

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
POSGRADO EN ECOTOXICOLOGÍA TROPICAL**

**EFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS CLOROTALONIL Y  $\beta$ -ENDOSULFAN EN  
RENACUAJOS DE *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii*  
(ANURA: HYLIDAE)**

**SUSTENTANTE  
MICHAEL ANTONIO MÉNDEZ RIVERA**

**CAMPUS OMAR DENGO**

**HEREDIA, COSTA RICA**

**2017**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado en  
Ecotoxicología Tropical, para optar al grado de Magíster Scientiae en Ecotoxicología  
Tropical con énfasis en Vida Silvestre.**

**EFFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS CLOROTALONIL Y  $\beta$ -ENDOSULFAN EN  
RENACUAJOS DE *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii*  
(ANURA: HYLIDAE)**

**Sustentante**

**Michael Antonio Méndez Rivera**

**Tesis presentada para optar al grado de Magíster Scientiae en Ecotoxicología Tropical  
con énfasis en Vida Silvestre. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de  
Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.**

## Miembros del Tribunal Examinador

---

Ph.D. Luis Alfredo Miranda Calderón  
Representante del Consejo Central de Posgrado

---

M.Sc. Freylan Mena Torres  
Representante Maestría Ecotoxicología  
Tropical

---

M.Sc. Margaret Pinnock Branford  
Tutora

---

Ph.D. Marco Barquero Arroyo  
Asesor

---

Ph.D. Manuel Spinola Parallada  
Asesor

---

Michael Antonio Méndez Rivera  
Sustentante

## IV. Resumen

Los anfibios son considerados un grupo clave dentro de los ecosistemas, ya que forman parte de las cadenas tróficas terrestres y acuáticas. Además, representan una considerable cantidad de biomasa en sus hábitats y tienen una amplia diversidad de especies y de hábitos. Sin embargo, los anfibios han sufrido disminuciones globales en sus poblaciones, inclusive en sitios prístinos y protegidos. En la actualidad se considera que este declive se debe a múltiples causas, entre ellas está la pérdida de hábitat, las enfermedades infecciosas emergentes, el calentamiento global, la exposición a la radiación ultravioleta, las especies exóticas y la contaminación ambiental. Con respecto a esta última causalidad, la información en Costa Rica es escasa, lo cual es preocupante, debido a que en el país se importan y utilizan altas cantidades de plaguicidas y sus prácticas agrícolas son en su mayoría dependientes de estas sustancias. La aplicación de plaguicidas ha propiciado que algunos de ellos hayan sido detectados en muestras recolectadas en áreas silvestres protegidas, donde ocurrieron eventos de declive de anfibios. Tal es el caso del clorotalonil, un fungicida utilizado en cultivos de banano, melón y vegetales y el  $\beta$ -endosulfan, un insecticida organoclorado persistente con efectos neurotóxicos y que fue restringido al cultivo de café. El objetivo general de este trabajo fue evaluar los efectos agudos y crónicos en renacuajos de *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii* expuestos al clorotalonil y en *I. pseudopuma* expuestos al  $\beta$ -endosulfan, en condiciones de laboratorio, además, medir los biomarcadores de colinesterasa en músculo y glutatión S-transferasa y peroxidación de lípidos en hígado. Se realizaron ensayos agudos de 96 horas para conocer la toxicidad y ensayos crónicos con concentraciones subletales. La concentración letal media del clorotalonil para *A. callidryas* fue 26.6  $\mu\text{g/L}$ , para *I.*

*pseudopuma* fue 25.5 µg/L y para *S. baudinii* 32.3 µg/L. En el caso del β-endosulfan la CL50 para *I. pseudopuma* fue 123.6 µg/L. Entre los efectos subletales encontrados, el clorotalonil aceleró el desarrollo en *S. baudinii* y el β-endosulfan redujo el crecimiento y retrasó el desarrollo en *I. pseudopuma*. Además, con la exposición al clorotalonil se observó un incremento de la actividad GST en *S. baudinii* con respecto al control y en el caso de ChE y LPO no se observaron efectos. Esta investigación determinó que ambos plaguicidas provocan efectos mortales, aceleración o reducción en el crecimiento y en el desarrollo y un estrés fisiológico en las especies de estudio, lo cual podría suceder en condiciones naturales y afectar a las poblaciones. Por tal motivo, la información generada es relevante y representa una evidencia de los efectos de la contaminación y los impactos en las especies de anfibios locales.

## Abstract

Amphibians are considered a key group within ecosystems, as they form part of terrestrial and aquatic food chains. In addition, they represent a considerable amount of biomass in their habitats and have a wide diversity of species and habits. However, amphibians have suffered global declines in their populations, including pristine and protected sites. This decline is now thought to be due to multiple causes, including habitat loss, emerging infectious diseases, global warming, exposure to ultraviolet radiation, exotic species and environmental pollution. With regard to this latter causation, information in Costa Rica is scarce, which is worrying, because the country imports and use high amounts of pesticides and its agricultural practices are mostly dependent on these substances. Some of the pesticides were detected in samples collected in wild protected areas, where amphibian decline events occurred. Such is the case of chlorothalonil, a fungicide used in banana, melon and vegetable crops and  $\beta$ -endosulfan, a persistent organochlorine insecticide with neurotoxic effects and restricted to coffee crop. The general objective of this work was to evaluate the acute and chronic effects on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles exposed to chlorothalonil and  $\beta$ -endosulfan in laboratory conditions, in addition to measuring cholinesterase biomarkers in muscle and glutathione S-transferase and peroxidation of Lipids in liver. Acute 96-hour trials were conducted to assess toxicity and chronic trials with sublethal concentrations. The mean lethal concentration of chlorothalonil for *A. callidryas* was 26.6  $\mu\text{g/L}$ , for *I. pseudopuma* was 25.5  $\mu\text{g/L}$  and for *S. baudinii* 32.3  $\mu\text{g/L}$ . In the case of  $\beta$ -endosulfan the LC50 for *I. pseudopuma* was 123.6  $\mu\text{g/L}$ . Among the sublethal effects found, chlorothalonil accelerated the development in *S. baudinii* and the  $\beta$ -endosulfan reduced the growth and delayed the development in *I. pseudopuma*. In addition, with exposure to chlorothalonil an increase in GST activity was observed in *S. baudinii* respect to the control. This research determined that both pesticides cause deadly effects, acceleration or reduction in growth and development and physiological stress in the species of study, which could happen in natural conditions and affect populations. For this reason, the information generated is relevant and represents evidence of the effects of contamination and impacts on local amphibian species.

## **V. Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi madre por todo el amor y apoyo que me ha dado a lo largo de mi vida. Porque me apoya en cada paso que doy hacia el alcance de mis metas.

Agradezco a mi familia, los cuáles nunca han dejado de mostrarse orgullosos de mí y me impulsan a seguir adelante. También a mis amigos y amigas cercanas, por todo el apoyo y buenos consejos.

Un agradecimiento a mi grupo asesor: Margaret Pinnock, Marco Barquero y Manuel Spinola, por todos sus consejos, aportes y recomendaciones durante el proceso de tesis y la elaboración de este documento. Asimismo a Elba de la Cruz, Freylan Mena y a Clemens Ruepert, académicos que amablemente también colaboraron en este proceso.

También quiero agradecer a los laboratorios del IRET: ECOTOX por las instalaciones para el desarrollo de los ensayos y el LAREP por la cuantificación de las muestras con plaguicidas. A la maestría EcoTrop por darme la oportunidad de estudiar en este posgrado.

Al proyecto FEES: La complejidad de las declinaciones poblacionales de anfibios: un enfoque multidisciplinario en búsqueda de una respuesta.

Al Sistema Nacional de Áreas de Conservación.

## VI. Índice

IV. Resumen	ii
<i>Abstract</i>	iv
V. Agradecimientos	v
VI. Índice	vi
VII. Lista de cuadros	vii
VIII. Lista de figuras	viii
IX. Lista de abreviaturas	x
X. Descriptores	xii
XI. Introducción general	1
XII. Conclusiones generales	4
XIII. Recomendaciones	6
XIV. Referencias generales	8
XV. Artículo I: Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on <i>Agalychnis callidryas</i> , <i>Isthmohyla pseudopuma</i> and <i>Smilisca</i> <i>baudinii</i> tadpoles	11
XVI. Artículo II: Efectos letales, subletales y medición de biomarcadores en renacuajos de <i>Isthmohyla pseudopuma</i> (Anura: Hylidae) expuestos al insecticida $\beta$ -endosulfan	41
Anexo 1: Concentraciones reales de los tratamientos con el insecticida $\beta$ -endosulfan	70
Anexo 2: Guía de autores de la Revista Biología Tropical	72
Anexo 3 Guía de autores de Environmental Science and Pollution Research	74



## VII. Lista de cuadros

### Artículo I

**Table 1.1** Chlorothalonil's ranges of concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) used in definite acute and chronic tests with tadpoles.....18

**Table 1.2** Acute 96-hour toxicity (median lethal concentration values [ $\text{LC}_{50}$ ] with 95% confidence intervals) in  $\mu\text{g/L}$  of chlorothalonil to tadpoles of three amphibian species.....22

**Table 1.3** Candidate set of linear models for the biomarkers GST, LPO and ChE of three Costa Rican anuran native species, with their respective Treatment and null model. Number of parameters ( $K$ ), Akaike's Information Criterion values (AICc), difference in AICc regard to best model ( $\Delta\text{AICc}$ ) and AICc weights ( $w$ ).....27

### Artículo II

**Cuadro 2.1** Modelos lineales candidatos para los biomarcadores GST, LPO y ChE medidos en *Isthmohyla pseudopuma*. Con su respectivo modelo nulo y modelo tratamiento, número de parámetros ( $K$ ), valores del Criterio de Información de Akaike (AICc), diferencia en AICc respecto al mejor modelo ( $\Delta\text{AICc}$ ) y pesos de AICc ( $w$ ).....55

## VIII. Lista de figuras

### Artículo I

**Figure 1.1** Mortality in tadpoles of three frog species, 96 h after exposure to a range of concentrations of chlorothalonil.....23

**Figure 1.2** Exposed viscera in tadpoles of *S. baudinii* (a) and *A. callidryas* (b) which died during first 24 h of exposure to lethal concentrations of chlorothalonil.....24

**Figure 1.3** Model estimates and 95 % CI for total length, body weight and development of *I. pseudopuma* and *S. baudinii* tadpoles exposed to sublethal concentrations of chlorothalonil. Confidence intervals below or above zero denote a difference with regard to control. SC = solvent control.....25

**Figure 1.4** Lesions on *S. baudinii* (a) and *I. pseudopuma* (b) tadpoles tails during chronic exposure to chlorothalonil.....26

**Figure 1.5** Biomarkers measured in tadpoles exposed to sub-lethal concentrations of chlorothalonil: muscle ChE activity (a–c), liver GST activity (d–f) and liver LPO (g–i). Bars represent mean  $\pm$  95 % CI of the biomarker measured for each treatment. Differences among treatments in an experiment are indicated with lowercase letters. C = negative control, SC = solvent control.....28

### Artículo II

**Figura 2.1** Mortalidad en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* a las 96 h de exposición a  $\beta$ -endosulfan.....52

**Figura 2.2** Estimaciones de la longitud total (A), el peso total (B) y el estadio de desarrollo (C) en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* expuestos a cuatro concentraciones

subletales de  $\beta$ -endosulfan. Los valores ( $\pm$  95% IC) que no contemplan el cero representan un efecto debido a la concentración del plaguicida con respecto al control negativo. CS= control solvente.....54

**Figura 2.3** Actividad de la GST (A) y nivel de LPO (B) en hígados y actividad de ChE (C) en colas de renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* expuestos a concentraciones subletales de  $\beta$ -endosulfan. Las barras representan las medias  $\pm$  95% IC para cada tratamiento. C= control negativo, CS= control solvente.....56

## IX. Lista de abreviaturas

AICc (por sus siglas en inglés)	Criterio de Información de Akaike ajustado para muestras de tamaños pequeños
<i>Bd</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Cb	Carbamatos
CDNB	1-cloro-2, 4-dinitrobenceno
ChE (por sus siglas en inglés)	Colinesterasa
CL50 (LC50 en inglés)	Concentración Letal Media
CN	Control Negativo
COP's	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CS (SC en inglés)	Control Solvente
DTPA (por sus siglas en inglés)	Ácido dietileno triamino pentaacético
ECOTOX	Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos
EPA	Environmental Protection Agency
GC-MS (por sus siglas en inglés)	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
GSH (por sus siglas en inglés)	Glutación Reducido
GST	Glutación S-transferasa
has	Hectáreas
IC (CI en inglés)	Intervalos de confianza
IRET	Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas
LAREP	Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas
LMMs (por sus siglas en inglés)	Modelos Lineales de Efectos Mixtos
LPO (por sus siglas en inglés)	Peroxidación de Lípidos
MDA	Malonaldehído
Of	Organofosforados
PAH's (por sus siglas en inglés)	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
SINAC	Sistema Nacional de Áreas de Conservación
TBARS (por sus siglas en inglés)	Especies Reactivas Tiobarbitúricas

UICN (IUCN en inglés)

Unión Internacional para la Conservación de la  
Naturaleza

UNA

Universidad Nacional de Costa Rica

UV

Ultravioleta

## **X. Descriptores**

*Agalychnis callidryas*

*Isthmohyla pseudopuma*

*Smilisca baudinii*

clorotalonil

β-endosulfan

## **XI. Introducción general**

La declinación de las poblaciones de anfibios ha trascendido como un fenómeno global. Las primeras evidencias de una posible disminución en diferentes regiones del planeta se presentaron desde la década de 1980 (Barinaga 1990), con casos como la disminución del emblemático sapo dorado (*Incilius periglenes*) de Monteverde, Costa Rica (Pounds y Crump 1994) y de anfibios neotropicales del género *Atelopus* (La Marca et al. 2005). La preocupación se acentuó ya que algunos eventos ocurrieron en sitios considerados prístinos y donde no había pérdida de hábitat por causas humanas (Pounds y Crump 1994; Pounds et al. 1997; Lips 1998; Young et al. 2001; La Marca et al. 2005).

