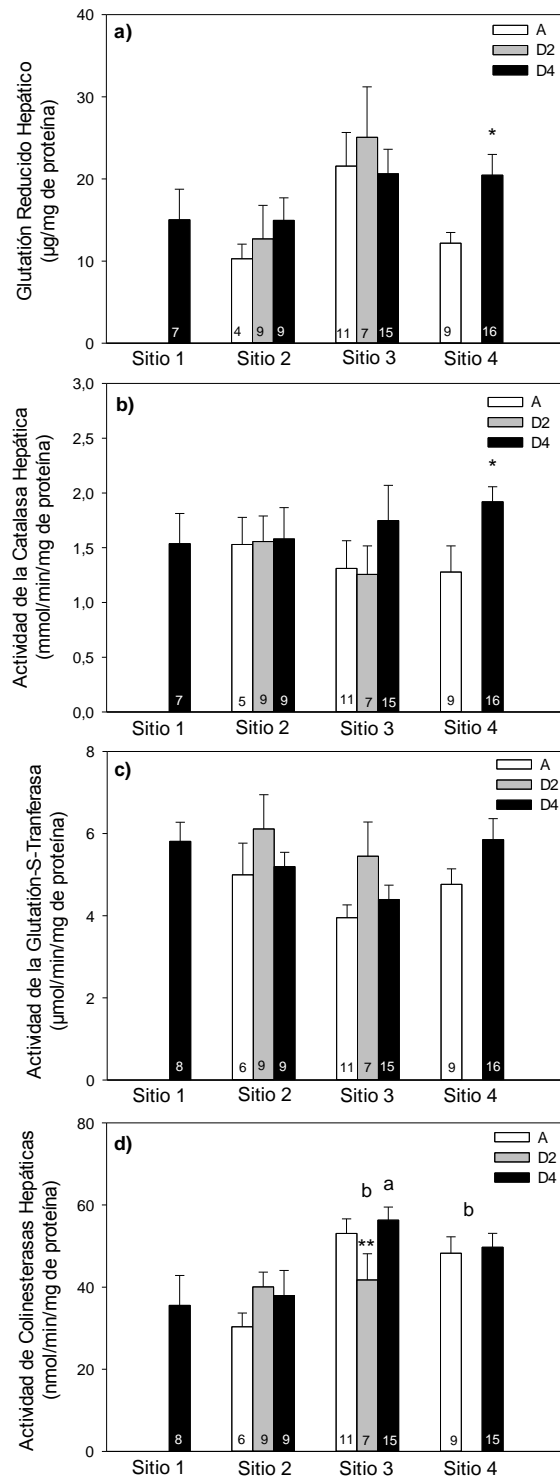


Figura 29. Biomarcadores (media \pm error estándar) determinados en individuos de la especie *Leptodactylus latinasus* **a)** GSH, **b)** CAT, **c)** GST y **d)** ChE. **a** Significativamente diferente al sitio 1 en la misma fecha de muestreo. **b** Significativamente diferente al sitios 2. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). **significativamente diferente entre el muestreo D2 y D4 dentro de un mismo sitio. El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados

C) *Boana pulchella*

En el caso particular de *B. pulchella*, se observó que en su mayoría los individuos capturados en todos los sitios, salvo el sitio 1 eran machos (**Fig. 30**). Es por esta razón, y para evitar que las diferencias existentes en el sexo de las ranas capturadas influenciaran en los resultados, es que se analizaron los distintos parámetros solo teniendo en cuenta los anuros machos. Además, en el sitio 2, sólo se capturaron anfibios adultos en el muestreo luego de 2 días de la aplicación de los plaguicidas (D2), por lo que este sitio no fue considerado para los análisis (**Fig. 30**).

La relación entre el peso corporal y el largo (LHC) era en este caso lineal, por lo que se utilizaron los residuos de la regresión entre el peso corporal y el largo para el análisis de condición corporal (**Fig 31a**). La grasa corporal, no sigue ningún patrón claro, ya que varios animales de distinto largo presentaron pesos de grasas similares, por lo que su contenido se analizó como un porcentaje del peso corporal (**Fig. 31b**).

El análisis de GLM demostró que ninguna variable era influenciada de manera significativa por la longitud hocico-cloaca (LHC) de los animales. La condición corporal de las ranas machos era mayor en todos los sitios respecto del sitio 1 (**Fig. 32**).

Los parámetros corporales IHS e ICE de las ranas de los sitios 1 y 4 son significativamente mayores que las del sitio 3. Además, el índice de contenido estomacal (ICE) de los anuros es inferior luego de la aplicación del plaguicida en todos los sitios, incluso en el que no tuvo aplicaciones (**Fig. 33a y 33c**). El índice gonadosomático (IGS) de las ranas del sitio 1 es menor a las del sitio 3 y 4 (**Fig. 33b**). No hubo diferencias en las grasas corporales de las ranas de ningún sitio ni en ningún momento, pero se observa una leve tendencia que es mayor en las ranas del sitio 1 (**Fig. 33b**).

La actividad de la catalasa de los anfibios del sitio 3 se encuentra disminuida 4 días después de la aplicación con respecto a 2 días después de la aplicación (D2). Ninguno de los otros biomarcadores examinados (GSH, GST y ChE) presentó una diferencia significativa entre los 3 sitios evaluados (**Fig. 34a y 34b, 34c y 34d**).

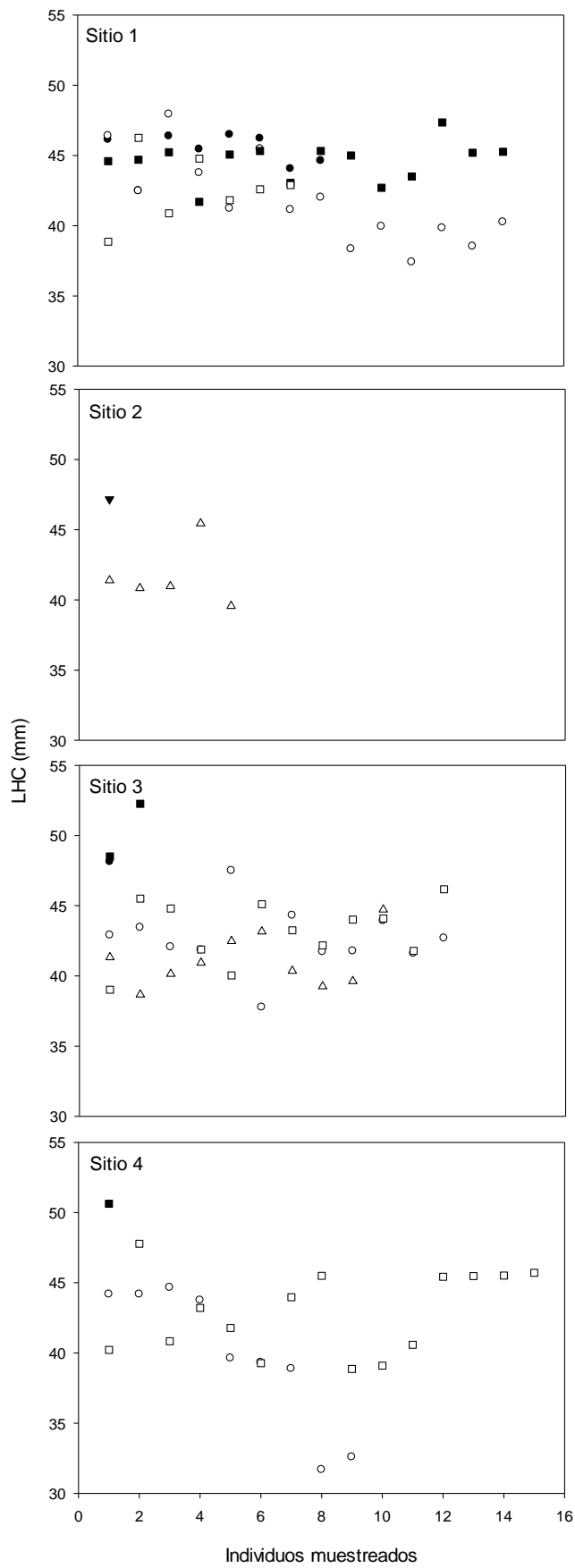


Figura 30. Largo hocico-cloaca (LHC) de las ranas capturadas en los diferentes sitios de muestreo para la especie *Boana pulchella*. Antes de la aplicación: Machos_◇, Hembras_◆; 2 días después de la aplicación: Machos_△, Hembras_▼; Cuatro días después de la aplicación: Machos_□, Hembras_■.

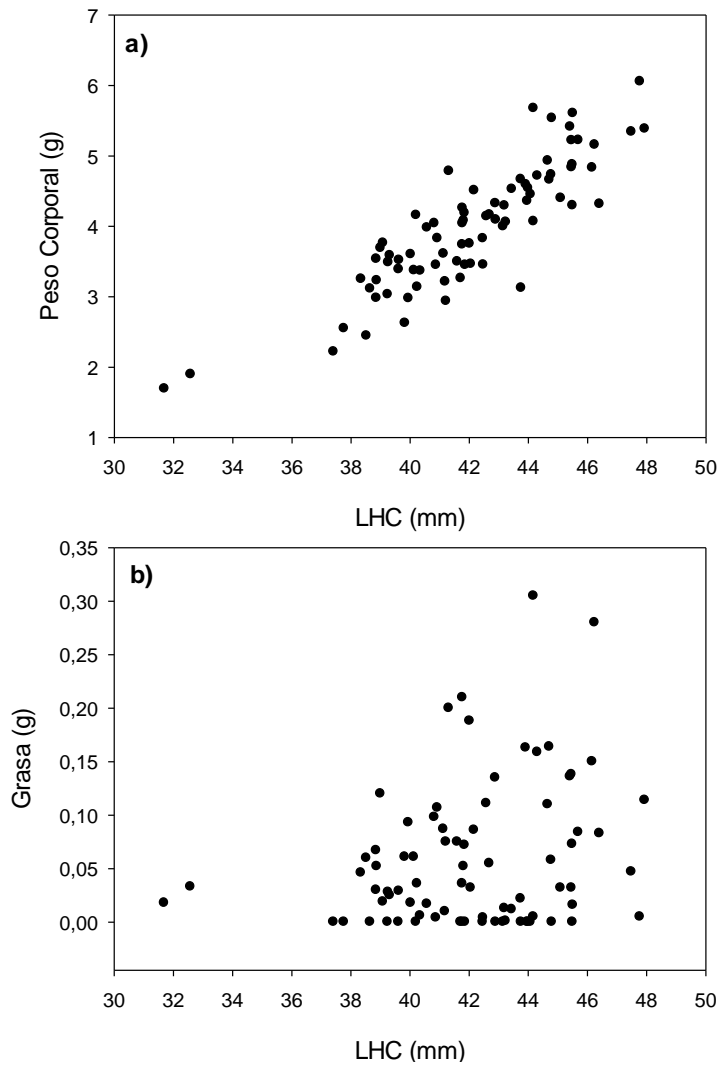


Figura 31. Relación entre **a)** peso corporal y **b)** grasa corporal y el largo (LHC) de los individuos machos de la especie *Boana pulchella*.

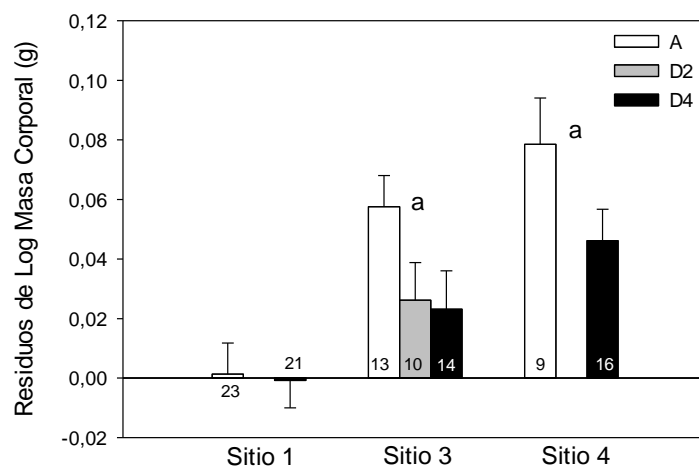


Figura 32. Condición corporal (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *Boana pulchella*. **a** Significativamente diferente al sitio 1. Los valores dentro, y sobre las barras corresponden al número de individuos analizados.

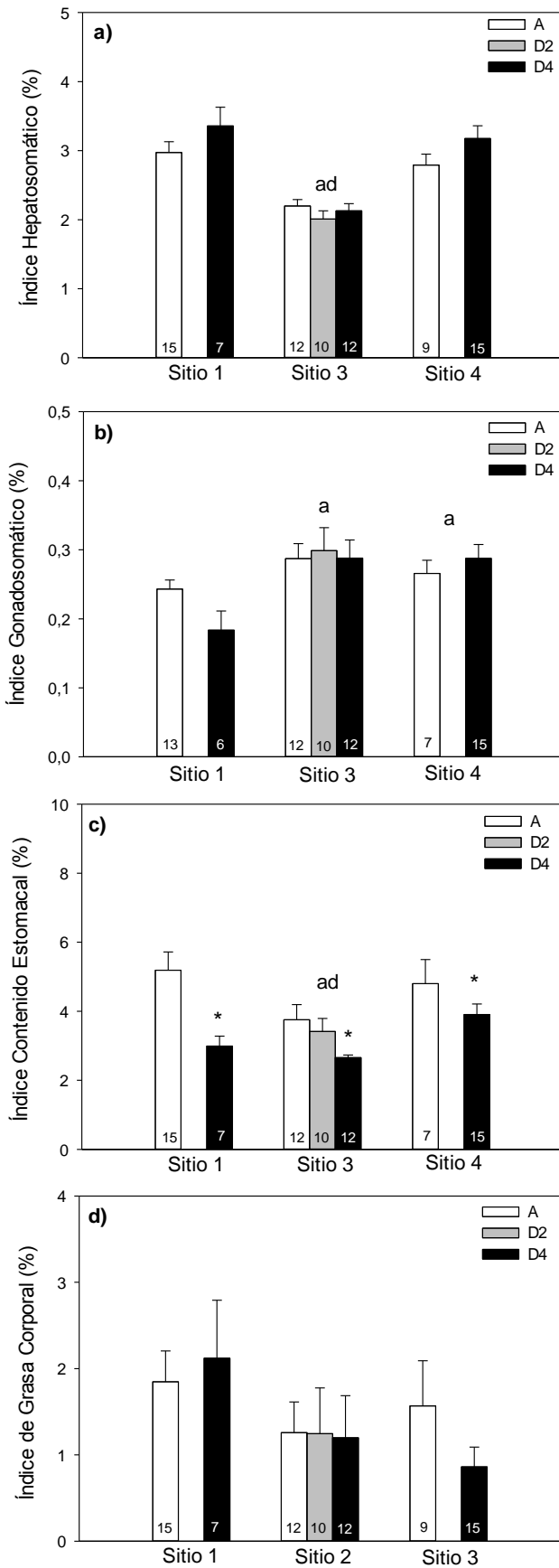


Figura 33. Índices corporales (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *Boana pulchella* **a)** IHS, **b)** IGS, **c)** ICE y **d)** IGC. **a)** Significativamente diferente al sitio 1. **d)** Significativamente diferente al sitio 4. * Diferencias significativas entre antes y después de la aplicación de plaguicidas dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

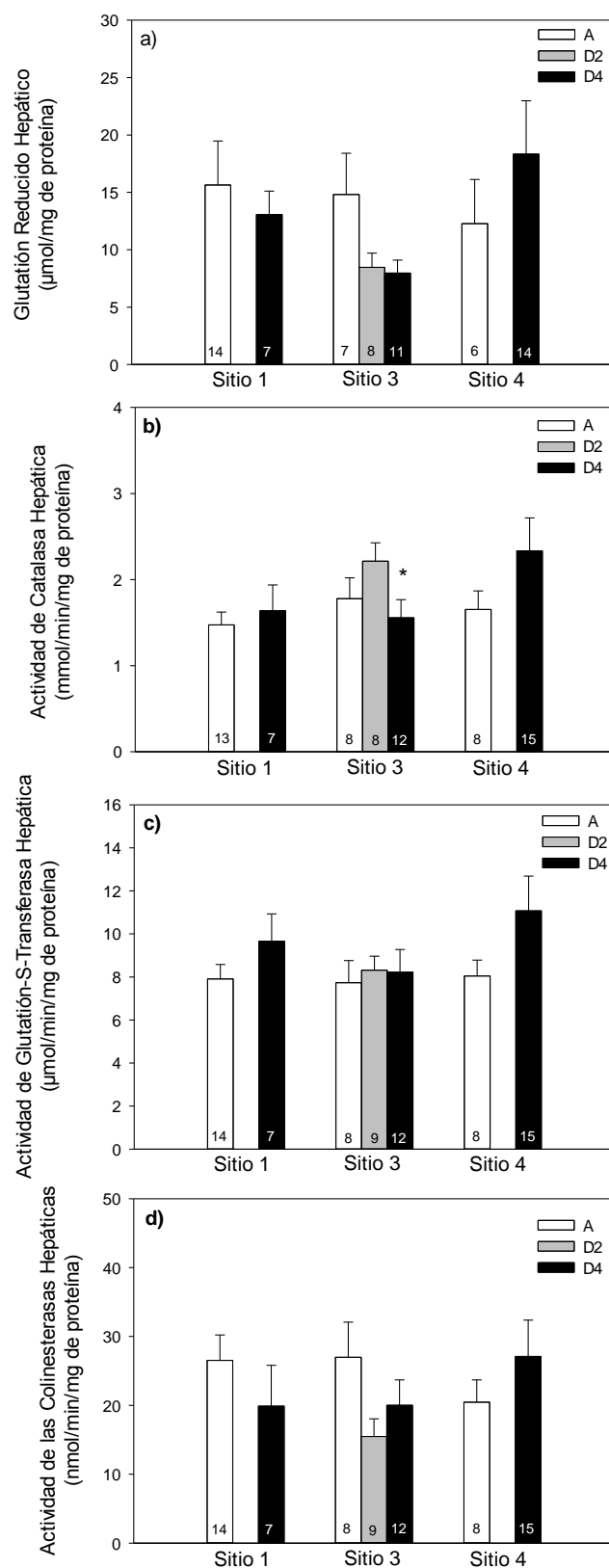


Figura 34. Biomarcadores (media \pm error estándar) determinados en individuos de la especie *Boana pulchella* **a)** GSH, **b)** CAT, **c)** GST y **d)** ChE. **Diferencias significativas entre D2 y D4 dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). El valor dentro de las barras corresponde al número de individuos analizados.

2.4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se caracterizó la disponibilidad de alimento, la dieta, la condición corporal y una serie de biomarcadores de daño oxidativo tanto enzimáticos y no enzimáticos en ejemplares adultos de las especies de anuros *L. latrans*, *L. latinasus* y *B. pulchella* capturados en tres sitios agrícolas ubicados en lotes de soja de la localidad de Chivilcoy. El muestreo se repitió en tres momentos distintos: Quince días antes (A), y dos (D2) y cuatro días (D4) después de aplicarse una mezcla de los insecticidas lambda-cialotrina y tiametoxam, el herbicida glifosato o el fungicida tetraconazole. En las mismas fechas, se muestreo, además, un sitio en donde no se aplicó plaguicidas, la reserva “El Destino”, en el partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires.

En la región pampeana se ha reportado la presencia de plaguicidas en diferentes compartimentos del ambiente como el agua, sedimento y suelo (Peruzzo et al., 2008, Aparicio et al., 2013; Bonansea et al., 2013; De Gerónimo et al., 2014; Hunt et al., 2016; Ronco et al., 2016; Etchegoyen et al., 2017; Primost et al., 2017; Caprile et al., 2016). Nuestros esfuerzos para caracterizar el nivel de contaminación a los que se hallaban expuestos los anuros, no dió resultados positivos en las muestras de agua. A pesar de poseer una baja detectabilidad (1ug/L) no se hallaron trazas de ningún plaguicida analizado en las muestras de agua, ni previo ni posterior a la aplicación de la mezcla de plaguicidas, aunque los insecticidas (lambda-cialotrina y tiametoxam) y el herbicida glifosato poseen una vida media en agua menor a los 30 días. Una explicación a los resultados observados podría deberse a la ocurrencia de una degradación biológica o que la afinidad de los plaguicidas por las partículas del suelo haya impedido, niveles de detección observables (Sterren et al., 2016). En cambio, en las muestras de suelo se han encontrado moléculas del herbicida glifosato y su metabolito AMPA, en los sitios agrícolas donde no se aplicó plaguicidas para la fecha de toma de las muestras. Se conoce que la vida media del glifosato en el suelo es muy larga y puede llegar desde semanas a años (Carlisle & Trevors, 1988). Luego de la aplicación de la mezcla de plaguicidas se detectaron sólo en el sitio 3, los insecticidas (lambda-cialotrina y tiametoxam) y el herbicida (glifosato y su metabolito AMPA). Seguramente este hallazgo se debió a que los productos aplicados tuvieron contacto con el suelo debido a que allí, la soja era poco densa, de plantas bajas y presentaba mucho suelo desnudo. El resto de los lotes de soja, tenían mucha cobertura de este cultivo, quizás lo que detuvo el ingreso del producto al suelo.

Con respecto a la disponibilidad de alimento, en el cultivo de soja, la riqueza de familias de artrópodos permaneció constante, tanto en presencia como en ausencia de los insecticidas aplicados;

pero pudieron encontrarse diferencias después de la fumigación entre los lotes de soja (sitio 2, 3 y 4) con el sitio 1, donde además de no tener actividad agrícola, tiene una estructura vegetal muy variada.

No se detectaron efectos de deriva del insecticida hacia los bajos, ya que no hubo diferencias en ninguna de las variables estudiada (riqueza, abundancia y volumen) entre antes y después de la fumigación. En caso de existir deriva, los artrópodos de los bajos poseen una disponibilidad mayor de refugios que podrían protegerlos de este efecto u otros disturbios (Dennis et al., 1994; Lee et al., 2001; Pollier et al., 2017). Los bajos luego de la aplicación, presentaron valores más altos de abundancia en los órdenes de Homoptera, Coleoptera y Arachnida, organismos de los cuales se alimentan los anuros de la especie *L. latrans*, siendo estos un refugio esencial para las presas consumidas por los anuros.

No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros de la abundancia y el volumen de presas capturadas en las trampas, debido quizás a la gran variabilidad que presentaban los datos, por lo que se debe aumentar la cantidad de trampas de caídas usadas en cada sitio para medir con menor margen de error y así poder realizar comparaciones significativas.

Estudios realizados en Argentina y Brasil, indican que *L. latrans* basa su dieta en varios grupos de invertebrados (insectos, arácnidos, anélidos, miriápodos, crustáceos, moluscos, etc) y vertebrados (anfibios, aves y pequeños mamíferos) y que se puede considerar a la especie un consumidor generalista (Gallardo, 1974; Basso, 1990; Lajamanovich, 1996; Solé et al., 2009). En el presente trabajo de Tesis Doctoral y coincidiendo con los hábitos alimenticios mencionados por otros autores, los taxa consumidos con mayor frecuencia fueron los coleópteros, hemípteros y homópteros, pero no así los arácnidos. Quizá este último ítem fue hallado en baja frecuencia en los anuros, debido a que permacieron aproximadamente 12hs desde la captura hasta su sacrificio, quedando esta presa digerida y sin poder identificarse en las muestras debido a su bajo contenido de quitina con respecto a otros organismos encontrados. Muy pocos estudios de dieta sobre anuros han realizado comparaciones con la disponibilidad de alimento. En el presente trabajo se calculó el índice de selectividad de Jacob (1974), el cual compara la proporción relativa de los artrópodos encontrados en el ambiente con los hallados en los contenidos estomacales de los anuros, y muestra qué tipo de organismos consumidos son seleccionados (Maneyro et al., 2004; López et al., 2009). *Leptodactylus latrans* ha sido considerada una especie generalista (Gallardo, 1974; Basso, 1990; Lajamanovich, 1996; Solé et al., 2009) como lo confirman los resultados de este estudio, observándose un consumo variado, en los diferentes sitios. Sin embargo, esta especie es selectiva para algunas de sus presas (teniendo en cuenta la disponibilidad en el entorno). Inferimos una selectividad de los valores

positivos del índice de Jacob para Coleoptera, Hemiptera y larvas de Lepidoptera y los valores negativos para otras categorías como Arachnida e Hymenoptera (generalmente Formicidos). Algunos resultados de este índice podrían ser explicados como falsos positivos, por ejemplo, para los grupos de artrópodos voladores, como las libélulas (Odonata) y las avispas (Hymenoptera) que no son muestreadas correctamente con el método de trampas de caída; por lo tanto, sus valores de abundancia en el ambiente serán bajos, dando como resultado cualquier consumo de ellos, valores positivos.

En cuanto al consumo de alimento (cantidad de presas y volumen) por parte de *L. latrans* en los diferentes sitios y momentos de muestreo no fue claro el patrón de la variación observada. La disminución en el consumo del volumen de presas 2 y 4 días después de la aplicación de plaguicidas en el sitio 3, podría deberse a los efectos de la aplicación, pero como el mismo patrón se observa en el sitio 1, donde no hubo aplicación, no podemos concluir que su efecto sea por el uso de los plaguicidas. Quizás esta variación se deba a las diferencias de días transcurridos entre los muestreos (A-D4), donde hubo casi un mes entre ambos y posiblemente las condiciones naturales del ambiente cambiaron. El alto valor en el volumen consumido a los 4 días después de la aplicación de plaguicidas (D4) en el sitio 2, se debe a que en ese momento muchos de los anfibios adultos se alimentaron de otros anuros, mientras que a otro 31% se les encontró el aparato digestivo vacío.

Las medidas del cuerpo (longitud y peso) de un individuo son detalles importantes, que pueden influenciar otras características como las tasas metabólicas y de crecimiento, y determinar atributos poblacionales como la abundancia o la densidad (Peters, 1983). La relación existente entre el tamaño y peso de los individuos en una población determinada se expresa como un índice de condición corporal que puede servir como indicador de estrés ambiental para muchas especies y contextos (McCoy & Harris, 2003). Se han desarrollado numerosos índices de condición corporal y se aplican en diferentes disciplinas científicas, y a menudo se han establecido metodologías específicas para usar con diferentes grupos de estudio (Schulte-Hostedde et al., 2005; Peig & Gree, 2009). La diversidad de éstos índices disponibles nos indica que ningún método es ideal y que estimar con éxito la condición corporal no es tarea fácil. No obstante, al desarrollar un índice de condición corporal es vital reconocer la importancia de la relación de escala entre diferentes medidas del tamaño corporal (incluida la masa) que puede variar entre las especies y las poblaciones (Peig & Green, 2009).

Evaluamos la relación del peso y el largo en las tres especies de anuros para tener información sobre la forma en la cual estas organismos aumentan de tamaño. Los individuos de las

especies *L.latrans* y *L.latinasus* tuvieron un crecimiento alométrico, lo que significa que experimentaron cambios en la forma corporal a medida que su masa aumentó o disminuyó en función a la longitud de su cuerpo. Por este motivo, utilizamos el índice de masa escalado (Peig & Green, 2009) que está basado en la presencia de tal tipo de relación exponencial entre el peso y el largo del organismo. Sin embargo, no encontramos la misma alometría en la especie *B. pulchella*, quizás debido a que solo trabajamos con los individuos machos y de un tamaño similar. Si bien, el índice de masa escalado puede considerarse como una mejora en los índices de condición corporal, éste parámetro idealmente, debe ser preciso e imparcial con respecto al tamaño, y no debe correlacionar con la masa corporal o con la longitud (Falk et al., 2017). Nosotros, al igual que Falk et al. (2017), encontramos una correlación negativa entre la condición corporal escalada y el largo corporal, resultado que nos indicaría que este método no corrige del todo el problema de la de longitud.

Por otro lado, el peso de grasa corporal seca y húmeda ha sido utilizado para aproximarse a la verdadera condición corporal (Falk et al., 2017). Las reservas de energía están relacionadas con el tamaño estructural, pero de una manera compleja en la que las relaciones de escala varían según las variables seleccionadas, así como entre las especies (Peig & Green, 2009). Sólo para la especie *L. latrans* encontramos que la acumulación de grasa corporal seguía un comportamiento alométrico como la masa corporal, igualmente las reservas de grasa sólo explicaron el 19% de la condición corporal observada. Estos resultados estarían indicando que las reservas energéticas se estarían depositando además en otros tejidos, y en otra forma de reserva como proteínas o glicógeno.

Los biomarcadores pueden ayudar a evaluar el estado de salud de las poblaciones de anfibios actuando como puntos finales subletales de intoxicación. Aunque muchos trabajos de nuestro grupo como otros autores encuentran evidencia de que los biomarcadores que hemos utilizados en el presente trabajo de Tesis Doctoral como GSH, CAT, GST y ChE constituyen biomarcadores válidos para demostrar los efectos nocivos de los plaguicidas sobre la salud de los anfibios (Venturino, 2003; Lajmanovich, 2008; Brodeur et al., 2011; Brodeur, et al., 2017, Moretti et al., 2017). En este estudio no encontramos claros efectos de toxicidad luego de la aplicación de la mezcla de plaguicidas o entre los individuos provenientes de sitios cultivados y del sitio control en ninguna de las tres especies de anuros estudiadas. Las únicas diferencias observadas que podrían indicar que la especie *L.latinasus* estaría afectada por la exposición crónica a los plaguicidas en el sitio 4 fue el aumento de forma significativa después de la aplicación de plaguicidas de CAT y GSH, GST presentó una tendencia, pero no alcanzó valores significativos. Se sabe que GSH es un sustrato para la actividad de GST y

que el aumento en los niveles de GSH con la elevación concomitante de la actividad de GST sugiere un papel crítico en la segunda fase de la biotransformación al conjugar xenobióticos con GSH para facilitar la disolución en los medios celulares y extracelulares acuosos y de esta manera, eliminarlos como desechos fuera del organismo (Hayes & Pulford, 1995; Farombi et al., 2007). El aumento de la actividad de CAT también se observa en presencia de contaminantes ambientales, ya que la CAT es un componente del sistema de defensa desarrollado por los organismos aeróbicos para contrarrestar los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de cualquiera de los dos metabolismos, el esencial y normal, o el de los xenobióticos (Abdollahi et al. 2004; Martínez-Álvarez et al. 2005, Moretti et al., 2017).

El trabajo realizado en este capítulo, con el diseño de muestreo empleado para caracterizar los efectos de una aplicación (A vs D2 y D4), no aportó evidencia clara de los efectos indirectos ni directos que producen los plaguicidas sobre las poblaciones de anfibios anuros adultos.

La gran variabilidad en los datos de disponibilidad de alimento observada en los distintos momentos del muestreo no fueron óptimos para caracterizar la abundancia y el volumen de artrópodos. Habría que realizar un muestro con mayor número de trampas para mejorar la precisión. Depender de las decisiones de un productor para el momento de aplicar hizo que pase demasiado tiempo entre los muestreos previos y posteriores a la aplicación, dificultando la asociación entre la exposición con los plaguicidas y los cambios observados en la dieta. No tenemos conocimiento del tiempo, exposición o ruta a la que están expuestos los anfibios en el campo, quizás la falta de lluvias después de la aplicación de plaguicidas impidió la exposición al mismo, no teniendo respuestas en los biomarcadores utilizados.

3. OPTIMIZACIÓN DEL USO DE TRAMPAS DE CAÍDAS DE ARTRÓPODOS PARA EVALUAR LA DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO PARA ANUROS

3.1 INTRODUCCIÓN

Es conocido que el grupo de organismos vertebrados más amenazado son los anfibios, y de este grupo, el 32% de las especies está en peligro de extinción y 43% en situación de declive (Stuart et al., 2004). En 2016, un grupo de investigadores reportó que las poblaciones de anfibios de Norte América se reducen cada año un 4%, por lo cual en 20 años aproximadamente las poblaciones habrán disminuido en un 50% (Grant et al., 2016). Con respecto a las posibles causas de la desaparición de las poblaciones de anfibios, se han encontrado evidencias significativas sobre la interacción de algunos factores ambientales tales como la pérdida o modificación del hábitat, asociados con otros componentes como las enfermedades, el cambio climático y la contaminación ambiental con el declive de las poblaciones de anfibios (Blaustein & Kiesecker, 2002; Collins & Storfer, 2003; Stuart et al., 2004; Sodhi, 2008; Mann et al., 2009, Hayes et al., 2010, Suarez et al., 2016). El principal efecto negativo e inmediato de la intensificación agrícola es el avance sobre áreas de tierras naturales, dejando pocos remanentes de hábitat no cultivado, que consisten a menudo en estructuras lineales como terrazas, cortinas de viento y márgenes de campos con vegetación silvestre (Dennis & Fry, 1992). La vegetación natural que crece en los márgenes de los cultivos constituye un relicto de hábitat muy valorado porque aporta diversidad vegetal, y ésta a su vez provee recursos a la vida silvestre (Altieri, 1999, Benton et al., 2003). Estos recursos son especialmente importantes para los artrópodos como sitios de oviposición y refugio. Los artrópodos aportan servicios ecosistémicos o son fuentes de alimento para otros animales en los agroecosistemas (Landis et al., 2000; Hallmann et al., 2014) En los lotes, los artrópodos se ven amenazados por las perturbaciones regulares que sufren los cultivos, por ejemplo, en la siembra, la cosecha y con las reiteradas aplicaciones de plaguicidas. Además, existen evidencias de deriva de insecticidas hacia los márgenes en perjuicio de los artrópodos que utilizan ese hábitat (Longley et al., 1997; Marshall & Moonen 2002; Langhof et al., 2005). Se sabe que los plaguicidas, tales como los herbicidas, influyen negativamente en la abundancia de artrópodos en cultivos de cereales a través de la eliminación de la cubierta de malezas (Ewald & Aebischer, 1999; Moreby & Southway, 1999). Uno de los casos mejor argumentados de efectos indirectos por uso de plaguicidas es la demostración en la disminución de las poblaciones de la perdiz gris (*Perdix perdix*) en Gran Bretaña. Allí, se demostró que la disminución en la supervivencia de los polluelos se debió a los efectos de la fumigación con herbicidas en cultivos de cereales que afectó la provisión de insectos como fuente de alimento (Potts, 1991). Asimismo, Campbell et al. (1997) analizaron las tendencias en las poblaciones de aves y sus fuentes de alimentos y dieta; pudiendo relacionar que las disminuciones en esas poblaciones se debieron a los efectos indirectos del uso de plaguicidas en la disponibilidad de semillas e invertebrados para las

poblaciones de aves. Sin embargo, hay poca evidencia de que la reducción en la disponibilidad de artrópodos como alimento, ya sea por la modificación de su hábitat o por la muerte directa después del uso de plaguicidas, haya influido en las poblaciones de anfibios. La falta de alimento puede afectar las funciones fisiológicas, como el crecimiento y el desarrollo de las gónadas, el crecimiento y el mantenimiento de las características sexuales secundarias y la búsqueda de pareja, que generalmente solo las conseguirán individuos sanos con un amplio suministro de alimentos (Moller et al., 1998; Neff & Cargnelli, 2004). Una ingesta adecuada de alimentos también puede aumentar el éxito reproductivo al ayudar a los individuos a evitar enfermedades o fenómenos de depredación (Congdon et al., 1982; McNab, 2002).