Ante esta situación se determinó, con datos de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), que el 32.5% (1856) de las especies de anfibios del mundo se encuentran amenazadas (Stuart et al. 2004). En el caso de Latinoamérica se reportaron 53 casos de pérdida de anfibios de sus hábitats naturales (Young et al. 2001). Para la mayoría de estas especies se conocía muy poco sobre sus hábitos. Por su parte, en Costa Rica el 32% de las especies disminuyeron sus poblaciones, tres de las cuales se declararon extintas y las endémicas se consideraron en riesgo (Bolaños 2009). La declinación de anfibios significa una pérdida de especies clave dentro de los ecosistemas, ya que forman parte de las cadenas alimenticias terrestres y acuáticas y por su amplia diversidad contribuyen a la riqueza de los ecosistemas en los que se encuentran (Sparling et al. 2003).

La declinación de anfibios se considera un fenómeno de múltiples causas. Sin embargo, la pérdida del hábitat provocada por el ser humano aparece como la causa más relevante, al modificar o eliminar las características naturales de los hábitats de los anfibios, por la tala y alteración de la vegetación o el drenaje de los humedales (Blaustein y Kiesecker 2002). Muchas disminuciones de poblaciones, no obstante, han ocurrido en sitios prístinos donde la pérdida de hábitat no es una explicación (La Marca et al. 2005), por lo que tales disminuciones se han asociado al cambio climático (Pounds et al. 2006), a agentes patógenos que pueden provocar mortalidad y defectos físicos en los individuos (ejemplo: *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Ranavirus* spp.) (Blaustein y Kiesecker 2002), a la

radiación ultravioleta y a la afectación por especies exóticas, entre otras (Alford y Richards 1999; Kiesecker et al. 2001; Blaustein y Kiesecker 2002).

La contaminación ambiental también representa una fuerte amenaza para las poblaciones de anfibios (Alford y Richards 1999; Hayes et al. 2006; Lehman y Williams 2010). En Costa Rica, cuando se reportaron las primeras disminuciones, los científicos plantearon que la contaminación pudo actuar directamente causando mortalidad o susceptibilidad a enfermedades (Lips 1999) o sinérgicamente con otras variables como condiciones climáticas (Pounds y Crump 1994; Lips 1998). Por medio de información generada en otras regiones, en la actualidad se conoce que las variedades de plaguicidas utilizados en la agricultura tienen efectos mortales en estos animales (Egea-Serrano et al. 2012), así como también provocan deficiencias en el crecimiento, el peso y el desarrollo. Además, los plaguicidas aumentan la susceptibilidad a enfermedades y generan alteraciones fisiológicas y bioquímicas (Burkhart et al. 2003; Mann et al. 2009; Ezemonye y Tongo 2010). Una situación que se agrava por la amplia variedad de plaguicidas utilizados en las actividades agrícolas.

Según Bravo et al. (2015), Costa Rica importa y utiliza plaguicidas que son tóxicos para los seres vivos, fundamentados en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos. Basados en datos al 2012, el país importaba plaguicidas clasificados por la OMS como extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, fumigantes no clasificables y moderadamente peligrosos (estos últimos se importaban en mayores cantidades). También, de acuerdo a la EPA, se importaron plaguicidas con peligro de provocar cáncer (Bravo et al. 2015). Asimismo, más de 3000 toneladas de ingrediente activo de estas importaciones correspondían a plaguicidas que producen efectos mortales y crónicos para peces, crustáceos y algas (de la Cruz et al. 2015). A pesar de estos datos, la información actual con respecto a daños en las especies locales es escasa, por lo que es necesario determinar los efectos en la vida silvestre generados por la utilización de plaguicidas en el país. Debido a la capacidad de dispersión de los plaguicidas, ya sea en el agua, el suelo o el aire, es probable que estos entren en contacto con organismos que no son el blanco de su acción.

En el caso de los anfibios, la exposición a contaminantes puede darse durante alguna etapa del ciclo de vida, ya sea como embriones, larvas o adultos, característica por la



cual se les considera buenos indicadores de contaminación. Durante su metamorfosis, estos vertebrados cambian de una larva acuática a un adulto terrestre generalmente, aunque existen especies con desarrollo directo (es decir, sin una fase larval) y otras cuyos adultos mantienen hábitos acuáticos. En el caso de las larvas, los plaguicidas entran en contacto con el individuo a través de su tegumento permeable y vascularizado o mediante la ingesta y como consecuencia pueden haber daños morfológicos, fisiológicos, alteración de la homeostasis y en la duración normal de la metamorfosis, entre otras (Rowe et al 2003). En Costa Rica han sido registrados plaguicidas en muestras de agua y suelo de sitios protegidos (Daly et al. 2007; Shunthirasingham et al. 2011), estos lugares corresponden a hábitats naturales de anfibios, razón por la cuál se quiso determinar los efectos que se manifiestan por la exposición a estos contaminantes.

Este trabajo presenta, mediante la modalidad de dos artículos científicos, la evaluación de los efectos en anuros de dos plaguicidas utilizados en el país. El primer artículo describe la evaluación de los efectos del clorotalonil en renacuajos de tres especies nativas, las cuáles son *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii*. El segundo artículo describe los efectos del  $\beta$ -endosulfan en renacuajos de *I. pseudopuma*. Ambos trabajos se hicieron bajo la hipótesis de que la exposición a ambos contaminantes por 96 horas resulta en una alta toxicidad para los renacuajos de las tres especies con clorotalonil y de *I. pseudopuma* con  $\beta$ -endosulfan. Además, la exposición prolongada durante la etapa larval a concentraciones subletales resultaría en afectaciones en la longitud, el peso y el desarrollo de los individuos. También se buscó comprobar una alteración en los niveles de la actividad de las enzimas colinesterasa (ChE) y glutatión S-transferasa (GST), así como el nivel de peroxidación de lípidos (LPO), los cuales son biomarcadores de contaminación y por ende indicadores tempranos al ser inhibidos o inducidos por el plaguicida (Linder et al. 2010).

Por estas razones, la investigación tuvo como objetivo principal evaluar los efectos letales, subletales y bioquímicos en renacuajos de *A. callidryas*, *I. pseudopuma* y *S. baudinii* expuestos al clorotalonil y de *I. pseudopuma* expuestos al  $\beta$ -endosulfan, en condiciones de laboratorio, para determinar las afectaciones a las poblaciones de anuros locales.

## XII. Conclusiones generales

Este trabajo examinó los efectos sobre renacuajos de *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii* al exponerse al clorotalonil y al  $\beta$ -endosulfan. Según la literatura, ambos plaguicidas fueron encontrados en muestras ambientales de sitios protegidos y conservados, en donde además ocurrieron declinaciones de poblaciones de anfibios. Como principales resultados de esta investigación se determinó que el clorotalonil es irritante para *A. callidryas* y *S. baudinii* y tóxico a bajas concentraciones para las tres especies; además, provocó aceleración del desarrollo y aumentó la actividad de GST en *S. baudinii*. Por su parte, el  $\beta$ -endosulfan provocó un menor crecimiento y lentitud en el desarrollo de los renacuajos de *I. pseudopuma*. En el caso de *I. pseudopuma* y *S. baudinii*, al exponer los renacuajos durante un periodo prolongado se observó que los efectos se manifestaron durante todo el tiempo evaluado de la metamorfosis.

En el caso de las enzimas, solamente con la especie *S. baudinii* se obtuvo un efecto en la actividad de la GST, a pesar de que el modo de acción del clorotalonil está relacionado con las enzimas del glutatión. Además, no hubo señal de daños por estrés oxidativo reflejado en los niveles de LPO. Por otra parte, se determinó que los dos plaguicidas no están relacionados con el mecanismo de inhibición de la ChE, aunque para estos mismos compuestos sí se ha obtenido un cambio en la actividad de la enzima con peces según la literatura. A pesar del resultado se resalta la importancia de generar líneas bases de las actividades de ChE para anfibios, ya que son datos poco conocidos.

Con estos hallazgos se determinó que las tres especies locales de anuros sí son susceptibles a la contaminación con plaguicidas, mediante las vías aquí evidenciadas. Si los individuos en sus hábitats están en continuo contacto con los plaguicidas, ya sea por pulsos o por periodos prolongados, es probable que se limite su sobrevivencia si se acercan a las concentraciones letales aquí obtenidas o que se afecte su éxito reproductivo, su fecundidad, su respuesta a estímulos, entre otros, si se exponen a concentraciones subletales. Estos efectos podrían repercutir en las poblaciones de las especies, sobre todo si se aumentan las cantidades y variedades de los plaguicidas utilizados en las prácticas agrícolas.

Por lo tanto, realizar estos estudios ecotoxicológicos nos permite reconocer cómo se afectan los individuos y posiblemente las poblaciones de anuros ante plaguicidas utilizados

en el país, lo que representa información base para continuar las investigaciones y tomar medidas en beneficio de la conservación de estos grupos.

### **XIII. Recomendaciones**

A partir de la información generada con este trabajo, se recomienda continuar los ensayos, ya sea con los mismos o utilizando diferentes plaguicidas. Justificado lo anterior en el uso intensivo de una amplia variedad de biocidas en el territorio costarricense, por lo que es necesario continuar aportando evidencia de los efectos en la biota.

Se recomienda considerar los datos de toxicidad generados con este estudio para los análisis de permisos y utilización de plaguicidas. Lo anterior ya que la información de los efectos es más precisa para el país y se evita extrapolar los resultados con otras especies utilizadas en pruebas ecotoxicológicas que no son parte de la biodiversidad local.

Por la relevancia de estos datos es necesario la divulgación de este trabajo a la sociedad en general, esto alertará a las instituciones y personas que trabajan con estas y otras sustancias sobre la importancia de la protección, regulación en el uso y conocimiento de los biocidas con los que tienen contacto. Para esto se puede generar una publicación en calidad de nota informativa, la cual tenga un mayor alcance informativo posiblemente y también mediante la entrega de una copia del trabajo a las entidades gubernamentales MINAET, SINAC y el MAG. El proceso de divulgación incluso puede tomar como una meta llegar a escuelas y colegios y empezar desde edades tempranas la educación sobre la importancia de los anfibios y las consecuencias de la contaminación ambiental.

Debido a la consecuencia ecológica que tiene la pérdida de anfibios en el ecosistema, es necesario para los tomadores de decisiones analizar y regular el uso del clorotalonil en el país, así como maximizar esfuerzos para corroborar la erradicación del uso del  $\beta$ -endosulfan. En el caso del clorotalonil, se clasifica como un Plaguicida Altamente Peligroso (PAP), tanto por su toxicidad aguda como crónica, por lo que las recomendaciones de una revaloración de su utilización son en torno a la protección de todos los organismos que forman parte de los ecosistemas locales. El país puede ir cambiando de una agricultura altamente dependiente de plaguicidas, sobre todo de aquellos considerados PAPs, hacia alternativas como control biológico y prácticas más agroecológicas que generen menos impactos ambientales.

Por otra parte, este estudio detectó efectos en el desarrollo de los individuos expuestos a los dos plaguicidas. Por lo tanto, es recomendable profundizar en la evaluación

de las causas de tales respuestas. Para esto es necesario estudiar la posible disrupción del mecanismo por el que funciona la hormona tiroidea durante la metamorfosis y si es afectado por los contaminantes.

Al continuar la investigación se puede implementar la misma metodología o realizar cambios a los ensayos de laboratorio. Por otra parte, aunque se tienen antecedentes con los estudios de Johnson et al. (2013) y Ghose et al. (2014), se debe probar con formulados o incluso mezclas de plaguicidas y analizar los posibles efectos en los renacuajos.

Otro aspecto importante es conocer los posibles efectos en etapas posteriores a las que se estudiaron, tal es el caso de los posmetamorfos, los juveniles y los adultos, esto puede hacerse con individuos expuestos desde larvas o durante dichas etapas. Para el estudio de los biomarcadores, se podría ampliar el tiempo de exposición de *A. callidryas* y de *I. pseudopuma* a más de 96 h e investigar qué otros órganos o tejidos se pueden analizar. También, se pueden evaluar los biomarcadores con productos formulados de ambos u otros plaguicidas.

Se sugiere investigar posibles efectos para otras especies nativas del país. Se pueden establecer ensayos con alguna especie de anfibio cuya población declinó y que muestre estabilidad o recuperación en sus poblaciones. De igual manera, es importante indagar los efectos con aquellas especies que tienen una distribución más cercana a los sitios de aplicación.

También se recomienda implementar pruebas o evaluaciones *in situ* para conocer los efectos en los anfibios directamente en los hábitats naturales, lo cual se debe complementar con toma de muestras ambientales que evidencien e identifiquen la presencia de plaguicidas.

#### **XIV. Referencias generales**

- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:133-165
- Barinaga M (1990) Where have all the froggies gone? *Science* 247:1033-1034
- Blaustein AR, Kiesecker JM (2002) Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5:597-608
- Bolaños F (2009) Situación de los anfibios de Costa Rica. *Biocenosis* 22(1-2):95-108
- Bravo V, de la Cruz E, Berrocal S, Ramírez F (2015) Importación de plaguicidas: peligros agudos en salud y efectos cancerígenos. Observatorio Ambiental, UNA <http://www.observatorioambiental.una.ac.cr/index.php/indicadores-ambientales/84-plaguicidasysalud>. Accesado el 15 de mayo del 2017
- Burkhart JG, Bidwell JR, Fort DJ, Sheffield SR (2003) Chemical stressors. En: Linder G, Krest SK, Sparling DW (eds) *Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects*. SETAC Press. Pensacola, Florida, USA. 111-128 pp
- de la Cruz E, Bravo V, Ramírez, F (2015) Importación de plaguicidas por peligros agudos y crónicos en peces, micro crustáceos y algas. Observatorio Ambiental, UNA <http://www.observatorioambiental.una.ac.cr/index.php/indicadores-ambientales/97-cantidad-importada-de-plaguicidas-como-herramienta-para-el-monitoreo-de-peligros-agudos-y-cronicos-en-peces-micro-crustaceos-y-algas-en-costa-rica>. Accesado el 15 de mayo de 2017
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M (2012) Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2(7):1382-1397
- Ezemonye L, Tongo I (2010) Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere* 81:214-217
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haefele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114(1):40–50

- Kiesecker JM, Blaustein AR, Belden LK (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681-684
- La Marca E, Lips KR, Otters SL, Puschendorf R, Ibañez R, Rueda-Almonacid JV, Schulte R, Marty C, Castro F, Manzanilla-Puppo J, García-Pérez JE, Bolaños F, Chaves G, Pounds JA, Toral E, Young BE (2005) Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *BIOTROPICA* 37(2):190-201
- Lehman CM, Williams BK (2010) Effects of current-use pesticides on amphibians. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK. (eds) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 167-202 pp
- Linder G, Palmer BD, Little EE, Rowe CL, Henry PFP (2010) Physiological ecology of amphibians and reptiles: natural history and life history attributes framing chemical exposure in the field. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK. (eds) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 139-142 pp
- Lips KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12(1):106-117
- Lips KR (1999) Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology* 13(1):117-125
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157:2903-2927
- Pounds JA, Crump ML (1994) Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8(1):72-85
- Pounds JA, Fogden MPL, Savage JM, Gorman GC (1997) Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology* 11(6):1307-1322
- Pounds JA, Bustamante MR, Colome LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439:161-167

- Rowe CL, Hopkins WA, Bridges CM (2003) Physiological ecology of amphibians in relation to susceptibility to natural and anthropogenic factors. En: Linder G, Krest SK, Sparling DW (eds) Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects. SETAC Press. Pensacola, Florida, USA. 19-36 pp
- Sparling DW, Krest SK, Linder G (2003) Multiple stressors and declining amphibian populations: an integrated analysis of cause-effect to support adaptive resource management. En: Linder G, Krest SK, Sparling DW (eds) Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects. SETAC Press. Pensacola, Florida, USA. 1-8 pp
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783-1786
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibáñez R, Salas AW, Cedeño JR, Coloma LA, Ron S, La Marca E, Meyer JR, Muñoz A, Bolaños F, Chaves G, Romo D (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15(5):1213-1223



**XV. Artículo I: Efectos agudos, crónicos y bioquímicos del clorotalonil en renacuajos de *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* y *Smilisca baudinii***

**Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles**

**Autores del artículo: Michael Méndez Rivera, Priscilla Obando, Margaret Pinnock-Branford, Clemens Ruepert, Luisa E. Castillo, Freylan Mena & Gilbert Alvarado**

**Artículo publicado en Environmental Science and Pollution Research  
(2016) 23:21238–21248  
(DOI 10.1007/s11356-016-7301-1)**

## **Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles**

Michael Antonio Méndez Rivera

Maestría Académica en Ecotoxicología Tropical. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional de Costa Rica

**Abstract** Declines of amphibian populations have been a worldwide issue of concern for the scientific community during the last several decades. Efforts are being carried out to elucidate factors related to this phenomenon. Among these factors, pathogens, climate change, and environmental pollution have been suggested as possible causes. Regarding environmental pollutants, some pesticides are persistent in the environment and capable of being transported long distances from their release point. In Costa Rica, some pesticides have been detected in protected areas, at locations where amphibian populations have declined. Information about toxicity of pesticides used in Costa Rican agriculture to amphibians is still scarce, particularly for native species.

Toxicity tests with chlorothalonil, a fungicide intensively used in Costa Rica, were carried out exposing tadpoles of three Costa Rican native species: *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma*, and *Smilisca baudinii* in order to evaluate acute and chronic toxicity as well as the biomarkers cholinesterase activity (ChE), glutathione-S transferase activity (GST), and lipid peroxidation (LPO).

96-h LC50: 26.6 (18.9–35.8) µg/L to *A. callidryas*, 25.5 (21.3–29.7) µg/L to *I. pseudopuma* and 32.3 (26.3–39.7) µg/L to *S. baudinii* were determined for chlorothalonil. These three species of anurans are among the most sensitive to chlorothalonil according to the literature. Besides, GST was induced in *S. baudinii* after exposure to sub-lethal concentrations of chlorothalonil while evisceration occurred in *S. baudinii* and *A. callidryas* tadpoles exposed to lethal concentrations of the fungicide. Chronic exposure to sub-lethal concentrations accelerated development in *S. baudinii* and caused lesions in tail of *S.*

*baudinii* and *I. pseudopuma* tadpoles. Our results demonstrate that chlorothalonil is highly toxic to native amphibian species and that low concentrations can cause biochemical responses related to phase II of biotransformation and effects on development.

**Keywords** Pesticides, Amphibians, Toxicity, Chlorothalonil

## Introduction

Declines of amphibian populations have been a worldwide issue of concern for the scientific community during the last several decades (Pounds and Crump 1994; Alford and Richards 1999; Lips et al. 2005; Mendelson et al. 2006; Whitfield et al. 2007; Blaustein et al. 2011). Several factors have been suggested as possible causes for these population declines; among them pathogens, specifically the infection caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Berger et al. 1998; Lips et al. 2006; Gillespie et al. 2015), climate change (Pounds 2001; Li et al. 2013), habitat loss and fragmentation (Becker et al. 2008), invasive species (Adams 1999; Kats and Ferrer 2003), environmental pollution (Sparling et al. 2001) and the interaction of these factors (Collins and Storfer 2003; Rohr and Palmer 2013).

Costa Rica, with only 51,100 km<sup>2</sup> of terrestrial and 568,000 km<sup>2</sup> marine territories, is among the 20 most biodiverse countries in the world, almost 100 thousand species have been described for the country and it represents 4.75 % of world's biodiversity (SINAC 2009). As of 2009, 192 amphibian species have been described in Costa Rica, making this among the top 13 most species-rich countries for amphibians (Bolaños 2009). Of those amphibian species described, 63 (33 %) are considered from vulnerable to extinct (2) according to IUCN red list. One of the extinct species is the emblematic golden toad (*Incilius periglenes*) which was endemic in Monteverde's cloud forest, Costa Rica (IUCN 2015).

Despite of the rich biodiversity, Costa Rican ecosystems face threats caused by human activities like other regions. Regarding amphibian populations, these pressures include global climate change, habitat loss due to land use conversion to productive or urbanistic activities, pollution, invasive species and diseases (Lips et al. 2005; Whitfield et al. 2009). In a country where agriculture is the main economic activity, pesticides are one of the major risks regarding chemical pollution. Furthermore, the use of pesticides in local agriculture is high compared to developed and even other developing countries and some compounds forbidden in many other places are used here (de la Cruz et al. 2014).

Pesticides are considered among the environmental pollutants related to amphibian declines. Pesticides can cause organism mortalities but also, even at low environmental

concentrations they might have negative effects on amphibian's growth and development (Hayes et al. 2006). Besides, some of these compounds are persistent in the environment and capable of being transported long distances from their point of release. In Costa Rica, some pesticides used in agriculture have been detected in air and fog samples collected from protected areas, far from their site of use and at places where amphibian populations have declined (Daly et al. 2007; Shunthirasingham et al. 2011). Information about effects of pesticides and other environmental pollutants on neotropical amphibian species is scarce and necessary. Especially as atmospheric drift might transport pollutants from croplands to protected areas.

The risk posed by fungicides to amphibian populations should be considered as it is one of the most imported and used groups of pesticides in Costa Rica (de la Cruz et al. 2014). Specifically, chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) is applied in banana, melon, coffee, chayote and other fruit and vegetable crops, along the country (Bravo et al. 2013). Chlorothalonil is a multi-site contact fungicide which causes toxicity by complexing with sulphhydryl containing proteins, affecting glutathione reserves. Aside from fungi, this thiol-related mechanism has also been described in fish and aquatic invertebrates (Elskus 2012). Chlorothalonil's toxicity is considered high for amphibians, fish, and aquatic invertebrates (de la Cruz et al. 2014; Van Scoy and Tjeerdema 2014); acute effects are expected on fish and invertebrates with environmental concentrations above 5.25 and 1.8 µg/L respectively while chronic effects are expected above 3 and 0.6 µg/L respectively for those groups (Elskus 2012). Chlorothalonil's half-life in aquatic environments goes from 2 h to 8 days (Grabuski et al. 2004). In Costa Rica, concentrations as high as 11 µg/L have been documented in surface water samples (Castillo et al. 2000). Daly et al. (2007) reported presence of chlorothalonil in air and soil samples from different sites in Costa Rica, the higher concentrations measured were 17.3 ng/m<sup>3</sup> in air and 1.06 ng/g in soil, both in samples collected at the central area of the country.

Evaluation of the effects of this pollutant on amphibians is necessary in order to suggest and eventually establish protective limits to its use. For toxicity assays with amphibians, early life stages (embryo and larvae) are frequently used; several endpoints can be evaluated in these tests, among them, survival, growth, development, behavior, deformities and several biochemical biomarkers (Sparling et al. 2010). Information on

acute and chronic toxicity as well as early warning physiological responses can be obtained. Typically, ecotoxicological information for amphibians is obtained using a few surrogates, well known and laboratory “adapted” species. This might pose an inconvenience as life history and other important ecological traits vary greatly among amphibians and it might affect the way they are exposed to pollutants (Sparling et al. 2010). In this regard, evaluating the toxicity of chlorothalonil on tropical species would contribute to build up information regarding the effects of this relevant pesticide.

In this work, we aimed to undertake the evaluation of one of the factors suspected to interact in the complex causing amphibian population declines: the toxicity and other effects caused by environmental pollutants. Specifically, we evaluated effects caused by chlorothalonil, a fungicide used in Costa Rican agriculture, to tadpoles of three native anurans species.

## **Material and methods**

Toxicity of chlorothalonil was evaluated on tadpoles of three Costa Rican native species: *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma*, and *Smilisca baudinii*. The three species are listed as Least Concern by the IUCN (IUCN 2015). All the tests were carried out at the Laboratory for Ecotoxicology Studies (ECOTOX) of the Central American Institute of Studies on Toxic Substances (IRET) at the Universidad Nacional (UNA) in Heredia.