Una forma de evaluar la disponibilidad de alimento en base a artrópodos es la colocación de trampas de caída para invertebrados. Las trampas de caída son simples de usar, económicas, requieren poca mano de obra para funcionar, relevan un gran número de taxas y de especímenes de artrópodos terrestres activos (Spence & Niemelä 1994; Driscoll, 2010; Grant & Matthews, 2016). Además, son el método de muestreo que obtiene la máxima captura en frecuencia y abundancia en comparación con otros métodos (Sabu et al., 2011). También, tiene una gran ventaja ya que capturan tanto gremios con hábitos diurnos como nocturnos (Sabu & Shiju, 2010).

Dos de las especies de anfibios que se estudiaron en el presente trabajo de Tesis Doctoral son consumidoras generalistas *L.latrans* y *L.latinasus*. Ambas especies se alimentan de invertebrados del suelo (Coleoptera, Arachnida, Orthoptera, etc) y de pequeños vertebrados (anuros, roedores, etc) (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Attademo et al., 2005; Solé et al., 2009). Es esencial saber qué taxones de alimentos son componentes importantes en la dieta de ambas especies de anfibios en los sitios de interés; y si su disponibilidad es susceptible a aspectos particulares del ambiente agrícola. En el presente estudio se tomaron muestras de artrópodos, con el objetivo de investigar cómo varía la riqueza y abundancia de las poblaciones de artrópodos en relación con la cantidad de trampas y los días de activación para poder evaluar la disponibilidad de alimento para anuros tanto en lotes de soja como en sitios controles.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

El área de estudio se localizó en un lote del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Hurlingham (**Fig. 1**). El lote se encuentra a 30° 36' S, 58° 40' W en la provincia de Buenos Aires, Argentina, en la

región de la pampa húmeda. La región se caracteriza por poseer un clima templado, con una temperatura media de 16.3°C y una humedad relativa anual de 72%. Las precipitaciones rondan los 1000 mm anuales y están distribuidas a lo largo del año. La estructura vegetal del lote era del tipo pastura, dominada por trébol blanco (*Trifolium repens*) asociado a reigras criollo (*Lolium multiflorum*), cebadilla criolla (*Bromus unioloides*) y cardo (*Carduus sp.*), y en menor proporción se encontraban vara de oro (*Solidago chilensis*), lotus (*Lotus sp.*), sorgo de alepo (*Sorghum alepense*) y flechilla (*Stipa sp.*).

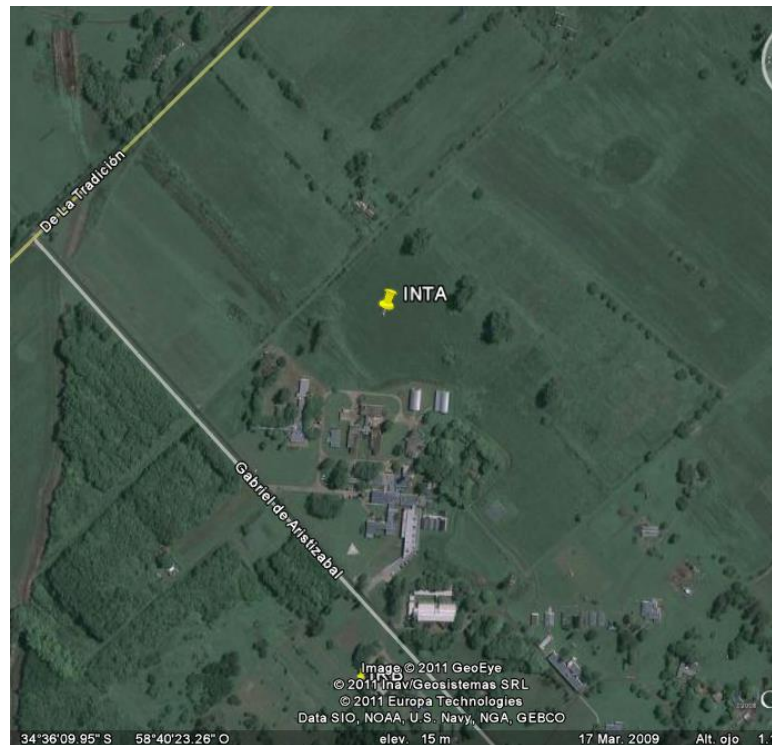


Figura 1. Imagen de Google Earth 2011 del lote donde se realizó el estudio.

Muestreo de artrópodos: disponibilidad de alimento

El muestreo se llevó a cabo desde el 24 al 30 de noviembre del 2010 en el horario del mediodía, realizando un esfuerzo de captura de 112 trampas días. Se establecieron 8 estaciones de muestreo que se colocaron en 2 transectas de 150 m, las transectas como las estaciones de muestreo se distanciaban entre si por 50 m, para asegurar la independencia de las muestras (Digweed *et al* 1995) (**Fig. 2 y 3**). En cada estación de muestreo, las trampas se dispusieron por duplicado, separadas en promedio entre si por 2 m (**Fig. 3**). Las trampas consistieron en un vaso de plástico de 8 cm de diámetro, que contenían una solución de ácido acético y formol al 2%, para matar y conservar a los artrópodos, y una gota de detergente para disminuir la tensión superficial (**Fig. 4**). Se colocó un techo de metal a 10 cm del suelo para proteger a cada trampa de la lluvia y de la luz del sol (Lövei & Sunderland 1996; Duelli et al. 1999; Marc et al. 1999). Las trampas fueron revisadas diariamente,

momento en el cual se colectaba los artrópodos capturados y se volvían a llenar de líquido conservante. Una vez en el laboratorio se procedió a limpiar las muestras de tierra y restos vegetales y, se las colocó en vasos de plástico con alcohol al 70% para conservar los ejemplares hasta su identificación. La identificación taxonómica de los artrópodos se realizó hasta nivel de familia (Claves de Invertebrados II 2005). Para cada una de las estaciones se cuantificó la riqueza y abundancia.

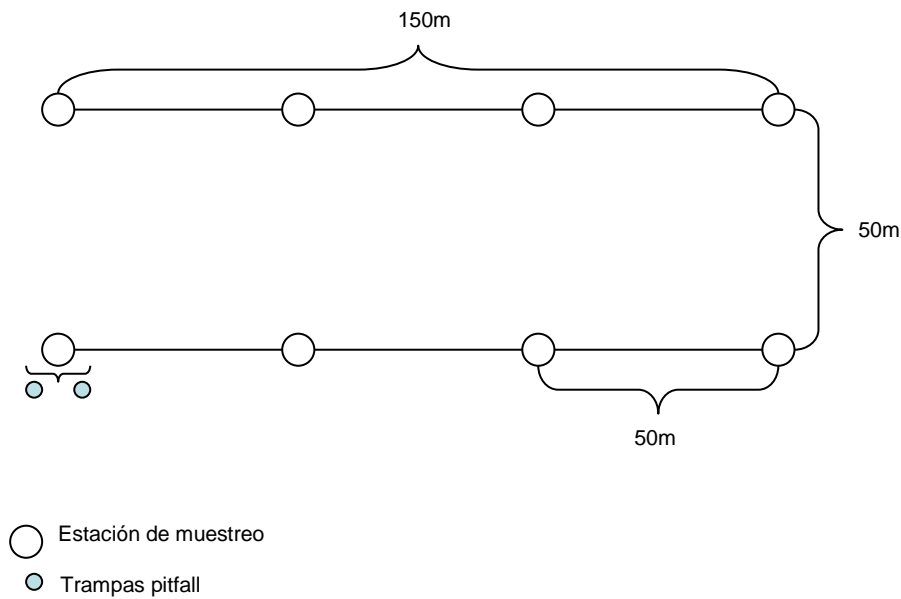


Figura 2. Esquema de la disposición de las trampas en el campo



Figura 3. Disposición en el lote de las estaciones de muestreo



Figura 4. Estación de muestreo con dos trampas



Figura 5. Trampas de caída para artrópodos. **A)** Colocadas debajo de la tierra dejando la apertura al ras del suelo y cubiertas con techo de chapa para evitar el ingreso de agua de lluvia durante el muestreo. **B)** Artrópodos capturados en la trampa. **C)** Colecta de artrópodos capturados.

Análisis estadístico

Las variables respuesta consideradas fueron número de familias de artrópodos (riqueza de familias) y su abundancia, y se analizaron por estación de muestreo. Se determinó la riqueza familiar, utilizando curvas de acumulación, que representa el incremento en el número de familias según el esfuerzo, ya sean días o trampas. Para realizar estas curvas se utilizó el paquete Biodiversity de R para dos grupos de datos: a) todas las familias y b) todas las familias que tenían por lo menos 3 individuos durante el muestreo. Esta última selección se realizó debido a que el resto de las familias que caen son menos frecuentes y los anuros a estudiar son generalistas por lo que se alimentan de

los artrópodos más abundantes (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Attademo et al., 2005; Solé et al., 2009).

Se usó el paquete Biodiversity del software R para realizar el ranking de abundancia de los artrópodos capturados. Para realizar este ranking se tuvo en cuenta dos situaciones: a) todas las familias capturadas y b) todas las familias que poseían al menos 3 individuos pero sin tener en cuenta las familias súper abundantes como Collembola y Formicidae.

En el análisis de abundancia se utilizaron todas las familias, menos las tres más abundantes (Actaletidae, Formicidae y Poduridae), ya que los valores de abundancia tan grandes de estas familias enmascaran el comportamiento de las familias importantes para la alimentación de los anuros. En este estudio se dejaron de lado las abundancias de las familias menos frecuentes (familias que aportaban menos de 3 individuos en el muestreo) debido a que el aporte a la abundancia total es insignificante. El promedio y desvío de la abundancia de individuos se calculó por *bootstrapping*, teniendo en cuenta un muestreo de 7 y de 4 días. El *bootstrapping* involucra un remuestreo de los datos de abundancia, obtenidos por día y por trampa, con reemplazamiento, y esta selección se realiza al azar. Se realizaron 100 interacciones con el programa SYSTAT 11.

Las diferencias entre el número de trampas como de días se analizaron usando ANOVA de un factor, y se realizaron los contrastes con el método Holm-Sidak. Cuando los supuestos de normalidad y homocedacia no se cumplían se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se realizaron contrastes de Dunn`s para las comparaciones. Estas pruebas se realizaron utilizando el software estadístico SigmaStat 3.11.

Para determinar cuál es el número de trampas necesarias que permita detectar diferencias en la abundancia entre los tratamientos (lotes vs sitios control), se utilizó la ecuación de prueba de poder $= (ES \alpha \sqrt{n}) / \sigma$, donde

ES: diferencia de medias a detectar,

α : Nivel de significancia

n: Tamaño de la muestra

σ : Desvío estándar estimado

El test de la prueba se realizó con el estadístico *t* pareado del software estadístico SigmaStat 3.11. El nivel de significación fue $p < 0.05$ en todos los casos.

3.3 RESULTADOS

Abundancia de artrópodos: disponibilidad de alimento

Durante los 7 días que duró el muestreo se colectaron 2711 individuos pertenecientes a 67 familias y 17 ordenes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Especies de artrópodos colectados en las trampas de caída. Los * corresponden a Suborden.

Clase	Orden	Familia	Abundancia	Frecuencia
ARACHNIDA	Acari	Ixodidae*	8	0.3
	Araneae	Agelenidae	1	0
		Amaurobiidae	3	0.1
		Anyphaenidae	7	0.3
		Araneidae	74	2.7
		Corinnidae	1	0
		Gnaphosidae	4	0.1
		Hanniidae	3	0.1
		Linyphiidae	1	0
		Lycosidae	34	1.3
		Salticidae	3	0.1
		Tetragnathidae	11	0.4
		Theridiidae	4	0.1
		Thomisidae	1	0
Titanoecidae	1	0		
Opiliona	Caddidae	1	0	
Seudoescorpionida	Cheliferinea*	1	0	
Chilopoda	Lithobiiomorpha		6	0.2
Crustacea	Isopoda	Oniscidae	64	2.4
Diplopoda	Polydesmida		3	0.1
INSECTA	Coleóptera	Carabidae	21	0.8
		Chrysomelidae	2	0.1
		Coccinellidae	12	0.4
		Cucujidae	1	0
		Curculionidae	2	0.1
		Elateridae	2	0.1
		Haliphidae	1	0
		Lampiridae	2	0.1
		Scarabaeidae	1	0
		Staphilinidae	29	1.1
		Tenebrionidae	1	0
	Collembola	Actaletidae	1316	48.5
		Poduridae	97	3.6
		Smithuridae	7	0.3
	Dictyoptera	Blattodea*	2	0.1
	Diptera	Cecidomyiidae	1	0
		Chironomidae	20	0.7
		Dolichopoidea	1	0
		Heleomyzidae	8	0.3
		Phoridae	7	0.3

Tabla 1. Continuación

	Sphaeroceridae	33	1.2	
	Stratiomyidae	1	0	
	Tipulidae	1	0	
	Trichoceridae	9	0.3	
Hemiptera	Aphidoidea	69	2.5	
	Cercopoidea	15	0.6	
	Coccoidea	1	0	
	Fulgoroidea	4	0.1	
	Jassoidea	35	1.3	
	Lygaeidae	26	1	
	Miridea	1	0	
	Octoridae	1	0	
	Psylloidea	2	0.1	
	Reduviidae	2	0.1	
	Tingitidae	1	0	
	Hymenoptera	Bethulidae	2	0.1
		Chalcididae	4	0.1
Formicidae		701	25.9	
Serphidae		4	0.1	
Sphicidae		1	0	
Lepidoptera		10	0.4	
Orthoptera	Acridoidea	2	0.1	
	Grillo.Tolpida	1	0	
	Gryllidae	18	0.7	
	Tettigonioidea	1	0	
Planipenia		1	0	
Siphonaptera		1	0	
TOTAL		2711		

Se determinó la riqueza de familias utilizando curvas de acumulación, que representan el incremento en el número de familias según el esfuerzo, ya sean días o trampas (**Fig. 6**). Se encontraron diferencias significativas en el incremento del número de trampas y de días sobre la riqueza ($p < 0.001$). Por tanto, con la finalidad de estimar la diversidad de artrópodos en el sitio estudiado, deberíamos poner más trampas y más días.

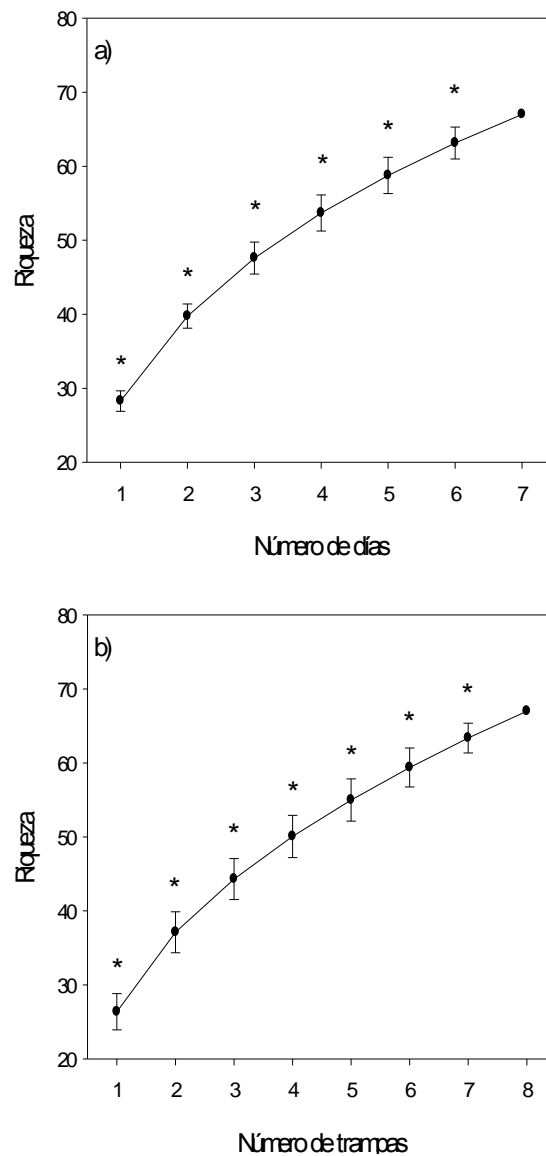


Figura 6. Curva de acumulación de familias capturadas durante el muestreo (media \pm error estándar). a) Días acumulados y b) Trampas acumuladas. * = Diferencias significativas entre todos los puntos.

Cuando realizamos el ranking de abundancia de artrópodos capturados, observamos que la familia Actaletidae representa el 48% del total de las capturas, seguido por Formicidae y Poduridae (**Fig. 7**). Si se tiene en cuenta estas tres familias más abundantes, se tiene el 78% de la abundancia

total capturada. Los anuros con los que trabajamos tuvieron una dieta generalista, por lo que eliminamos las familias menos frecuentes, según nuestro criterio, que son aquellas familias que tenían menos de 3 individuos durante todo el muestreo y que aportaron sólo el 1,5% de la abundancia total capturada. También eliminamos las 3 familias más abundantes (Actaletidae, Poduridae y Formicidae) por no estar incluidas, según bibliografía dentro de la dieta de los anfibios a estudiar.

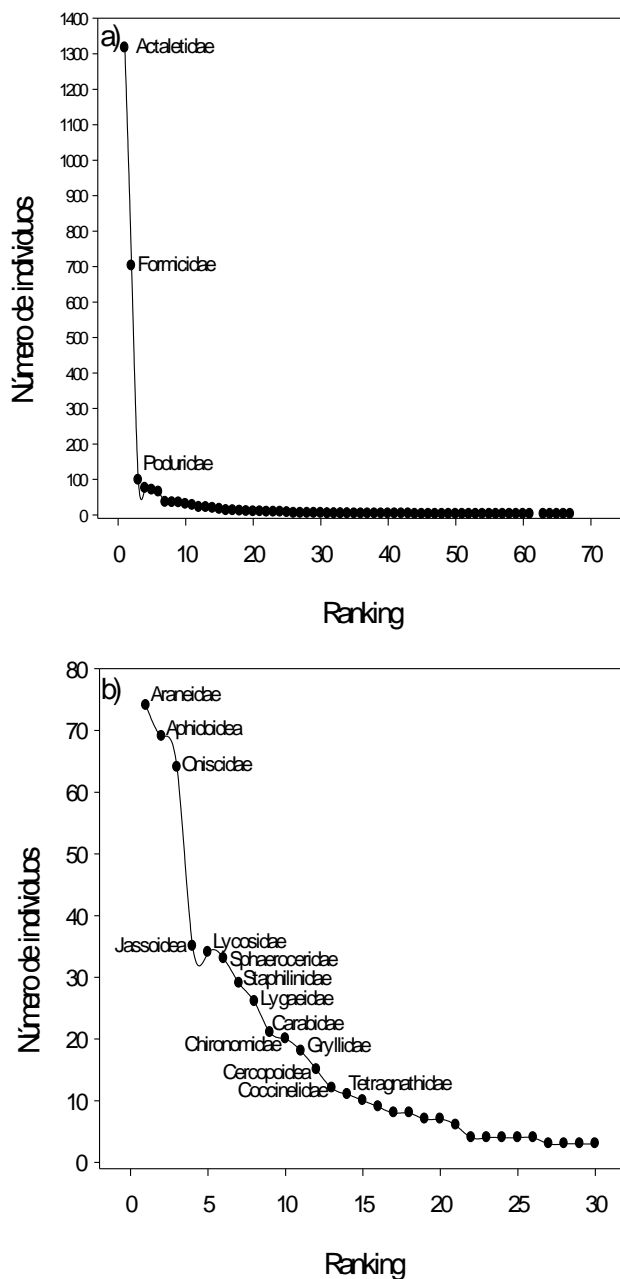


Figura 7. Ranking de abundancia de artrópodos capturados durante el muestreo a) Todas las familias. b) Familias con hasta 3 individuos menos Collembola y Formicidae.

Volvimos a realizar las curvas de riqueza con las 34 familias más abundantes y observamos que dejando las trampas por un período de más de 4 días el cambio en la riqueza no fue significativo, aunque al día 4 vemos la tendencia y sucede lo mismo al poner más de 5 trampas (**Fig. 8**). Por lo tanto, se observa que el muestreo más eficiente se obtiene a los 4 días con 5 trampas.

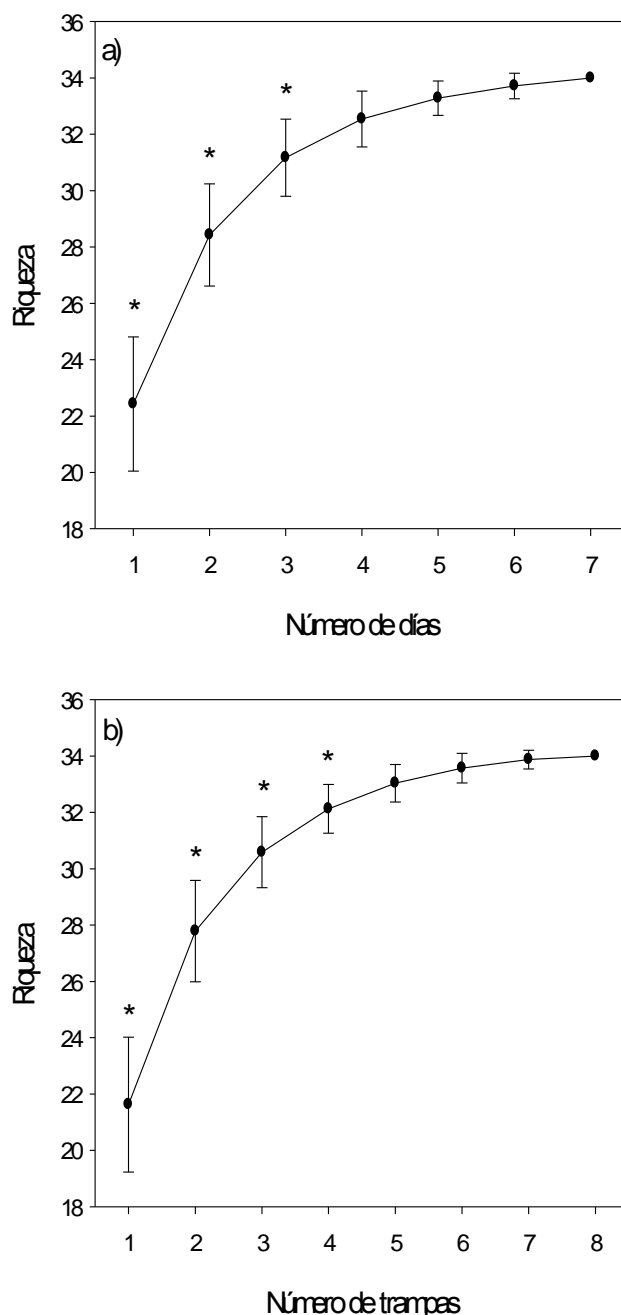


Figura 8. Curva de acumulación de familias capturadas durante el muestreo (media \pm DE). a) Días acumulados, * = Diferencias significativas entre 4, 5 y 6 y b) Trampas acumuladas.* = Diferencias significativas entre 5, 6, y 7. Cada día es la suma de 8 estaciones de muestreo.

El desvío estándar de la abundancia con 7 o 4 días entre el número de trampas no varió significativamente, aunque a los 7 días vemos que hay una diferencia significativa entre la trampa 5 y la 2, esta diferencia no es biológicamente significativa, ya que es dada por el azar (**Fig. 9**). Contrario a lo que esperábamos, la precisión no aumento (no disminuyo el DE) a medida que se agregaban trampas. Se realizaron las pruebas de potencia con un 80% de certeza y se obtuvo que para notar un cambio del 30% en la abundancia entre los tratamientos a los 7 y 4 días, se deben colocar 10 o 12 trampas respectivamente.

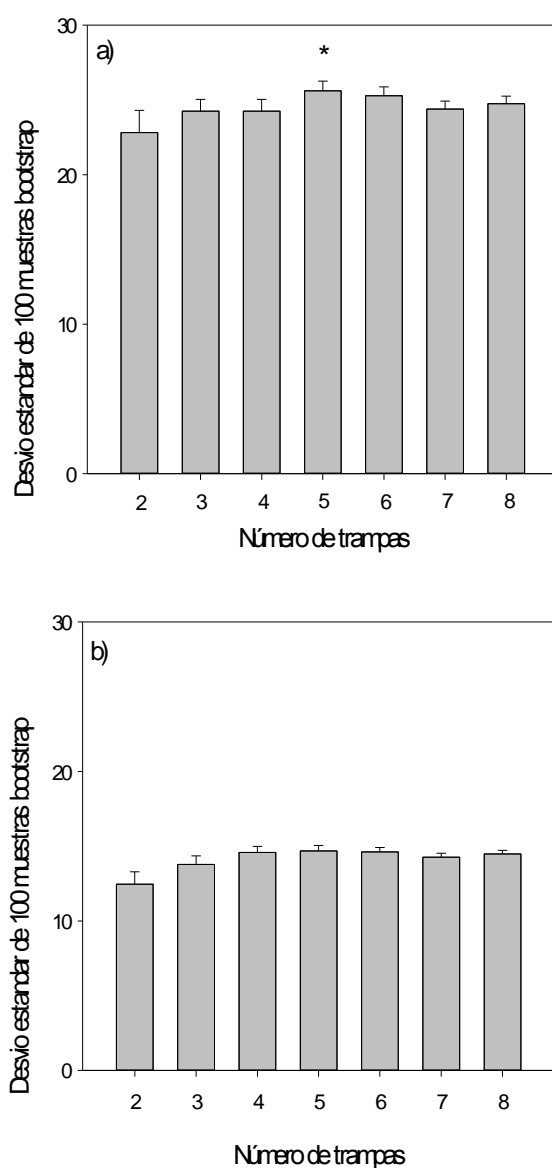


Figura 9. Desvío estándar (media \pm E.E) de la abundancia de todas las familias capturadas menos las familias de Collembola y Formicidae con diferente número de trampas. a) 7 días y b) 4 días. * = diferencias significativas con respecto a 2 trampas.

3.4 DISCUSIÓN

La escasa disponibilidad de alimentos puede afectar a las poblaciones, actuando sobre su mantenimiento y crecimiento (tanto a nivel individual como poblacional, respectivamente). Los organismos necesitan la energía necesaria para el mantenimiento de sus funciones vitales, es decir para la formación de tejidos, locomoción, forrajeo, acumulación de reservas energéticas, reproducción, etc. (Congdon et al., 1982; McNab, 2002). Sabemos no obstante que tanto la reproducción como el crecimiento pueden ser detenidos temporalmente, sin poner en riesgo la supervivencia (McNab, 2002). Asimismo, estas carencias pueden afectar a las poblacionales suprimiendo eventos de cortejo, o disminuyendo el número de puestas, en momentos de recursos energéticos limitados (Colin et al., 2016).

Las especies generalistas consumen una variedad de presas en proporciones relativas a la disponibilidad existente en el ambiente. Los anuros adultos estudiados son generalistas y se alimentan, en mayor medida, de invertebrados del suelo (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Attademo et al., 2005; Solé et al., 2009). Para estudiar la disponibilidad de artrópodos, como alimento para los anfibios, se utilizaron trampas de caída. Las trampas de caída son el método más utilizado para el muestreo de artrópodos que viven en el suelo (Southwood, 1978; Niemelä et al., 1992; Pekár, 2002; Phillips & Cobb, 2005). Este método estima la abundancia relativa de artrópodos, reflejando la abundancia individual de las especies dentro de un hábitat dado (Mazía et al., 2006). La literatura actual muestra que las trampas de caída se pueden usar de varias maneras: para evaluar la distribución de macroinvertebrados en diversos ecosistemas a diferentes escalas, para describir patrones de actividad, asociaciones de hábitats, así como para establecer abundancias de especies relativas, o los efectos que las perturbaciones pueden causar en la biodiversidad (Niemelä et al., 1992; Pekár, 2002; Mazía et al., 2006). En este trabajo pudimos relevar 67 familias pertenecientes a 17 órdenes de artrópodos del suelo. Para determinar cuál era el mejor diseño de muestreo, se seleccionaron aquellos órdenes y familias que no estuvieran subrepresentados (con menos de 3 individuos), o que fueran superabundantes. Las trampas de caída resultaron ser un método eficaz para relevar la disponibilidad de artrópodos que podrían ser presa de los anuros, dado que dentro de los órdenes seleccionados, se encontraron Coleóptera, Hemiptera, Homóptera, Arachnida y Ortóptera que son ítems en la dieta de las especies de anfibios estudiadas (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Attademo et al., 2005; Solé et al., 2009.).

En este capítulo, analizamos cómo se puede elegir el tamaño de la muestra para garantizar la potencia deseada. Previo a estos análisis es muy importante elegir las técnicas de muestreo (trampa

de caída) para la población de interés (artrópodos del suelo), criterios de inclusión (ítems consumidos por los anuros) y criterios de exclusión (ítems no consumidos por los anuros, ítems raros o superabundantes) que interfieran en la decisión del objetivo de estudio.

El cálculo del tamaño de la muestra es una función matemática que expresa la relación entre las variables, cantidad de muestras y poder estadístico. El tamaño de muestra permite saber cuántas muestras son necesarias estudiar. El poder es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es falsa, es decir, la probabilidad de decir que hay una diferencia cuando realmente existe una diferencia. Un estudio de poca potencia no tiene un tamaño de muestra suficientemente grande para responder la pregunta de investigación de interés. Otro con un tamaño de muestra demasiado grande, desperdicia recursos (García-García et al., 2013).

3.5 CONCLUSIONES

Para determinar la riqueza de las familias que comen los anuros a estudiar, solo basta con dejar 5 trampas durante 4 días, pero no sólo nos interesa como cambiará la riqueza de artrópodos después de una aplicación de agroquímicos, sino también ver estos cambios en la abundancia de artrópodos. Por lo tanto deberíamos colocar más trampas para notar cambios en la abundancia. Para notar una diferencia del 30% en la abundancia con un poder del 80%, se deberían colocar 12 trampas durante 4 días.

**4. DETECCIONES DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN
ÓRGANOS DE ANUROS Y SU RELACIÓN CON ALTERACIONES
BIOQUÍMICAS Y ENERGÉTICAS**

4.1 INTRODUCCIÓN

Con el inicio de la Revolución Verde en los años 70, las prácticas agrícolas se volvieron dependientes de las tecnologías modernas para la selección y modificación genética de los cultivos y el control químico de diferentes tipos de plagas (malezas, insectos y patógenos), (Tilman, 1999; Bindraban et al., 2009). Por lo general, las tierras productivas de la región pampeana se dedican al cultivo extensivo de soja, trigo o maíz, realizando dos ciclos de cultivo en un año y utilizando diversos tipos de plaguicidas. A modo de ejemplo, durante la campaña 2010/2011, los fungicidas más utilizados en la zona núcleo de la región pampeana fueron el carbendazim y el tebuconazol; mientras que dentro de los herbicidas se usaron principalmente glifosato, metsulfuron, 2,4-D, acetoclor, atrazina, y clorimuron (RETAA, 2013). Con respecto a los insecticidas, se utilizaron principalmente clorpirifos y cipermetrina, además de otros insecticidas piretroides y reguladores de crecimiento como el metoxifenocido. Estos plaguicidas se usaron individualmente o más comúnmente en combinaciones varias (Rennella & Quirós, 2000; Perez Leiva y Anastasio, 2003; Bindraban et al., 2009). Por otro lado, ya son varios los trabajos que reportan la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales, subterráneas y de lluvia; en sedimentos y en suelos, y también en la biota presente en la región pampeana (Peruzzo et al., 2008; Aparicio et al., 2013; Bonansea et al., 2013; De Gerónimo et al., 2014; Lupi et al., 2015; Hunt et al., 2016; Ronco et al., 2016; Etchegoyen et al., 2017; Pérez et al., 2017; Primost et al., 2017; Caprile et al., 2016; Brodeur et al., 2017; Castro Berman et al., 2018; Alonso et al., 2018; Milesi Delaye et al., 2018).

Los anfibios son excelentes indicadores biológicos de la calidad ambiental debido a que poseen ciertas particularidades anatómicas, reproductivas y ecológicas. Debido a su fisiología e historia de vida únicas (bifásica), los anfibios son más vulnerables a los plaguicidas que otras especies silvestres (Quaranta et al., 2009). Además, los anfibios tienen una piel altamente permeable que permite la absorción dérmica de plaguicidas (Van Meter et al., 2014). Es común encontrar plaguicidas en el hábitat de los anfibios presentes en agroecosistemas, y tales moléculas han sido previamente detectadas en tejidos de algunos anfibios (Smalling et al., 2015; Battaglin et al., 2016). Sin embargo, los niveles de plaguicidas detectados en los tejidos de los anuros no siempre pueden explicarse por los niveles detectados en los hábitats acuáticos (Battaglin et al., 2016; Smalling et al., 2015), con lo cual algunos investigadores han propuesto que el medio ambiente terrestre puede contribuir significativamente a la exposición a plaguicidas de las poblaciones de anfibios (Brühl et al., 2011, 2013; Van Meter et al., 2014). El momento en el que acontece la exposición, el metabolismo y la excreción desempeñan un rol importante en el potencial de acumulación y el tiempo de permanencia de los plaguicidas en los tejidos. El contacto con los productos químicos

puede causar la muerte o una variedad de efectos subletales (Mann et al., 2009). Además de los efectos tóxicos directos que producen los plaguicidas en la poblaciones de anfibios, los insecticidas y herbicidas destruyen, además, a insectos y plantas no blanco, reduciendo así la disponibilidad de alimento y refugio para los anfibios (Schäfer et al., 2012; Beketov et al., 2013). Las determinaciones de la toxicidad directa claramente no son suficientes para evaluar las consecuencias ecológicas completas del uso de plaguicidas, pero no existen metodologías estándares para evaluar los efectos de plaguicidas en la eliminación de presas y competidores y sería imposible estandarizarlas, particularmente en la escala de campo (Devine & Furlong, 2007).