### **Tadpole collection and maintenance**

All tadpoles were acclimatized to laboratory conditions during at least 1 week before any assay, they were fed ad libitum, three times per week with TetraVeggie spirulina-enhanced flakes (Tetra®) and water was 50 % renewed weekly. Collection of eggs or tadpoles of each species was carried out according to their reproductive habits.

### *A. callidryas*

Eight egg masses were collected from vegetation surrounding a pond located outside Tirimbina Rainforest Center in Sarapiquí. Egg masses were transported in plastic containers with water from the pond and at the ECOTOX laboratory they were placed in aquariums with a shallow amount of carbon filtered, UV treated tapwater (UV water). Leaves containing the eggs were held with adhesive tape to aquarium walls just above the water surface, until they hatched and the tadpoles fell into the water. All *A. callidryas* tests were started using tadpoles on stages 26–27 (Gosner 1960).

### *I. pseudopuma*

Four egg masses were collected from temporary or permanent natural ponds located in mountain area of San Rafael in Heredia. Organisms were transported in plastic container with site water to the laboratory where they were treated as described for *A. callidryas*. Toxicity tests were started with tadpoles on stages 25–27 (Gosner 1960).

### *S. baudinii*

Two hundred recently hatched tadpoles were collected from the Palo Verde wetland, at Palo Verde National Park in Guanacaste, transported to laboratory in water from the site and then transferred to clean UV treated tapwater. Toxicity tests using *S. baudinii* started with tadpoles on stages 28–34 (Gosner 1960).

### **Acute test**

Acute, static, 96-h toxicity tests were carried out to find chlorothalonil's LC50 for each species. A minimum of six pesticide concentrations were tested in every assay (Table 1.1), a negative (UV treated tapwater) and a solvent control (methanol added to UV water in a volume equal to the one added to the highest concentration of chlorothalonil stock in the corresponding assay) were also set for every test. Tadpoles were exposed individually in 1

L glass containers with 500 mL of exposure solution. For every treatment, nine replicates were set and tadpoles were randomly distributed among treatments and replicates. Animals were not fed during the assay and mortality was recorded every 24 h.

**Table 1.1** Chlorothalonil's ranges of concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) used in definite acute and chronic tests with tadpoles.

Test	<i>Agalychnis callidryas</i>	<i>Isthmohyla pseudopuma</i>	<i>Smilisca baudinii</i>
Acute	70	100	60
	35	50	40
	17.5	25	20
	8.75	12.5	10
	4.37	6.25	5
	2.2	3.12	2.5
Chronic	20	20	20
	15	15	10
	10	10	5
	5	5	
		2.5	

### Chronic test

Chronic effects (growth and development) were evaluated in tadpoles exposed to sub-lethal concentrations (Table 1.1) (defined according to the outcome of acute tests) of chlorothalonil in a semi-static assay. At least three concentrations of fungicide plus controls



were tested; with nine replicates per treatment and 500 mL of exposure solution. During the test, tadpoles were fed three times per week with approximately 15 mg of tetraVeggie/individual and once a week transferred into containers with freshly prepared solutions. Weight, total length, and developmental stage were registered weekly until tadpoles reached stage 42 or died (Gosner 1960).

For each experiment, exposure solutions were prepared by adding an aliquot of a stock solution to the exposure medium (UV water). Stock solution (1162 µg/mL) was prepared from 97.5 % pure chlorothalonil standard (Dr. Ehrenstorfer, Germany) dissolved in HPLC-grade, 99.97 % methanol (J.T. Baker) and kept at 4 °C. Aliquots were taken using a micro volume syringe (SGE Analytical science).

Concentration of chlorothalonil was evaluated at the beginning and at the end of acute and chronic tests: a 20 mL sample of each exposure solution was extracted (liquid/liquid extraction) with 98 % pure n-hexane (SupraSolv®) and resuspended in a final volume of 99.8 % pure isooctane (SupraSolv®). Determination of chlorothalonil in the extracts was performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and electron capture detection (GCECD). For determination, an external calibration curve of chlorothalonil was processed. Initial concentrations were confirmed with a regression to nominals of  $R^2 = 0.86$ ; no chlorothalonil was detected in samples collected at the end of assays, either acute (96-h) or chronic (7 days). For this reason, acute tests should be interpreted as static 96-h exposure with an initial pulse of the nominal concentrations and the chronic tests, the exposure to a weekly pulse of the fungicide during the time the assay lasted. A 10% error associated with the analytical methods should be considered for the quantification.

Four physical-chemical parameters: pH (Corning pH meter 220), dissolved oxygen (WTW Oxi 325), temperature and conductivity (WTW Cond 315i) were monitored in exposure solutions during the tests. Average and standard deviation of these parameters kept during the assays were pH =  $6.6 \pm 0.25$ ; dissolved oxygen =  $5.3 \pm 1.35$  mg/L; conductivity =  $108.8 \pm 4.5$  µS/cm and temperature =  $25.1 \pm 0.7$  °C.

## **Biomarkers**

Muscle (tail) cholinesterase activity (ChE), liver glutathione-S transferase activity (GST), and liver lipid peroxidation (LPO) were evaluated in tadpoles after 96 h of exposure to sub-lethal concentrations of chlorothalonil. Samples were homogenized in an appropriate buffer and processed as described in Mena et al. (2014) for biomarker determinations. Briefly, protein content in sample homogenates was determined by the method of Bradford (1976) using  $\gamma$ -globulin as standard. ChE activity was measured using the method of Ellman et al. (1961), using 1 mM acetylthiocholine and 0.1 mM 5,5' dithiobis-2- dinitrobenzoic acid (DTNB) as substrate and conjugate; reaction was measured at 415 nm during 15 min and expressed as nmol/min/mg protein. GST activity was determined as described by Habig et al. (1974), exposing samples to 1 mM CDNB and 1 mM GSH and monitoring the reaction at 340 nm during 3 min.; activity reported as nmol/min/mg protein. Lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric reactive species (TBARS) (Oakes and Van Der Kraak 2003) and expressed as nmol TBARS per mg of protein.

## **Data analysis**

Toxicity parameters: (LC50) and 95 % confidence limits were calculated using IBM® SPSS® Statistics 22 (trial version). Concentration data were log-transformed and effect data were Probit-transformed.

To determine the effects of chlorothalonil on total length, weight and development stage of tadpoles, we used linear mixed-effect models (LMMs) as suggested by Cox (2010). The total length, weight and development stage of tadpoles were specified as response variables. We used specified treatment as fixed factor and the number of individuals as random effect to account for repeated measures in each tadpole. During the analysis, the variables were classified as significant if the 95% confidence intervals (CI) did not overlap zero (which represents the negative control).

We constructed linear models for each species to assess the effect of chlorothalonil for each biomarker (LPO level, ChE and GST activities). Models were compared with null models (hypothesizes a difference of 0) and ranked according to their Akaike Information

Criterion adjusted for small sample sizes (AICc). When a treatment effect was detected, we conducted model-averaged effect sizes (Mazerolle 2006); this is an information-theoretic alternative to multiple comparisons (e.g., Burnham et al. 2011). We log-transformed response variables if they showed non-normality.

The analyses of chronic effects and biomarkers were conducted in R version 3.1.2 (R Development Core Team 2014) using the package “lme4” (Bates et al. 2014) to conduct LMMs, and the package “AICcmodavg” to calculate AICc and model-averaged effect sizes (Mazerolle 2006).

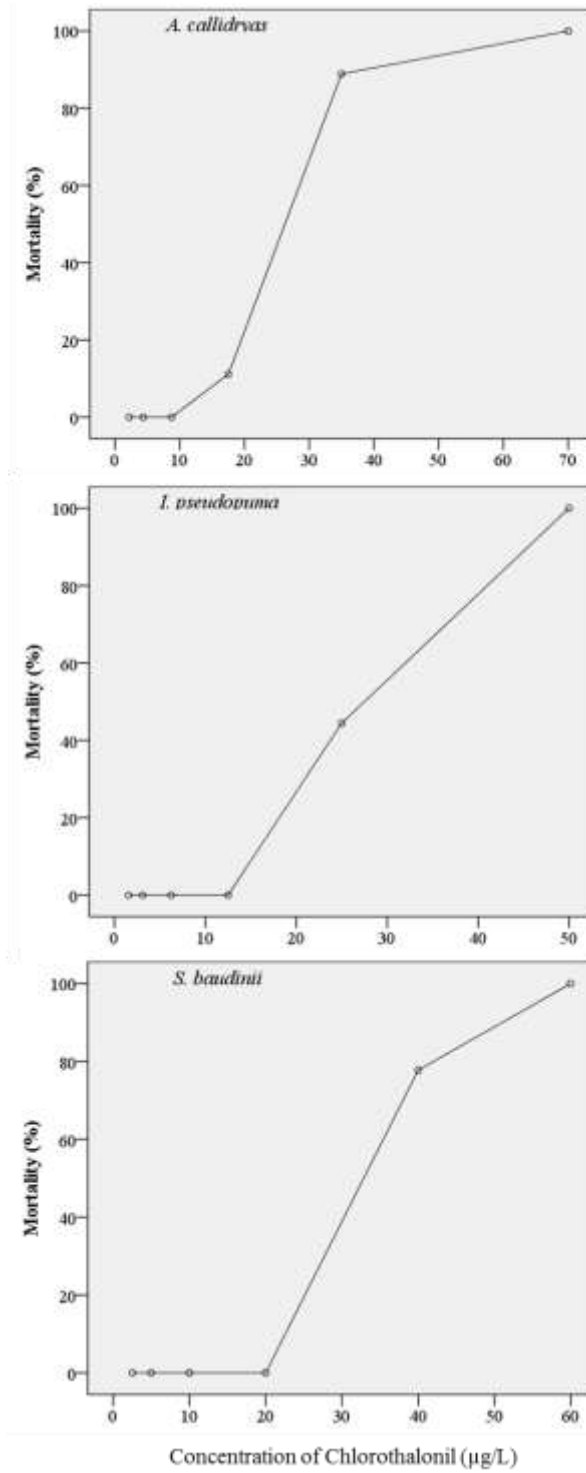
## **Results**

### **Acute toxicity**

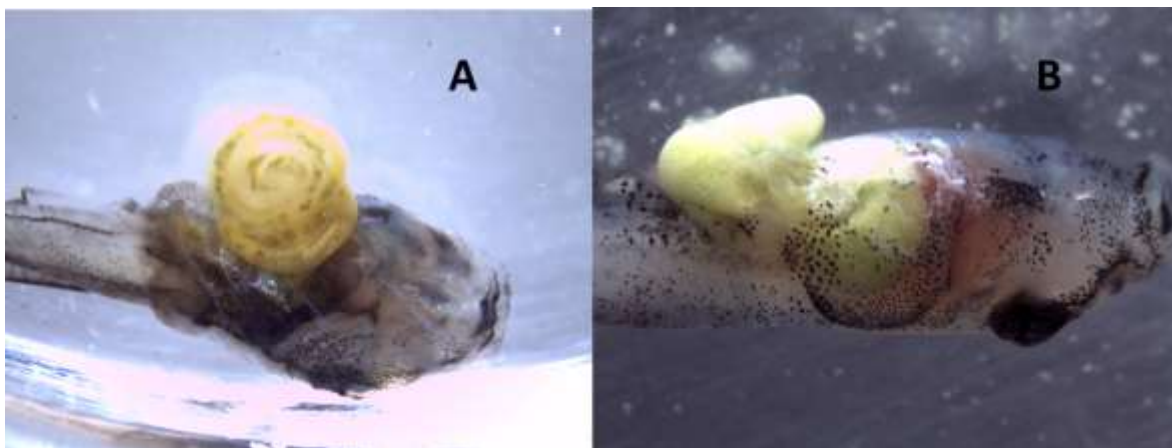
The tadpoles of the three native species tested showed a high and very similar sensitivity to chlorothalonil (Table 1.2, Fig. 1.1). Additionally, in *A. callidryas* and *S. baudinii* acute assays, it was observed that tadpoles which died during the first 24 h exposed to lethal concentrations of chlorothalonil, a spontaneous rupture of linea alba and posterior evisceration was observed (Fig. 1.2). In *A. callidryas*, after 15 h of exposure, this effect was observed in one out of nine tadpoles exposed to 40 µg/L, two out of nine tadpoles exposed to 50 µg/L and three out of nine individuals exposed to 60 µg/L. During acute tests, we had a hundred percent survival of controls.

**Table 1.2** Acute 96-hour toxicity (median lethal concentration values [LC<sub>50</sub>] with 95% confidence intervals) in µg/L of chlorothalonil to tadpoles of three amphibian species.

Species	Gosner Stage	LC <sub>50</sub>	Lower 95% confidence limit	Upper 95% confidence limit
<i>A. callidryas</i>	26-27	26,6	18,9	35,8
<i>I. pseudopuma</i>	25-27	25,5	21,3	29,7
<i>S. baudinii</i>	28-31	32,3	26,3	39,7



**Fig. 1.1** Mortality in tadpoles of three frog species, 96 h after exposure to a range of concentrations of chlorothalonil



**Fig. 1.2** Exposed viscera in tadpoles of *S. baudinii* (a) and *A. callidryas* (b) which died during first 24 h of exposure to lethal concentrations of chlorothalonil

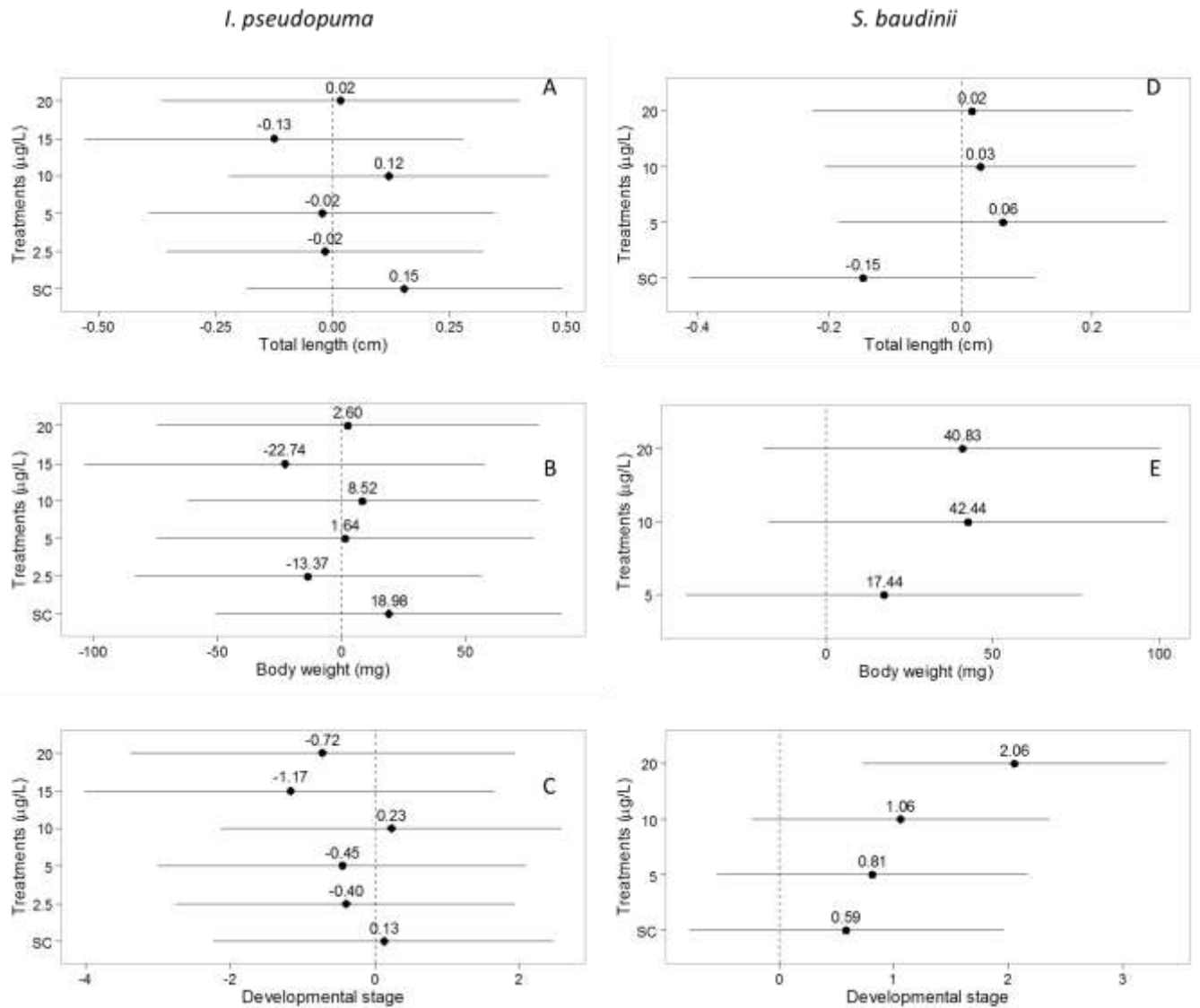
### Chronic effects

Exposure to chlorothalonil did not affect the variables associated with growth and development measured in *I. pseudopuma* individuals compared to controls (Fig. 1.3a–c). In contrast, development of *S. baudinii* tadpoles exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  of the fungicide showed a positive difference compared to controls (95 % CI 0.69, 3.43) (Fig. 1.3f); while total length and body weight were not affected in this species (Fig. 1.3d, e). In the case of *S. baudinii*, the solvent control affected significantly the body weight of the tadpoles, therefore, for animals exposed to chlorothalonil, this variable was tested against the solvent control (Fig. 1.3e).

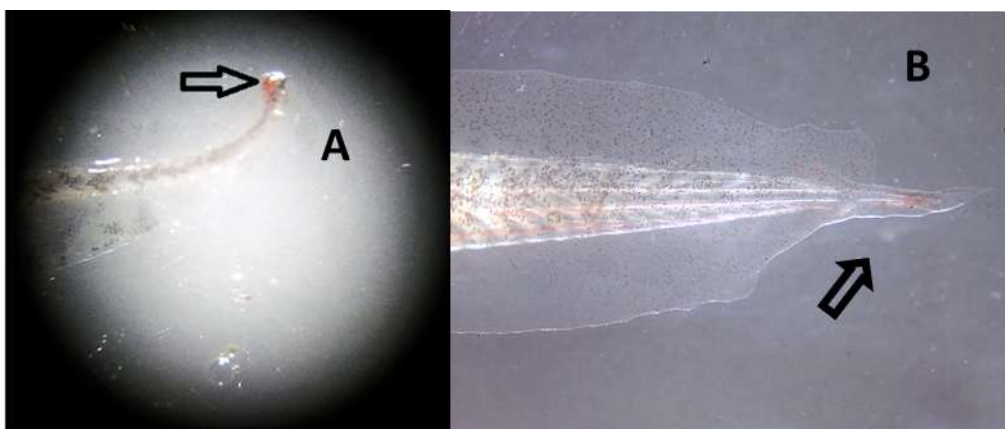
As an additional observation, during chronic exposure, lesions were observed on tails of *S. baudinii* and *I. pseudopuma* tadpoles exposed to the fungicide but not in the controls (Fig. 1.4). In *S. baudinii*, this effect was observed in five out of nine tadpoles exposed to 5  $\mu\text{g/L}$ , six out of nine exposed to 10  $\mu\text{g/L}$  and six out of nine exposed to 20  $\mu\text{g/L}$ .

During chronic tests with *I. pseudopuma* no mortalities occurred in the negative control. In the case of *S. baudinii*, three individuals in the control died during the experiment before reaching stage 42, their data was analyzed for the period they lived. Chronic tests with *A. callidryas* were ended because of mortality of more than four

replicates in controls during the first week of exposure. In this case, the batch of organisms used to start chronic test came from different egg masses than the ones used for acute assays.



**Fig. 1.3** Model estimates and 95 % CI for total length, body weight and development of *I. pseudopuma* and *S. baudinii* tadpoles exposed to sublethal concentrations of chlorothalonil. Confidence intervals below or above zero denote a difference with regard to control. SC = solvent control



**Fig. 1.4** Lesions on *S. baudinii* (a) and *I. pseudopuma* (b) tadpoles tails during chronic exposure to chlorothalonil

### **Biomarkers**

The analysis of model selection identified an effect of chlorothalonil treatments for *I. pseudopuma* ChE activity and *S. baudinii* GST activity (Table 1.3).

ChE activity was not affected in tadpoles of *A. callidryas* and *S. baudinii* exposed to chlorothalonil (Fig. 1.5a, c). In the case of *I. pseudopuma*, tadpoles exposed to 3  $\mu\text{g/L}$  had a lower ChE activity compared to tadpoles exposed to higher concentrations of the pesticide (Fig. 1.5b).

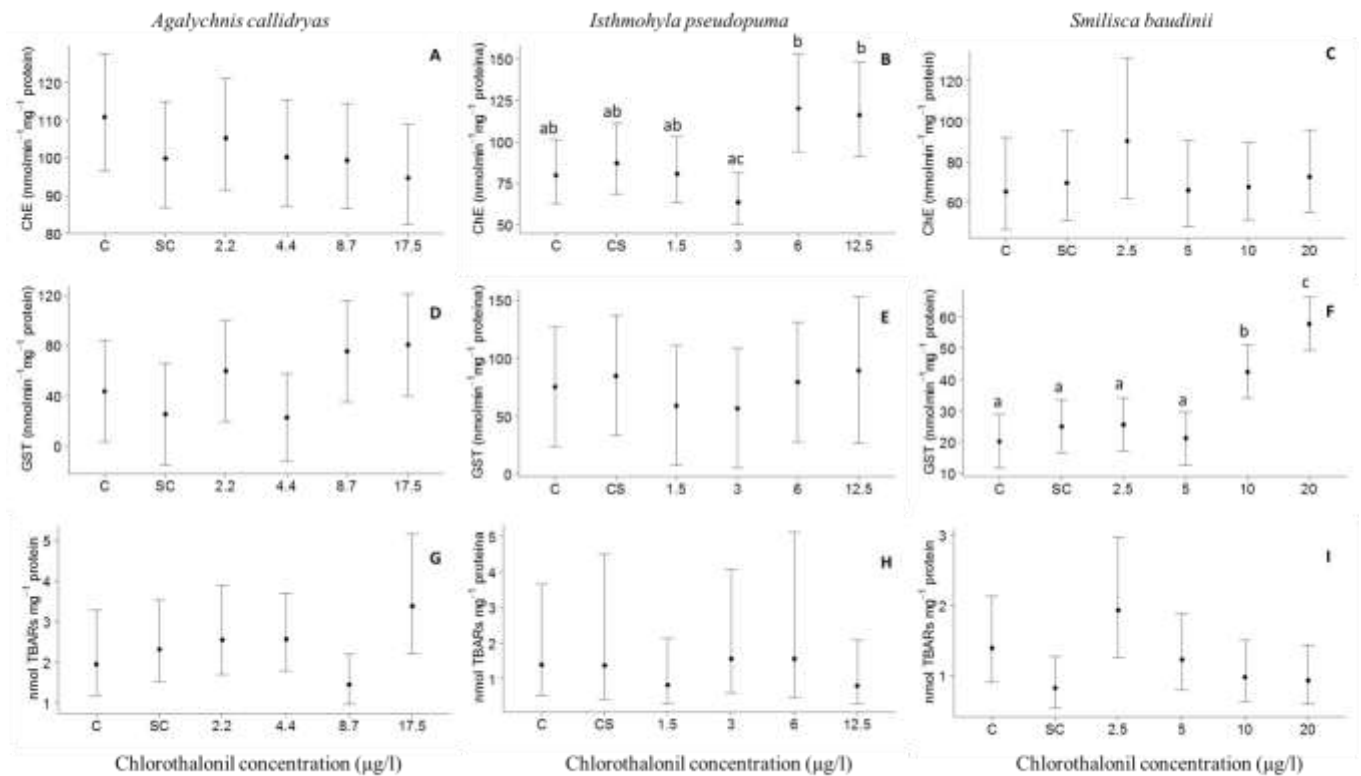
A significant increase in GST activity was observed in livers of *S. baudinii* tadpoles exposed to 10 and 20  $\mu\text{g/L}$  of chlorothalonil compared to controls and lower concentrations of the pesticide (Fig. 1.5f). A positive dose-response relationship was observed in this species (Fig. 1.5f), indicating an induction of phase II biotransformation process caused by the fungicide.

We measured LPO liver levels as a possible sign of oxidative stress induced by exposure of tadpoles to the fungicide; however, no significant increase of this biomarker was observed in any of the three species tested (Fig. 1.5g–i).



**Table 1.3** Candidate set of linear models for the biomarkers GST, LPO and ChE of three Costa Rican anuran native species, with their respective Treatment and null model. Number of parameters ( $K$ ), Akaike's Information Criterion values (AICc), difference in AICc regard to best model ( $\Delta$ AICc) and AICc weights ( $w$ ).