El objetivo del presente estudio fue comparar el estado de salud de los anfibios adultos que habitan campos con diferentes niveles de intensidad agrícola. Los efectos de esta intensificación fueron evaluados mediante la determinación de la disponibilidad y del consumo de alimento, de varios índices corporales y de la condición corporal, y, finalmente, de una serie de biomarcadores bioquímicos. El nivel y la naturaleza de la contaminación por plaguicidas presente en los sitios muestreados fueron caracterizados midiendo 46 moléculas de plaguicidas diferentes en muestras de riñón y de músculo de los anfibios adultos capturados. Los biomarcadores examinados incluyeron el contenido hepático de glutatión reducido (GSH) y las actividades enzimáticas de catalasa (CAT), glutatión-S-transferasas (GST) y colinesterasas (ChE). Estos últimos cuatro parámetros sirvieron, respectivamente, como biomarcadores de estrés oxidativo (CAT y GSH), activación de la biotransformación de pesticidas (GST) y exposición a insecticidas organofosforados y carbamatos (ChE) (Brodeur et al., 2011; Colin et al., 2016).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Los animales fueron capturados en cinco sitios distintos (**Fig. 1**). Los sitios de muestreo se encuentran todos ubicados en la subregión de la Pampa Ondulada, en la provincia de Buenos Aires, (Velazquez & Linares, 2009). En la Pampa Ondulada, el clima es húmedo a subhúmedo, con precipitaciones que varían entre 600 mm al sudoeste hasta 1100 mm en el noreste (Soriano et al., 1992). Los parches con campos de cultivo dominan la matriz del paisaje, y las condiciones climáticas permiten el doble cultivo: *i.e.* se siembran y cosechan dos cultivos seguidos en un mismo año (Barsky et. al., 1991).

Con el objetivo de obtener ejemplares de anfibios adultos expuestos a un gradiente de contaminación, los sitios de muestreo fueron seleccionados en base a tres características que influyen

su probabilidad de ser contaminados por plaguicidas: a) la distancia desde la naciente del río (los plaguicidas se van acumulando a medida que el río atraviesa más tierras productivas) b) el porcentaje de superficie ocupada por cultivos (mayor superficie de cultivos significa mayor cantidad de plaguicidas utilizados) y c) la proximidad de los cultivos al río (más cerca está el cultivo del río, mayor es la probabilidad de que los plaguicidas entren en el curso de agua a través de escorrentía y/o deriva).

De los cinco sitios muestreados, uno se encuentra en la reserva privada “El Destino” en el partido de Magdalena, uno en un campo mixto de Chivilcoy, y tres se sitúan en el partido de Pergamino, en ubicaciones con distintos niveles de intensificación agrícola (**Fig. 2**). La Tabla 1 describe las características geográficas y la localización exacta de los cinco sitios. La numeración asignada a cada sitio corresponde, de manera general, al gradiente de contaminación esperado; el sitio 1 siendo el sitio en el cual se esperaba encontrar la menor contaminación. En todos los sitios, los anuros adultos fueron capturados en los márgenes de arroyos angostos y poco profundos, típicos de la región.

En la Reserva el Destino, los anfibios fueron capturados en los márgenes del arroyo denominado Primera Estancia, en un sitio cercano a su desembocadura en el río de La Plata. Esta reserva no tiene actividad agrícola, pero si actividad ganadera. En Chivilcoy, el muestreo se realizó cerca de la naciente del arroyo Las Saladas, un curso de agua intermitente conformado por una serie de lagunas que se conectan en momentos de mucha lluvia, y que desemboca en el río Salado. El arroyo Pergamino se origina en una región de bañados llamada Esteros del Juncal ubicado al sureste de la localidad de Juncal, provincia de Santa Fe. El curso de agua es, sin embargo, conocido como río “Sin Nombre” por unos 17 km hasta llegar a un sitio llamado Laguna El Pescado donde el río se ensancha para formar un pantano. El río se denomina oficialmente río Pergamino desde la salida de este pantano hasta que desemboca en el río Arrecifes a unos 70 km río abajo. Los tres sitios de muestreo sobre el arroyo Pergamino, se ubicaron antes de la ciudad homónima, para evitar interferencias de contaminación urbana e industrial en el diseño del estudio.

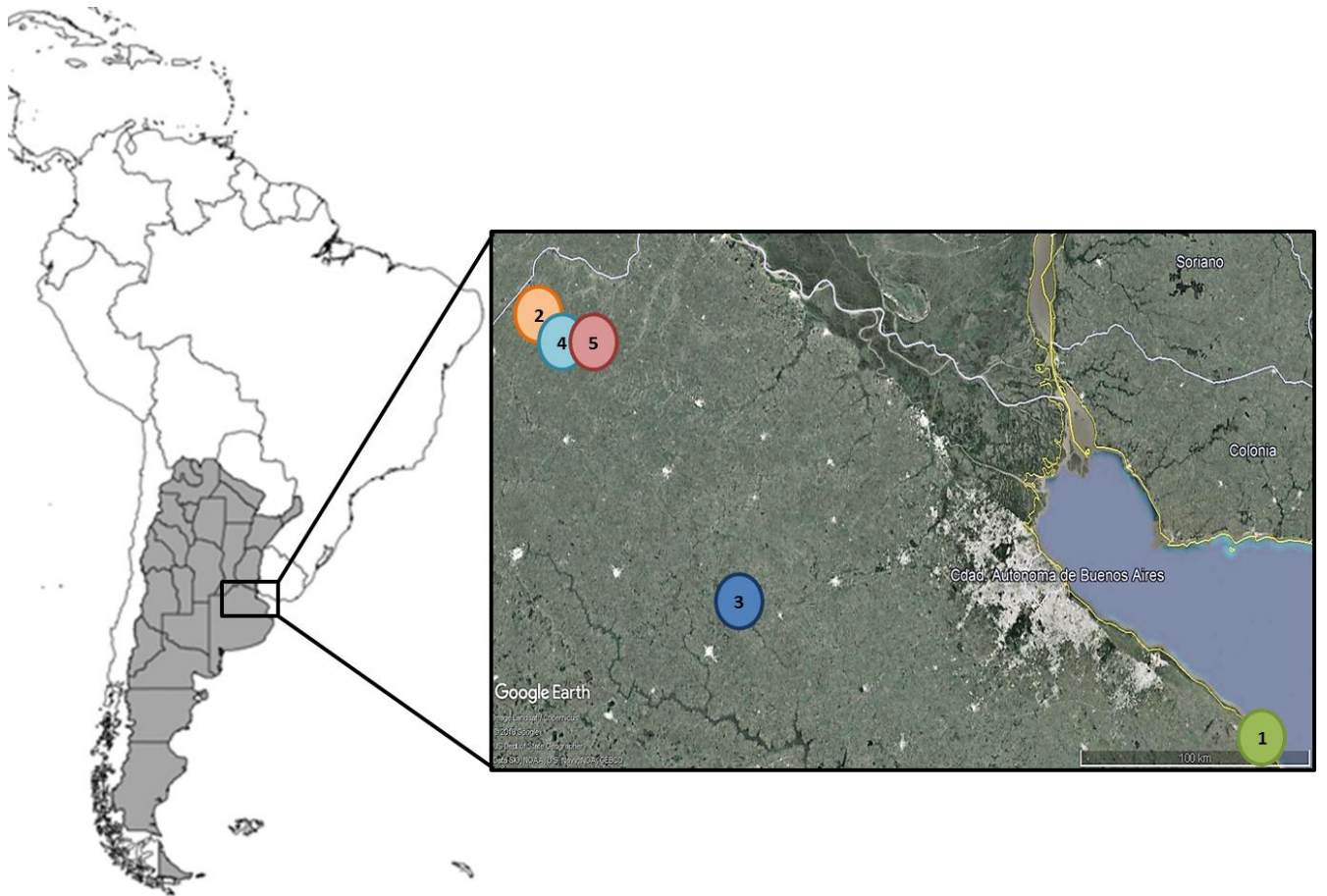


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en la Pampa Ondulada, provincia de Buenos Aires.

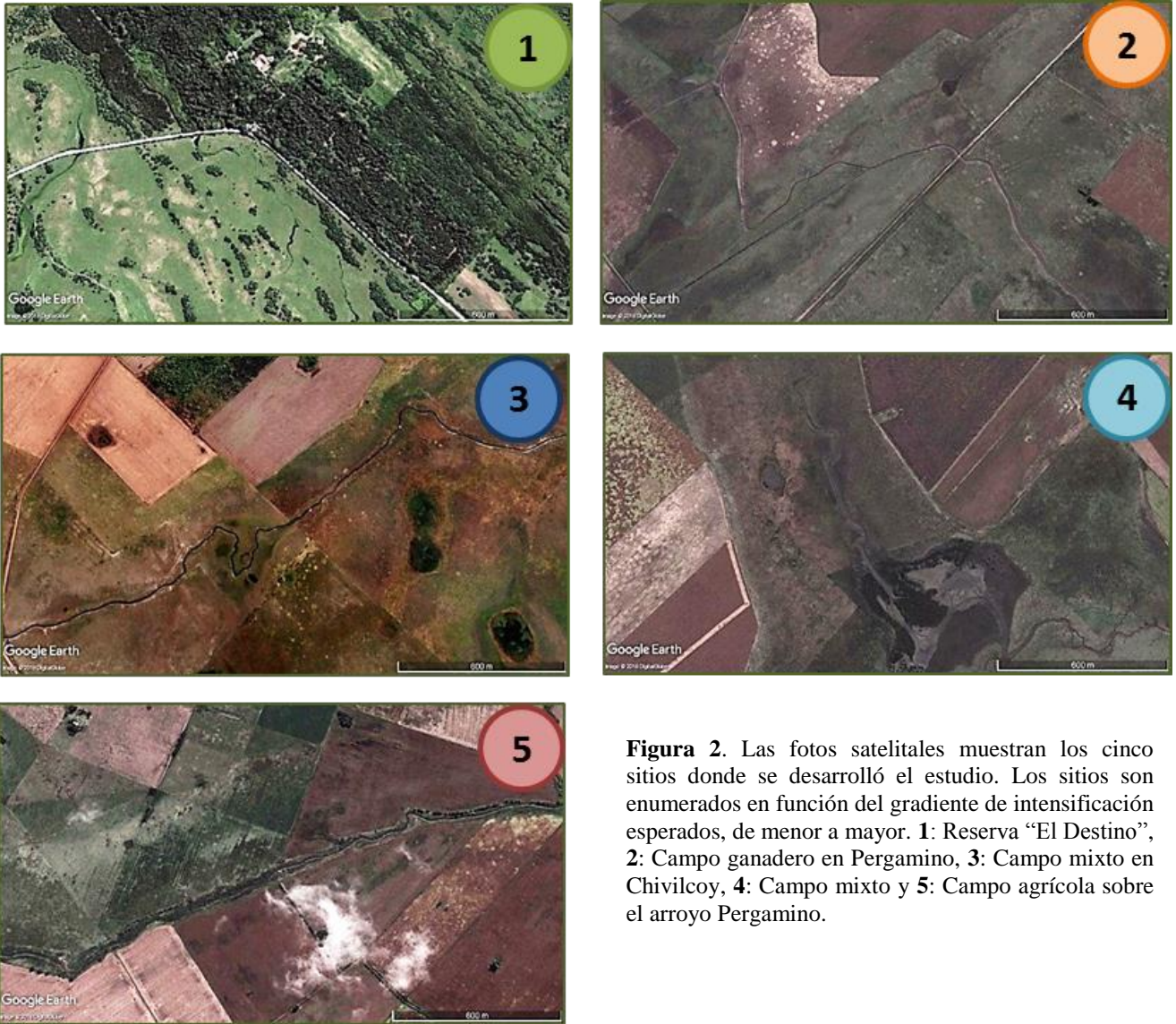


Figura 2. Las fotos satelitales muestran los cinco sitios donde se desarrolló el estudio. Los sitios son enumerados en función del gradiente de intensificación esperados, de menor a mayor. **1:** Reserva “El Destino”, **2:** Campo ganadero en Pergamino, **3:** Campo mixto en Chivilcoy, **4:** Campo mixto y **5:** Campo agrícola sobre el arroyo Pergamino.

De manera a caracterizar la intensidad de la agricultura en cada uno de los cinco sitios de muestreo, se calculó con imágenes satelitales (Google Earth) el porcentaje de superficie cultivada en un cuadrante de 1 km^2 alrededor de los puntos de muestreo. Adicionalmente, en cada sitio de muestreo, se estimó la proximidad del cultivo al arroyo midiendo la distancia entre el cultivo y la ribera en 10 puntos igualmente espaciados a lo largo del cuadrante (Tabla 1). El sitio 1 está ubicado a 12,5 km de la naciente del arroyo Primera Estancia y no tiene cultivos cercanos. El sitio 2 está situado al comienzo del arroyo Pergamino, cerca de las cabeceras. Quince por ciento de la tierra que le rodea está ocupada por cultivos, el cultivo más cercano estando ubicado a una distancia de 467 m del río. El sitio 3, sobre el arroyo Las Saladas, se localiza a 13k m de la cabecera, presenta un 12% de área cultivada en sus alrededores y el cultivo más próximo está ubicado a 160 m del arroyo. Los campos que rodean el sitio 4, también sobre el arroyo Pergamino, presentan una mayor proporción

de cultivos con 42% de la superficie ocupada por cultivos y los cultivos se ubican a 315 m del río en promedio. Finalmente, el 97% de la tierra circundante al sitio 5 está ocupada por cultivos, y estos se encuentran a una distancia promedio de solo 22 m del río. Los sitios 4 y 5 están ubicados respectivamente a 13 y 25 km de la cabecera del arroyo Pergamino (**Tabla 1**).

Tabla 1. Localización y características geográficas de los sitios muestreados

Sitio	Localización	Descripción	Distancia de la naciente del arroyo (km)	Superficie de área cultivada (%)	Distancia entre cultivos y el arroyo (m)
1	35° 08' 20" S 57° 23' 27" O	Reserva privada "El Destino", creada en 1979 cuenta con una superficie de 1879 ha. Se encuentra dentro del Parque Costero del Sur, una Reserva de Biosfera de la UNESCO de 265 km ² creada en 1997 a lo largo del Río de la Plata.	12,5	0	sin cultivo cercano
2	33° 48' 18" S, 60° 54' 09" O	Naciente del arroyo Pergamino. Campo ganadero con pastura muy pisoteada.	2	15	467
3	34° 46' 58" S 59° 54' 07" O	Naciente del arroyo Las Saladas. De un lado del arroyo, campo potrero con pastura muy pisoteada, y del otro, pastura con lotes de cultivos cercanos.	13	12	160
4	33° 52' 48" S, 60° 46' 40" O	Margen del arroyo ganadero con pastura mixta. Cultivos cercanos de soja y sorgo.	13	42	315
5	33° 53' 3" S, 60° 39' 7" O	Margen del arroyo con vegetación natural. Cultivos cercanos de soja, sorgo y alfalfa.	25	97	22

Especies de anuros estudiadas

Las especies de anuros estudiadas fueron *L. latrans* y *L. latinasus*; dos especies representativas de los agroecosistemas de la región pampeana y que fueron las más abundantes encontradas (**Fig. 3**). Además, presentan distintos hábitos de vida, son fácilmente identificables a nivel de especie y se encuentran en la categoría de especies no amenazadas la categorización del estado de conservación de los anfibios de la república Argentina (Veira et al., 2012).

A) *L. latrans* (Linnaeus, 1758): Semiacuática. Dorso verdoso o pardo amarillento, con varias cadenas glandulares longitudinales y manchas grandes oscuras con bordes claros. Tamaño 9-14 cm. Mancha triangular entre los ojos. Macho más grande que la hembra con brazos muy desarrollados y 2 espinas en el 1er dedo de la mano. Se reproduce de septiembre a febrero. Su alimento es variado, desde escarabajos a otros anuros más pequeños. La hembra pone los huevos en un nido de espuma que cuida situándose en la parte interna del mismo (Achaval & Olmos, 2003).

B) *L. latinasus* (Jimenez de la Espada, 1875): Terrestre. Dorso gris a castaño con reticulado negro y una mancha color beige a anaranjada en el dorso. Tamaño de 3-4 cm. Cadena glandular blanquesina. Macho con manchas gulares bilaterales oscuras y un saco vocal. Se reproduce de octubre a febrero. Se alimenta de varios invertebrados. Los machos vocalizan en cuevas de tierra cavadas por ellos. Ahí la pareja pone los huevos en un nido de espuma (Achaval & Olmos, 2003).

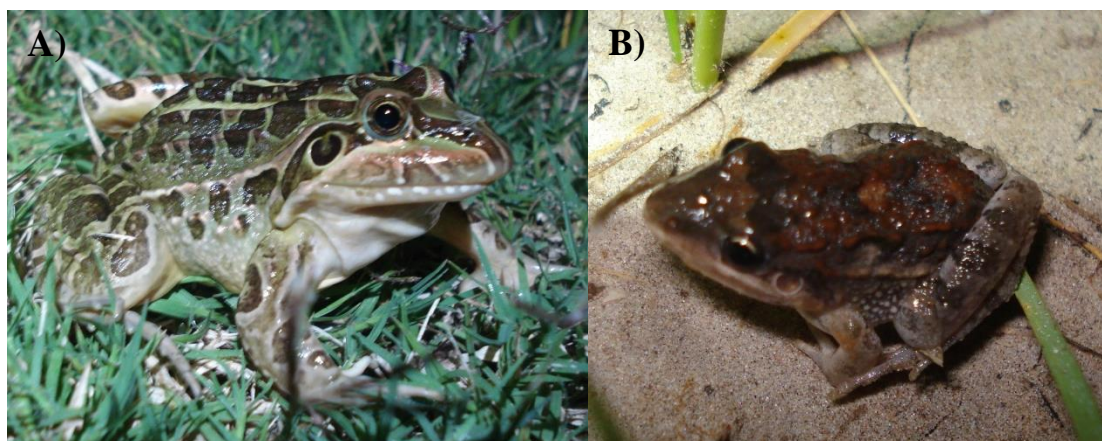


Figura 3. Especies estudiadas: **A)** *L. latrans* y **B)** *L. latinasus*

Captura de anuros

Ejemplares adultos de las especies *L. latrans* y *L. latinasus* fueron capturadas en cada sitio en dos oportunidades: primero en diciembre de 2011 y luego en marzo de 2012. Las condiciones climáticas presentes en los sitios estudiados durante diciembre fueron las siguientes: Para los sitios 2 a 5, ubicados en Chilvicoy y Pergamino, la temperatura del aire y las precipitaciones promedio fueron 22,07°C y 7,55 mm, respectivamente, mientras que en el sitio 1, ubicado en Magdalena, la temperatura promedio y las precipitaciones fueron de 20,7°C y 111,6 mm. Durante el mes de marzo, la temperatura del aire fue en promedio de 19,7°C y cayeron 125 mm en los sitios 2 a 5. Las condiciones fueron similares en el sitio 1 con 20,78°C de temperatura promedio y 107,3 mm de precipitaciones (<http://siga2.inta.gov.ar>).

El clima seco durante la primer captura (diciembre) hizo difícil el muestreo de anfibios y resultó imposible conseguir un número adecuado de individuos de ambas especies para todos los

sitios y fechas de muestreo. Se consideraron para los análisis estadísticos solamente los sitios que tenían un número de ejemplares igual o superior a 5 individuos. Para la especie *L. latrans*, los sitios 1, 2 y 4 en el mes de marzo no pudieron ser considerados por el bajo número de individuos capturados (**Tabla 2a**). Para la especie *L. latinasus*, en el mes de marzo, la gran mayoría de ejemplares capturados en los sitios 2 y 3 eran individuos juveniles a los cuales no se pudo identificar el sexo (**Tabla 2b**). Los animales fueron colectados de forma manual al anochecer y se trasladaron en jaulas húmedas a laboratorios temporarios establecidos en las cercanías de los sitios de muestreo. A la mañana siguiente, los ejemplares fueron anestesiados individualmente por inmersión en una solución de 100 mg/L tricaina de metanosulfonato. Se midió su peso con una balanza digital Sartorius 412 (0,01 g de precisión) y el largo hocico-cloaca (LHC) con un calibre digital Essex (0,01 mm de precisión). En cada individuo, se extrajeron los siguientes órganos y tejidos: el hígado, el aparato digestivo, las gónadas, los riñones y un trozo de músculo de aproximadamente 1 cm³ del muslo de la pierna derecha. El hígado, el aparato digestivo y las gónadas fueron pesados con 0,01 g de precisión de manera a poder calcular los índices corporales correspondientes. Todos los tejidos, salvo los aparatos digestivos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio, estas muestras fueron colocadas en un freezer de -80°C hasta su procesamiento. Los aparatos digestivos fueron fijados en formol al 10% para utilizarse en la determinación del contenido estomacal y el análisis de dieta. Las capturas de anfibios en Chivilcoy y Pergamino fueron realizadas bajo permiso de la Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires, mientras que las capturas en la Reserva “El Destino” contaban con el permiso de Áreas Naturales Protegidas del Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) de la provincia de Buenos Aires. Todos los procedimientos que implican anuros vivos se realizaron de acuerdo con las pautas de referencia para la investigación con animales de laboratorio, de granja y salvajes del Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica de Argentina (CONICET, 2005).

Tabla 2. Número de individuos capturados en los diferentes sitios y fechas de muestreo. a) *L. latrans* y b) *L. latinasus*. F: Hembra, M: Macho, I: Indeterminado.

		a) <i>L. latrans</i>				b) <i>L. latinasus</i>				
Sitio	Muestreo	Sexo				Sexo				
		H	M	I	Total		H	M	I	Total
1	Diciembre	6	9	0	15		5	1	0	6
	Marzo	1	1	0	2		5	6	0	11
2	Diciembre	5	5	0	10		3	4	0	7
	Marzo	1	0	0	1		1	1	6	8
3	Diciembre	7	0	0	7		1	3	0	4
	Marzo	5	2	0	7		0	0	8	8
4	Diciembre	6	5	0	11		2	8	0	10
	Marzo	1	2	0	3		1	1	0	2
5	Diciembre	1	3	0	4		5	7	0	12
	Marzo	10	6	0	16		1	1	1	3
Total		41	31	0	72		24	32	15	71

Determinaciones analíticas de plaguicidas

La determinación de los residuos de plaguicidas tisulares se realizó en riñón y musculo. En total, se analizaron 47 moléculas de plaguicidas distintas (**Tabla 3**). Para las extracciones, se pesó entre 0,08 y 0,12 g de tejido. Por lo general era posible obtener esta cantidad de tejido de un solo individuo, pero en algunos casos donde no se llegó a este peso con un solo animal, se juntaron los tejidos de dos animales de un mismo sitio y fecha de muestreo. Para las extracciones de plaguicidas, los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml de acetonitrilo conteniendo 3% de sulfato de magnesio, 3% de sodio acetato y 1,5 % de cloruro de sodio, usando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio. Los homogeneizados fueron sonicados durante diez minutos antes de ser centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de células. El sobrenadante resultante se analizó en busca de plaguicidas por cromatografía gaseosa (GC) y líquida (HPLC) seguidos por detección de masa.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para el análisis de plaguicidas. Tiempo de retención (TR), ion de cuantificación (Ion Q) y iones de confirmación (Ion C) usados como criterios de identificación. En todos los casos, el límite de detección fue de 1 µg / L y el límite de cuantificación fue 4 µg / L. GC = cromatografía de gases, LC = cromatografía líquida, EI = impacto electrónico, ESI = ionización por electrospray.

INSECTICIDAS	GC	LC	TR (min)	Ion Q (m/z)	Ion C (m/z)			Categoría de Plaguicida
	Ei	ESI (+)						
Diclorvos	X		8.61	185	220	187	145	Organofosforado
Clorpirifos-metil	X		14.92	125	286	288		Organofosforado
Clorpirifos etil	X		16.81	197	316	258	199	Organofosforado
Pirimifos metil	X		16.05	290	276	233	305	Organofosforado
Fenitrothion	X		16.22	277	260	109		Organofosforado
Malathion	X		16.62	125	173	158	127	Organofosforado
Diazinon	X		13.08	137	179	304	152	Organofosforado
Bromofos metil	X		17.78	331	329	333		Organofosforado
Parathion	X		17.27	139	109	135	155	Organofosforado
Permetrina	X		30.39	183	165	163	184	Piretroide
Fenvelarato	X		31.56	125	181	167	225	Piretroide
β-Cyflutrina	X		30.73	163	206	226	199	Piretroide
λ -Cialotrina	X		29.80	181	197	208		Piretroide
Bifentrin	X		29.04	181	250	166	182	Piretroide
Carbofuran fenol	X		9.31	164	149	123	131	Carbamato
		X	4.66	165	222			
Pirimicarb	X		14.19	166	182	138	238	Carbamato
		X	4.13	239	182			
Buprofezin		X	8.20	201	306			Reg de crecimiento
Metoxifenocide		X	6.33	149	369			Reg de crecimiento
Chlorantroniprole		X	5.61	286	505			Diamides
Imidacloprid		X	3.38	175	256			Neonicotinoides
Triflumuron		X	7.28	156	359			Benzoilurea
HERBICIDAS								
Atrazina	X		12.98	200	217	216	202	Triazina
		X	5.19	216	174			
Acetochlor	X		14.87	146	223	162	174	Chloroacetamida
		X	6.76	148	224			
Metalocho	X		16.94	162	238	146	211	Chloroacetamida
Flurocloridona	X		18.02	187	311	145	174	Pirrolidona
Imazetapir		X	4.17	290	312			Imidazolinona
Prosulfuron		X	5.97	420	141			Sulfonilureas
Triasulfuron		X	4.55	402	167			Sulfonilureas
FUNGICIDAS								

Tabla 3. Continuación

Azoxystrobin	X		32.46	344	388	403	345	Strobilurina
		X	5.95	372	404			
Picoxystrobin		X	7.01	145	205			Strobilurina
Piraclostrobin		X	7.36	194	388			Strobilurina
Trifloxistrobin		X	7.77	186	409			Strobilurina
Kresoxim-metil	X		27.77	116	131	206	132	Strobilurina
Metalaxyl	X		15.49	206	192	220	132	Acylalanina
		X	5.39	220				
Cyproconazole	X		30.85	308	309	180	266	Triazol
		X	6.22	292	294			
Epoxiconazole	X		28.54	192	194	165	138	Triazol
		X	6.49	330	192			
Penconazole	X		18.96	159	248	161		Triazol
Tebuconazole	X		28.19	125	250	252	163	Triazol
Protioconazole		X	7.15	344	326			Triazol
Fusilazole	X		22.75	127	206	234		Phenylpyrrola
Difeconazole	X		31.98	265	323	267	325	Triazol
Myclobutaril	X		22.68	179	150	181	152	Triazol
Bupirimato		X	6.62	317				Pirimidine
Fenpropimorph		X	5.73	304				Morfolina
Carbendazim		X	2.63	192				Benzimidazole
Carboxine		X	4.87	143	236			Alinidae

Los análisis de cromatografía de gases se realizaron con un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600, equipado con un detector de masa cuadrupolar. La columna utilizada fue DB-5MS (30 m, 0,25 mm, I.D, 0,25 mm de espesor de película) (Agilent Technologies). El gas helio se programó con un flujo constante de 1 ml / min. El programa de temperatura del horno se estableció inicialmente a 80°C con retención de 5 min y rampa (80-178) ° C a 25 ° C / min, (178-205) ° C a 2 ° C / min, (205-300) ° C a 30 C / min con una espera de 5 min. Los ajustes de adquisición del espectrómetro de masas fueron: electrón ionización de impacto 70 eV. Los análisis de cromatografía líquida se realizaron usando un aparato Waters Acquity de alta resolución (UPLC) equipado con un detector de masas cuadrupolar simple usando XBridge BEH C18 2,5 µm columna 2,1x150 mm, ácido acético al 0,1% en 1 agua: metanol en el siguiente gradiente; (95: 5) - (95: 5) 0 - 2 min, (95: 5) - (80:20) 2-5 min, (80:20) - (20:80) 5 - 10 min, (20 : 80) - (0: 100) 10-11 min, (0: 100) - (0: 100) 11-13 min, (0: 100) - (95: 5) 13-14 1 min, (95: 5) 14-20 minutos como la fase móvil.

Las configuraciones de adquisición del espectrómetro de masas fueron: ESI negativo o positivo (ver Tabla 3), el tiempo de retención y la presencia del ion de cuantificación (Ion Q) y la abundancia relativa del ion de confirmación (Ion C) se usaron como criterios de identificación.

Muestreo de artrópodos: disponibilidad de alimento

Con el objetivo de estimar la abundancia de artrópodos disponibles como fuente de alimento para los anfibios, se colocaron trampas de caída para artrópodos. Las trampas se colocaron a lo largo de los ríos donde se capturaron a los anuros. En cada sitio, se instalaron 12 estaciones de muestreo en transectas de 600 m y separadas en promedio por 50 m (**Fig. 4**). En cada estación de muestreo se disponían dos trampas rellenas con una solución conteniendo 2% ácido acético, 2% formol y unas gotas de detergente (para romper la tensión superficial) con la finalidad de matar y conservar los artrópodos capturados. A cada trampa se le colocaba un techo metálico para protegerla de los rayos del sol y de la lluvia (**Fig. 5**). En cada oportunidad de muestreo, se dejaban las trampas activas durante 4 días y luego se colocaba el material capturado en bolsas con la misma solución conservante de las trampas. Una vez en el laboratorio se procedió a limpiar las muestras de tierra y de los restos vegetales que contenían y, se las colocaba en vasos de plástico con alcohol etílico al 70% para conservar los ejemplares de artrópodos hasta su identificación a nivel de familia. Las variables analizadas en cada sitio y fecha de muestreo fueron riqueza, abundancia y volumen de artrópodos caídos. Para calcular el volumen se midió con escala milimétrica el largo y ancho de unos ejemplares tomados al azar de cada una de las especies caídas. Con estas dimensiones se estimó el volumen de cada especie con la fórmula para cuerpos elipsoides descrita por Colli & Zamboni (1999):

$$\text{Volúmen} = 4/3\pi (\text{largo}/2)(\text{ancho}/2)^2$$

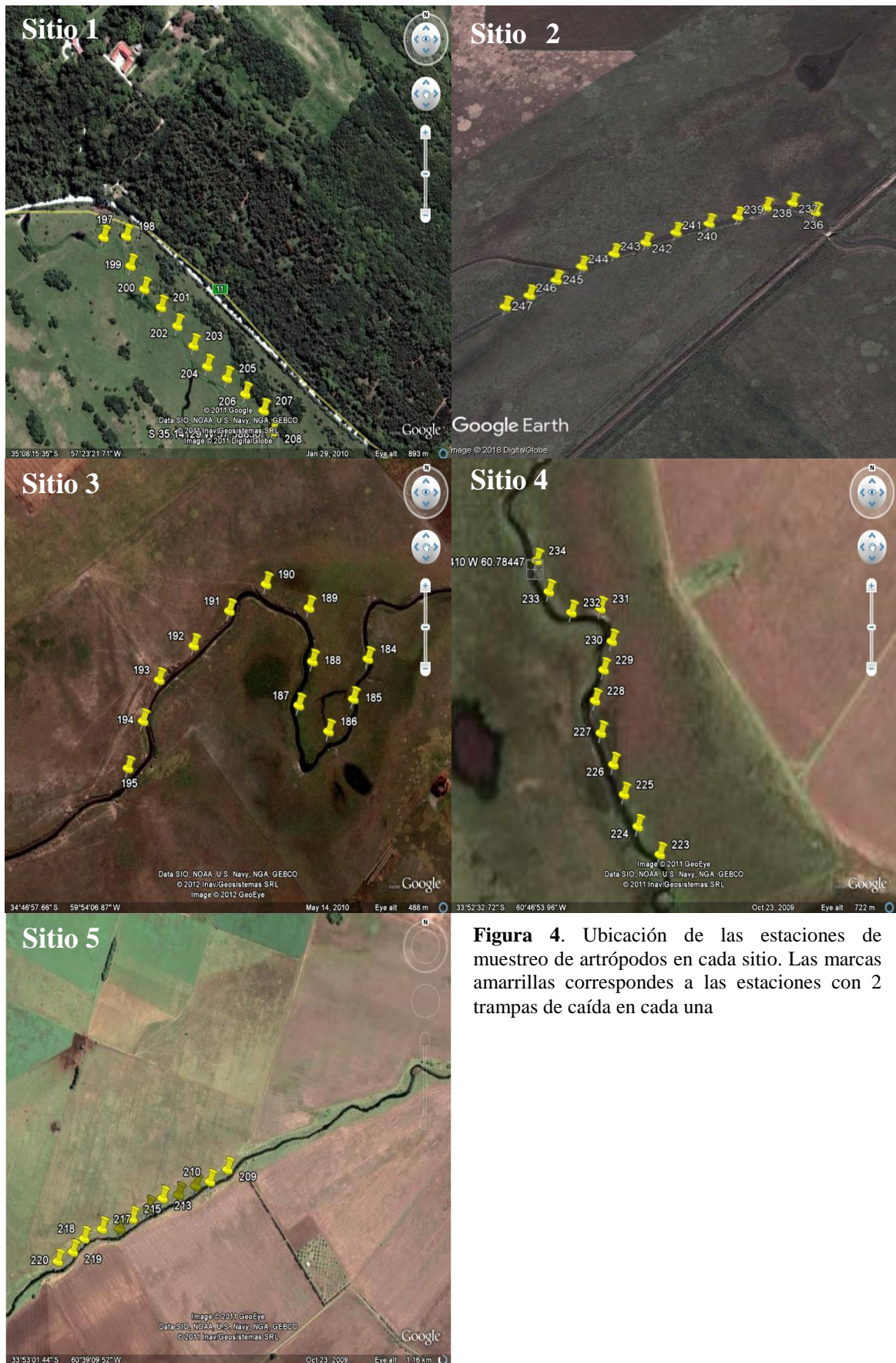


Figura 4. Ubicación de las estaciones de muestreo de artrópodos en cada sitio. Las marcas amarillas corresponden a las estaciones con 2 trampas de caída en cada una



Figura 5. Trampas de caída de artrópodos. A) Estación de muestreo con 2 trampas. B) Trampa colocada debajo de la tierra dejando la apertura al ras del suelo y cubiertas con techo de chapa para evitar el ingreso de agua de lluvia durante el muestreo.