Model	$K$	AICc	$\Delta$ AICc	$w$
<i>A. callidryas</i>				
GST ~ 1	2	194	0	0.99
GST ~ Treatment	7	203	9	0.01
LPO ~ 1	2	20.8	0	0.99
LPO ~ Treatment	7	29.6	8.7	0.01
ChE ~ 1	2	-14.2	0	0.99
ChE ~ Treatment	7	-5.3	8.9	0.01
<i>I. pseudopuma</i>				
GST ~ 1	2	174	0	1
GST ~ Treatment	7	193	19.4	<0.00
LPO ~ 1	2	37.1	0	1
LPO ~ Treatment	7	55.2	18	<0.00
ChE ~ Treatment	7	53.4	0	0.968
ChE ~ 1	2	60.2	6.8	0.032
<i>S. baudinii</i>				
GST ~ Treatment	7	138	0	1
GST ~ 1	2	153	14.9	<0.00
LPO ~ 1	2	22.7	0	0.976
LPO ~ Treatment	7	30.1	7.4	0.024
ChE ~ 1	2	46	0	0.9942
ChE ~ Treatment	7	56.3	10.3	0.0058



**Fig. 1.5** Biomarkers measured in tadpoles exposed to sub-lethal concentrations of chlorothalonil: muscle ChE activity (a–c), liver GST activity (d–f) and liver LPO (g–i). Bars represent mean  $\pm$  95 % CI of the biomarker measured for each treatment. Differences among treatments in an experiment are indicated with lowercase letters. C = negative control, SC = solvent control.

## Discussion

The three species tested showed a similar sensitivity to chlorothalonil and this level of sensitivity agrees with observations made on other amphibian species (Yu et al. 2013). Also, this data confirms that larval stages of amphibians are more sensitive to chlorothalonil than other aquatic organisms (invertebrates and fish) (Yu et al. 2013). Compared to databases reports and literature, the three species tested are among the most sensitive to chlorothalonil (US-EPA 2015; Kegley et al. 2015). Previous works developed in Costa Rica found also a high toxicity of chlorothalonil to *A. callidryas* tadpoles (Johnson

et al. 2013; Ghose et al. 2014). The studies mentioned, used formulations of the fungicide and evaluated acute and chronic endpoints also. The acute 96-h LC50 reported by them is higher than the one reported in this study, but still agrees with the fact that compared to other species, *A. callidryas* is very sensitive to chlorothalonil. According to our data, this species is more sensitive to the pure compound than to the formulation. Regarding the toxicokinetics of pesticides, some research shows that through dermal exposure, the process of absorption of chemicals in amphibians is two orders faster than mammals (Brühl et al. 2013) which could be related with the higher sensitivity observed.

Considering other anurans, a great variation of sensitivity among species has been reported. For instance, McMahon et al. (2011) observed significant mortality in tadpoles of two frog species exposed to chlorothalonil at a concentration below the range tested in this work (16.4 ng/L) while the exposure of *Osteopilus septentrionalis* tadpoles to the a concentration thousand times higher (17.6 µg/L) did not cause mortality (McMahon et al. 2013). This last report agrees with our results regarding sub-lethal concentrations. In other example, McMahon et al. (2012) applied chlorothalonil in concentrations above 164 µg/L to a mesocosm where *O. septentrionalis* and *Rana sphenoccephala* tadpoles among aquatic organisms were present. The treatment with the fungicide in this case increased mortality of the tadpoles and other groups. For the species we tested, this concentration would be lethal to a hundred percent of the animals.

Chlorothalonil is a multi-site contact fungicide, which in aquatic organisms is known to affect immune responses and interfere with glutathione-related and oxidase-like enzymes (Elskus 2012; Van Scoy and Tjeerdema 2014). In humans, the occurrence of dermatitis has been reported in individuals exposed to this compound (Penagos 2002) and this effect has been attributed to irritant properties of the substance (Lensen et al. 2007). During acute assays with *A. callidryas* and *S. baudinii*, evisceration was observed in tadpoles exposed to lethal concentrations and we hypothesize that this effect might be attributed to a rupture of the linea alba because of the pesticide irritant properties. It would be necessary to confirm our findings with histological analysis. In this case, due to overnight mortality, some decomposition had already occurred in the samples and it was not possible to properly process them.

During chronic exposure, damage in tails was observed in *S. baudinii* and *I. pseudopuma* tadpoles. Yu et al. (2013) reported a similar effect of chlorothalonil on amphibians and they suggest that it might be related with an apoptotic process. It has been observed that xenobiotics have the capacity to produce skin lesions: recently it was found that after a short exposure to endosulfan, morphology and structure of the skin of *Bufo bufo* tadpoles suffered alterations and degenerative processes (Bernabò et al. 2013). Other pesticides may produce similar effects, in Sri Lanka, tadpoles of an endemic species were exposed chronically to chlorpyrifos, dimethoate, glyphosate and propanil. They developed malformations at high frequencies, mainly kyphosis, scoliosis, skin ulcers and edema (Jayawardena et al. 2010).

Regarding sub-lethal chronic effects, in most of the cases reported so far, exposure to pesticides has been observed to affect negatively the growth and development of tadpoles (Brunelli et al. 2009; Sparling and Fellers 2009; Baker et al. 2013). In the specific case of chlorothalonil, its sub lethal toxicity to *A. callidryas* has been studied and it resulted in a reduction of biomass in tadpoles exposed to the chemical for periods of 8 or 12 days (Johnson et al. 2013; Ghose et al. 2014; Alza et al. 2016). Also, Yu et al. (2013) found that 96-h exposure to chlorothalonil reduced length of *Xenopus laevis* tadpoles.

The study we conducted maintained a prolonged exposure of tadpoles to the fungicide. In these conditions, we had no effect on *I. pseudopuma* growth or development; but in *S. baudinii*, development was positively affected by the exposure. This response has already been observed with the herbicide acetochlor in the presence of an exogenous dose of 3, 3', 5-triiodothyronine ( $T_3$ ), which is the active form of thyroxine ( $T_4$ ) hormone, both involved in the metamorphosis activation. It produced an accelerated development of *Rana pipiens* forelimbs and this was attributed to an enhancement of the hormone action caused by the presence of the pesticide (Cheek et al. 1999). In *X. laevis*, when exposed to acetochlor and  $T_3$ , the metamorphosis was accelerated. The authors relate the course of action of acetochlor with gene transcription during metamorphosis (Crump et al. 2002).

Acceleration of development associated with pollutants interacting with thyroid hormones is an endpoint already considered in toxicity testing (OECD 2009). In this regard, Grabuski et al. (2004) suggested the potential of chlorothalonil as an endocrine disruptor as it can potentially interfere with endogenous hormones. In mammals, it has been reported

that this fungicide can be an agonist of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Elskus 2012), which can be a molecular pathway to endocrine disrupting effects. Considering the outcome of our test with *S. baudinii*, we suggest that further investigation should be aimed to elucidate this issue. Based on our observations, we recommend the evaluation of malformations and behavioral effects as well as the continuation of the assays post-metamorphosis in order to identify possible alterations caused by the compound during juvenile and adult stages. This would be especially valuable considering that *I. pseudopuma* inhabits areas where declines have occurred (Abarca 2012) and the life cycle stage and parameters we evaluated did not reveal significant chronic effects on this species.

No significant ChE inhibition was observed in muscle samples of *A. callidryas* or *S. baudinii*, this is reasonable as this fungicide is not associated with a mechanism of ChE inhibition. It is still important to consider and measure ChE activity as its inhibition has been related to several pollutants others than organophosphates and carbamates (Lionetto et al. 2011). Tadpoles of *I. pseudopuma* exposed to 3 µg/L of chlorothalonil had a lower ChE activity compared to individuals exposed to higher concentrations of the pesticide but not lower compared to controls. We consider this difference unrelated with a possible inhibition caused by the pesticide as ChE inhibitors are known to show a clear dose response relationship (Thomson 1999; Pathiratne et al. 2008; Mena et al. 2012). However, nonmonotonic responses like this have been observed in the dose-mortality relationship of three amphibian species exposed to chlorothalonil (McMahon et al. 2011). Also, immunological parameters of fish exposed to chlorothalonil have shown nonmonotonic responses (Shelley et al. 2009).

Chlorothalonil's mode of action is related to interference with glutathione and cellular sulfhydryl enzymes (Van Scoy and Tjeerdema 2014), which are involved in phase II of biotransformation. In this work, we found evidence of biotransformation phase II induction in tadpoles of *S. baudinii* exposed to sub-lethal concentrations of chlorothalonil. The role of GST in biotransformation of chlorothalonil has been broadly described in bacteria (Wang et al. 2011) but also in aquatic vertebrates (fish) (Davies 1985). Ezemonye and Tongo (2010) reported the induction of GST in amphibians (adult toads) exposed to endosulfan and diazinon, furthermore they found that the liver is a good tissue to measure this activity. On the other hand, we did not find signs of oxidative stress evidenced as lipid

peroxidation. This absence of oxidative stress has been observed in amphibians exposed to pesticides (Venturino et al. 2003), even when phase II responses are evident, like in our case. This might be attributed to the reported low activity of the mixed-function oxidases belonging to the cytochrome P450 family in amphibians (Huang et al. 1998; Venturino et al. 2003; Jung et al. 2004), being xenobiotics metabolized via phase II without a significant induction of phase I reactions and a lower oxidative process.

This work represents one of the few efforts in order to characterize the sensitivity of tropical amphibian species to pesticides. Two studies carried out in Costa Rica (Daly et al. 2007; Shunthirasingham et al. 2011) evidenced that pesticides used in agriculture in the lowlands of the country (including chlorothalonil) are atmospherically transported and found at places where habitat degradation is not evident. Although the three species tested in this work are listed as Least Concern by the IUCN (IUCN 2015), there is already evidence of the presence of pesticides, including chlorothalonil, in areas they inhabit: Cordillera Volcanica Central (Daly et al. 2007), the Caribbean Region (Castillo et al. 2000) and the Pacific Region (Mena et al. 2014). Accordingly, these and other amphibians are exposed to pollution and consequences as those shown in this work, during their life cycle (aquatic and terrestrial). Declines of some amphibian populations have been documented in pristine areas where *Bd* and temperature variability have been identified as causes for those events (Lips et al. 2008; Rohr and Raffel 2010). At the same time, La Marca et al. (2005) warn about the lack of information regarding environmental pollutants released by human activities and their effects on neotropical amphibian species. In this regard, efforts should be undertaken in order to elucidate the role of pollutants and hopefully their interaction with other environmental stressors as part of the factors influencing amphibian declines.

## **Conclusions**

In the present study, we report that amphibian species that inhabit pristine areas of Costa Rica are sensitive to chlorothalonil, a pesticide that has been found to be transported atmospherically and that is intensively used in the country. Thus, efforts should be made in order to reduce the use of pesticides in the country and also focus on the protection of amphibian populations that are currently affected by declines.

Induction of phase II biotransformation indicates that relevant environmental concentration of chlorothalonil can be inducing biological responses that are related to its mode of action.

This study evaluated the chronic effects of a prolonged exposure to chlorothalonil on anurans. Because the tadpoles of *S. baudinii* showed impaired growth and development, it is recommended to investigate the possible role of this pesticide as an endocrine disruptor. It is also suggested to assess effects on juveniles and adults of the species tested. Spontaneous rupture of linea alba and posterior evisceration was observed in the tadpoles exposed to lethal concentrations of chlorothalonil as well as lesions in tail at sub-lethal concentrations, these effects could be related to histological alterations of the skin, but further studies are needed to confirm this.

**Acknowledgments** This project was supported by the Fondo Especial para la Educación Superior (FEES-CONARE). The authors recognize the contributions of Professor Manuel Spínola, PhD and MSc. Randall Jiménez during the data analysis; Professor David R. S. Lean, PhD for the revision of the English language of the final manuscript and the two anonymous reviewers for their thorough revision of the document. We also want to extend our gratitude to all the friends and colleagues who supported us in the collections of the eggs masses and tadpoles for the experiments.

## References

- Adams MJ (1999) Correlated factors in amphibian decline: exotic species and habitat change in Western Washington. *J Wild Manag* 63(4): 1162–1171
- Abarca JG (2012) Cambios en la estructura de la comunidad de anuros (Amphibia: Anura) en el Cerro Chompipe, Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED* 4(1):9–15
- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 30:133–165

- Alza CM, Donnelly MA, Whitfield SM (2016) Additive effects of mean temperature, temperature variability, and chlorothalonil to red-eyed treefrog (*Agalychnis callidryas*) larvae. *Environ Toxicol Chem* in press
- Baker NJ, Bancroft BA, Garcia TS (2013) A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *STOTEN* 449:150–156
- Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC (2014) Fitting linear mixed effects models using lme4. *J Stat Softw* 51 p
- Becker CG, Fonseca CR, Baptista Haddad CF, Fernandes Batista R, Prado PI (2008) Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 318(14):1775–1777
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci* 95:9031–9036
- Bernabò I, Guardia A, La Russa D, Madeo G, Tripepi S, Brunelli E (2013) Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquat Toxicol* 142–143:164–175
- Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PTJ, Buck JC, Gervasi SS, Kats LB (2011) The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1223:108–119
- Bolaños F (2009) Situación de los anfibios de Costa Rica. *Biocenosis* 22(1–2):95–108
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bravo V, De la Cruz E, Herrera G, Ramírez F (2013) Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. *Uniciencia* 27(1):351–376
- Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonaccia A, Tripepi S (2009) Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquat Toxicol* 9:135–142



- Brühl C, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated caused of global decline? *Sci Rep* 3:1135
- Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP (2011) AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations and comparisons. *Behav Ecol Sociobiol* 65:23–25
- Castillo LE, Ruepert C, Solis E (2000) Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the north Atlantic zone of Costa Rica. *Environ Toxicol Chem* 19(8):1942–1950
- Cheek A, Ide C, Bollinger J, Rider C, McLachlan (1999) Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. *Arch. Environ Contam Toxicol* 37:70–77
- Collins JP, Storfer A (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers Distrib* 9(2):89–98
- Cox SB (2010) Statistical models in wildlife toxicology. In: Kendall RJ, Lacher TE, Cobb GP, Cox JP (eds) *Wildlife toxicology: emerging contaminant and biodiversity issues*. CRC Press, Florida, USA, pp. 173–195
- Crump D, Werry K, Veldhoen N, Van Aggelen G, Helbing C (2002) Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ Health Perspect* 110:1190–1205
- Daly GL, Lei YD, Teixeira C, Muir DCG, Castillo LE, Wania F (2007) Accumulation of current-use pesticides in neotropical montane forests. *Environ Sci Technol* 41:1118–1123
- Davies PE (1985) The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. *Metabolism, enzymatic and detoxication in Salmo spp. and Galaxias spp.* *Aquat Toxicol* 7:277–299
- de la Cruz E, Bravo-Durán V, Ramírez F, Castillo LE (2014) Environmental hazards associated with pesticide import into Costa Rica, 1977-2009. *J Environ Biol* 35(1):43–55
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95

- Elskus AA (2012) Toxicity, sublethal effects, and potential modes of action of select fungicides on freshwater fish and invertebrates: U.S. Geological Survey Open-File Report 2012–1213, 42 p., at <http://pubs.usgs.gov/of/2012/1213/>.
- Ezemonye L, Tongo I (2010) Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere* 81:214–217
- Ghose SL, Donnelly MA, Kerby J, Whitfield SM (2014) Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environ Toxicol Chem* 33(9):2114–2119
- Gillespie GR, Hunter D, Berger L, Marantelli G (2015) Rapid decline and extinction of a montane frog population in southern Australia follows detection of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Anim Conserv* 18(3):295–302
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16(3):183–190
- Grabuski J, Martin PA, Struger J (2004) Pesticides in Ontario: A Critical Assessment of Potential Toxicity of Urban Use Products to Wildlife, with Consideration for Endocrine Disruption. Volume 3: Phenoxy herbicides, chlorothalonil and chlorpyrifos. Technical Report Series No. 410. Canadian Wildlife Service, Ontario Region, Burlington, Ontario, Canada. <http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/CW69-5-410E.pdf>. Accessed 14 June 2016
- HabigWH, Pabst MJ, JakobyWB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem* 249: 7130–7139
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haefele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114(1):40–50
- Huang YW, Melancon MJ, Jung RE, Karasov WH (1998) Induction of cytochrome P450-associated monooxygenases in northern leopard frogs, *Rana pipiens*, by 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl. *Environ Toxicol Chem* 17(8):1564–1569
- Jayawardena UA, Rajakaruna RS, Navaratne AN, Amerasinghe PH (2010) Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. *Int J Agric Biol* 12(5):641–648

- Johnson LA, Welch B, Whitfield SM (2013) Interactive effects of pesticides mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. *Environ Toxicol Chem* 32(10):2379–2386
- Jung RE, Karasov WH, Melancon MJ (2004) Cytochrome P450 activity in green frogs (*Rana clamitans melanota*) exposed to water and sediments in the Fox River and Green Bay, Wisconsin, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:955–962
- Kats LB, Ferrer LP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Divers Distrib* 9:99–110
- Kegley S. E, Hill B. R, Orme S, Choi A. H (2015) PAN: Pesticides Database, Pesticide Action Network. [http://www.pesticideinfo.org/Search\\_Chemicals.jsp](http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp). Accessed 8 Dec 2015
- La Marca E, Lips KR, Lotters S, Puschendorf R, Ibáñez R, Rueda-Almonacid JV, Schulte R, Marty C, Castro F, Manzanilla-Puppo J, García-Pérez JE, Bolaños F, Chaves G, Pounds JA, Toral E, Young BE (2005) Catastrophic Population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37(2): 190–201
- Lensen G, Jungbauer F, Goncalo M, Coenraads PJ (2007) Airborne irritant contact dermatitis and conjunctivitis after occupational exposure to chlorothalonil in textiles. *Contact Dermatitis* 57:181–186
- Li Y, Cohen JM, Rohr JR (2013) Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integr Zool* 8:145–161
- Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Schettino T (2011) Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives. In: *Ecotoxicology around the globe*. Nova Science Publishers, Inc. 88–115
- Lips KR, Borrowes PA, Mendelson JR III, Parra-Olea G (2005) Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica* 37(2):222–226
- Lips KR, Brem F, Brenes R, Reeve JD, Alford RA, Voyles J, Carey C, Livo L, Pessier AP, Collins JP (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *P Natl Acad Sci USA* 103(9):3165–3170
- Lips KR, Diffendorfer JE, Mendelson JR, Sears MW (2008) Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol* 6:441–454

- Mazerolle MJ (2006) Improving data analysis in herpetology: using Akaike's information criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. *Amphibia-Reptilia* 27:169–180
- McMahon TA, Halstead NT, Johnson S, Raffel TR, Romansic JM, Crumrine PW, Boughton RK, Martin LB, Rohr JR (2011) The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environ Health Perspect* 119(8):1098–1103
- McMahon TA, Halstead NT, Johnson S, Raffel TR, Romansic JM, Crumrine PW, Rohr JR (2012) Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecol Lett* 15:714–722
- McMahon TA, Romansic JM, Rohr JR (2013) Nonmonotonic and monotonic effects of pesticides on the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in culture and on tadpoles. *Environ Sci Technol* 47:7958–7964
- Mena F, Pfennig S, Arias-Andrés M, Márquez-Couturier G, Sevilla A, Protti M (2012) Acute toxicity and cholinesterase inhibition of the nematicide ethoprophos in larvae of gar *Atractosteus tropicus* (Semionotiformes: Lepisosteidae). *Int J Trop Biol* 60(1):361–368
- Mena F, Fernández San Juan M, Campos B, Sánchez-Ávila J, Faria M, Pinnock M, de la Cruz E, Lacorte S, Soares AMVM, Barata C (2014) Pesticide residue analyses and biomarker responses of native Costa Rican fish of the Poeciliidae and Cichlidae families to assess environmental impacts of pesticides in Palo Verde National Park. *J Environ Biol* 35:19–27
- Mendelson JR III, Lips KR, Gagliardo RW, Rabb GB, Collins JP, Diffendorfer JE, Daszak P, Ibáñez R, Zippel KC, Lawson DP, Wright KM, Stuart SN, Gascon C, da Silva HR, Burrowes PA, Joglar RL, La Marca E, Lötters S, du Preez LH, Weldon C, Hyatt A, Rodriguez-Mahecha JV, Hunt S, Robertson H, Lock B, Raxworthy CJ, Frost DR, Lacy RC, Alford RA, Campbell JA, Parra-Olea G, Bolaños F, Calvo Domingo JJ, Halliday T, Murphy JB, Wake MH, Coloma LA, Kuzmin SL, Price MS, Howell KM, Lau M, Pethiyagoda R, Boone M, Lannoo MJ, Blaustein AR, Dobson A, Griffiths RA, Crump ML, Wake DB, Brodie ED Jr (2006) Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* 313:48

- Oakes FD, Van Der Kraak VD (2003) Utility of TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63:447–463
- OECD (2009) Guideline for Testing of Chemicals, No. 231: The Amphibian Metamorphosis Assay
- Pounds JA, Crump ML (1994) Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conserv Biol* 8(1):72–85
- Pounds JA (2001) Climate and amphibian declines. *Nature* 410:639–640
- Pathiratne A, Chandrasekera L, De Seram P (2008) Effect of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: implications for biomonitoring neurotoxic contamination. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:309–317
- Penagos H (2002) Contact dermatitis caused by pesticides among banana plantation workers in Panama. *Int J Occup Environ Health* 8:14–18
- R Development Core Team (2014) R Foundation for Statistical Computing. Version 3.1.2. <http://www.rproject.org/>
- Rohr JR, Raffel TR (2010) Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *P Natl Acad Sci USA* 107:8269–8274
- Rohr JR, Palmer BD (2013) Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. *Conserv Biol* 27(4):741–751
- Shelley LK, Balfry SK, Ross PS, Kennedy CJ (2009) Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 92:95–103
- Shunthirasingham C, Gouin T, Lei YD, Ruepert C, Castillo LE, Wania F (2011) Current-use pesticide transport to Costa Rica's high-altitude tropical cloud forest. *Environ Toxicol Chem* 30(12):2709–2717
- Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) (2009) IV Informe de País al Convenio sobre la Diversidad Biológica. GEF-PNUD. Mimeografiado. 220 p
- Sparling D, Fellers G, McConnell L (2001) Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ Toxicol Chem* 20:1591–1595

- Sparling DW, Fellers GM (2009) Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ Toxicol Chem* 28(8):1696–1703
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (2010) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, USA
- The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).  
Downloaded on 25 August 2015
- Thomson H (1999) Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology* 8:369–384
- US Environmental Protection Agency (2015) ECOTOX Database.  
<http://www.epa.gov/ecotox>. Accessed 8 Dec 2015
- Van Scoy AR, Tjeerdema RS (2014) Environmental fate and toxicology of chlorothalonil. *Rev Environ Contam T* 232:89–105
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich de Schroeder T, de D'Angelo P (2003) Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8(3–4):167–186
- Wang G, Liang B, Li F, Li S (2011) Recent advances in the biodegradation of chlorothalonil. *Curr Microbiol* 63(5):450–457
- Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G, Savage JM, Donnelly MA (2007) Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *PNAS* 104(20):8352–8356
- Whitfield SM, Lips KR, Donnelly MA (2009) Decline and conservation of amphibians in Central America. In: Heatwole HH, Barrios-Amoros C, Wilkenson JW (eds) *Amphibian biology, Vol 9—status of conservation and declines of amphibians: western hemisphere*. Surrey Beatty and Sons, Sydney, Australia
- Yu S, Wages MR, Cobb GP, Maul JD (2013) Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. *Environ Pollut* 181:329–334

**XVI. Artículo II: Efectos letales, subletales y medición de biomarcadores en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* (Anura: Hylidae) expuestos al insecticida  $\beta$ -endosulfan**

**Sustentante**

**Michael Antonio Méndez Rivera**

**Artículo con el formato de la Revista Biología Tropical**

# **Efectos letales, subletales y medición de biomarcadores en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* (Anura: Hylidae) expuestos al insecticida $\beta$ -endosulfan**

Michael Antonio Méndez Rivera

Maestría Académica en Ecotoxicología Tropical. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

## **RESUMEN**

Costa Rica es un país dependiente de plaguicidas en sus prácticas agrícolas, así lo constató el último Censo Nacional Agropecuario. El problema en la utilización de estos biocidas es que una vez que son liberados al ambiente también son tóxicos para vertebrados e invertebrados que no son el blanco de su acción. Tal es el caso del  $\beta$ -endosulfan, un organoclorado persistente, que ha sido registrado en muestras ambientales de sitios protegidos en el país. Uno de los grupos afectados por el uso de plaguicidas son los anfibios. Los efectos en estos animales por la exposición se han observado en su comportamiento, crecimiento, desarrollo, entre otros, sin embargo, la información en el país continúa siendo escasa con relación a esta problemática. Por dicho motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos letales, subletales y cambios en tres marcadores bioquímicos de contaminación (ChE, GTS, LPO) en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* expuestos en laboratorio al  $\beta$ -endosulfan. Para hacer esta evaluación, se utilizaron concentraciones letales y subletales, con ámbitos de concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{g/L}$  de  $\beta$ -endosulfan. Se calculó la concentración letal media y se midió la longitud, el peso y el desarrollo de los renacuajos, después de la exposición aguda y crónica. Además, se hizo una medición de los biomarcadores colinesterasa, glutatión S-transferasa y peroxidación de lípidos en los individuos sobrevivientes al ensayo agudo. La CL<sub>50</sub> para esta especie fue de 123.6  $\mu\text{g/L}$ . A la concentración de 50  $\mu\text{g/L}$ , tanto la longitud como el peso total se vieron disminuidos con respecto al control, asimismo, en 30 y 50  $\mu\text{g/L}$  los individuos se desarrollaron más lento. La medición de biomarcadores no determinó algún efecto a este nivel. Con esta investigación se determinó que el  $\beta$ -endosulfan es tóxico para una especie nativa a concentraciones  $\geq 123.6 \mu\text{g/L}$ . Además, los resultados demuestran que este insecticida tiene las propiedades para reducir el tamaño y retrasar el desarrollo en esta especie, lo que podría suceder con otras ranas del país y del trópico, para lo cual se necesitan de más pruebas. Estas deficiencias indican que en la naturaleza estos individuos serían más propensos a la



depredación, la desecación y tendrían menos éxito reproductivo, lo cual es una forma de incidir en las poblaciones de anuros locales.