Análisis de los componentes dietarios

El consumo de alimento se evaluó analizando el tipo y las cantidades de artrópodos presentes en los estómagos de los ejemplares capturados. Las presas de artrópodos fueron identificadas a nivel de orden y/o familia. Los contenidos gastrointestinales se analizaron cuantitativamente (número de individuos) y cualitativamente (identificados por taxas). Cuando fue posible, los ítems alimenticios hallados fueron medidos (largo y ancho) utilizando un calibre milimétrico. Con estas dimensiones, se calculó el volumen de las presas por la fórmula para cuerpos elipsoides de Colli & Zamboni (1999):

$$V = 4/3\pi (\text{largo}/2)(\text{ancho}/2)^2$$

Con los datos relativos a los distintos taxa de presas consumidos, se calculó el índice de importancia relativa (IRI), el cual informa sobre la contribución respectiva de cada categoría de presas en la dieta del animal (Pinkas, 1971; Basso, 1990; Dietl et al., 2009):

$$\text{IRI} = \%FO (\%N + \%V)$$

donde %FO es la proporción de estómagos conteniendo un ítem ($100 \times$ número de estómagos que contienen el ítem “t” / número total de estómagos), %N es el porcentaje de individuos ($100 \times$ número total de ítems “t” en todos los estómagos / número total de todos los ítems en todos los estómagos), y %V es el porcentaje de volumen ($100 \times$ el volumen total de los ítem “t” en todos los estómagos / volumen total de todos los taxas en todos los estómagos).

Finalmente, se calculó también el índice de selectividad de Jacob (1974), el cual compara la proporción relativa de los artrópodos encontrados en el ambiente con los hallados en los contenidos estomacales de los anuros. Este índice se calculó usando la siguiente ecuación:

$$D = \frac{d_k - f_k}{d_k + f_k - 2d_k f_k}$$

Donde d_k es la proporción de la presa “k” en el estómago y f_k es la proporción de la presa k en el ambiente. El índice varía de +1 (indica preferencia por una presa) a través de 0 (las presas se encuentra en las misma proporción en el ambiente como en la dieta) a -1 (la presa está ausente en la dieta y presente en el ambiente).

Condición corporal e índices somáticos

La condición corporal fue calculada como el índice de masa escalado de acuerdo a Peig y Green (2009) para evaluar la cantidad de reservas energéticas de los animales en cada sitio.

El índice S se calculó de la manera siguiente para cada una de las dos especies: primero, se calculó el valor promedio de largo hocico cloaca (LHC) de todos los individuos capturados en todos los sitios y fecha de muestreo. Luego, se transformaron los valores de LHC y peso en logaritmo en base e para cada variable. Se realizó una regresión del LnPeso vs LnLHC, aquí se tomó el valor de la pendiente (m) y el coeficiente de correlación R^2 , así se obtuvo el $b_{SMA} = m/R^2$ (Fig. 6).

$$S = M_i(L_0/L_i)^{b_{SMA}}$$

Donde:

- M_i y L_i son el peso corporal y el largo de un individuo i, respectivamente.
- b_{SMA} es el exponente estimado por una regresión entre el Ln peso y Ln de LHC.
- L_0 es el valor promedio de LHC para el grupo de animales estudiado
- S es el peso corporal predicho para un individuo i cuando su largo es estandarizado a un valor L_0 .

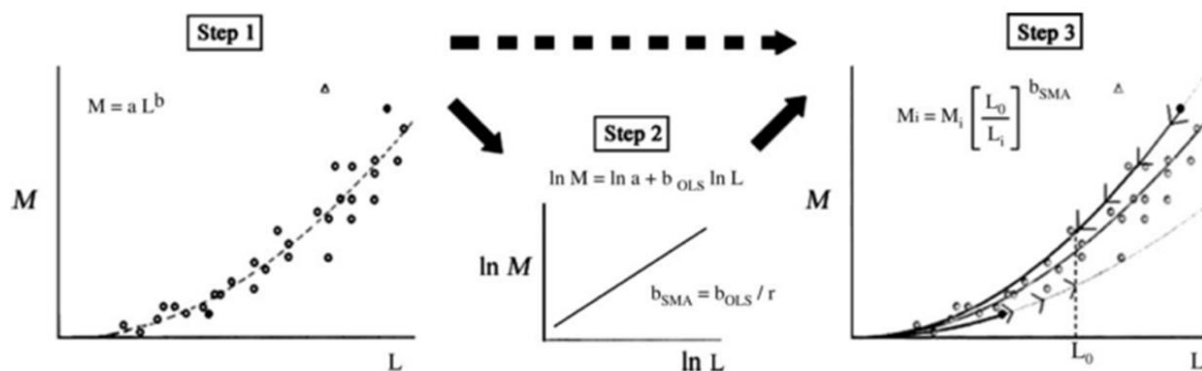


Figura 6. Pasos para calcular el índice de masa escalada (S). Fuente: Peig y Grenn 2009.

Además de la condición corporal, se calcularon también el índice hepatosomático (IHS), el índice gonadomático (IGS) y el índice de grasa corporal (IGC) como indicadores de la cantidad de reservas energéticas contenidas en los individuos. Además, el índice de contenido estomacal (ICE) fue calculado como un indicador del consumo reciente de alimento. Estos índices se calcularon como un porcentaje del peso de cada uno de estos órganos/tejidos respecto al valor del peso corporal al que se le restó el peso de las gónadas y del aparato digestivo (Brodeur et al., 2012).

Biomarcadores

Cuatro biomarcadores hepáticos fueron determinados: el contenido en glutatión reducido (GSH) y la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y colinesterasas (ChE). El hígado de cada individuo fue homogeneizado en frío en una solución tampón de 50 mM tris (hydroxymethyl) aminometano (pH 7.4) conteniendo 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y 0.25 M de sucrosa utilizando un homogeneizador teflón-vidrio tipo Potter-Elvehjem. Los homogeneizados obtenidos fueron centrifugados a 12.500 rpm y 4°C durante 5 min de manera a precipitar los residuos sólidos y posterior recolección del sobrenadante. Las determinaciones de GSH se realizaron con sobrenadante recién procesado y sin congelar, mientras que el resto del sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta medir el resto de los biomarcadores.

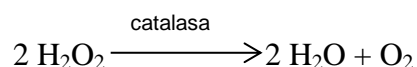
1. Contenido de Glutatión Reducido

Los contenidos hepáticos de GSH se determinaron mediante una modificación del método descrito por Tietze (1969) en el cual se cuantifica colorimétricamente la cantidad de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) resultante de la interacción de GSH con el cromógeno 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). En un primer tiempo, se precipitaron las proteínas de los homogeneizados de hígado mezclando 60 µL de estos con 120 µL de acetonitrilo en replicado. Para cada muestra analizada, se prepararon, además, dos blancos a los cuales se agregaron 10 µL de N-etilmaleimida (NEM) 16 M (i.e. 60 µl del homogeneizado, 10 µL de NEM y 110 ul de acetonitrilo). NEM evita que GSH participe en la reacción colorimétrica uniéndose al tiol libre de GSH (Guntherberg & Rost 1966). Fue necesario preparar blancos para cada muestra analizada ya que cada uno de los extractos de hígado poseía un color amarillento de diferente intensidad que interfería con la lectura de la reacción colorimétrica. Las muestras diluidas en acetonitrilo fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C para precipitar y remover las proteínas, y el sobrenadante se utilizó para la determinación de GSH.

Las determinaciones de GSH se efectuaron en microplacas de 96 pocillos. Las mezclas de reacción contenían: 200 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.5), 160 µl de homogeneizado de hígado en acetonitrilo y 10 µl de solución de DTNB. Luego de 30 min de incubación, se registró la absorbancia a 412 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. Las concentraciones de GSH presentes en las muestras se calcularon restando la absorbancia promedio de los blancos a la absorbancia promedio de las muestras, y comparando el valor obtenido a una curva estándar que se procesó en paralelo con las muestras usando varias diluciones de una solución de GSH de 76 mM preparada en tampón de homogeneización.

2. Actividad de la enzima catalasa

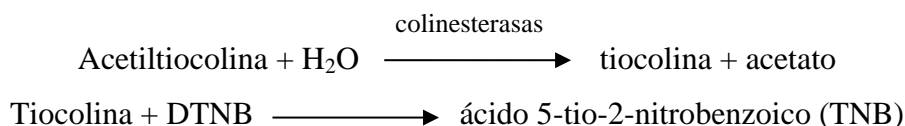
La actividad hepática de la enzima CAT se determinó utilizando la técnica de Baudhin et al. (1964). La técnica se basa en la detección de la disminución de absorbancia resultando de la degradación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂); una especie oxidante que se reduce a agua y oxígeno en la reacción catalizada por la enzima CAT.



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción contenían: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0), 10 µl de homogeneizado de hígado de anfibios adultos (diluido 1/100 en el caso de *L. latinasus* y 1/200 para *L. latrans*) y 10 µl de solución de H₂O₂ al 5%. El cambio en la absorbancia se registró durante 2 min por espectrofotometría UV a 240 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de H₂O₂ degradado por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

3. Actividad de las enzimas colinesterasas

La actividad de las enzimas ChE (butiril y acetil colinesterasas) se determinó mediante el método colorimétrico de Ellman et al., (1961). En este método, la actividad de las ChE se determina indirectamente cuantificando la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico luego de la reacción entre el ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB o Reactivo de Ellman) y la tiocolina, la cual resulta de la hidrólisis de la acetiltiocolina por las ChE (Sinko et al., 2007).



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción conteniendo: 200 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 8.0), 50 µl de homogeneizado de hígado de anfibio adulto diluido 1/10, 10 µl de una solución de 2.5 mM de ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoato) y 10 µl de una solución de 5 mM de acetiltiocolina iodada. El cambio en la absorbancia se registró durante 3 min por espectrofotometría a 412 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de 2-nitro-5-mercaptobenzoato producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 14 150 M⁻¹ cm⁻¹.

4. Actividad de la enzima Glutación-S-transferasa

La actividad de la GST se cuantificó utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) como sustrato.



Las determinaciones se efectuaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C, las mezclas de reacción conteniendo: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0), 10 µl de homogenato de hígado de rana diluido 1/100 para *L. latinasus* o 1/200 para *L. latrans* y 10 µl de una solución de 20 mM de 1-cloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB). El cambio en la absorbancia se registró durante 4 min por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG. La actividad enzimática se expresó en términos de cantidad de GS-DNB conjugado producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹.

5. Concentración de Proteínas Totales

Como las actividades enzimáticas antes mencionadas se expresan en términos de la cantidad total de proteínas presentes en el homogenato, se determinaron éstas por el método colorimétrico de Lowry et al., (1951). En esta técnica las proteínas reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que genera un complejo proteína-cobre de color azulado. La intensidad del color depende de la cantidad de tirosina y triptófano presentes en las proteínas. La coloración presenta un máximo de absorbancia a 700 nm. Para las determinaciones, se incubó a temperatura ambiente y durante 10 min, 50 µl del

homogeneizado de hígado con 100 µl de del reactivo de Lowry, cuya solución se prepara en el momento y consta de (96.5% de Na₂CO₃, 1% de KNaC₄H₄O₆·4H₂O, 2% de CuSO₄ y 0.5% de NaOH al 1 M). Posteriormente se agregan 50 µl de solución de Folin-Ciocalteau fenol 2N diluido 1/10 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de leer la absorbancia a 700 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTROstar nano marca BMG.

Análisis estadístico

1. Disponibilidad y consumo de alimento

Se comparó la disponibilidad de alimento presente en los distintos sitios comparando la riqueza, la abundancia y el volumen total de artrópodos capturados. Los datos presentados para cada sitio y fecha de muestreo representan el promedio de las capturas obtenidas en las 12 estaciones de muestreo activadas en cada sitio. Las distintas variables fueron comparadas entre sitios y fecha con un ANOVA de dos factores seguido por un análisis de contrastes de Holm-Sidak cuando una diferencia significativa existía entre los grupos. Cuando los supuestos de normalidad y homocedacia asociados a la ANOVA de dos factores no se cumplían, se comparaban sitios y fechas de muestreo de manera separada por medio de una ANOVA de un factor seguida por una prueba de contraste de Tukey, o por una prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de contrastes de Dunn's, según si se lograba o no respetar los supuestos de normalidad y homocedacia asociados a la ANOVA de un factor.

Se comparó el consumo de alimento de los anuros capturados en cada sitio y fecha de muestreo comparando el número y el volumen de presas presentes en el tubo digestivo. En diciembre se realizó un ANOVA de un factor y en marzo como solamente se analizaron dos sitios, se utilizó una prueba de t. Además, dentro de cada sitio cuando estaba la posibilidad de analizar más de un muestreo se utilizó la prueba de t para analizar las diferencias.

2. Índices corporales y biomarcadores

Comparaciones entre sitios de estudio

La influencia del LHC y sexo de los anfibios adultos sobre las distintas variables determinadas en estos animales fue examinada en cada fecha de muestreo usando un modelo lineal generalizado (GLM). El modelo fue fijado como: variable de interés = LHC + Sexo + Sitio + Sex*LHC + LHC*Sitio + Sexo*Sitio. La significancia de los factores e interacciones de la ecuación fue testada con un test de F. Luego, las interacciones no significativas fueron removidas del modelo y los

términos significativos dejados en el nuevo modelo y vueltos a examinar con el mismo test. Esta secuencia de remoción de los términos no significativos siguió hasta quedarse solo con los términos significativos en el modelo final. El GLM se realizó usando el software Systat 11 y se analizaron la normalidad y la dispersión de los residuos para validar los modelos.

La condición corporal, los índices somáticos y los biomarcadores fueron comparados entre sitios en cada fecha de muestreo utilizando un análisis de varianza de un factor, seguido por el test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. Cuando la comparación incluía solamente dos sitios se utilizó una prueba de t. Cuando los supuestos de normalidad y homocedacia fallaban, se utilizaba la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples Dunn's, o la prueba de U de Mann-Whitney en los casos con solamente dos grupos a comparar. Todas las pruebas estadísticas, se realizaron usando el software estadístico SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA). El criterio de significancia fue de $p < 0.05$ en todos los casos.

Comparaciones entre individuos con detección y sin detección de plaguicidas

La condición corporal, los índices somáticos y los biomarcadores fueron comparados entre dos grupos, los individuos que habían dado positivos para algún plaguicida y los individuos que no presentaron contaminantes en cualquiera de los tejidos estudiados. Para las comparaciones se utilizó una prueba de t. Cuando los supuestos de normalidad y homocedacia fallaban, se utilizaba la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas, se realizaron usando el software estadístico SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA). El criterio de significancia fue de $p < 0.05$ en todos los casos.

4.3 RESULTADOS

Determinaciones analíticas de plaguicidas

A) Leptodactylus latrans

Se analizaron 66 ejemplares de los distintos sitios, a 48 de ellos se les extrajeron los riñones y a 51 un trozo de músculo para cuantificar diversos compuestos. El 47% de los ejemplares analizados se encontraba contaminado con algún plaguicida. Se detectaron 17 moléculas de plaguicidas en los órganos, de las cuales, 4 fueron herbicidas (acetoclor, metaloclor, atrazina e imazetapir) y 5 fungicidas (azoxistrobina, picoxistrobin, trifloxistrobin, metalaxyl y epoxiconazole). Los insecticidas se detectaron menos en músculo que riñón. Se detectaron 8 compuestos (clorpirifos metil, pirimifos

metil, fenitrothion, bifentrin, permetrina, chlorantronilipole, imidacloprid y buprofezin) en riñón y solo los dos primeros organofosforados se encontraron en músculo (**Tabla 4, 5, 6 y 7**).

En los ejemplares con trazas de plaguicidas, los insecticidas fueron los más encontrados (71%), seguidos de los herbicidas (61%) y fungicidas (50%). Se encontró que algunos ejemplares presentaban varias moléculas de plaguicidas, el 25% más de una molécula y el 29 % cuatro o más moléculas, llegando a 7 moléculas en 2 ranas del sitio 4 en marzo. Los insecticidas organofosforados pirimifos metil y clorpirifos metil fueron los que se hallaron con más frecuencia, 46% y 38% respectivamente (**Tabla 4 y 5**). Le siguen en frecuencia de detección los herbicidas acetochlor y metalochlor, 38% y 23% respectivamente y los fungicidas metalaxyl y trifloxistrobin en un 19% ambos (**Tabla 6 y 7**).

Los productos variaron su concentración de acuerdo al compuesto, y al tejido donde fueron hallados. En riñón los plaguicidas más frecuentes como el pirimifos metil y el clorpirifos metil, se encontraron en concentraciones promedio de 3,6 y 51 ng/g respectivamente. La concentración más baja se registró para metalaxyl (0,3 ng/g) y la más alta para acetochlor con 2158 ng/g (**Tabla 8**). En musculo, el imidacloprid se encontró en 0,34 ng/g y el metalochlor en 6549 ng/g (**Tabla 9**).

Los sitios se caracterizaron por la cantidad de ejemplares contaminados, presentando valores similares entre ellos (**Tabla 10**).

B) Leptodactylus latinasus

Se analizaron 35 muestras de musculo, de las cuales el 37% se encontraba con trazas de contaminantes de 1 a 13 plaguicidas. Se encontraron 4 herbicidas (acetochlor, metalochlor, atrazina y imazetapir), 5 insecticidas (clorpirifos metil, clorpirifos etil, pirimifos metil, bifentrin y chlorantronilipole) y 6 fungicidas (azoxistrobin, picoxistrobin, piraclostrobin, trifloxistrobin, metalaxyl y epoxiconazole) (**Tabla 11 y 12**). El 54% de los ejemplares presentaba trazas de acetochlor, el 38% pirimifos metil y el 31% atrazina y trifloxystrobin. Los plaguicidas en los músculos variaron su concentración, siendo la más baja para el metalaxyl (0,26 ng/g) y la más alta de 7555 ng/g para metalochlor (**Tabla 13**).

Los sitios se caracterizaron cuantificando el número de ranas contaminadas en ambos muestreos, los sitios 1, 2, 4 y 5 presentaron valores similares. El sitio 3 no presento valores de contaminación (**Tabla 14**).

Tabla 4. Frecuencia de detección de insecticidas en ambos muestreos en riñones de la especie *L. latrans*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (10)	Mzo (1)	Total (11)	Dic (6)	Mzo (0)	Total (6)	Dic (5)	Mzo (5)	Total (10)	Dic (9)	Mzo (2)	Total (11)	Dic (4)	Mzo (6)	Total (10)
Organofosforado															
Diclorvos	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Clorpirifos metil	20.00	--	18.18	16.70	--	16.67	--	60.00	30.00	--	50.00	9.09	25.00	16.70	20.00
Clorpirifos etil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimifos metil	20.00	--	18.18	16.7	--	16.67	--	40.00	20.00	22.20	100.00	36.36	25.00	16.70	20.00
Fenitrotion	--	--	--	--	--	--	20.00	--	10.00	--	--	--	--	--	--
Malathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Diazinon	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bromofos metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Parathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	4.44	--	4.04	3.70	--	3.70	2.2	11.10	6.67	2.50	16.70	5.05	5.60	3.70	4.44
Piretroides															
Permetrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	50.00	9.09	--	--	--
Fenvelarato	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
β -Cyflutrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
λ -Cialotrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bifentrin	--	--	--	--	--	--	--	20.00	10.00	11.10	50.00	18.18	--	16.70	10.00
Total	--	--	--	--	--	--	--	4.00	2.00	2.20	10.00	5.45	--	3.30	1.00
Carbamatos															
Carbofuran fenol	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimicarb	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Otros															
Buprofezin	--	100.00	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metoxifenocide	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Chlorantroniprole	--	--	--	--	--	--	--	20.00	10.00	--	--	--	--	--	--
Triflumuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	25.00	2.27	--	--	--	--	5.00	2.50	--	--	--	--	--	--
Total de Insecticidas	2.00	6.30	2.27	1.70	--	1.67	1.00	7.00	4.00	1.70	12.50	3.64	2.50	2.50	2.50

Tabla 5. Frecuencia de detección de insecticidas en ambos muestreos en musculo de la especie *L. latrans*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (8)	Mzo (2)	Total (10)	Dic (10)	Mzo (0)	Total (10)	Dic (5)	Mzo (5)	Total (10)	Dic (7)	Mzo (3)	Total (10)	Dic (4)	Mzo (7)	Total (11)
Organofosforado															
Diclorvos	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Clorpirifos metil	--	--	--	--	--	10.00	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Clorpirifos etil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimifos metil	--	--	--	10.00	--	--	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Fenitrothion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Malathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Diazinon	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bromofos metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Parathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	1.11	--	1.11	--	--	--	--	7.41	2.22	--	--	--
Piretroides															
Permetrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	25.00	--	0.09
Fenvelarato	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
β -Cyflutrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
λ -Cialotrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bifentrin	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5.00	--	0.02
Carbamatos															
Carbofuran fenol	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimicarb	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Otros															
Buprofezin	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metoxifenocida	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Chlorantroniprole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Imidacloprid	--	--	--	10.00	--	--	--	--	--	--	--	--	25.00	--	--
Triflumuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	2.00	--	--	--	--	--	--	--	--	5.00	--	--
Total de Insecticidas	--	--	--	0.95	--	0.48	--	--	--	--	3.17	0.95	2.38	--	0.004

Tabla 6. Frecuencia de detección de Herbicidas y Fungicidas en ambos muestreos en riñones de la especie *L. latrans*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (10)	Mzo (1)	Total (11)	Dic (6)	Mzo (0)	Total (6)	Dic (5)	Mzo (5)	Total (10)	Dic (9)	Mzo (2)	Total (11)	Dic (4)	Mzo (6)	Total (10)
Herbicidas															
Atrazina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	22.20	--	18.18	--	16.7	--
Acetochlor	20.00	--	18.18	16.70	--	16.67	20.00	20.00	20.00	22.20	--	18.18	25.00	--	10.00
Metalochlor	20.00	--	18.18	16.70	--	16.67	--	20.00	10.00	--	50.00	9.09	--	--	--
Flurocloridona	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Imazetapir	--	--	--	--	--	--	--	20.00	10.00	--	50.00	9.09	--	--	--
Prosulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Triasulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total Herbicidas	5.71	--	5.19	4.77	--	4.76	2.86	8.57	5.71	6.34	14.29	7.79	3.57	--	1.43
Fungicidas															
Azoxystrobin	10.00	--	9.09	--	--	--	--	--	--	--	50.00	9.09	--	--	--
Picoxystrobin	--	--	--	--	--	--	--	20.00	10.00	--	50.00	9.09	--	--	--
Piraclostrobin	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Trifloxistrobin	--	--	--	16.70	--	16.67	--	--	--	22.20	--	18.18	--	--	--
Kresoxim-metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metalaxyl	10.00	--	9.09	16.70	--	16.67	20.00	--	--	33.30	--	27.27	--	16.70	10.00
Cyproconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Epoxiconazole	--	--	--	--	--	--	20.00	--	--	--	--	--	--	--	--
Penconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tebuconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Protioconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fusilazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Difeconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Myclobutaryl	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bupirimate	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenpropimorph	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carbendazim	10.00	--	9.09	16.70	--	16.67	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carboxine	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total Fungicidas	1.67	--	1.52	2.78	--	2.78	2.22	1.11	0.56	3.08	5.56	3.54	--	0.93	0.56

Tabla 7. Frecuencia de detección de Herbicidas y Fungicidas en ambos muestreos en musculo de la especie *L. latrans*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (8)	Mzo (2)	Total (10)	Dic (10)	Mzo (0)	Total (10)	Dic (5)	Mzo (5)	Total (10)	Dic (7)	Mzo (3)	Total (10)	Dic (4)	Mzo (7)	Total (11)
Herbicidas															
Atrazina	--	--	--	--	--	--	--	20.00	10.00	14.29	--	10.00	--	--	--
Acetochlor	--	--	--	10.00	--	10.00	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Metalochlor	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Flurocloridona	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Imazetapir	--	50.00	10.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Prosulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Triasulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	0.00	7.14	1.43	1.43	0.00	1.43	0.00	2.86	1.43	2.04	9.52	4.29	0.00	0.00	0.00
Fungicidas															
Azoxystrobin	--	50.00	10.00	--	--	--	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Picoxystrobin	--	50.00	10.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Piraclostrobin	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Trifloxistrobin	--	50.00	10.00	--	--	--	--	--	--	--	33.33	10.00	--	--	--
Kresoxim-metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metalaxyl	--	--	--	--	--	--	--	--	--	14.29	33.33	20.00	--	--	--
Cyproconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Epoxiconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	33.33	10	--	--	--
Penconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tebuconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Prothioconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fusilazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Difeconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Myclobutaryl	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bupirimato	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenpropimorph	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carbendazim	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carboxine	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	0.00	8.33	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79	7.41	2.78	0.00	0.00	0.00

Tabla 8. Concentraciones de insecticidas, herbicidas y fungicidas detectadas en diciembre y marzo en riñón de *L. latrans*. Los valores están expresados en ng/g.

	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5	
	Dic (10)	Mzo (1)	Dic (6)	Mzo (0)	Dic (5)	Mzo (5)	Dic (9)	Mzo (2)	Dic (4)	Mzo (6)
Organofosforado										
Clorpirifos metil	34.95 41.97	nd	57.31	nd	nd	27.10 66.76 54.27	nd	75.10	42.46	57.83
Pirimifos metil	0.44 1.15	nd	8.92	nd	nd	0.30 12.49	2.11 0.58	0.64 5.49	3.37	3.80
Fenitrotion	nd	nd	nd	nd	5.05	nd	nd	nd	nd	nd
Piretroides										
Permetrina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.41	nd	nd
Bifentrin	nd	nd	nd	nd	nd	0.84	0.37	0.99	nd	0.19
Otros Insecticidas										
Buprofezin	nd	183.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorantroniprole	nd	nd	nd	nd	nd	176.17	nd	nd	nd	nd
Herbicidas										
Atrazina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	37.74 63.69	nd	nd	33.43
Acetoclor	92.04 203.83	nd	191.73	nd	99.46	2158.17	217.7 67.03	nd	42.61	nd
Metaloclor	0.20 0.49	nd	0.12	nd	nd	0.24	nd	0.24	nd	nd
Imazetapir	nd	nd	nd	nd	nd	291.2	nd	844.1	nd	nd
Fungicidas										
Azoxystrobin	0.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	49.05	nd	nd
Picoxystrobin	nd	nd	nd	nd	nd	63.25	nd	56.65	nd	nd
Trifloxistrobin	nd	nd	36.57	nd	nd	nd	185.6 100.4	nd	nd	nd
Metalaxyl	250.5	nd	0.31	nd	354.49	nd	0.24 0.39 16.88	nd	nd	22.27
Epoxiconazole	nd	nd	nd	nd	157.09	nd	nd	nd	nd	nd
Carbendazim	32.72	nd	560.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla 9. Concentraciones de insecticidas, herbicidas y fungicidas detectadas en diciembre y marzo en músculo de *L. latrans*. Los valores están expresados en ng/g.

	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5	
	Dic (8)	Mzo (2)	Dic (10)	Mzo (0)	Dic (5)	Mzo (5)	Dic (7)	Mzo (3)	Dic (4)	Mzo (7)
Organofosforado										
Clorpirifos metil	--	--	--	--	--	--	--	5066.63	--	--
Pirimifos metil	--	--	353.74	--	--	--	--	124.15	--	--
Prietroides										
Permetrina	--	--	--	--	--	--	--	--	257.17	--
Otros										
Imidacloprid	--	--	1.21	--	--	--	--	--	0.34	--
Herbicidas										
Atrazina	--	--	--	--	--	43.66	33.34	--	--	--
Acetochlor	--	--	23.28	--	--	--	--	198.64	--	--
Metalochlor	--	--	--	--	--	--	--	6549.05	--	--
Imazetapir	--	617.85	--	--	--	--	--	--	--	--
Fungicidas										
Azoxystrobin	--	28.49	--	--	--	--	--	123.10	--	--
Picoxystrobin	--	29.45	--	--	--	--	--	56.65	--	--
Trifloxistrobin	--	38.60	--	--	--	--	--	109.87	--	--
Metalaxyl	--	--	--	--	--	--	0.57	955.28	--	--
Epoxiconazole	--	--	--	--	--	--	--	239.09	--	--

Tabla 10. Frecuencia de detección de plaguicidas en los diferentes sitios, en ambos muestreos para los tejidos riñón y músculo de la especie *L. latrans*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Diciembre	Marzo	Total
Sitio 1	46 (13)	50 (2)	47 (15)
Sitio 2	57 (7)	0 (0)	57 (7)
Sitio 3	14 (7)	57 (7)	36 (14)
Sitio 4	45 (11)	67 (3)	50 (14)
Sitio 5	50 (4)	33 (9)	39 (13)

Tabla 11. Frecuencia de detección de insecticidas en ambos muestreos en músculo de la especie *L. latinasus*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (4)	Mzo (7)	Total (11)	Dic (2)	Mzo (4)	Total (6)	Dic (1)	Mzo (2)	Total (3)	Dic (7)	Mzo (1)	Total (8)	Dic (6)	Mzo (2)	Total (8)
Organofosforado															
Diclorvos	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Clorpirifos metil	--	28.57	18.18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Clorpirifos etil	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimifos metil	--	42.86	27.27	--	--	--	--	--	--	14.29	--	12.50	16.67	--	12.50
Fenitroton	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Malathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Diazinon	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bromofos metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Parathion	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Piretroides															
Permetrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenvelarato	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
β -Cyflutrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
λ -Cialotrina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bifentrin	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carbamatos															
Carbofuran fenol	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimicarb	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Otros															
Buprofezin	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metoxifenocida	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Chlorantroniprole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Imidacloprid	--	--	--	--	25.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Triflumuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total de Insecticidas	--	4.76	3.03	0.00	1.19	--	--	--	--	0.68	--	0.60	2.38	--	1.79

Tabla 12. Frecuencia de detección de herbicidas y fungicidas en ambos muestreos en músculo de la especie *L. latinasus*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentra el número de ejemplares estudiados.

	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3			Sitio 4			Sitio 5		
	Dic (4)	Mzo (7)	Total (11)	Dic (2)	Mzo (4)	Total (6)	Dic (1)	Mzo (2)	Total (3)	Dic (7)	Mzo (1)	Total (8)	Dic (6)	Mzo (2)	Total (8)
Herbicidas															
Atrazina	--	28.57	18.18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	50.00	25.00
Acetochlor	--	42.86	27.27	50.00	25.00	33.33	--	--	--	--	--	--	33.33	--	25.00
Metalochlor	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Flurocloridona	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Imazetapir	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	100.00	12.50	--	--	--
Prosulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Triasulfuron	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	0.00	12.24	7.79	7.14	3.57	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00	14.29	1.79	9.52	7.14	8.93
Fungicidas															
Azoxystrobin	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Picoxystrobin	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Piraclostrobin	--	14.29	9.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Trifloxistrobin	25.00	14.29	18.18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	33.33	--	25.00
Kresoxim-metil	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metalaxyl	--	14.29	9.09	50.00	--	--	--	--	--	--	--	--	16.67	--	12.50
Cyproconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Epoxiconazole	--	28.57	18.18	--	--	--	--	--	--	14.29	--	12.50	--	50.00	12.50
Penconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tebuconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Protioconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fusilazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Difeconazole	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Myclobutaryl	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Bupirimate	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenpropimorph	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carbendazim	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Carboxine	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Total	1.39	5.56	4.04	2.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00	0.69	4.63	2.78	4.17

Tabla 13. Concentraciones de insecticidas, herbicidas y fungicidas detectadas en diciembre y marzo en músculo de *L. latinasus*. Los valores están expresados en ng/g.

	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5	
	Dic (4)	Mzo (7)	Dic (2)	Mzo (4)	Dic (1)	Mzo (2)	Dic (7)	Mzo (1)	Dic (6)	Mzo (2)
Organofosforado										
Clorpirifos metil	--	6.78 2.75	--	--	--	--	--	--	14.41	--
Clorpirifos etil	--	0.80	--	--	--	--	--	--	--	--
Pirimifos metil	--	53.38 6.87 14.25	--	--	--	--	12.84	--	32.90	--
Piretroides										
Bifentrin	--	6429.61	--	--	--	--	--	--	--	--
Otros Insecticidas										
Chlorantroniprole	--	--	--	--	--	--	--	--	226.84	--
Imidacloprid	--	--	--	0.75	--	--	--	--	--	--
Herbicidas										
Atrazina	--	86.63 230.37	--	--	--	--	--	--	97.68	84.65
Acetoclor	--	93.92 100.66 200.65	78.87	42.47	--	--	--	--	31.02 385.59	--
Metaloclor	--	7547.95	--	--	--	--	--	--	7555.29	--
Imazetapir	--	--	--	--	--	--	--	89.65	--	--
Fungicidas										
Azoxystrobin	--	174.68	--	--	--	--	--	--	--	--
Picoxystrobin	--	41.03	--	--	--	--	--	--	63.19	--
Piraclostrobin	--	71.15	--	--	--	--	--	--	64.82	--
Trifloxistrobin	33.58	106.28	--	--	--	--	--	--	106.28 22.64	--
Metalaxyl	--	37.69	0.30	--	--	--	--	--	0.26	--
Epoxiconazole	--	315.16 1084.27	--	--	--	--	241.85	--	--	1226.18

Tabla 14. Frecuencia de detección de plaguicidas en los diferentes sitios para ambos muestreos en músculo de la especie *L. latinasus*. Los valores son expresados en porcentaje de las muestras examinadas. En paréntesis se encuentran el número de ejemplares estudiados.

	Diciembre	Marzo	Total
Sitio 1	25 (4)	43 (7)	36 (11)
Sitio 2	50 (2)	50 (4)	50 (6)
Sitio 3	0 (1)	0 (2)	0 (3)
Sitio 4	14 (7)	100 (1)	25 (8)
Sitio 5	33 (6)	50 (2)	38 (8)

Abundancia de artrópodos: disponibilidad de alimento

En términos de número de individuos, los más abundantes fueron generalmente Hymenoptera y Araneae, excepto en el sitio 1 donde es Isopoda en diciembre (**Tabla 15 y 16**).

En términos de volumen, en diciembre los más abundantes son Araneae, Coleóptera e Hymenoptera, excepto el sitio 1 donde son los isópodos (**Tabla 15**). Marzo es parecido a diciembre, aunque algo más variable ya que aparecen como importantes Blatodea (sitio 2), Ortoptera (Sitio 4) y en el sitio 5, Spirosteptida (**Tabla 16**).

En el mes de diciembre, la riqueza de artrópodos fue significativamente mayor en el sitio 1 que en los otros sitios. Sin embargo, en el mes de marzo, esta diferencia se había atenuado y la riqueza del sitio 1 había vuelto a niveles comparables a la de los otros sitios. Este cambio temporal de la riqueza de artrópodos del sitio 1 se ilustra con la presencia de una diferencia significativa entre las 2 fechas de muestreo ($p=0.045$) (**Fig. 7a**).

Con respecto a la abundancia de artrópodos expresada en términos de número de individuos capturados, todos los sitios, salvo el sitio 4, presentaron una diferencia significativa entre las fechas de muestreo. Sin embargo, la fecha en la cual se observó mayor abundancia de artrópodos era variable según el sitio, siendo mayor la abundancia de artrópodos en el mes de diciembre en el sitio 1, con respecto a los sitios 2 y 5; mientras que a la inversa, el sitio 5 presentó mayor abundancia en el mes de marzo, siendo significativamente más alto con respecto al sitio 3 (**Fig. 7b**).

Con respecto al volumen (mm^3) total de artrópodos capturados, este valor es parecido en diciembre y marzo en los cinco sitios muestreados. El sitio 1 presenta valores significativamente más altos que todos los sitios en diciembre y en marzo solo con los sitios 3 y 4 (**Fig. 7c**).

Tabla 15. Órdenes y familias de artrópodos (total) capturados en diciembre en los cinco sitios de muestreo en términos del número y el volumen de ejemplares capturados.

Diciembre			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5		
			N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	184	346.19	118	145.30	788	203.28	468	616.28	143	236.40	
		Vespididae	5	316.25	1	3.14	2	397.93	1	1.44			
		Serphidae	2	3.14									
		Apinae	1	11.78					1	4.19			
		Total	192	677.36	119	148.44	790	601.22	470	621.90	143	236.40	
	Coleoptera	Chrisomelidae	37	424.90	3	175.54	8	173.83	7	139.54	2	250.02	
		Tenebrionidae	32	339.29									
		Elateridae	21	140.13	3	36.13	2	7.33	2	2.62	2	61.78	
		Scarabaeidae	1	150.80	2	8.84	7	922.58	5	77.49	3	727.15	
		Bruchinae	18	445.84	1	0.52	1	14.66	1	8.25			
		Curculionidae	13	375.09	1	27.82	2	34.56	2	45.95	2	33.51	
		Cucujidae	1	348.45									
		Coccinelidae	1	13.09									
		Carabidae			8	828.59			1	235.62	2	262.85	
		Total	124	2237.60	18	1077.43	20	1152.96	18	509.46	11	1335.31	
		Orthoptera	Gryllidae	62	1105.97	4	285.62	3	198.97	2	215.20		
			Acridoidea	3	115.19			1	29.32				
			Tettigoniodea	1	196.35								
	Total	66	1417.51	4	285.62	4	228.29	2	215.20				
	Homoptera	Fulgoroidea	2	3.14									
		Jassoidea	2	6.54			37	48.50	1	44.90			
		Cicadoidea	1	1.05					1	0.20			
	Total	5	10.73			37	48.50	2	45.09				
	Hemiptera	Anthracoridae	2	24.87			2	20.94	1	5.30			
		Reduviidae	1	18.00			2	7.85	1	14.66	2	58.64	
		Cercopoidae	1	2.88									
		Aphidoidea	36	7.07									
		Cydnidae									1	0.26	
	Total	40	52.82			4	28.80	2	19.96	3	58.90		
Diptera	Muscidae	2	47.39	6	108.12	4	67.02	3	62.05				
	Culicidae	1	14.66										
	Nemestrinidae	2	9.42										
	Sciaridae			1	4.71	1	0.20						
	Dolichopoidae			2	1.51								
Total	5	71.47	9	114.34	5	67.22	3	62.05					
Dictyoptera	Blattodea*	1	137.44										
Arachnida	Araneae	Lycosidae	44.00	1210.04	20.00	1199.69	43.00	947.12	40.00	1320.97	33.00	2128.36	
		Ctenidae	5	15.45	1	1.57					2	45.03	
		Theraphosidae	3	172.79									
		Dictyonidae	3	22.97	1	1.05	4	97.65					
		Salticidae	2	2.36					2	18.85	1	4.71	
		Anaurobiidae	1	10.47									
		Gnaphosidae	1	5.89									
		Sicariidae	1	2.36									
		Senoculidae	1	1.31	4	28.80	4	9.95			2	9.42	
		Araneidae									2	11.78	
		Conniidae									1	9.42	
		Diguettidae	1	1.05							1	56.55	
		Uloboridae	1	0.79	1	2.09							
		Hanniidae	1	0.20									
		Total	62	1445.65	27	1233.20	51	1054.72	42	1339.82	42	2265.28	
		Crustacea	Isopoda	Oniscidae	370	13016.65			1	4.71	12	249.76	2
Diplopoda	Spirostreptida									24	18.85		
Total Final			859	18919.07	177	2859.043	875	3137.92	549	3018.152	201	4105.338	

Tabla 16. Órdenes y familias de artrópodos capturados en marzo (total) en los cinco sitios de muestreo en términos del número y el volumen de ejemplares capturados.

Marzo			Sitio 1		Sitio 2		Sitio 3		Sitio 4		Sitio 5	
			N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)	N° de ej	Volumen (mm3)
Clase	Orden	Familia										
Insecta	Hymenoptera	Formicidae	185	372.87	5	460.00	2	4.71	368	1129.86	481	524.38
		Apinae					4	7.59				
		Terthedinidae					1	47.12				
		Total	185	372.87	5	460	7	59.43	368	1129.86	481	524.38
	Coleoptera	Chrisomelidae	8	31.15	139	595.25			2	20.55	8	671.25
		Tenebrionidae					1	196.35				
		Elateridae	9	120.56					1	18.85	8	266.51
		Scarabaeidae	2	1685.99							3	167.55
		Bruchinae	5	60.74					1	12.57		
		Curculionidae	6	108.38					10	215.46	8	169.12
		Cucujidae					1	47.12				
		Carabidae	1	84.82					1	2.88		
		Lampiridae							1	12.57		
		Total	31	2091.64	139	595.25	2	243.47	16	282.87	27	1274.44
	Orthoptera	Gryllidae	5	148.18	6	157.5	1	1.05	11	2259.59	7	1590.69
		Acridoidea							1	160.35		
		Tettigonioidea	1	70.69								
		Grillotalpidae					1	2.62				
		Total	6	218.86	6	157.5	2	3.67	12	2419.94	7	1590.69
	Homoptera	Fulgoroidea					1	1.31				
		Cicadoidea	1	2.62	23	2.75					1	2.09
		Total	1	2.62	23	2.75	1	1.31			1	2.09
	Hemiptera	Anthocoridae	1	9.42	1	13.5	2	139.93				
		Reduviidae	2	35.60							3	8.90
		Cercopoidae	1	2.88	15	382.00			1	3.14		
		Coccoidea			1	3.00						
		Total	4	47.91	17	398.5	2	139.93	1	3.14	3	8.90
	Diptera	Muscidae	3	98.17							1	14.66
		Culicidae			3	324						
		Heleomyzidae			2	4						
		Chironomidae			1	565.4862						
		Total	3	98.17	6	893.4862					1	14.66
	Dictyoptera	Blattodea*	1	47.12	22	317.00						
Arachnida	Araneae	Lycosidae	19	13.50					27	653.06	188	3483.63
		Ctenidae	1	8.38					1	0.20		
		Dictyonidae			1	6			1	35.34		
		Salticidae					1	14.66				
		Gnaphosidae					23	545.59				
		Corinnidae					6	53.93				
		Diguetidae					38	768.90				
		Uloboridae										
		Linyphiidae			3	2.5						
		Hannidae					18	735.26				
		Ixodidae			6	19	1	44.90				
		Total	20	21.88	10	27.5	87	2163.25	29	688.60	188	3483.63
Crustacea	Isopoda	Oniscidae	174	10123.12	28	392			5	137.71	9	844.43
Diplopoda	Spirostreptida								9	5.30	219	2272.30
Total Final			424	12977.07	234	2926.986	101	2611.054	431	4662.12	717	7743.234

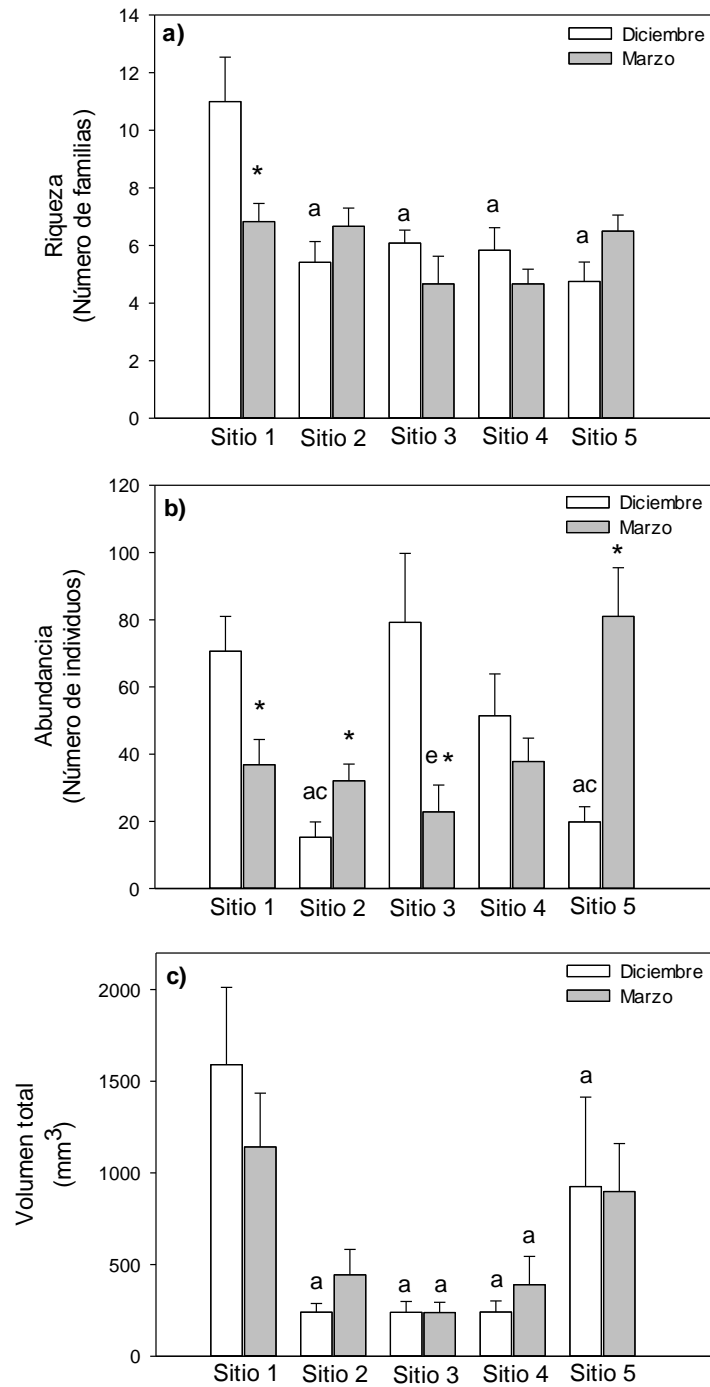


Figura 7. Artrópodos capturados (media \pm error estándar) en las trampas desplegadas en los sitios de captura de anfibios. **a)** Riqueza **b)** Abundancia y **c)** Volumen total de los artrópodos capturados. * Diferencias significativas entre diciembre y marzo dentro de un mismo sitio ($p < 0.05$). a Significativamente diferente al sitio 1 en diciembre o marzo ($p < 0.001$). ac significativamente diferente a los sitios 1 y 3 en diciembre ($p < 0.05$). e significativamente diferente al sitio 5 en marzo ($p < 0.05$).

Dieta

A) *Leptodactylus latrans*

En el muestreo de diciembre se analizaron 48 aparatos digestivos (estómagos + intestinos) de los cuales, 33 tenían contenido. Se identificaron 84 ejemplares de 16 taxa, que correspondieron a 3987.86 mm³. La contribución de cada presa a la dieta de la especie según el índice de importancia relativa IRI ordenados de mayor a menor, fue la siguiente: Coleóptera en todos los sitios, seguido de los Orthoptera. El índice de selectividad (D) de Jacob (1974), también presentó valores positivos para los ítems nombrados, por lo que *L. latrans* selecciona estas presas (**Tabla 17 y 18**).

En marzo, se analizaron 29 aparatos digestivos de los cuales 21 tuvieron algún tipo de contenido. Se identificaron 79 ejemplares de 10 taxa que representaron 12037,24 mm³ de volumen. La contribución de cada presa a la dieta de la especie según el índice de importancia relativa IRI ordenados de mayor a menor, fue la siguiente: Coleoptera en todos los sitios, seguido de los anuros y Crustacea. El índice de selectividad (D) en este caso, solo mostró índices positivos en Coleóptera, ya que los cangrejos como las ranas no fueron capturadas en las trampas, seguramente debido a que no es un método de captura para estos grupos de animales, el primero porque son acuáticos y el segundo por el tamaño de la trampa (**Tabla 17 y 18**).

Con respecto al número de presas consumidas en los diferentes sitios y muestreos. En diciembre el número de presas en el sitio 2 es significativamente menor al sitio 3. En el mes de marzo, el sitio 3 presentó valores menores al sitio 5. Y además, el sitio 3 varió significativamente entre los distintos muestreos, teniendo un número menor de presas capturadas por las ranas en el mes de marzo (**Fig. 8a**).

El volumen promedio de presas consumidas es similar en todos los sitios y momentos muestreados. Salvo, el sitio 3 que presenta valores más altos a los del sitio 2 en diciembre y más bajos al sitio 5 en marzo (**Fig 8b**).

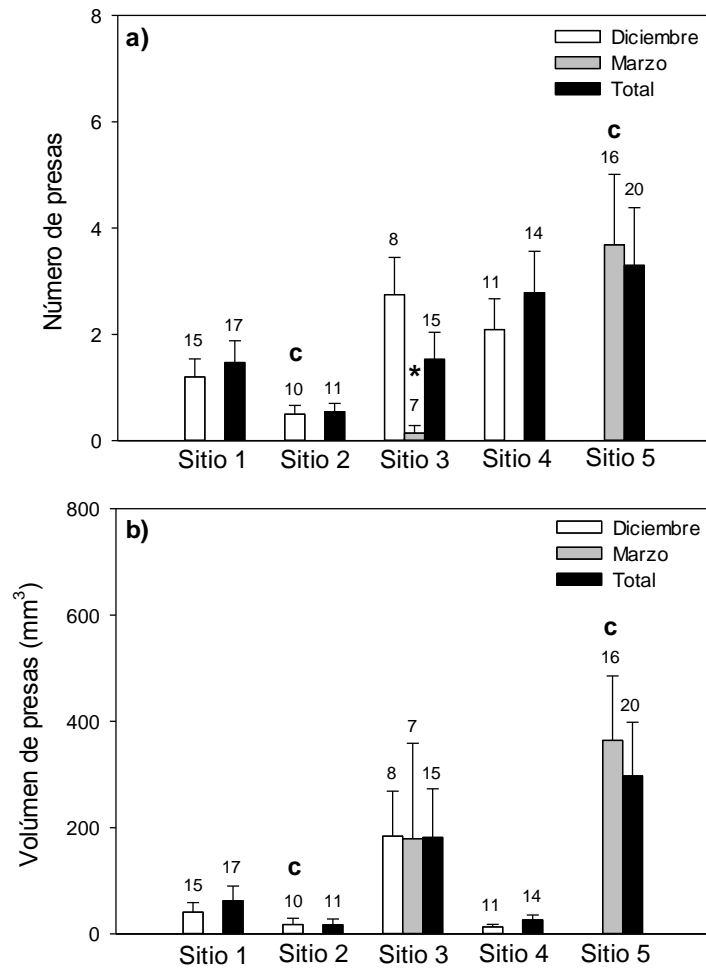


Figura 8. Presas consumidas (media \pm error estándar) por *L. latrans* en los sitios de captura. **a)** Número de presas **b)** Volumen total de las presas consumidas. **c** Significativamente diferente al sitio 3 en diciembre o en marzo ($p < 0.05$). * Diferencias entre diciembre y marzo. Los valores sobre las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados.

Tabla 17. Contenido estomacal de *L. latrans* en los muestreos de diciembre (Dic) y marzo (Mzo). %N= porcentaje de la categoría en el total de las presas; %V= porcentaje del volumen de la categoría en el volumen total. Los valores entre paréntesis corresponden a los aparatos digestivos con algún ítem alimenticio en su interior.

Item alimenticios		Sitio 1						Sitio 2						Sitio 3						Sitio 4						Sitio 5						
		Dic (9)		Mzo (2)		Total (11)		Dic (5)		Mzo (1)		Total (6)		Dic (7)		Mzo (1)		Total (8)		Dic (9)		Mzo (3)		Total (12)		Dic (3)		Mzo (14)		Total (17)		
Orden	Familia	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V	%N	%V			
Anfibia	Anura	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	100.00	100.00	3.70	33.09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--			
Araneae		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	8.70	5.86	0.00	0.00	5.13	1.63	14.29	20.51	0.00	0.00	1.64	0.36			
	Lycosidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	42.86	61.54	--	--	4.92	1.07		
Coleoptera		27.27	7.34	--	--	21.43	3.70	66.67	33.77	--	--	57.14	31.72	30.77	1.37	--	--	29.63	0.91	47.83	27.47	25.00	6.85	38.46	12.59	--	--	--	--			
	Bruchinidae	27.27	11.02	57.14	6.48	35.71	9.25	--	--	--	--	--	--	11.54	1.73	--	--	11.11	1.16	--	--	6.25	2.18	2.56	1.57	--	--	70.37	6.06	62.30	5.95	
	Carabidae	13.64	47.21	--	--	10.71	23.78	--	--	--	--	--	--	23.08	18.13	--	--	22.22	12.13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	Chrysomelidae	4.55	10.49	14.29	0.93	7.14	5.81	--	--	--	--	--	--	15.38	14.07	--	--	14.81	9.42	13.04	6.87	62.50	88.79	33.33	65.99	28.57	10.26	--	--	3.28	0.18	
	curculionidae	13.64	3.93	--	--	10.71	1.98	--	--	--	--	--	--	3.85	0.41	--	--	3.70	0.28	8.70	8.08	--	--	5.13	2.25	--	--	1.85	0.11	1.64	0.11	
	Elateridae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4.35	3.23	--	--	2.56	0.90	--	--	--	--	--	--	
	Lucanidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5.56	12.30	4.92	12.09		
	Scarabaeidea	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	15.38	64.29	--	--	14.81	43.01	8.70	45.25	0.00	0.00	5.13	12.59	--	--	5.56	1.70	4.92	1.66	
	Staphylinidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	14.29	7.69	--	--	1.64	0.13		
Diptera	Muscidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4.35	1.62	--	--	--	--	2.56	0.45	--	--	--	--	--	--	
Homoptera		--	--	--	--	--	--	16.67	55.20	--	--	14.29	51.85	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Hymenoptera	Formicidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4.35	1.62	--	--	--	--	2.56	0.45	--	--	--	--	--	--	
Larva		4.55	14.75	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Orthoptera		--	--	--	--	--	--	16.67	11.04	--	--	14.29	10.37	--	--	--	--	--	--	--	--	6.25	2.18	2.56	1.57	--	--	3.70	0.11	3.28	0.11	
	Tettigonidae	9.09	5.25	28.57	92.59	14.29	55.48	--	--	100.00	100.00	14.29	6.07	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Crustacea	Decapoda	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	12.96	79.72	11.48	78.33	--	--
		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 18. Contenido estomacal de *L. latrans* en los muestreos de diciembre (Dic) y marzo (Mzo). IRI= Índice de importancia relativa de cada categoría; D= índice de selectividad. Los valores entre paréntesis corresponden a los aparatos digestivos con algún ítem alimenticio en su interior.

Item alimenticios		Sitio 1						Sitio 2						Sitio 3						Sitio 4						Sitio 5						
		Dic (9)		Mzo (2)		Total (11)		Dic (5)		Mzo (1)		Total (6)		Dic (7)		Mzo (1)		Total (8)		Dic (9)		Mzo (3)		Total (12)		Dic (3)		Mzo (14)		Total (17)		
Orden	Familia	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	IRI	D	
Anfibia	Anura	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.00	20000.00	1.00	459.90	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Araneae		--	-1.00	--	-1.00	--	-1.00	--	-1.00	--	-1.00	--	--	-1.00	--	-1.00	323.43	0.05	0.00	-1.00	112.64	-0.18	13919.41	-0.25	0.00	-1.00	140.99	-0.89				
	Lycosidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6959.71	0.31	0.00	-1.00	70.50	-0.68				
Coleoptera		16636.36	0.46	7883.60	0.71	12419.73	0.55	6025.96	0.60	0.00	-1.00	4443.00	-0.24	20000.00	0.91	0.00	-1.00	14280.69	0.91	17351.78	0.87	19156.93	0.85	18307.61	0.86	4053.72	0.73	8131.93	0.85	7430.99	0.83	
	Bruchinidae	1276.30	0.85	3181.22	0.95	1566.92	0.70	--	--	--	--	--	--	189.56	0.98	0.00	--	153.37	0.98	0.00	-1.00	281.02	0.93	34.48	0.85	0.00	--	4367.39	1.00	3211.68	1.00	
	Carabidae	676.11	1.00	0.00	-1.00	295.26	0.98	--	--	--	--	--	--	1766.10	1.00	0.00	--	1288.30	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	Chrysomelidae	167.08	0.02	760.58	0.76	223.76	0.59	--	--	--	--	--	--	1262.47	0.88	0.00	--	908.67	0.89	663.74	0.82	15128.50	0.98	4966.27	0.94	1294.26	0.93	0.00	-1.00	20.34	0.50	
	curculionidae	390.46	0.80	0.00	-1.00	221.62	0.64	--	--	--	--	--	--	60.83	0.89	0.00	--	49.74	0.89	372.81	0.92	0.00	-1.00	122.94	0.61	0.00	--	14.04	1.00	10.30	1.00	
	Elateridae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	84.22	0.85	0.00	-1.00	28.86	0.79	--	--	--	--	--	--	
	Lucanidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.00	--	127.54	1.00	100.02	1.00	
	Scarabaeidea	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2276.31	0.90	0.00	--	1445.74	0.91	599.42	0.81	0.00	--	147.66	0.82	0.00	-1.00	51.76	0.86	38.70	0.76	
	Staphylinidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	732.60	--	0.00	--	10.43	--	--	--	
Diptera	Muscidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	66.27	0.78	0.00	--	25.11	0.79	--	1.00	--	--	--	1.00	
Homoptera		--	--	--	--	--	--	1437.23	1.00	0.00	-1.00	1102.19	0.42	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Hymenoptera	Formicidae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	66.27	-0.98	0.00	-1.00	25.11	-0.99	--	--	--	--	--	--	
Lava		214.44	1.00	0.00		175.45	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Orthoptera		--	--	--	--	--	--	554.11	0.75	0.00	-1.00	410.91	0.70	--	--	--	--	--	--	0.00	--	281.02	1.00	34.48	1.00	0.00	--	54.54	0.58	39.89	0.62	
	Tettigoniidae	159.30	0.97	6058.20	0.98	1189.78	0.91	0.00	--	20000.00	1.00	339.23	1.00	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Crustacea	Decapoda	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.00	--	3310.18	1.00	2641.35	1.00	

Anfibios: condición corporal, índices somáticos y biomarcadores

Comparaciones entre sitios de estudio

*A) *Leptodactylus latrans**

El clima seco hizo difícil el muestreo de anfibios y resultó imposible conseguir un número adecuado de individuos de ambas especies para todos los sitios y fechas de muestreo. Por otro lado, en el caso particular de *L. latrans*, se observó que los individuos capturados en el mes de diciembre eran claramente más chicos que los capturados en el mes de marzo (**Fig. 9**). Es por esta razón, y para evitar que las diferencias existentes en el tamaño de las ranas capturadas influenciaran a los resultados, que se analizaron los distintos parámetros evaluados en anuros de manera separada en las dos fechas de muestreo (**Fig. 9**). En cada fecha, se consideraron para los análisis estadísticos solamente los sitios que tenían un número de ranas igual o superior a 5. Es así que, para la especie *L. latrans*, en el mes de diciembre, se compararon solamente los sitios número 1 a 4, mientras que, en el mes de marzo, solamente los sitios 3 y 5 pudieron ser comparados debido al bajo número de capturas en los otros sitios.

Para el muestro de diciembre, el análisis de GLM demostró que ninguna de las variables estudiadas (índices somáticos, condición corporal, y biomarcadores) era influenciada de manera significativa por el sexo o la longitud hocico-cloaca (LHC) de los animales. En esta fecha de muestreo, solamente dos diferencias significativas fueron encontradas entre los distintos sitios: 1) La condición corporal de los anfibios adultos del sitio 4 era significativamente inferior a la de los ejemplares de los sitios 2 y 3 (**Fig. 10**). 2) El IHS de los anfibios adultos del sitio 4 era significativamente menor al de los individuos capturados en el sitio 2 (**Fig. 11a**). Ninguno de los otros parámetros examinados presentó una diferencia significativa entre los cuatro sitios evaluados (IGC, ICE, biomarcadores) (**Fig. 12, 13 y 14**).

En el muestreo de marzo, el análisis de GLM demostró que, en esta época del año, el valor de los índices IHS y IGC está significativamente influenciado por el sexo de los individuos; las hembras presentaron valores superiores a las de los machos ($p = 0.016$ y $p = 0.049$, respectivamente). Por esta razón, la comparación entre sitios de estos índices se realizó de manera separada para los machos y las hembras. Solamente dos de los parámetros determinados en los ejemplares presentaron diferencias significativas entre los

dos sitios que fueron comparados en marzo: 1) La condición corporal de los ejemplares capturados en el sitio 3 eran significativamente mayor a los observados en las ranas del sitio 5 (**Fig. 10**). 2) El índice de contenido estomacal (ICE), se comportó a la inversa, siendo mayor en los ejemplares de sitio 5 con respecto a las del sitio 3 (**Fig.12**). 3) El índice hepatosomático (IHS) es mayor en las hembras con respecto a los machos de los sitios 3 y 5 (**Fig. 11b**). Además, se observa que este índice es mayor en el mes de marzo con respecto a diciembre. Ninguno de los otros parámetros examinados presento una diferencia significativa entre los dos sitios evaluados (IGC, biomarcadores) (**Fig. 13a y 14**).

B) *Leptodactylus latinasus*

Al igual de lo mencionado para *L. latrans*, acá también, para la especie *L. latinasus*, se consideraron para los análisis estadísticos solamente los sitios que tenían un número de ranas igual o superior a 5 individuos. Es así que, en el mes de diciembre, se compararon solamente los sitios número 1, 2, 4 y 5, mientras que, en el mes de marzo, solamente los sitios 1, 2 y 3 pudieron ser comparados. Además, se puede notar en la **Fig. 15** que, en el mes de marzo, la gran mayoría de ejemplares de *L. latinasus* capturados en los sitios 2 y 3 eran individuos juveniles más pequeños que la mayoría, lo cual dificultó su sexado. Tanto para marzo como para diciembre, el análisis de GLM demostró que las variables analizadas no eran influenciadas por el sexo del animal o su largo hocico-cloaca.

Algunas diferencias fueron detectadas entre los sitios estudiados en el muestro de diciembre. El IHS se observó significativamente más bajo en el sitio 4 que en el sitio 1 (**Fig. 17b**), y los valores de GSH eran significativamente más altos en sitio 1 que en todos los otros sitios (**Fig. 18a**). La actividad hepática de GST se encontraba significativamente más alta en el sitio 5 que en los sitios 1 y 4 (**Fig. 18c**). Finalmente, la actividad de la enzima catalasa, tendía a ser mayor en todos los sitios comparados al primero, aunque estas diferencias no fueron significativas estadísticamente (**Fig. 18b**).

En el mes de marzo, el sitio 2 tiene una condición corporal significativamente menor que en el mes de diciembre (**Fig. 16**). Con respecto al IHS, en el mes de marzo, las ranas del sitio 2 presentan un IHS significativamente más alto que las del sitio 3. Además, comparando el IHS del sitio 2 entre ambos meses, se puede observar que el valor calculado en marzo es significativamente mayor al de diciembre (**Fig. 17b**). Finalmente, el ICE de las

ranas del sitio 3, en marzo es mayor que en diciembre (**Fig. 17a**). Ninguno de los biomarcadores examinados presento una diferencia significativa entre los dos sitios evaluados (**Fig. 18**).

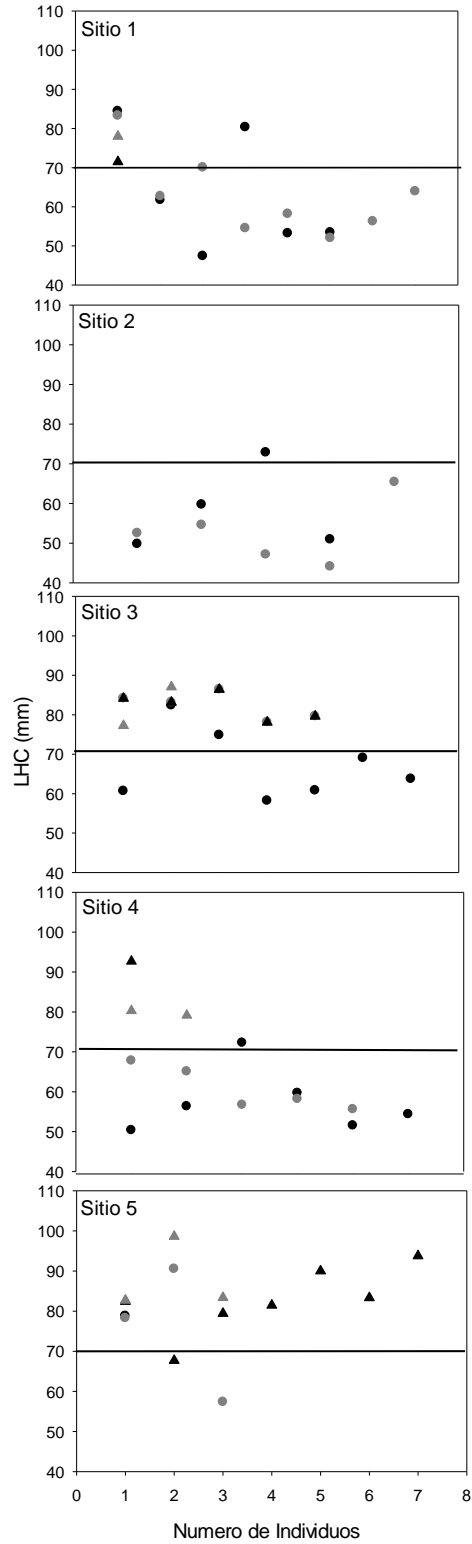


Figura 9. Largo hocico-cloaca (LHC) de los ejemplares capturados en los diferentes sitios de muestreo para la especie *L. latrans*. Diciembre: Hembras ● Machos ○ ; Marzo: Hembras ▲ Machos △

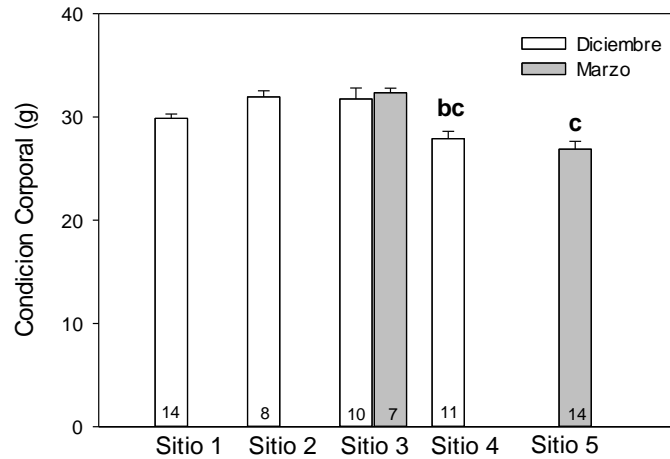


Figura 10. Condición corporal de los ejemplares de la especie *L. latrans* (media \pm error estándar). Los valores dentro de las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados. **bc** Significativamente diferente de los Sitios 2 y 3 en diciembre. **c** Significativamente diferente del Sitio 3 en marzo.

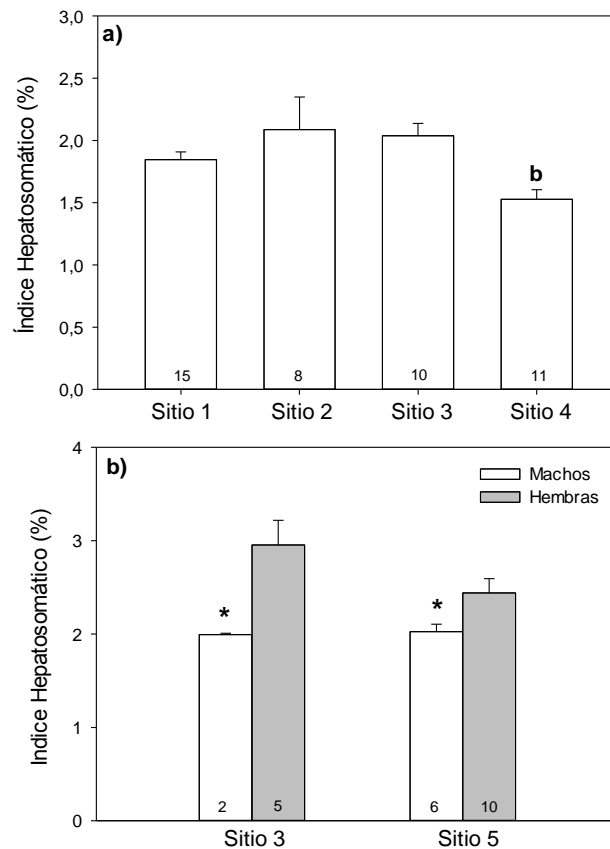


Figura 11. Índice Hepatosomático (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latrans* capturados en **a)** Diciembre y **b)** Marzo. **b** Significativamente diferente al sitio 2. * Significativamente diferente a las hembras en ambos sitios. Los valores dentro de las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados.

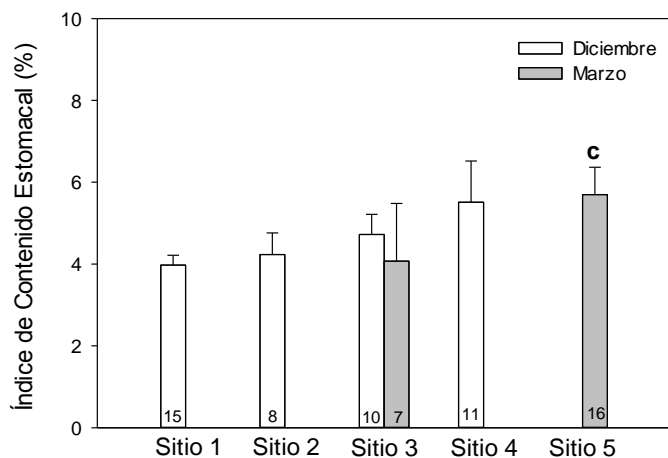


Figura 12. Índice de Contenido Estomacal (ICE) (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latrans* capturados en diciembre y marzo. ^c Diferencia significativa con el sitio 3 en el mes de marzo. Los valores dentro de las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados.

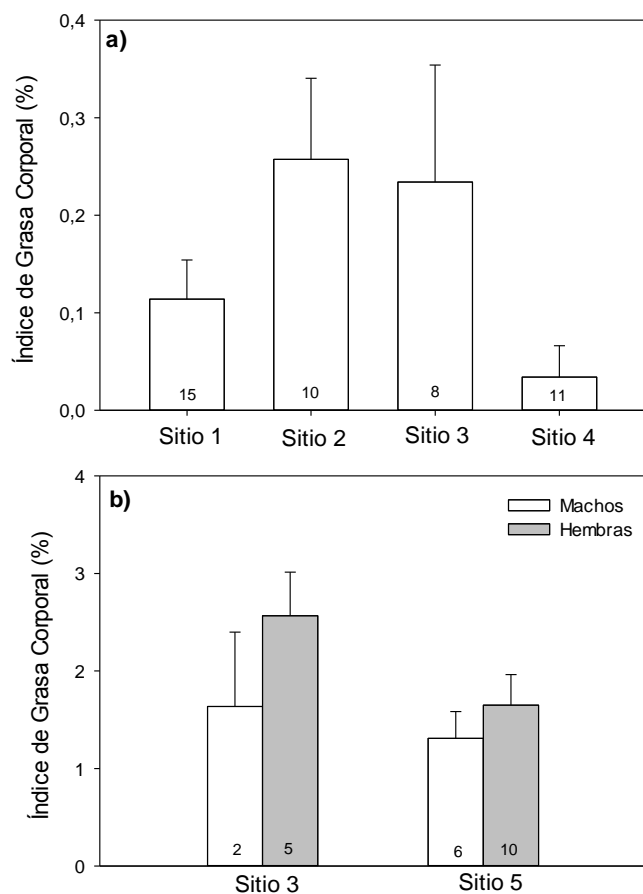


Figura 13. Índice de Grasa Corporal (media \pm error estándar) de los individuos de la especie *L. latrans* capturados. **a)** Diciembre y **b)** Marzo. Los valores dentro de las barras corresponden a los individuos analizados.

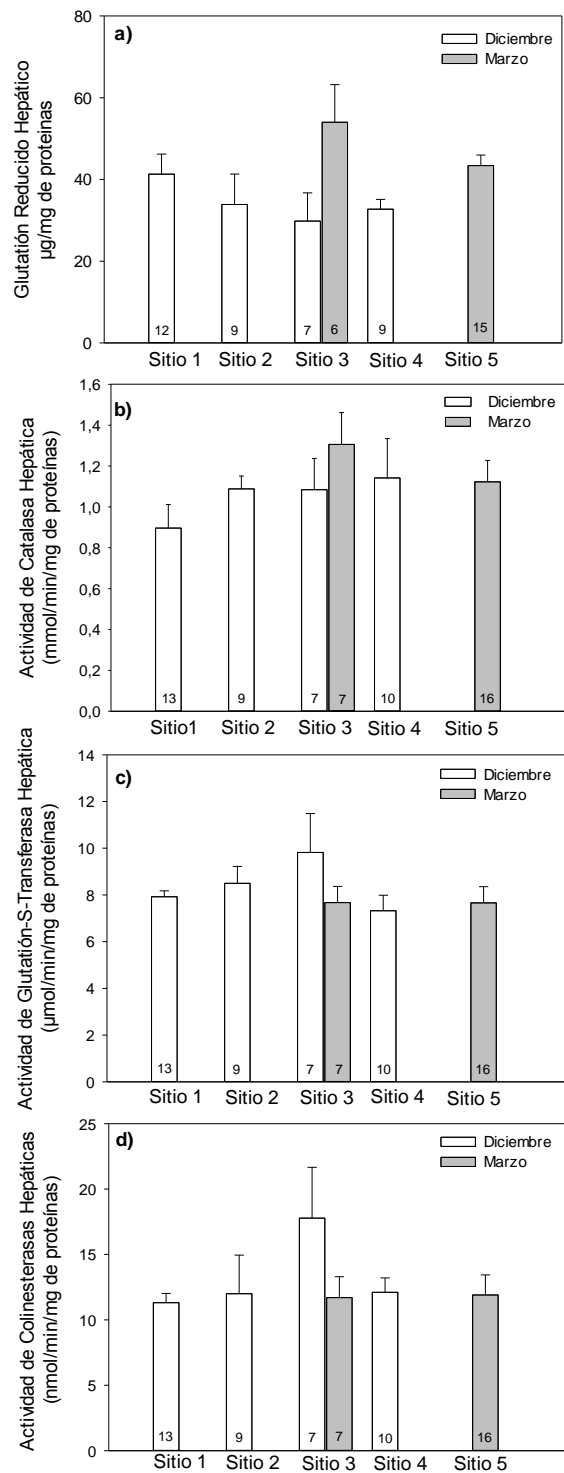


Figura 14. Biomarcadores (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latrans* capturados en diciembre y marzo. **a)** GSH, **b)** CAT, **c)** GST y **d)** ChE. Los valores dentro de las barras corresponden a los individuos analizados.

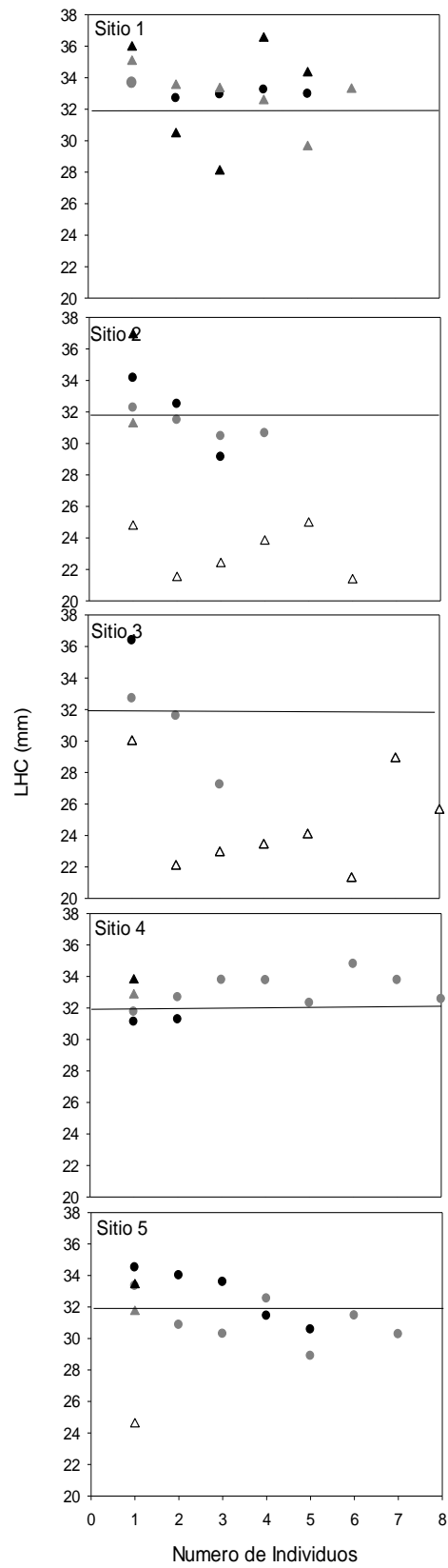


Figura 15. Largo hocico-cloaca (LHC) de los ejemplares capturados en los diferentes sitios de muestreo para la especie *L. latinasus*. Diciembre: Hembras ● y Machos ● . Marzo: Hembras ▲, Machos ▲ , Indeterminados Δ.

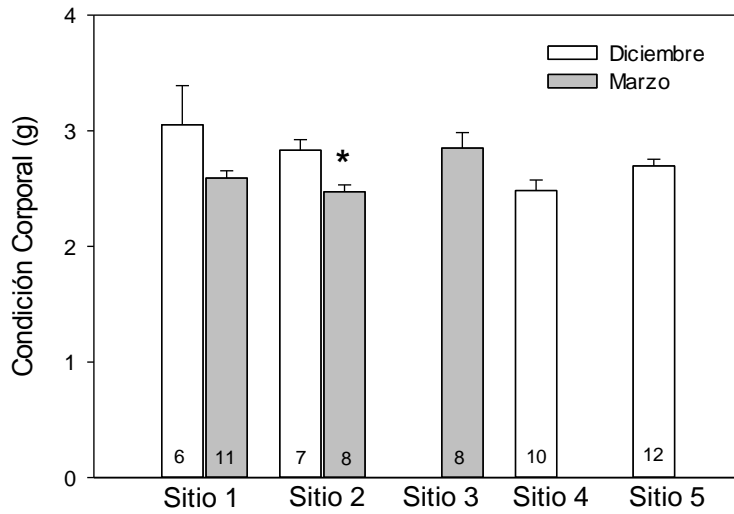


Figura 16. Condición corporal (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latinasus* (media \pm error estándar) capturados en diciembre y en marzo. * Diferencias significativas en el sitio 2 entre diciembre y marzo. Los valores dentro de las barras corresponden al número de individuos evaluados.

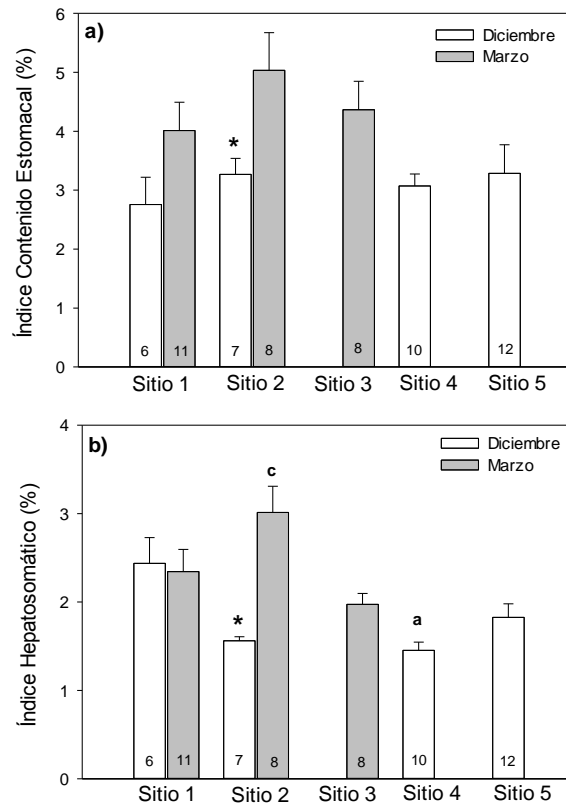


Figura 17. Índices somáticos (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latinasus* capturados en diciembre y marzo. a) ICE y b) IHS. * Significativamente diferente dentro del mismo sitio. **a** Significativamente diferente al sitio 1 en diciembre; **c** significativamente diferente al sitio 3 en marzo. Los valores corresponden a los individuos analizados.

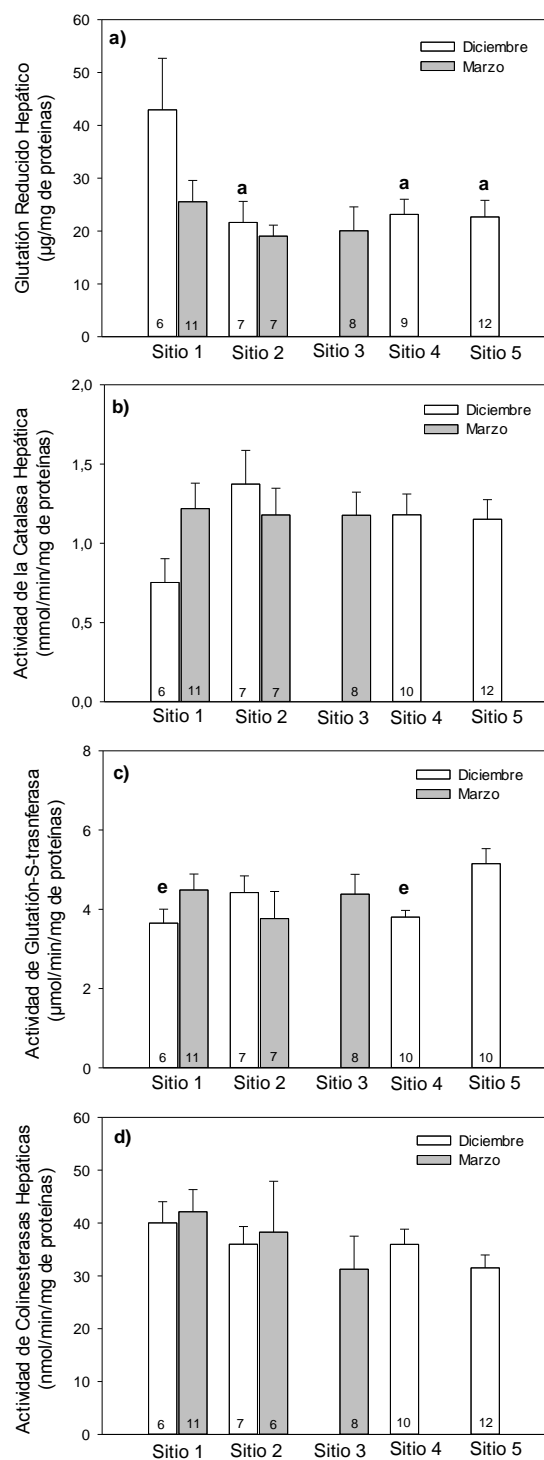


Figura 18. Biomarcadores (media \pm error estándar) de *L. latinasus*. **a)** GSH **b)** CAT **c)** GST **d)** ChE. **a** Diferencias significativas con respecto al sitio 1 en el mes de diciembre ($p < 0.05$). **e** Diferencias significativas con respecto al sitios 5 en el mes de diciembre ($p < 0.05$). Los valores dentro de las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados.

Comparaciones entre individuos con detección y sin detección de plaguicidas

Los ejemplares capturados en los diferentes sitios mostraron niveles de contaminación similares en sus tejidos. Es por ello, que se decidió analizar los diferentes parámetros estudiados sólo en los anuros que fueron medidos para cuantificar valores de plaguicidas, de este modo, se conformaron dos grupos, sin detección de plaguicidas (SD) y con detección de plaguicidas (CD).

*A) *Leptodactylus latrans**

Se analizaron 66 ranas de las cuales el 45% presentaron algún tipo de plaguicida en sus tejidos (**Tabla 10**). Los parámetros que mostraron diferencias fueron: 1) La condición corporal de los anfibios adultos con detección de algún tipo de plaguicida es significativamente menor a los individuos sin detecciones (**Fig. 19**). 2) El consumo de presas se encuentra disminuido significativamente en número y volumen con respecto a las ranas que no tenían detecciones (**Fig.20a y 20b**). 3) Se encuentra aumentado significativamente el contenido de glutatión reducido en los anuros que tenían detecciones (**Fig. 22a**). 4) También, la actividad enzimática de la CAT hepática esta significativamente elevada en los ejemplares con detección de plaguicidas que las que no tienen detección (**Fig.22b**). Ninguno de los otros parámetros examinados presentó diferencias (**Fig. 21, 22c y 22d**).

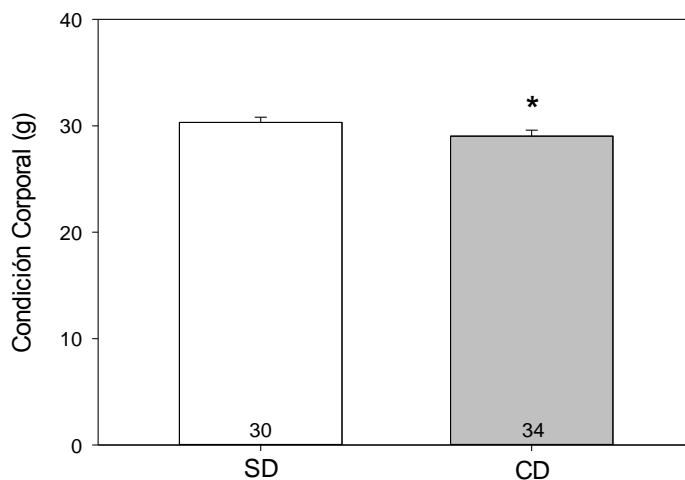


Figura 19. Condición Corporal de los individuos de la especie *L. latrans* (media ± error estándar) capturados en ambos muestreos. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. * Significativamente diferente a SD ($p < 0.05$). Los valores dentro de las barras corresponden al número de individuos evaluados.

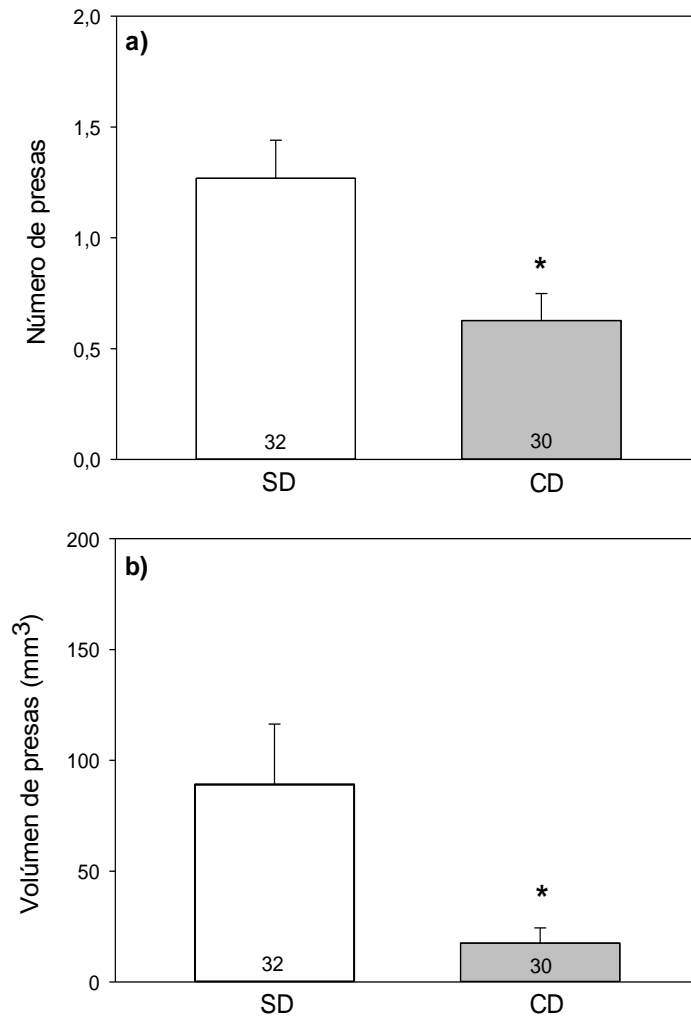


Figura 20. Presas consumidas (media \pm error estándar) por *L. latrans* en ambos muestreos. **a)** Número de presas **b)** Volumen total de presas consumidas. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. * Significativamente diferente a SD ($p < 0.05$). Los valores dentro de las barras corresponden a la cantidad de individuos analizados.

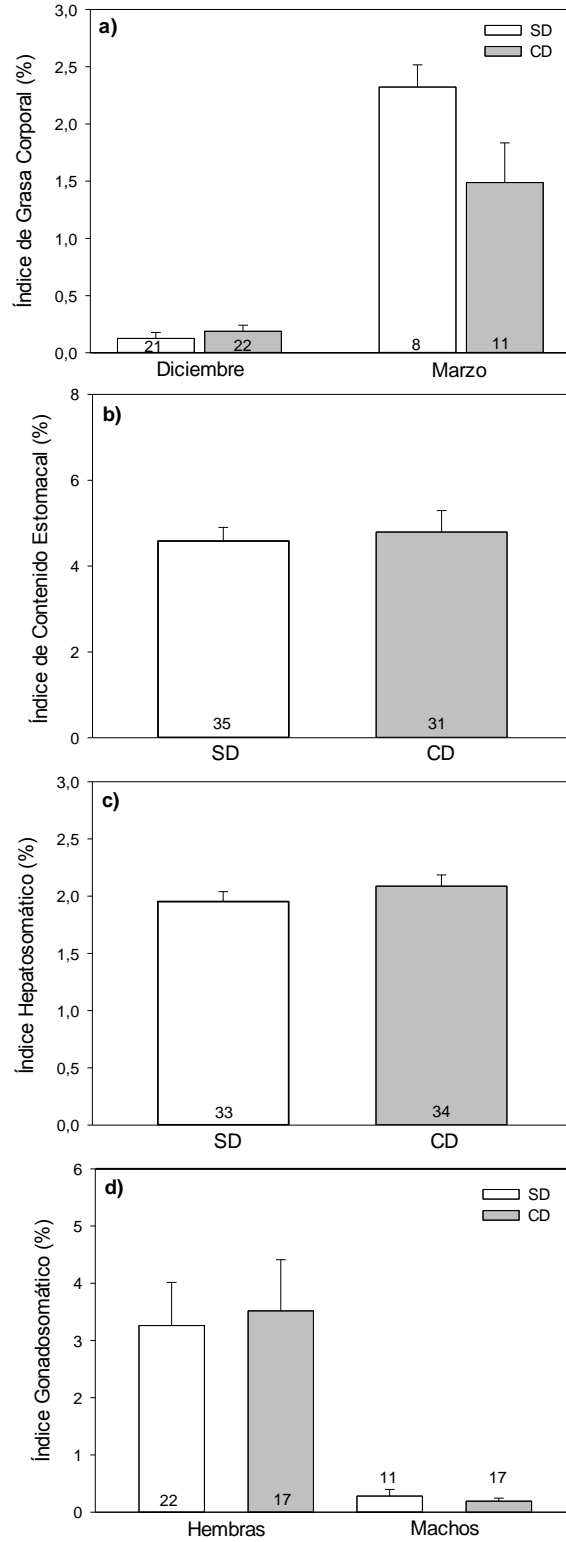


Figura 21. Índices corporales (media \pm error estándar) de *L. latrans* capturados en ambos muestreos. **a)** IGC **b)** ICE **c)** IHS **d)** IGS. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. Los valores dentro y sobre las barras, corresponden al número de individuos evaluados

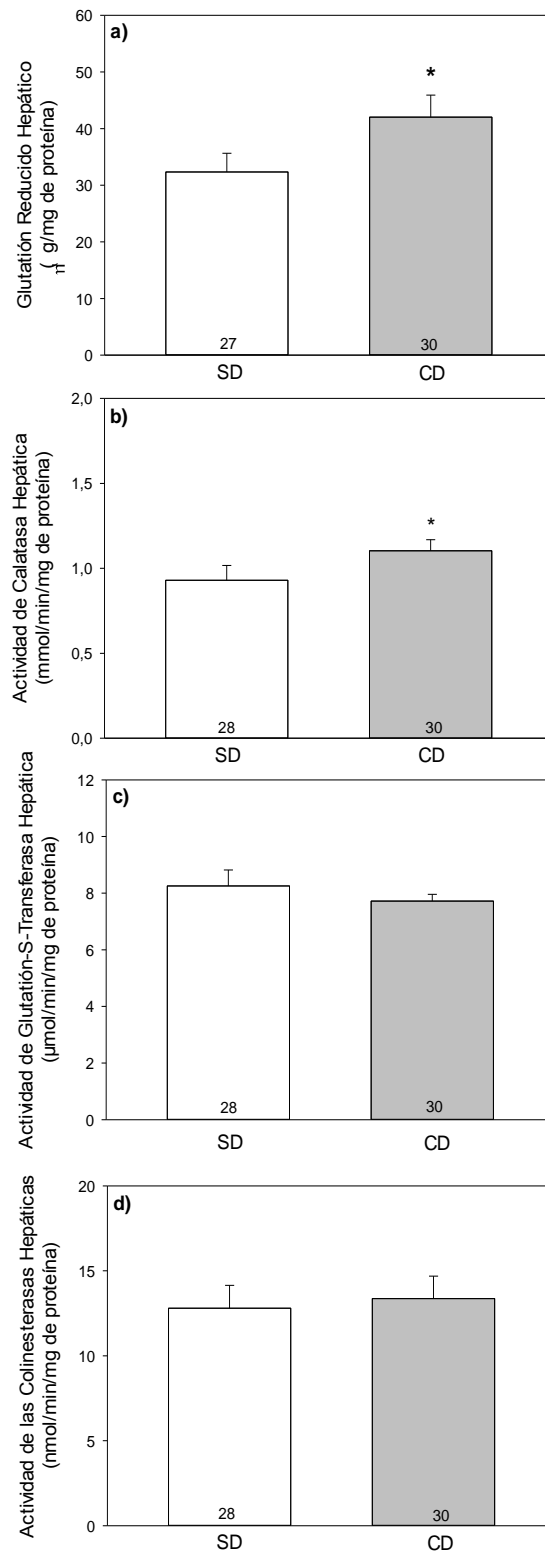


Figura 22. Biomarcadores (media \pm error estándar) de *L. latrans* capturados en ambos muestreos. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. **a)** GSH **b)** CAT **c)** GST **d)** ChE. * Significativamente diferente a Sin detección (SD) $p < 0.05$. Los valores dentro de las barras corresponden al número de individuos evaluados.

B) *Leptodactylus latinasus*

Se analizaron 35 ejemplares de las cuales el 37% presentaron algún tipo de plaguicida en sus músculos (**Tabla 14**). Los parámetros que mostraron diferencias fueron: 1) La actividad enzimática de la catalasa hepática (CAT) esta significativamente disminuida en las ranas con detección de plaguicidas que las que no tienen detección (**Fig. 25b**). 2) También se encuentra disminuida significativamente la actividad de las colinesterasas (ChE) en los anuros con detecciones (**Fig. 25d**). El resto de los parámetros no presento diferencias (**Fig. 23, 24, 25a y 25c**).

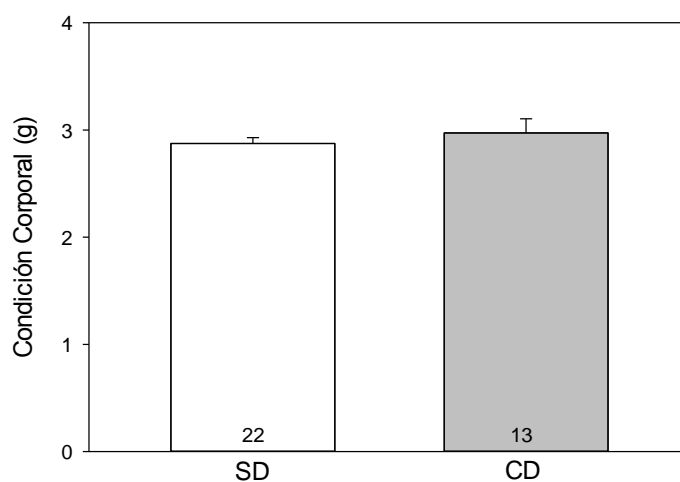


Figura 23. Condición Corporal de los individuos de la especie *L. latinasus* (media \pm error estándar) capturados en ambos muestreos. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. Los valores dentro de las barras corresponden al número de individuos evaluados.

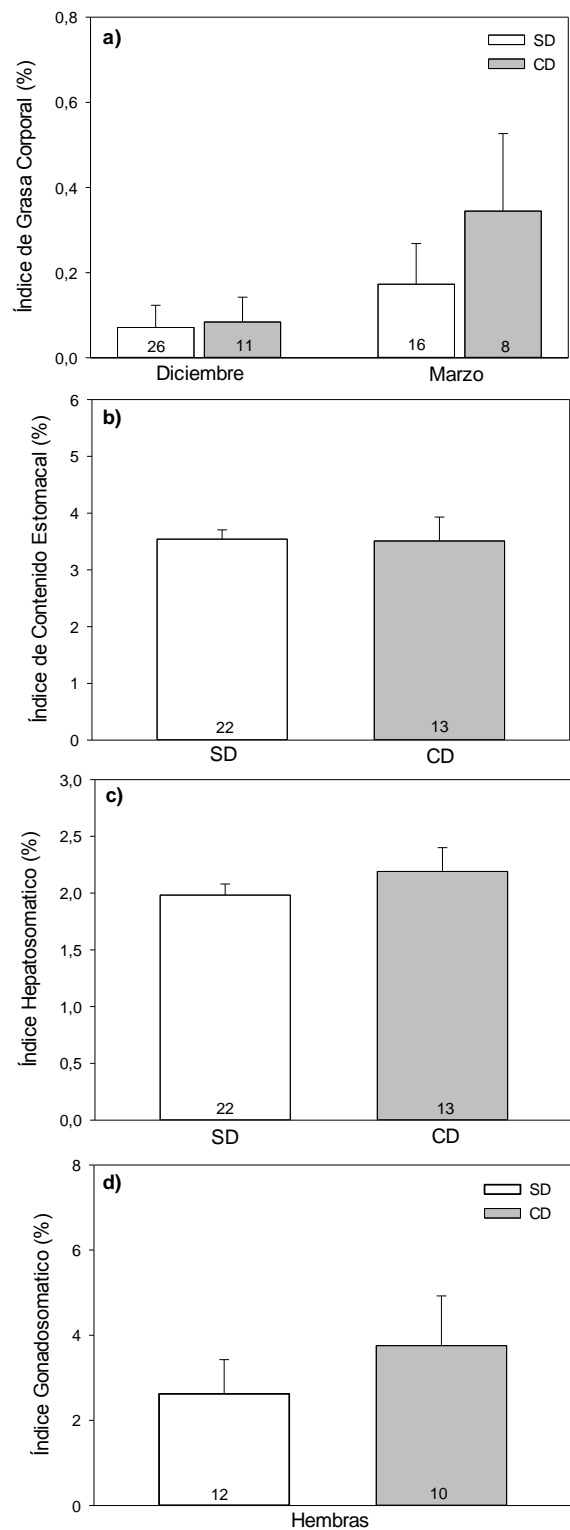


Figura 24. Índices corporales (media \pm error estándar) de *L. latinasus* capturados en ambos muestreos. **a)** IGC **b)** ICE **c)** IHS **d)** IGS. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. Los valores dentro de las barras corresponden al número de individuos evaluados.

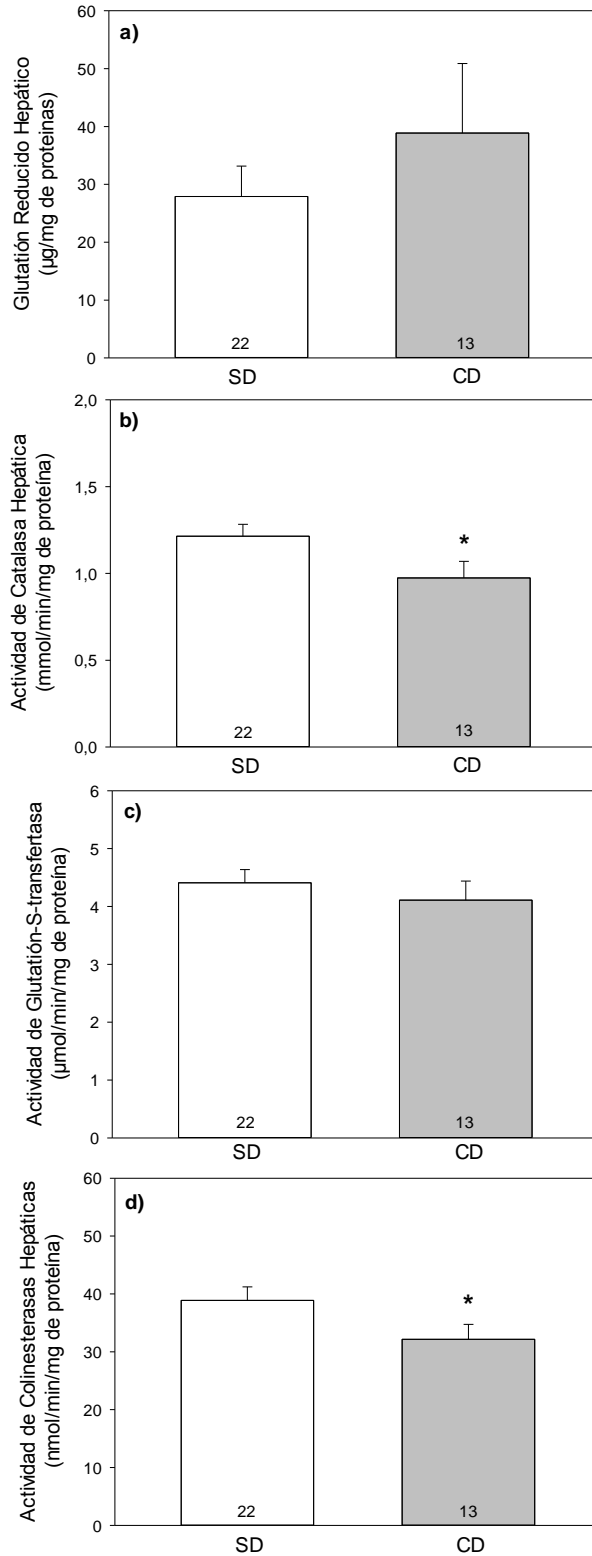


Figura 25. Biomarcadores (media \pm error estándar) de los ejemplares de la especie *L. latinasus* capturados en ambos muestreos. **a)** GSH, **b)** CAT, **c)** GST y **d)** ChE. SD: Sin detección de plaguicidas; CD: Con detección de plaguicidas. * Significativamente diferente a Sin detección (SD) $p < 0.05$. Los valores dentro de las barras corresponden a los individuos analizados.

4.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo se caracterizó la disponibilidad de alimento, la dieta, la condición corporal y una serie de biomarcadores químicos en ejemplares de las especies de anuros *L. latrans* y *L. latinasus* capturados en cinco sitios ubicados en lotes agrícolas de las localidades de Chivilcoy y Pergamino. El muestreo se repitió en dos momentos distintos del ciclo de cultivo: en diciembre cuando se aplican herbicidas y en marzo cuando se usan insecticidas y fungicidas.

Los diferentes sitios de muestreos fueron seleccionados en base a rasgos de paisaje, en un intento de evaluar un gradiente de intensificación agrícola y así obtener distintos niveles de contaminación a los que estarían expuestos los anuros estudiados. Casi el 50% de *L. latrans* y el 40% de *L. latinasus* se encontraba con alguna traza de contaminantes. Se detectaron 19 plaguicidas en los tejidos de riñón y músculo entre los que se encuentran insecticidas, fungicidas y herbicidas. No hubo diferencias entre los sitios cultivados y el sitio de referencia, en todos los sitios se encontraron un número similar de ejemplares con detecciones. A diferencia de lo reportado previamente por Brodeur et al., 2017, las detecciones de plaguicidas en los tejidos de los anuros no mostraron diferencias claras en los cinco sitios estudiados ni en los meses de muestreados. Los lugares elegidos, incluso el sitio 1, la Reserva de Biosfera de la UNESCO “El Destino”, utilizada como sitio control, presentó los mismos niveles de contaminación que los sitios agrícolas. Aunque se esperaría que la escorrentía sea la principal fuente de contaminación por plaguicidas en los cuerpos de agua (Sasal et al., 2015), se ha notificado que bajo ciertas condiciones específicas, por ejemplo, una tormenta torrencial, la deposición húmeda de plaguicidas podría exceder su contribución por escorrentía (Donald et al., 2005). La contaminación por plaguicidas en la reserva podría deberse a que los plaguicidas hayan sido arrastrados desde otros sitios contaminados a través del cauce del arroyo y/o además, como lo confirmó un estudio en la región pampeana, que los herbicidas como glifosato y atrazina pueden ser aerotransportados hacia otras áreas, agregando así una posible vía de exposición (Alonso et al., 2018).

En general, los efectos indirectos de los plaguicidas, ya sea mediante la alteración del hábitat o la reducción de alimento disponible (e.g., fitoplancton, perifiton, zooplancton,

artrópodos terrestres, etc.) pueden ser más importantes a nivel ecológico que la toxicidad directa sobre los individuos (Relyea, 2005).

El esfuerzo realizado para medir correctamente la disponibilidad de alimento, y encontrar efectos diferentes en la abundancia se reflejó en el hecho que los valores observados fueron homogéneos y además también se pudieron encontrar diferencias significativas en el volumen de artrópodos capturados.

La disponibilidad de alimento en el mes de diciembre, reflejada en la riqueza, el volumen, y en menor medida en la abundancia de artrópodos capturados en las trampas de caída fue mayor en el sitio 1(Reserva) que en el resto de los sitios agrícolas. La diversidad en la estructura de la vegetación y la falta de perturbaciones antrópicas se observa en una mayor diversidad de presas en el sitio control (Rousseau et al., 2013). En marzo, se produjo un aumento en las precipitaciones, dejando anegadas los márgenes de los arroyos de todos los sitios, salvo en el sitio 5. Las diferencias en la disponibilidad de alimento en ese mes se ven atenuadas con respecto al mes de diciembre debido a que las inundaciones redujeron la cantidad de invertebrados en los sitios anegados (Lambeets et al., 2008).

Estudios realizados en Argentina y Brasil, indican que la dieta *L. latrans* se encuentra compuesta por varios grupos de invertebrados (insectos, arácnidos, anélidos, miriápodos, crustáceos, moluscos, etc) y vertebrados (anfibios, aves y pequeños mamíferos) y que se puede considerar a la especie un consumidor generalista (Gallardo, 1974; Basso, 1990; Lajmanovick, 1996 y Solé et al., 2009).

Coincidiendo con otros estudios sobre la dieta de *L. latrans*, los órdenes más representados fueron Coleóptera, Ortóptera, Homóptera, Anura y Crustácea, pero no así Arácnida. Quizás este último ítem fue encontrado en baja frecuencia en los análisis de dieta, debido a la tardanza en sacrificar a los animales, quedando disuelto por los jugos gástricos su exoesqueleto por el bajo contenido de quitina. Muy pocos estudios de dieta han realizado también comparaciones con el alimento disponible. En este trabajo se utilizó la disponibilidad de alimento para calcular el índice de selectividad de Jacob (1974), el cual compara la proporción relativa de los artrópodos encontrados en el ambiente con los hallados en los contenidos estomacales de los anuros. En nuestro estudio, *L. latrans* selecciona todos los ítems consumidos, salvo los arácnidos que están disponibles en el ambiente pero no los elige. Quizás la selectividad en los órdenes consumidos de anuros y

crustáceos este sesgada debido a que estos ítems no fueron medidos correctamente. El primero por ser trampas chicas para la captura de los mismos y el segundo, porque este ítem está disponible en el agua, donde seguramente fue consumido. No se ha analizado la dieta de *L. latinasus* debido a que la mayoría de los ejemplares analizados de esta especie no presentaba ningún tipo de contenido en sus aparatos digestivos.

Los análisis de los diferentes parámetros que se realizaron en las ranas que habitaban distintos sitios en los diferentes muestreos no mostraron resultados contundentes con respecto al gradiente teórico propuesto de intensificación agrícola. Es por ello que, al analizar los anuros con detección de algún tipo de plaguicida (CD) separados de los fueron analizados pero que no se les encontró contaminación por plaguicidas (SD), las diferencias en los parámetros estudiados se notaron y se pudieron interpretar fácilmente.

La mayor cantidad y variedad de detecciones de plaguicidas se encontró en los riñones en comparación a los músculos. Por lo que el primer tejido permite una mejor estimación de la contaminación a la que están expuestos los anuros, por ser un órgano de detoxificación (Naccari et al., 2009). En cambio, los principios activos hallados en el musculo muestran depósito y acumulación de los plaguicidas en ese tejido (Naccari et al., 2009).

Los productos encontrados en los tejidos de los anfibios revelan que todos son muy tóxicos para organismos acuáticos. Como lo muestran las altas frecuencias encontradas de los organofosforados pirimifos metil y clorpirifos metil (CASAFE 2015). Estos productos son utilizados como control de insectos y ácaros en granos de maíz y sorgo almacenados, y el último compuesto también se utiliza en la fumigación de cultivos (CASAFE 2015).

Se conoce que los insecticidas organofosforados inhiben la actividad de la colinesterasa, lo que resulta en una acumulación del neurotransmisor acetilcolina; esto conduce a efectos tóxicos a través de la estimulación continua del sistema nervioso (Slotkin, 2004; Bernabo et al., 2011). En peces se ha estudiado los efectos subletales del pirimifos metil, informando anomalías en el desarrollo embrionario y larvario con deformidades esqueléticas y edema del pericardio (Mhadhbi & Beiras, 2012). Otros estudios reportaron que en lombrices la respuesta de la actividad de las colinesterasas (ChE) es dependiente de la concentración del plaguicida, mostrando un aumento de ChE a bajas concentraciones, y a altas concentraciones una disminución de ChE, volviéndose el

cuerpo de las mismas rígidas y contraídas debido a la estimulación repetida de las células nerviosas (Velki & Hackenberger, 2013). Además, se ha documentado que los niveles más bajos de clorpirifos, similares a los niveles que se encuentran a menudo en los hábitats naturales, pueden actuar directamente en los procesos de desarrollo independientes de los cambios en la acetilcolina (Colborn, 2006). Comprender cómo la exposición al clorpirifos afecta al desarrollo es importante porque muchos animales jóvenes, como los anfibios, pueden estar expuestos durante su fase larval. El estudio de Sparling & Fellers (2009), encontró que el clorpirifos metil alargó el tiempo de metamorfosis. También se han encontrado alteraciones morfológicas en el cerebro de anfibios recién metamorfoseados expuestas a concentraciones ambientales de clorpirifos (McClelland et al., 2018).

Se han documentado efectos subletales en los anfibios para otros plaguicidas encontrados en los tejidos. El herbicida atrazina es responsable de una variedad de efectos estrogénicos, como reducción de la respuesta inmune y modificación de la conducta (Lehman & Williams 2010) y el metalochlor retrasa el desarrollo y el crecimiento, y tiene efectos negativos en la glándula del timo (Hayes et al., 2006; Osano et al., 2002), y además tiene un impacto sinérgico con los efectos tóxicos ejercidos por la atrazina (Hayes et al., 2006; Lehman, 2010). La exposición a formulaciones de fungicidas que contienen piraclostrobina disminuyen el crecimiento y el desarrollo en los anfibios larvales (Hartman et al., 2014).

A pesar de las dificultades que se presentaron en el muestreo y en la interpretación de los datos en los diferentes sitios, nuestros resultados muestran conexiones entre la contaminación y los parámetros utilizados para analizar la salud de los anuros. La condición corporal de los anfibios es un indicador de la salud y de la calidad del hábitat en general. En nuestro caso, la condición corporal y consumo de presas (número y volumen) de la especie *L. latrans* que presentaron detecciones de plaguicidas se encontraba reducida. Los contaminantes de cualquier tipo pueden disminuir las reservas energéticas por los costos asociados a la desintoxicación (Adams, 1999) y por las reparaciones de los daños producidos en las células o en los tejidos (Campbell et al., 2003). Alternativamente, muchos insecticidas pueden reducir la capacidad de alimentación por afectar el sistema nervioso central y alterar el comportamiento de forrajeo. Es por ello, que la condición

disminuida puede deberse a la sinergia entre la contaminación y a la falta de consumo de alimento.

También se encontró estrés oxidativo, indicado por el aumento en el GSH y la actividad de la CAT. El GSH es quizás el secuestrador de ROS más importante que participa en el control del estado redox intracelular (Finkel & Holbrook 2000). Algunos plaguicidas se desintoxican mediante la conjugación o desmetilación de GSH a través de una vía que involucra la actividad de GST, y las alteraciones en la defensa antioxidante celular se han asociado con exposiciones a organofosforados (Hai et al., 1997). Debido a su participación en la eliminación de varios compuestos de xenobióticos, es común que la actividad de GST se induzca después de la exposición a pesticidas, aunque también se han informado muchos casos donde la actividad de GST no es afectada (Van der Oost et al., 2003). El aumento de la actividad de CAT también se observa en presencia de contaminantes ambientales, ya que la CAT es un componente del sistema de defensa desarrollado por los organismos aeróbicos para contrarrestar los efectos dañinos de la generación de ROS derivadas de cualquiera de los dos metabolismos, el esencial y normal, o el de los xenobióticos (Abdollahi et al., 2004; Martínez-Álvarez et al., 2005, Moretti et al., 2017).

En cambio, en la especie *Leptodactylus latinasus* no se observó la condición corporal reducida, quizás porque el número de detecciones de esta especie fue menor considerando el total de muestras analizadas en comparación con la especie *Leptodactylus latrans*. Si comparamos sólo el tejido muscular, que fue medido en ambas especies, se observa que *L. latinasus* tiene más detecciones que *L. latrans*. En *L. latinasus* se encontraron disminuidas las actividades de la catalasa (CAT) y las colinesterasas (ChE). La disminución de la catalasa puede deberse a exposición a plaguicidas, donde se observa una disminución del sistema de defensa antioxidante (Velisek et al., 2018). La inhibición de las colinesterasas (ChE) se ha utilizado como bioindicador de contaminación por carbamatos y organofosforados (Thompson, 1999; Fulton & Key, 2001).

5. DISCUSIÓN GENERAL

Es ampliamente conocido que, a nivel mundial, las actividades agrícolas superan el 40% siendo de hecho las acciones antrópicas que ocupan las mayores extensiones en la superficie terrestre (Foley et al., 2005). La agricultura además de su amplia extensión, se basa en el uso de cultivos genéticamente modificados y de agroquímicos (fertilizantes y plaguicidas químicos) (Tilman, 1999; Bindraban et al., 2009). La Argentina siempre fue un país que se basó en un modelo agroexportador, debido a la constante demanda externa, variable más significativa que explica el crecimiento de este modelo económico. Asimismo, la actividad agrícola, también sufrió una tremenda transformación a partir de los ´70. Las actividades ganaderas fueron cambiando hacia la agricultura de doble cultivo, rotación de trigo-soja; hasta que a mediados de los 90 surgió la soja transgénica (GM), cultivo que hoy domina la producción agrícola del país (Satorre, 2005; INTA, 2015). En Buenos Aires, el cultivo de soja se adoptó rápidamente, abarcando el 80% de la provincia con una extensión de más de 13 millones de hectáreas (Ministerio de economía, 2013). La extensa siembra de este cultivo trajo aparejado el uso de herbicidas, insecticidas y funguicidas (RETAA, 2013). Estos agroquímicos se utilizan separados o comúnmente en forma de mezclas (Rennella & Quirós, 2000; Perez Leiva y Anastasio, 2003; Bindraban et al., 2009).

Así, los factores de amenaza hacia la vida silvestre son superiores en los lugares donde el hombre desarrolla sus actividades, es decir por medio de la destrucción y alteración de los recursos, la contaminación, la presencia de especies exóticas, etc (Blaustein & Kiesecker, 2002; Collins & Storfer, 2003; Stuart et al., 2004; Sodhi, 2008; Hayes et al., 2010). Bajo este panorama, los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazado del mundo, debido a que sufren las consecuencias negativas de la fragmentación del hábitat, el cambio climático, las enfermedades, la contaminación, etc., y su declive no se puede explicar teniendo en cuenta una sola causa (Blaustein & Wake, 1990; Wake & Vredenburg, 2008).

Es un hecho que la mayor parte de los estudios de impacto de los plaguicidas sobre los anfibios se realizan en laboratorio (Relyea, 2005; Piha, 2006; Mann et al., 2009; Hayes et al., 2003; Brodeur et al., 2009; Brodeur et al., 2013), lo que permite tener un control riguroso de las condiciones en las que se realizan los experimentos, pudiendo, por tanto, determinar el efecto directo de las sustancias consideradas. Además, los factores ambientales influyen en la biodisponibilidad de los plaguicidas y así regulan su capacidad

de producir algún efecto sobre los organismos no-blanco. En contraposición a lo anterior, los efectos de los plaguicidas sobre los anfibios adultos en el campo, es un tema poco estudiado.

Los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral fueron obtenidos a partir de evaluaciones en escenarios naturales típicos de la región, que incluyeron el estudio de los efectos directos e indirectos sobre tres especies de anuros adultos nativos (*L. latrans*, *L. latinasus* y *B. pulchella*): provenientes de sitios con diferente grado de intensificación agrícola, capturados en sitios cultivados antes y después de una aplicación de mezcla de plaguicidas, y comparando individuos con y sin presencia de plaguicidas en órganos.

En este trabajo se detectaron plaguicidas en órganos de anuros en aproximadamente el 50% de los ejemplares de la especie *L. latrans* y el 40 % de los individuos de la especie *L. latinasus*. Los lugares estudiados, incluso el sitio de referencia ubicado en la Reserva de Biosfera de la UNESCO “El Destino”, presentó los mismos niveles de contaminación que los sitios con intensificación agrícola. La contaminación ingresa en los diferentes compartimentos ambientales por escurrimiento superficial, drenaje y deriva durante la pulverización; y ocurre por la sumatoria de pequeños aportes individuales imperceptibles de uno o más contaminantes que vienen desde diversos sitios, que se repiten con cierta periodicidad y por períodos prolongados de tiempo, generándose con ello efectos acumulativos (Montoya et al., 2018). La reserva “El Destino” se encuentra a más de 15 kilómetros de distancia de cualquier establecimiento que se dedique a la actividad agrícola, por lo que se sospecha que los plaguicidas hallados pudieron ingresar por distintas vías. El escurrimiento superficial, es una vía de contaminación que podría ocurrir aguas arriba del arroyo “La Estancia” arrastrando los contaminantes a la reserva (Sasal et al., 2015). Otra posible vía de ingreso de los plaguicidas a la reserva podría ser la aérea. Un estudio en la región pampeana, confirmó que los herbicidas glifosato y atrazina podían ser aerotransportados hacia otras áreas, agregando así una vía posible de exposición (Alonso et al., 2018).

Hemos detectado que la intensa producción agrícola y el uso masivo de plaguicidas en la región se vieron reflejados en la variedad de moléculas halladas de los diferentes tejidos de los anfibios adultos analizados. Los plaguicidas son uno de los múltiples factores estresantes que contribuyen a la disminución de las poblaciones de anfibios, y sus efectos

en la salud a nivel poblacional aún son poco conocidos (Devinson et al., 2004; Mann et al., 2009). Comúnmente los organismos en ambientes naturales están expuestos a mezclas de plaguicidas. El efecto final de la contaminación sobre cada individuo dependerá de la magnitud de la contaminación ambiental y de la sensibilidad que tenga cada uno a los contaminantes a los que estuvo expuesto. Las interacciones de los contaminantes sobre los organismos pueden tener efectos aditivos (si los efectos de los factores implicados se suman), sinérgicos (si el efecto global es superior a la suma de los efectos de cada factor por separado) o antagónicos (si el efecto global es inferior a la suma de los efectos de cada factor por separado) (Ortiz-Santaliestra & Egea-Serrano, 2013; Brodeur et al., 2016). La presencia y los efectos de los contaminantes sobre los organismos se evalúa utilizando biomarcadores, estos implican cualquier respuesta biológica a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico o histológico (nivel sub-individual) que se desvían del estado normal. (Walker et al., 2004).

En este estudio se utilizó la detección de plaguicidas en los distintos órganos de ejemplares adultos como un biomarcador de exposición y permitió determinar qué individuos de las poblaciones estudiadas estuvieron expuestos en algún momento a los contaminantes. Como se mencionó anteriormente, el 50% de *L. latrans* y el 40% de *L. latinasus* presentaron plaguicidas en sus órganos; en general, más del 30% de los individuos con 3 o más moléculas. La mayor frecuencia de detecciones se produjo para los insecticidas organofosforados (pirimifos metil y clorpirifos metil) y cloroacetamidas (acetoclor y metaloclor). Los individuos de la especie *L. latrans* que mostraron valores significativos en las detecciones de plaguicidas, presentaron además niveles elevados de GSH y CAT, los cuales son biomarcadores de efecto con baja especificidad que responden al estrés oxidativo generado por una gran variedad de contaminantes. Por otro lado, los individuos contaminados de *L. latinasus* mostraron disminuidas las actividades enzimáticas de CAT y ChE. Las enzimas ChE, son biomarcadores de especificidad intermedia y se inhiben al entrar en contacto con insecticidas organofosforados y/o carbamatos, en nuestro caso coincidió con las detecciones de organofosforados en sus músculos.

Los compuestos organofosforados pirimifos metil y clorpirifos metil encontrados en los órganos de los anfibios no sólo son muy tóxicos para organismos acuáticos, sino que son encontrados en altas frecuencias en los diversos sitios de estudio (CASAFE 2015).

Estos productos son utilizados principalmente como control de insectos y ácaros en granos de maíz y sorgo almacenados, por lo que no se esperaría encontrar residuos de estos plaguicidas en los organismos estudiados (CASAFE 2015).

Los plaguicidas, al igual que cualquier otro contaminante ambiental pueden tener también efectos indirectos sobre los organismos no-blanco. Los efectos indirectos son el impacto que genera el contaminante sobre el organismo al verse modificado su entorno, alterando su hábitat o el alimento que consume (Sotherton, 1998, Wilson et al., 1999). La disponibilidad de alimento es una de las medidas que puede ser afectada por el uso de plaguicidas. En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron trampas de caídas de artrópodos para evaluar la disponibilidad de alimento. Este método se eligió debido a que releva una gran cantidad de taxa de artrópodos del suelo (ítems consumidos por los anuros), es económico y de fácil colocación (Spence y Niemelä 1994; Driscoll, 2010; Grant & Matthews, 2016). En ambos muestreos se repite el mismo patrón, sin importar la cantidad de trampas colocadas, los sitios agrícolas contienen menor riqueza (número de familias) que el sitio de referencia. Los disturbios antrópicos como la aplicación de plaguicidas y algunos disturbios naturales como inundaciones pueden afectar la riqueza y abundancia. Para los artrópodos es importante mantener una oferta adecuada de hábitats naturales o seminaturales, como los bosques, los márgenes de los campos, los pastizales permanentes; cruciales en el paisaje agrícola, ya que proporcionan sitios de hibernación y refugio ante perturbaciones del ambiente y variedad de presas (Landis et al., 2000; Tschardt et al., 2007; Rusch et al., 2010). La diversidad en la estructura de la vegetación y la falta de perturbaciones antrópicas se observa en una mayor diversidad de presas solamente en el sitio de referencia (Douglas et al., 2010; Rousseau et al., 2013).

La condición corporal de los anfibios es un indicador de la salud y de la calidad del hábitat en general (Maceda-Veiga et al., 2014). La condición corporal y el consumo (cantidad y volumen) de artrópodos del suelo por parte de la especie *L. latrans* se encontraba disminuido en animales que presentaron detecciones de plaguicidas. Se sabe que los efectos de los insecticidas organofosforados como los hallados en los órganos, actúan a nivel neurológico y pueden manifestarse como una alteración de la conducta en los individuos expuestos, los cuales podrían emplear más tiempo en la captura, manipulación e ingestión de las presas (Amaral et al., 2012; Egea-Serrano et al., 2012;). La condición

corporal disminuida detectada puede deberse a la sinergia entre el gasto energético producto de la detoxificación de los contaminantes y la disminución en el consumo de alimento (Brodeur et al., 2011).

Este trabajo es uno de los pocos estudios en anfibios que realizan comparaciones entre el consumo, la dieta y la disponibilidad de alimento (Attademo et al, 2005). En ambos muestreos se confirmó que *L. latrans* es una especie generalista por el amplio espectro de familias de artrópodos que componen su dieta (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Solé et al, 2009). Sin embargo, la especie es selectiva para algunas de sus presas consumidas, cuando se compara con la disponibilidad de su entorno. Inferimos selectividad con valores positivos del índice de Jacob para Coleoptera, Hemiptera y Larvas; y los valores negativos para otras categorías Arachnida e Hymenoptera (generalmente formicidos). Otros autores reportaron que el orden Arachnida era consumida por la especie (Basso, 1990; Lajmanovich, 1996; Solé et al, 2009), en este trabajo, Arachnida se encontró en baja frecuencia en los individuos analizados. Esta diferencia quizás se debió al tiempo que se mantuvieron vivos los anfibios capturados hasta su eutanasia, quedando este ítem digerido por tener menor cantidad de quitina. Además, como nuestro trabajo se emplaza en sitios de cultivo, la especie mostró un gran consumo de artrópodos considerados plagas de cultivo de los órdenes Coleptera (Curculionidae, Crisomelidae, Elateridae, Scarabaidea), Homoptera, Hemiptera y Orthoptera, todos ellos fitófagos del cultivo de la soja en diferentes etapas del cultivo (Saluso et al., 2006; Molina, 2006; Molina, 2008).

Finalmente, pudimos decidir el mejor método de condición corporal evaluando la relación del peso y el largo en las tres especies de anuros. La forma de crecimiento de los individuos de estas poblaciones de anuros fue la variable que estimo mejor la condición corporal para determinar la cantidad de reservas de energía que estos poseen (Peig y Green, 2010). Los ejemplares de las especies *L. latrans* y *L. latinasus* tuvieron un crecimiento alométrico, es por eso que utilizamos el índice de masa escalado, que basa su método en la relación entre peso y largo. El objetivo de los índices de condición corporal es determinar la masa de un animal que está asociada con las reservas de energía después de corregir el tamaño corporal estructural. Por lo tanto, se supone que un individuo con una condición corporal alta tiene más reservas de energía que un animal con una condición baja (Brodeur et al., 2011). En el biomonitoreo, la condición corporal se considera un punto final de

relevancia ecológica ya que la aptitud (crecimiento, supervivencia, reproducción, etc.) de un animal está relacionada con sus reservas de energía (Colin et al., 2016). Es por ello, que existe la necesidad de medir correctamente este parámetro y así poder utilizarlo como un indicador de estrés ambiental para muchas especies en su contexto ambiental (Maceda-Veiga et al., 2014).

De los resultados obtenidos a partir de los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral, surge la dificultad de identificar respuestas claras cuando se trabajó en la comparación del estado fisiológico y energético de anuros provenientes de sitios con diferentes grados de intensificación agrícola, o capturados en sitios cultivados antes y después de una aplicación de mezcla de plaguicidas. Las condiciones ambientales del campo complejizaron los resultados obtenidos para evaluar si los impactos en los anfibios fueron resultado de alteraciones ocurridas en los agroecosistemas. Sólo se pudieron identificar los efectos de la aplicación de plaguicidas sobre los anuros cuando se trabajó en la caracterización de exposición específica de los plaguicidas en cada uno de ellos. Nuestros resultados demuestran que los biomarcadores utilizados son fundamentales para detectar los efectos tempranos en la salud de los individuos lo que podría traducirse en efectos a la población (Hayes, 2010).

En necesario contar a futuro con biomarcadores más sensibles a los productos que hoy la industria química utiliza como plaguicidas. Además, se deberían desarrollar biomarcadores alternativos para medirlos en diferentes tipos de muestras tales como sangre, heces, cultivos celulares, fluidos reproductivos, comportamentales y otros rasgos individuales, sin la necesidad de sacrificar a los animales y así poder cumplir mejor con los estándares de conservación y bienestar animal.

Finalmente, los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral son una evidencia más de que los anfibios están acumulando plaguicidas en sus órganos y que impactan de manera negativa en su salud. Cabe esperar entonces que los efectos evidenciados a lo largo de nuestras investigaciones pudieran, en gran parte, afectar negativamente a la herpetofauna de la Región Pampeana. Por ello, es fundamental que las diferentes organizaciones encargadas de regular el uso de agroquímicos tomen las medidas de control necesarias para

proteger de los plaguicidas tanto a las reservas biológicas cómo a los ambientes naturales en los cuales dichas especies se encuentran.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor* 10: 141-147.
- Achaval, F. & Olmos, A., 2003. *Anfibios y reptiles del Uruguay*. Ed. Graphis. 136 pp.
- Adams, M.J., 1999. Correlated Factors in Amphibian Decline: Exotic Species and Habitat Change in Western Washington. *Journal of Wildlife Management* 63: 1162-1171.
- Agostini, M.G., 2013. *Ecotoxicología de anfibios en agroecosistemas del noreste de la región pampeana*. Tesis Doctoral. 150pp.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Etchegoyen, M.A., Marino, D.J., 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment* 645: 89-96
- Altieri MA. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 19-31.
- Amaral, M.J., Sanchez-Hernandez, J.C., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Valente, R., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M., Mann, R.M., 2012. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 2345-2353.
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonate acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93: 1866-1873.
- ArgenBio, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 2013. www.argenbio.org.
- Attademo A, Lajmanovich R, Peltzer P, Cejas W. 2005. Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106: 389-394.
- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Fiorenza, G., 2007. Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology* 16: 533-539.
- Bachman, G. & Widemo, F., 1999. Relationships between body composition, body size and alternative reproductive tactics in a lekking sandpiper, the ruff (*Philomachus pugnax*). *Functional Ecology* 13: 411-416.
- Badii, M., Garza, R., Garza, V., Landeros, J., 2005. Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados. *CULCyT* 24: 4-20.
- Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of Total Environment* 449: 150-156.
- Barnosky, A.D., Matzke N., Tomiya S., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51-57.
- Barsky, O. (ed.). 1991. *El Desarrollo Agropecuario Pampeano*. Grupo Editor Latinoamericano. Argentina. 665 pp.

- Basso, N. G., 1990. Estrategias adaptativas de una comunidad subtropical de anuros. Monografía Asociación Herpetológica Argentina 1: 1-70.
- Battaglin, W.A., Smalling, K.L., Anderson, C., Calhoun, D., Chestnut, T., Muth, E., 2016. Potential interactions among disease, pesticides, water quality and adjacent land cover in amphibian habitats in the United States. *Science of the Total Environment* 566–567: 320-332.
- Baudhuin, P., Beaufy, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C., 1964. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochemical Journal* 92:179-184.
- Beketova, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B. y Liessa, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11039-11043.
- Benton, T.G., Vickery, J.A., Wilson, J.D., 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology and Evolution* 18(4): 182-188.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocumbe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H., 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036.
- Bernabo, I., Sperone, E., Tripepi, S., Brunelli, E., 2011. Toxicity of chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61(4): 704-718.
- Berubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A. 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *Aquatic Toxicology* 71: 109-120.
- Beyers, D.W., Rice, J.A., Clements, W.H., Henry, C.J., 1999. Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56(5): 814-822.
- Bindraban, P.S., Franke, A.C., Ferrar, D.O., Ghersa, C.M., Lotz, L.A.P., Nepomuceno, A., Smulders, M.J.M., van de Wiel, C.C.M., 2009. GM-related sustainability: agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil. *Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands*.
- Blaustein, A.R. & Kiesecker, J.M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597-608.
- Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M., 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology* 91: 118-125.
- Bonansera, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A. 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere* 90: 1860-1869.

- Bonny, S. 2008. Genetically modified glyphosate-tolerant soybean in the USA: adoption factors, impacts and prospects. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 21-32.
- Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., Aiassa D. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 3(6): 155-163.
- Boyland, E. & Chasseaud, L.F., 1969. The Role of Glutathione and Glutathione S Transferase in Mercaptic Acid Biosynthesis. *Advances in Enzymology* 32: 173-219.
- Bradley, E., 1979. Computers and the Theory of Statistics: Thinking the Unthinkable. *SIAM Review* 21(4): 460–480.
- Brodeur, J.C., Økland, F., Finstad, B., Dixon, G.D., McKinley, R.S., 2001. Effects of subchronic exposure to aluminium in acidic water on bioenergetics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 226-234.
- Brodeur, J.C., Svartz, G., Perez-Coll, C.S., Marino, D.J.G., 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. *Aquatic Toxicology* 91: 161-170.
- Brodeur, J.C., Suarez, R.P., Natale, G.S., Ronco, A., Zaccagnini, M.E. 2011. Frogs inhabiting intensive crop production areas of Argentina exhibit reduced body condition and a distinct pattern of enzyme alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1370-1380.
- Brodeur, J.C., Vera Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., Ronco, A.E., 2012. Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology* 46(1): 72-78.
- Brodeur, J.C., Sassone, A., Hermida, G.N., Codugnello, N., 2013. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92:10-17.
- Brodeur, J.C., Sanchez, M., Castro, L., Rojas, D.E., Cristos, D., Damonte, M.J., Poliserpi, M.B., D'Andrea, M.F., Andriulo, A.E., 2017. Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere* 185: 36-46.
- Brown, G.R & Matthews, I.M., 2016. A review of extensive variation in the design of pitfall traps and a proposal for a standard pitfall trap design for monitoring ground-active arthropod biodiversity. *Centre Ecology and Evolution* 6 (12): 3953-3964.
- Brühl, C.A., Pieper, S., Weber, B., 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(11): 2465-2472.
- Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A., 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3: 1135.

- Campbell, L.H., Avery, M.I., Donald, P., Evans, A.D., Green, R.E., Wilson, J.D., 1997. A review of the indirect effects of pesticides on birds. JNCC Report 227, Joint Nature Conservation Committee, Peterborough, UK.
- Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguere, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovescs, J., Lacroix, A., Levesque, H., Sherwood, G., 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 847-866.
- Caprile, A.C., Aparicio, V.C., Sasal, M.C., Andriulo, A.E., 2016. Detección de atrazina, glifosato y AMPA en el arroyo pergamino. XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, 27 de Junio - 1 de Julio de 2016, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Carlisle, S.M. & Trevors, J.T. 1988. Glyphosate in the Environment. *Water, Soil and Air Pollution* 39: 409-420.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications* 8: 559-568.
- Carvalho, J.E., Gomes, F.R., Navas, C.A., 2008. Energy substrate utilization during nightly vocal activity in three species of *Scinax* (Anura/Hylidae). *Journal of Comparative Physiology B* 178: 447-456.
- CASAFE. 2012. Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. www.casafe.org.
- CASAFE. 2015. Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. www.casafe.org.
- Castro Berman, M.C., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., Zagarese, H., 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.103.
- Castro Jimenez, J., 2002. Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., Stratus, D.L., 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 8: 165-176.
- Choung, C.B., Hyne, R.V., Mann, R.M., Stevens, M.M., Hose G.C., 2011. Developmental toxicity of two common corn pesticides to the engered southern bell frog (*Litoria raniformis*). *Environmental Pollution* 159: 2648-2655.
- Claves de invertebrados II. 2005. Partes I y II. Invertebrados II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).
- Colborn, T., 2006. A Case for Revisiting the Safety of Pesticides: A Closer Look at Neurodevelopment. *Environmental Health Perspectives* 114 (1): 10-17.
- Colin, N., Porte, C., Fernades, C., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Piña, A., Maceda-Veiga, A., 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science Total Environmental* 540: 307-323.

- Colli, G.R. & Zamboni, D.S., 1999. Ecology of the worm-lizard *Amphisbaena alba* in the Cerrado of central Brazil. *Copeia* 733-742.
- Collins, J.P. & Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9(2): 89-98.
- Congdon, J.D., Dunham, A.E., Twinkle, D.W., 1982. Energy budgets and life histories of reptiles. In: Gans, C. (Ed.), *Biology of Reptilia*, vol. 13. Academic Press, New York. 233-271.
- Conti, M.E., & Cecchetti, G., 2001 Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment: a review. *Environmental Pollution* 114(3): 471-492.
- Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., Gregoire, C., 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science* 68: 16-30.
- Couture, P., Dutil, J.D., Guderley, H., 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1591-1598.
- Dautremepuits, C., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., Vernet, G., 2004. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137: 325-333.
- David, M., Patil, V.K., Chebbi, S.G., Marigoudar, S.R., Chittaragi, J.B., Halappa, R., 2009. Gas-liquid chromatography for fenvalerate residue analysis: In vivo alterations in the acetylcholinesterase activity and acetylcholine in different tissues of the fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Toxicology Mechanisms and Methods* 19: 410-415.
- De Geronimo, E., Aparicio, V.C., Barbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107 (4): 423-431.
- De March, B.G.E., 1987. Mixture toxicity indices in acute lethal toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 16: 33-37.
- De Solla, S.R., Pettit, K.E., Bishop, C.A., Cheng, K.M., Elliot, J.E., 2002. Effects of agricultural runoff on native amphibians in the lower Fraser River valley, British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 353-360.
- Delmas, R., Serca, D., Jambert, C., 1997. Global inventory of NO_x sources. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 48: 51-60.
- Dennis, P. & Fry, G.L., 1992. Field margins: can they enhance natural enemy population densities and general arthropod diversity on farmland? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 40: 95-115.
- Dennis, P., Thomas, M.B., Sotherton, N.W., 1994. Structural features of field boundaries which influence the overwintering densities of beneficial arthropod predators. *Journal of Applied Ecology* 31: 361-370.
- Devine, G. J. & Furlong, M.J., 2007. Insecticide use: Context and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24: 281-306.

- Dietl, J., Engels, W., Mirco, S., 2009. Diet and feeding behaviour of the leaf-litter frog *Ischnocnema henselii* (Anura: Brachycephalidae) in Araucaria rain forests on the Serra Geral of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of Natural History* 43: 1473-1483.
- Digweed, S.C., Curier, C.R., Carcamo, H.A., Spence, J.R., 1995. Digging out the “digging-in effect” of pitfall traps: Influence of depletion and disturbance on catches of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Pedobiologia* 39: 561-576.
- Dobson, F.S., 1992. Body mass, structural size, and life history patterns of the Columbian ground squirrel. *American Naturalist* 140 (1): 109-125.
- Dobson, F.S., Michener, G.R., 1995. Maternal traits and reproduction in Richardson’s ground squirrels. *Ecology* 76: 851-862
- Donald, D.B., Hunter, F.G., Sverki, E., Hill, D.B., Syrgiannis, J., 2005. Mobilization of pesticides on an agricultural Landscape flooded by a torrential storm. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2-10.
- Driscoll, D. A., 2010. Few beetle species can be detected with 95% confidence using pitfall traps. *Austral Ecology* 35:13-23.
- Duelli, P., Obrist, M.K., Schmatz, D.R., 1999. Biodiversity evaluation in agricultural landscapes: above-ground insects. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 33-64.
- Dunham, A.E., 1983. Realized niche overlap, resource abundance and intensity of interspecific competition. In: Huey, R.D., Pianka, E.R., Schoener, T.W. eds. *Lizard Ecology*. London, Harvard University. 261-280 pp.
- Durant, S.E., Hopkins, W.A., Talent, L.E., 2007. Energy acquisition and allocation in an ectothermic predator exposed to a common environmental stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145: 442-448.
- Ebert, T.A., Hernandez, J.C., Russell, M.P., 2011. Problems of the gonad index and what can be done: analysis of the purple searuch in *Strongylo centrotuspurpuratus*. *Marine Biology* 158: 47-58.
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M, Torralva, M., 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2: 1382-1397.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andreas, V.Jr., Feathersone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
- Etchegoyen, M.A., Ronco, A.E., Almada, P., Abelando, M., Marino, D.J., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental Monitoring and Assessment* 189: 63-74.
- European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection., 2001. Review report for the active substance lambda-cyhalothrin.
- Falk, B.G., Snow, R.W., Reed, R.N., 2017. A validation of 11 body-condition indices in a giant snake species that exhibits positive allometry. *PLoS One* 12, e0180791.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from

- Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(2): 158-165.
- Finkel, T. & Holbrook, N., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P.K., 2005. Global consequences of land use. *Science* 309: 570-574.
- Franco-Belussi, L., Santos, L.R.S., Zieri, R., Vicentini, C.A., Taboga, S.R., Oliveira C., 2012. Liver Anatomy, Histochemistry and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. *Zoological Science* 29: 844-848.
- Fryday, S. & Thompson, H., 2012. Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. EFSA Supporting Publications 343-348.
- Fulton, M.H. & Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 37-45.
- Gallant, A.L., Klaver, R.W., Casper, G.S., Lannoo, M.J., 2007. Global rate of habitat loss and implications for amphibian conservation. *Copeia* 967-979.
- Gallardo, J. M., 1974. Anfíbios de los alrededores de Buenos Aires. EUDEBA. 1-229.
- García-García, A., Reding-Bernal, J.C., López-Alvarenga, J.A., 2013. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica* 2(8): 217-224.
- Giroux, I. & Pelletier, L., 2012. Présence de pesticides dans l'eau au Québec: bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ISBN 978-2-550-64159-9 (PDF), 46 p. et 3 annexes.
- Gómez-Olivares, J.L., 2000. Propiedades estructurales de las colinesterasas de corazón, eritrocito e hígado de ratones normales y distróficos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Murcia, España. 346 pp.
- Goya, J., Placci, G., Arturi, M., Brown, A., 1992. Distribución y características estructurales de los Talares de la reserva de biosfera 'Parque Costero del Sur'. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 68: 53-64.
- Grant, E.H.C., Miller, D.A.W., Schmidt, B.R., Adams, M.J., Amburgey, S.M., Chambert, T., Cruickshank, S.S., Fisher, R.N., Green, D.M., Hossack, B.R., Johnson, P.T.J., Joseph, M.B., Rittenhouse, T.A.G., Ryan, M.E., Waddle, J.H., Walls, S.C., Bailey, L.L., Fellers, G.M., Gorman, T.A., Ray, A.M., Pilliod, D.S., Price, S.J., Saenz, D., Sadinski, W., Muths, E., 2016. Quantitative evidence for the effects of multiple drivers on continental-scale amphibian declines. *Scientific Reports* 6: 25625.
- Green, A.J., 2001. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82: 1473-1483.

- Guntherberg, H. & Rost, J., 1966. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymatic and paper chromatographic methods. *Analytical Biochemistry* 15: 205-210.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2: 312-329.
- Hallmann, C.A, Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., De Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *NATURE* 511: 341-343.
- Hartman, E.A., Belden, J.B., Smith, L.M., McMurry, S.T., 2014. Chronic effects of strobilurin fungicides on development, growth, and mortality of larval Great Plains toads (*Bufo cognatus*). *Ecotoxicology* 23: 396-403.
- Hayes, J.D. & Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemo- protection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30: 445-600.
- Hayes, J.P. & Shonkwiler, J.S., 2001. Morphological indicators of body condition: useful or wishful thinking? *Body Composition Analysis of Animals: A Handbook of Non-Destructive Methods* (ed. J. R. Speakman), pp. 8–38. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2003. Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111: 568-575.
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M., 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213: 921-933.
- Heredia, J., 2008. Anfíbios del Centro de la Argentina. Ed. L.O.L.A. 100 pp.
- Hermest-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Storey HB 319-368.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns Jr.J., 2003. *Handbook of ecotoxicology*. Chelsea, Mich, USA: Lewis Publishers. 755.
- Huang W.S., Lin J.Y., Yu J.Y.L., 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoological Science* 14: 497-503.
- Hunt, L., Bonetto, C., Resh, V.H., Buss, D.F., Fanelli, S., Marrochi, N., Lydy, M.J., 2016. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment* 547: 114-124.
- INTA 2011. Campaña Sojera 2010 – 2011 - República Argentina Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria RIAN – Red de Información Agropecuaria Nacional.
- INTA 2015. Informe estadístico mercado de la soja. 9 pp. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.pdf.
- IUCN. Conservation International, NatureServe, Global Amphibian Assessment. <http://www.globalamphibians.org>

- Jacobs, J., 1974. Quantitative measurement of food selection: a modification of the forage ration and Ivlev's electivity index. *Oecologia* 14: 413-17.
- Kennedy, S.W. & Jones S.P., 1994. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Analytical Biochemistry* 222: 217-223.
- Koehn, R.K. & Bayne, B.L., 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetic of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* 35: 157-171.
- Kumar, A., Rai, D.K., Sharma, B., Pandey, R.S., 2009. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 96-99.
- Lajmanovich, R. C., 1996. Dinámica trófica de juveniles de *Leptodactylus ocellatus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE), en una isla del Paraná, Santa Fe, Argentina. *Cuadernos de Herpetología, Tucumán* 10(1-2): 11-23.
- Lajmanovich, R., Sánchez-Hernández, J.C., Stringhini, G., Peltzer, P.M., 2004. Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 586-591.
- Lajmanovich, R., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., Attademo, A.M., 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587: 67-72.
- Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernández, J.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Fiorenzac, G.S., Cabagna, M.C., Basso, A., 2008. Levels of plasma B-esterases and glutathione-S-transferase activities in three South American toad species. *Toxicological & Environmental Chemistry* 90 (6): 1145-1161.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Junges, C.M., Peltzer, P.M., 2015. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2, 4-,D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air Soil Pollut.* 226: 427. doi: 10.1007/s11270-015-2695-9.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M., 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology.* 45: 175-201.
- Langhof, M., Gathmann, A., Poehling, H.M., 2005. Insecticide drift deposition on noncrop plant surfaces and its impact on two beneficial nontarget arthropods, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) and *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(8): 2045-2054.
- Le Viol, I., Chiron, F., Julliard, R., Kerbiriou, C., 2012. More amphibians than expected in highway stormwater ponds. *Ecological Engineering* 47: 146-154.
- Lee, J.C., Menalled, F.D., Landis, D.A., 2001. Refuge habitats modify impact of insecticide disturbance on carabid beetle communities. *Journal of Applied Ecology* 38: 472-483.
- Lehmann, C.E.R., 2010. Savannas need protection. *Science* 327: 642-643.

- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010. Exposure and effects assessments of persistent organohalogen contaminants in Arctic wildlife and fish. *Science of the Total Environment* 408: 2995-3040.
- Linder, S., Hägg Olofsson, M., Herrmann, R., Ulukaya, E., 2010. Utilization of cytokeratin-based biomarkers for pharmacodynamic studies, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 10(3): 353-359.
- Longley, M., Jepson, P.C., Izquierdo, J., Sotherton, J., 1997. Temporal and spatial changes in aphid and parasitoid populations following applications of deltamethrin in winter wheat. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83(1): 41-52.
- López, J.A., Scarabotti, P.A., Medrano, M.C., Ghirardi, R., 2009. Is the red spotted green frog *Hypsiboas punctatus* (Anura : Hylidae) selecting its preys? The importance of prey availability. *Revista de Biología Tropical* 57(3): 847-857.
- Lopez-Antia, A. 2015. Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds: the red-legged partridge case. Tesis doctoral. Universidad Castilla-La Mancha. España, 275 pp.
- Lorenzatti, E., Altahus, R., Lajmanovich, R., Peltzer, P., 2004. Residues of Endosulfan in Soy Plants in Argentina Croplands. *Fresenius Environmental Bulletin* 13: 89-92.
- Lövei, G.L. & Sunderland, K.D., 1996. Ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annual Review of Entomology* 41: 231-256.
- Lowe, W. H., 2003. Linking dispersal to local population dynamics: a case study using a headwater salamander system. *Ecology* 84: 2145-2154.
- Lowe, W. H., G. E. Likens, Cosentino, B.J., 2006. Self-organisation in streams: the relationship between movement behaviour and body condition in a headwater salamander. *Freshwater Biology* 51: 2052-2062.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lupi L., Miglioranza, K.S.B., Aparicio V., Marino D., Bedmar F., Wunderlin D., 2015. Ocurrance of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536: 687-694.
- McClelland, S.J., Bendis, R.J., Relyea, R.A., Woodley, S.K., 2018. Insecticide Induce Change in Amphibians Brains: How Sublethal Concentrations of Chlorpyrifos Directly Affect Neurodevelopment. *Environmental Toxicology* (10): 2692-2698.
- MacCracken, J.G., 2002. Response of forest floor vertebrates to riparian hardwood conversion along the Bear River, southwest Washington. *Forest Science* 48: 299-308.
- MacCracken, J. G., 2005. Effects of uneven-aged timber harvest on forest floor vertebrates in the Cascade Mountains of southern Washington. *Forest Ecology and Management* 208: 123-135.
- MacDonald, D.W, Newman, C., Stewart, P.D., Domingo-Roura, X., Johnson, P.J., 2002. Density-dependent regulation of body condition in Badgers (*Meies meles*) from Wytham Woods. *Ecology* 83: 2056-2061.
- McNabb, F.M.A. & Fox, G.A., 2002. Avian thyroid development in chemically contaminated environments:

- is there evidence of alterations in thyroid dysfunction and development? *Evolution & Development* 5: 76-82.
- Maneyro, R., Naya, D.E., Rosa, I., Canavero, A., Camargo, A., 2004. Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura , Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia Série Zoologia* 94 (1): 57-61.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903-2927.
- Marc, P., Canard, A., Ysnel, F., 1999. Spiders (Araneae) useful for pest limitation and bioindication. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 229-273.
- Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M., 2009. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology* 91: 126-134.
- Marigoudar, S.R., Nazeer Ahmed, R., David, M., 2009. Impact of Cypermethrin on Behavioural Responses in the Freshwater Teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *World Journal of Zoology* 4: 19-23.
- Marino, D. & Ronco, A.E., 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75(4): 820-826.
- Marshall, E.J.P., Moonen, A.C. 2002. Field margins in northern Europe: Their functions and interactions with agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 89(1-2): 5-21.
- Martínez-Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 75-88.
- Mazía, C.N., Chaneton, E.J., Kitzberger, T., 2006. Small-scale habitat use and assemblage structure of ground-dwelling beetles in a Patagonian shrub steppe. *Journal of Arid Environments* 67: 177-194.
- McCord, J., Fridovieh, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22): 6049-6055.
- McCoy, K.A. & Harris, R.N., 2003. Integrating developmental stability analysis and current amphibian monitoring techniques: an experimental evaluation with the salamander *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica* 59(1): 22-36.
- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette Jr., L.J., St. Mary, C.M., 2008. Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the Toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives* 116: 1526-1532.
- McDaniel, T.V., Martin, P.A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C.H., McMaster, M.E., Clarence, S., Tetreault, G., 2008. Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology* 88: 230-242.
- McNab, B.K., 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates: a View From Energetics*. Cornell University Press, Ithaca.

- Mhadhbi, L. & Beiras, R., 2016. Retraction Note: Acute Toxicity of Seven Selected Pesticides (Alachlor, Atrazine, Dieldrin, Diuron, Pirimiphos-Methyl, Chlorpyrifos, Diazinon) to the Marine Fish (Turbot, *Psetta maxima*). *Water Air Soil Pollut* 227- 275.
- Ministerio de Economía, 2013. Panorama productivo de la provincia de Buenos Aires.
- Molina, A.R., 2006. La soja y sus insectos y otros organismos benéficos y perjudiciales. 1a ed., V.1, 96 pp.
- Molina, A.R., 2008. La soja y sus insectos y otros organismos benéficos y perjudiciales. 1a ed., V.2, 96 pp.
- Moller, A., Christe P., Erritzoe, J., Mavarez, J., 1998. Condition, disease and immune defence. *Oikos* 83 (2): 301–306.
- Moreby, S.J., 1997. The effects of herbicide use within cereal headlands on the availability of food of arable birds. The 1997 Brighton Crop protection Conference. Weeds British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Reino Unido, 1197-1202.
- Moretti, D.B, Nordi, W.M., Cruz, T.M.P., Machado-Neto, R., 2017. Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and oxygen radical absorbance capacity in the gut of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* and dourado *Salminus brasiliensis* fed bovine first milk secretion. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45(4): 717-723.
- Moreby, S.J., Southway, S.E., 1999. Influence of autumn applied herbicides on summer and autumn food available to birds in winter wheat fields in southern England. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 72: 285-297.
- Morrison, R. I. G., Davidson, N. C., Wilson, J. R., 2007. Survival of the fittest: body stores on migration and survival in Red Knots *Calidris canutus Islandica*. *Journal of Avian Biology* 38: 479-487.
- Murphy, M. B., Hecker, M., Coady, K. K., Tompsett, A. R., Jones, P. D., DuPreez, L. H., Solomon, K. R., Carr, J. A., Smith, E. E., Kendall, R. J., van der Kraak, G., Giesy, J. P., 2006. Sediment TCDD-EQ's and EROD and MROD Activities in Ranid Frogs from Agricultural and Nonagricultural Sites in Michigan (USA). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 467-477.
- Naccari, C., Cristani, M., Cimino, F., Arcoraci, T., Trombetta, D., 2009. Common buzzards (*Buteo buteo*) bio-indicators of heavy metals pollution in Sicily (Italy). *Environment International* 35: 594-598.
- Neff, B. & Cargnelli, L., 2004. Relationships between condition factors, parasite load and paternity in bluegill sun- fish, *Lepomis macrochirus*. *Environmental Biology of Fishes* 71(3): 297-304.
- Niemelä, J., Spence, J.R., Spence, D.H., 1992. Habitat associations and seasonal activity of ground beetles (Coleoptera) in central Alberta. *The Canadian Entomologist* 124: 521-540.
- Nwani, C.D., Singh Lakra, W., Negpure, N.S., Kumar, R., Kushwana, B., Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of the herbicide Atrazine: effects of lipids peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 3298-3312.
- Oliveira, C. & Zieri, R., 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(2): 454-460.

- Ortiz-Santaliestra, M.E. & Egea-Serrano, A., 2013. Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 24 (1): 2-34.
- Ossana, N.A. & Salibián, A., 2013. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 8 (1): 67-74.
- Osano, O., Admiraal, W., Otieno, D., 2002. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 375-379.
- Panorama productivo de la provincia de Buenos aires, 2013. Ministerio de Economía, Dirección Provincial de Estudios y Proyecciones Económicas. <http://goo.gl/RdMfVp>.
- Paruelo, J.M. & Guerschman, J.P., 2003. Expansion agrícola y cambio en el uso del suelo. *Ciencia Hoy* 15(87): 14-23.
- Paoletti, M.G., 1999. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74: 1-18.
- Papoulias, D.M., Schwarz, M.S., Mena, L., 2013. Gonadal abnormalities in frogs (*Lithobates* spp.) collected from managed wetlands in an agricultural region Nebraska, USA. *Environmental Pollution* 172: 1-8.
- Peig, J. & Green, A.J., 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883-1891.
- Peltzer P.M. & Lajmanovich, R.C., 2003. Anuran tadpole assemblages in riparian areas of Paraná river (Argentina). *Biodiversity and Conservation* 12: 00-00.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Cejas, W., 2005. Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control biológico de plagas. In *Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino II*, F. G. Aceñolaza (ed.). INSUGEO, Tucumán. p. 399-416
- Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C., 2007. Amphibians. En: Iriondo et al., eds. *The middle Paraná river*. Springer. Capítulo 13.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sanchez, L.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Bionda, C.L., Martino, A.L., Bassó, A., 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6(3): 432-442.
- Pengue, W.A., 2000. Cultivos transgénicos ¿hacia dónde vamos? / Walter A. Pengue.
- Pengue, W.A., 2008. Modelo agroexportador, monoproducción y deuda ecológica. ¿Hacia el agotamiento del granero del mundo? *Aportes* 59-81.
- Pekár, S., 2002. Differential effects of formaldehyde concentration and detergent on the catching efficiency of surface active arthropods by pitfall traps. *Pedobiologia* 46: 539-547.
- Pérez, D.J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M.L., Aparicio, V.C., Costa, J.L., 2017. Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 3206-3216.

- Pérez Leiva, F. y Anastasio M.D., 2003. Consumo de fitosanitarios en el contexto de expansión agrícola. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. www.agro.uba.ar/apuntes/no_5/agroquimicos.htm.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic región of Argentina. *Environmental Pollution* 61-66.
- Peters, R.H., 1983. *The Ecological Implication of Body Size*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 329 pp.
- Phillips, I.D. & Cobb, T. P. 2005. Effects of habitat structure and lid transparency on pitfall catches. *Environmental Entomology* 34: 875-882.
- Pimentel, D., 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the united states. *Environment, Development and Sustainability* 7: 229-252.
- Pinkas, L., Oliphant, M.S., Iverson, Z.L., 1971. Food habit of albacore bluefin, tuna and bonito in California water. California Department of Fishing Game. *Fishery Bulletin* 152: 1105.
- Pollier, A., Guillomo, L., Tricault, Y., Plantegenest, M., Bischoff, A., 2018. Effects of spontaneous field margin vegetation on the regulation of herbivores in two winter crops. *Basic and Applied Ecology*. 27: 71-82.
- Potts, G.R., 1991. The environmental and ecological importance of cereal fields. En Firbank, L.G., Carter, N., Darbyshire, J.F., Potts, G.R. (Eds), *The Ecology of Temperate Cereal Fields*. 32nd Symposium of The British Ecological Society. Blackwell-Science, Cambridge, Reino Unido, pp. 3-21.
- Potts, S.G., Biesmeije, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25(6): 345-353.
- Pough, F. H., Heiser, J. B., Mcfarland, W.N., 2003. *Vertebrate life*. 798 pp.
- Primost, J.E., Marino, D.J.G., Aparicio, V.C., Costa, J.L., Carrquiriborde, P., 2017. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution* 229: 771-779.
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., Lippe, C., 2009. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS ONE* 4:e7699. doi: 10.1371/journal.pone.0007699.
- R Development Core Team., 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reigart, J.R., Roberts, J.R., Morgan, D.P., 1999. *Recognition and Management of Pesticide Poisoning*. 5th Edn., EPA., Washington, 34-38 pp.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15(2): 618-627.
- Rennella, A. & Quirós, R., 2000. Relevamiento del uso de pesticidas agrícolas en la alta cuenca del río Salado (Provincia de Buenos Aires). Área de Sistemas de Producción Acuática, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

- RETAA, 2012. Relevamiento de Tecnología Agropecuaria Aplicada de la Bolsa de Cereal. www.bolcereales.com.ar/retaa
- RETAA, 2013. Relevamiento de Tecnología Agropecuaria Aplicada de la Bolsa de Cereal. www.bolcereales.com.ar/retaa
- Roelants, K., Gower, D.J., Wilkinson, M., Loader, S.P., Biju, S.D., Guillaume, K., Moriau, L. and Bossuyt, F., 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 887-892.
- Rohr, J.R., Schotthoefler, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Johnson, C.M., Johnson, L.B., Lieske, C., Piwoni, M.D., Schoff, P.K., Beasley, V.R., 2008. Agrochemicals increase trematode infection in a declining amphibian species. *Nature* 455: 1235-1239.
- Romeo, M. & Giamberini, L., 2013. History of biomarkers. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainboe, P.S. (Eds.), *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. (15–44 pp.) CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton London, New York.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment* 188: 458-470.
- Rousseau, L., Fonte, S., Téllez, O., Hock, R., Lavelle, P., 2013. Soil macrofauna as indicators of soil quality and land use impacts in smallholder agroecosystems of western Nicaragua. *Ecological Indicators* 27: 71-82.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M., Arnold, K.E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285(1885): 1-10.
- Safe, S., 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem? *Toxicology* 205 (1–2): 3-10.
- Saluso, A., De Carli, R., Zaccagnini, M.E., Bernardos, J., Decarre, J., Cáceres, C., 2006. Guía práctica para el control químico de artrópodos plaga en soja considerando el riesgo de toxicidad aguda para las aves. Ediciones INTA, 22 pp.
- Sanabria, E.A., Quiroga, L.B., Acosta, J.C., 2005. Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en un humedal del oeste de Argentina. *Revista Peruana de Biología* 12: 472- 477.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 33-340.
- Sasal, M.C., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Wilson, M.G., Michlig, N., Beldomenico, H.R., Repetti, M.R., 2015. Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 4444-4448.
- Satake, F., Ishikawa, M. M., Hisano, H., Padua, S.B., Tavares-Dias, M., 2009. Relação pesocomprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos do dourado *Salminus brasiliensis* cultivados em condições experimentais. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Ed 1. EMBRAPA, 22 pp.
- Satorre, E. H., 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy*. 15, 24–31.

- Schäfer, R.B., Van den Brink, P.J., Liess, M., 2011. Impacts of Pesticides on Freshwater Ecosystems. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* 111-137.
- Schäfer, R.B., von der Ohe, P.C., Rasmussen, J., Kefford, B.J., Beketov, M.A., Schulz, R., Liess, M., 2012. Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environmental Science & Technology* 46: 5134-5142.
- Schulte-Hostedde, A.I., Ziner, B., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86: 155-163.
- Scott, D.E., Casey, E.D., Donovan, M.F., Lynch, T.K., 2007. Amphibian lipid levels at metamorphosis correlate to post-metamorphic terrestrial survival. *Oecologia* 153: 521-532.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., 1992. Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. *Risk Analysis* 12(3): 353-360.
- Sibley, P.K. & Hanson, M.L., 2011. Ecological Impacts of Organic Chemicals on Freshwater Ecosystems. In F. Sanchez-Bayo, P. J. Van den Brink, & M. R. Mann (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* (138–164 pp.). EE. UU.: Bentham e Books.
- SIIA, 2015. MAPyG, Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería. Superficie sembrada de Soja, <http://www.sii.gov.ar>.
- SIIA, 2017. MAPyG, Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería. Superficie sembrada de Soja, <http://www.sii.gov.ar>.
- Sinko, G., Calid, M., Bosak, A., Kovarik, Z., 2007. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry* 370: 223-227.
- Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica del INTA. <http://siga2.inta.gov.ar>
- Slotkin, T.A., 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants; Nicotine environmental tobacco smoke, organophosphate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 132-137.
- Smalling, K.L., Reeves, R., Muths, E., Vandever, M., Battaglin, W.A., Hladik, M.L., Pierce, C.L., 2015. Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Science of the Total Environment* 502: 80-90.
- Smith, S. R. & Riddell-Black, D., 2007. Sources and impacts of past, current and future contamination of soil. Appendix 2: Organic contaminants. Final Report to DEFRA. See http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=SP0547_7266_FRA.pdf
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., Koh, L. P., Brook, B.W., Sekercioglu, C. H., Bradshaw, C. J. A., 2008. Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. *PLOS one* 3:e1636.
- Solé, M., Dias, I.R., Rodrigues, E. A. S., Marciano, E., Branco, S.M.J., Cavalcante, K.P., Rödder, D., 2009. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 2: 9-15.

- Soriano, A., León, R.J.C., Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., Cahuepé, M.A., Scaglia, O.A., Velazquez, C.A., Lemcoff, J.H., 1992. Río de la Plata grasslands. En: Coupland, R.T. (ed.): *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands*. 367-407 pp. Elsevier, New York.
- Sotherton, N.W., 1982. Effects of herbicides on the chrysomelid beetle *Gastrophysa polygoni* in laboratory and field. *Z. Angewandte Entomol.* 94: 446-451.
- Sotherton, N.W., 1998. Land use changes and the decline of farmland wildlife: an appraisal of the set-aside approach. *Biological Conservation* 83: 259-268.
- Southwood, T., 1978. *Ecological methods*. Second Edition, Chapman y Hall. England. 570 p
- Sparling, D.W. & Fellers, G.M., 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1696-1703.
- Sparling, W.D., Linder, G., Bishop, A.C., Krest, K.S., 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Technical Publications Series. (2nd ed.). Pensacola, FL.: CRC Press.
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.E., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *Aquatic Toxicology* 91(2): 110-117.
- Spence, J.R. & Niemelä, J.K., 1994. Sampling carabids assemblages with pitfall traps: the madness and the method. *Canadian Entomologist* 126: 881-894.
- Sterren, M.A., Uhrich, W., Benintende, S., 2016. Residualidad de glifosato en suelos de Entre Ríos y su efecto sobre los microorganismos del suelo. *Ecología Austral* 26: 246-255.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1785.
- Suarez, R.P., Brodeur, J.C., Bernardos, J.N., Zaccagnini, M.E., 2013. *Los Agroquímicos y el Ambiente*. Programa de Formación Integral en el Uso Responsable de los Fitosanitarios. Editores: V. Gómez Hermida y M.P. Bogliani. Ediciones INTA. 600 pp.
- Suarez, R.P., Zaccagnini, M.E., Kimberly, E.Z., Calamari, N.C., Natale, G.S., Cerezo, A., Codugnello, N., Boca, T., Damonte, M.J., Candiotti, J.V., Gavier-pizarro, G.I., 2016. Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina. *Landscape Ecology* 31(10): 2485-2505.
- Swanson, J.E., Muths, E., Pierce, C.L., Dinsmore, S.J., Vandever, M.W., Hladik, M.L., Smalling, K.L., 2018. Exploring the amphibian exposome in an agricultural landscape using telemetry and passive sampling. *Scientific Reports* 8: 1-10.
- Thompson, H.M., 1999. Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates. *Ecotoxicology* 8: 369-384.
- Tietze, F., 1969. Enzymatic method for the quantitative determination of nano- gram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502-522.
- Tilman, D., 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5995-6000.

- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R.A., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-676.
- Todd, B.D., Bergeron, C.M., Hepner, M.J., Hopkins, W.A., 2011. Aquatic and terrestrial stressors in amphibians: A test of the double jeopardy hypothesis based on maternally and trophically derived contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 2277-2284.
- Tran, C.P., Bode, R.W., Smith, A.J., Kleppel, G.S., 2010. Land-use proximity as a basis for assessing stream water quality in New York State (USA). *Ecological Indicators* 10: 727-733.
- Tsvey, A., Bulyuk, V.N., Kosarev, V., 2007. Influence of body condition and weather on departures of first-year European Robins, *Reithacus rubecula*, from an autumn migratory stopover site. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1665-1674.
- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86(1): 271-278.
- UICN. [/www.iucn.org/es/regiones/américa-del-sur/nuestro-trabajo/políticas-de-biodiversidad/lista-roja-de-uicn](http://www.iucn.org/es/regiones/américa-del-sur/nuestro-trabajo/políticas-de-biodiversidad/lista-roja-de-uicn)
- Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barraso, D., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, R., Ingaramo, M., 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131-159.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Van Gestel, C.A.M. & Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.
- VanMeter, R.J., Glinski, D.A., Hong, T., Cyterski, M., Henderson, W.M., Purucker, S.T., 2014. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. *Environmental Pollution* 193: 262-268.
- Velazquez, G. & Linares, S., 2009. el mosaico pampeano: geografía y bienestar según subregiones (1991-2001). *Breves Contribuciones del I.E.G. - N° 21 - Año 2009/10 - ISSN 2250-4176*.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., Kouba, A., 2018. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Science of The Total Environment* 643: 1456-1463.
- Velki, M. & Hackenberg, B.K., 2013. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* 90: 1216-1226.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero, D.E., Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich, D.E., Schroeder, T., Pechen, D.E., D'angelo, A.M., 2003. REVIEW Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*. 8 (3-4): 167-186.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89:166-173.

- Vogiatzis, A.K. & Lounbourdis, N.S., 1999. A study of glycogen, lactate, total fats, protein, and glucose concentration in the liver of the frog *Rana ridibunda*, after exposure to cadmium for 30 days. *Environmental Pollution* 104: 335-340.
- Vonesh, J.R. & Buck, J.C., 2007. Pesticide alters oviposition site selection in gray treefrogs. *Oecologia* 154: 219-226.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2004. *Principles of Ecotoxicology*, 2nd editio. ed. Taylor & Francis.
- Walker, C.H., 2014. *Ecotoxicology: Effects of Pollutants on the Natural Environment*. Journal of Environment Quality (Vol. 30). EE. UU.CRC Press.
- Warton, D. I., Wright, I.J., Falster, D.S., Westoby, M., 2006. Bivariate line-fitting methods for allometry? *Biological Reviews* 81: 259-291.
- White R.G., 1992. Nutritional in Relation to Season, Lactation, and Growth of North Temperate Deer. En: Brown R.D. (eds) *The Biology of Deer*. Springer, New York, NY.
- Williams, M., Zalasiewicz, J., Haff, P.K., Schwägerl, C., Barnosky, A.D., Ellis, E.C., 2015. The Anthropocene biosphere. *Anthropocene Rev* 2: 196-219.
- Wilson, J.D., Morris, A.J., Arroyo, B.E., Clark, S.C., Bradbury, R.B., 1999. A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 75: 13-30.
- Winston, G.W. & Di Guilio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19: 137-161.
- Young, B.E., Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Boucher, T.M., 2004. Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. *Nature Serve*, Arlington, Virginia. USA 53 pp.
- Zelaya, M.J, Costa, J.L., Bedmar, F., Aparicio, V.; Gianelli, V. Okada, E., Kloosterman, M.E., Gómez Ortiz, A.M., 2010. Análisis de Glifosato y AMPA en Balcarce: Cromatografía Líquida y Espectrometría de masas. En: *Toxicidad Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato*. Editorial INTA.