**Palabras clave:**  $\beta$ -endosulfan, decline de anfibios, efectos subletales, biomarcadores, *Isthmohyla pseudopuma*.

**Abstract: Lethal, sublethal and biomarkers effects on *Isthmohyla pseudopuma* tadpoles (Anura: Hylidae) exposed to  $\beta$ -endosulfan insecticide.** Costa Rica is a pesticides dependent country in its agricultural practices, as evidenced by the last National Agricultural Census. The problem in using these biocides is that once they are released into the environment they are also toxic to vertebrates and invertebrates that are not the target of their action, such as  $\beta$ -endosulfan, a persistent organochlorine that has been registered in environmental samples of protected sites in the country. Amphibians are a group affected by pesticides. The effects on these animals by the exposure have been observed in their behavior, growth, development, among others, however, information in the country continues to be scarce in relation to this problem. For that reason, the objective of this study was to evaluate the lethal and sublethal effects and changes in three biochemical contamination markers (ChE, GTS, LPO) in *Isthmohyla pseudopuma* tadpoles exposed in the laboratory to  $\beta$ -endosulfan. For this evaluation, we used lethal and sublethal concentrations, with ranges of 10 to 100  $\mu\text{g/L}$  of  $\beta$ -endosulfan. The mean lethal concentration was calculated and the total length, total weight and development of the tadpoles were measured by acute and chronic tests. In addition, we measured the biomarkers cholinesterase, glutathione S-transferase and lipid peroxidation in the individuals that survived to the acute test. The LC50 for this species was 123.6  $\mu\text{g/L}$ . At the concentration of 50  $\mu\text{g/L}$ , both the length and the total weight were decreased with respect to the control, also, in 30 and 50  $\mu\text{g/L}$  the individuals developed slower. The measurement of biomarkers did not determine any effect at this level. This study determined that  $\beta$ -endosulfan is toxic to a native species at concentrations  $\geq 123.6 \mu\text{g/L}$ , which is relevant since this information is scarce in the country. In addition, the results demonstrate that this insecticide has the properties to reduce the size and to delay the development in this species, which could occur with other tropical frogs, for what more tests are needed. These deficiencies indicate that in wild conditions these individuals would be more prone to depredation, desiccation, and would have less fitness, which is a way of affecting local anuran populations.

**Key words:**  $\beta$ -endosulfan, amphibians decline, sublethal effects, biomarkers, *Isthmohyla pseudopuma*.

Costa Rica abarca un territorio de 51 100 km<sup>2</sup> o lo que equivale a 5 110 000 hectáreas (has). Según el VI Censo Nacional Agropecuario 2 406 418.4 has corresponden a fincas agropecuarias que utilizan la tierra para pastos (43.4 %), bosques (30.6 %), cultivos permanentes (15.7 %), tierras de labranza (6.9 %) y otros usos (3.4 %) (INEC, 2015). El mismo estudio determinó que 64 377 fincas (82.1 %) aplican fertilizantes y 70 699 (90.1 %) utilizan plaguicidas como tecnologías de producción. Según datos del 2000 al 2012, el país presentó una tendencia al aumento en la cantidad de plaguicidas ingresados, importando en el 2012 más de 12 000 toneladas de ingrediente activo (Ramírez, de la Cruz & Bravo, 2015).

Esta alta dependencia por los plaguicidas en los tratamientos agrícolas representa un riesgo asociado para otros organismos vivos que no son el blanco de su acción biocida (Smith et al., 2007). En años recientes, la información generada en el país evidenció los efectos negativos en diferentes taxones por la exposición a los plaguicidas utilizados en actividades agrícolas (Diepens et al., 2014; Mena et al., 2014, Méndez et al., 2016). Datos de 1977 a 2009, indican que el 98 % de plaguicidas importados eran altamente tóxicos para peces y crustáceos, mientras que 42 y 85 % eran moderada y altamente tóxicos para algas; en el caso de los anfibios, para el 26 % de todo el periodo de análisis no hubo información disponible de toxicidad, sin embargo, del 2000 al 2009 el 49 % del total importado se consideró altamente tóxico para este grupo (de la Cruz, Bravo-Durán, Ramírez & Castillo, 2014).

La contaminación con plaguicidas se considera, como una de las causas globales de los eventos de pérdida de anfibios (Lehman & Williams, 2010). Sin embargo, la destrucción del hábitat, las enfermedades infecciosas emergentes, el cambio climático, la radiación ultravioleta y las especies exóticas, son factores de alta cuota en este problema, incluso actuando en combinación entre ellos o con los biocidas (Alford, 2010). A pesar de lo trascendental del tema, la información generada en el trópico (donde ocurrió el 49 % de las declinaciones de especies) sobre el efecto de los plaguicidas en los anfibios ha sido muy limitada (Schiesari, Grillitsch & Grillitsch, 2007). El caso específico de Costa Rica es una tendencia similar, aunque recientemente se evidenció como el fungicida clorotalonil, de amplio uso en el país, tiene efectos mortales y crónicos en tres especies de ranas (Méndez et al., 2016). De igual manera, Johnson, Welch & Whitfield (2013) y Ghose, Donnelly,

Kerby & Whitfield (2014) observaron una susceptibilidad de larvas de *Agalychnis callidryas* al clorotalonil y el endosulfan. Estos antecedentes demuestran lo necesario que es determinar las consecuencias por la exposición a plaguicidas (de alta relevancia por sus características) para los anfibios locales.

Estudios llevados a cabo en las áreas silvestres protegidas Volcán Barva, Volcán Poás y Volcán Turrialba, obtuvieron en muestras de agua, suelo y aire, residuos de los plaguicidas clorotalonil, dactal, pendimetalin y endosulfan, los cuales fueron transportados largas distancias por el viento desde sus sitios de aplicación y depositados con la lluvia y la neblina en estos lugares de mayores alturas y hábitats de anfibios (Daly et al., 2007; Shunthirasingham et al., 2011). En el caso del endosulfan, este es un insecticida organoclorado de amplio espectro, cuyo grado técnico se compone de 70 % del isómero  $\alpha$ -endosulfan (más volátil) y de 30 % de  $\beta$ -endosulfan (más persistente), ambos con alta afinidad por el suelo, sin embargo no tienen alta movilidad en él, es por ello que puede alcanzar el agua superficial durante eventos de escorrentía pero adherido a partículas de sedimento (EPA, 2012). Su principal producto degradado es el sulfato de endosulfan, el cual se puede encontrar en el ambiente (Bejarano, 2009). Este insecticida puede llegar a la atmósfera durante las aspersiones y moverse en el aire con las partículas de polvo (EPA, 2012).

En Costa Rica el endosulfan se utilizaba en cultivos de café, chile, brócoli, coliflor, papa, tabaco, algodón, arroz y frutas como fresa, piña, melón y tomate (Ramírez-Muñoz, 2009). Sin embargo, debido a su alta persistencia en el ambiente, alto potencial de transporte a largas distancias, alta toxicidad a organismos acuáticos y mamíferos, tendencia a bioacumularse y riesgo a la salud humana (Bejarano, 2009), el país prohibió su utilización en todos los cultivos, excepto en el cultivo de café, para el cual se autorizó su uso por un periodo máximo de 24 meses a partir del 15 de mayo del 2014 (La Gaceta, 2015). Las características antes mencionadas motivaron la restricción del endosulfan en Europa y parte de América, incluso se propuso incluirlo en la lista de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) (Bejarano, 2009).

El endosulfan así como otros contaminantes orgánicos, son liposolubles, por lo cual se bioacumulan en tejidos del individuo (Sparling, 2010). Cuando un xenobiótico es incorporado, el organismo puede utilizar vías metabólicas de alto costo para desintoxicarse

y eliminarlo. Estas se conocen como reacciones de biotransformación (dos fases) y son mediadas por enzimas. La fase I son reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis de los contaminantes y forman grupos reactivos (hidroxilo, amino, carboxilo, epóxido, halogenuro) que de no eliminarse puede provocar daños como la peroxidación de lípidos. La fase II es de conjugación y combina al xenobiótico o sus metabolitos con sustancias endógenas, como el glutatión, para ser más fácilmente excretadas (Venturino et al., 2003). Ciertos plaguicidas también pueden alterar la actividad de la enzima colinesterasa, entre ellos los organofosforados y los carbamatos, los que actúan directamente en el sitio activo de la enzima, impidiendo la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, por lo que la neurona no retorna a su estado de reposo durante la sinapsis (Venturino et al., 2003).

El presente estudio se planteó, primero, demostrar que la exposición al  $\beta$ -endosulfan resulta en una alta mortalidad de renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma*, efecto observado con el clorotalonil en esta especie (Méndez et al., 2016). Segundo, si la exposición a concentraciones subletales se prolonga durante la etapa larval se verán afectaciones en la longitud, el peso y el desarrollo de los individuos (Johnson et al., 2013; Lavorato et al., 2013; Yu, Wages, Willming, Cobb & Maul, 2015). Tercero, demostrar la afectación en la actividad de las enzimas colinesterasas (ChE) y glutatión S-transferasa (GST), así como el nivel de peroxidación de lípidos (LPO), estos biomarcadores son indicadores tempranos de contaminación al ser inhibidos o inducidos por el plaguicida (Ballesteros et al., 2009; Ezemonye & Tongo, 2010b). Por este motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos letales, subletales y cambios en tres marcadores bioquímicos de contaminación (ChE, GTS, LPO) en renacuajos de *I. pseudopuma* expuestos en laboratorio al  $\beta$ -endosulfan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Especie de estudio:** *Isthmohyla pseudopuma*, Günter 1901, es conocida como rana de potrero. Los machos adultos presentan longitudes de 37-45 mm y las hembras de 41-52 mm. Se reproducen de manera explosiva durante la época lluviosa, de mayo a diciembre aproximadamente. Las masas de huevos son depositadas a la vegetación circundante de

pozas temporales o permanentes y pueden contener hasta 500 huevos. Los huevos eclosionan a las 24 h y los renacuajos alcanzan longitudes máximas de 31 mm en promedio. Su distribución en Costa Rica abarca las Cordilleras: Volcánica Central, Talamanca y Tilarán (1 120-2 340 msnm) y también se le puede encontrar en Panamá (Savage, 2002).

Históricamente se consideró como una rana común y abundante en las zonas donde habitaba (Crump, 1989), aunque existe un reporte de disminución en sus poblaciones en La Reserva de Bosque Nuboso Monteverde en la década de los 90 (Pounds, Fogden, Savage & Gorman, 1997). En la actualidad se considera de preocupación menor y estable según la UICN (Solís et al., 2008). En las partes medias y altas de la Cordillera Volcánica Central (sitios donde se realizaron las colectas de huevos para este estudio) se considera una rana común y es muy probable que se beneficiara por la disponibilidad de hábitat a partir de la disminución poblacional o pérdida de otras especies (Abarca, 2012).

**Colecta de los individuos y mantenimiento en el laboratorio:** Se recolectaron tres masas de huevos de una poza natural localizada en el distrito de Los Ángeles de San Rafael de Heredia (10.07603 N y 84.07706 W), sitio que se encuentra a 1 923 msnm. En este cuerpo de agua se midieron las variables ambientales: temperatura del agua (17.8-26.2 °C), conductividad (33.57-41.3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), oxígeno disuelto (2.36-3.55 mg/L) y el pH (5.31-8.06). Los huevos colectados se transportaron en contenedores plásticos con agua del sitio hasta el laboratorio y se depositaron en peceras de vidrio de 15 L. Una vez eclosionados, todos los renacuajos se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante al menos una semana antes de cada ensayo. Se alimentaron *ad libitum* cada dos días con hojuelas enriquecidas con espirulina de marca Tetra Veggie (Tetra). Las pruebas se iniciaron con renacuajos en estadios de 25-27 (Gosner, 1960). Cabe destacar que aquellos individuos no utilizados en las pruebas, se devolvieron a las pozas donde se colectaron. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (Ecotox) del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional de Costa Rica (UNA).

**Efectos letales:** Este ensayo se llevó a cabo para determinar la Concentración Letal media (CL50) del  $\beta$ -endosulfan y cuantificar la actividad de biomarcadores de efecto. Para

ello se realizó un ensayo estático de 96 horas de duración, donde se utilizaron las concentraciones 20, 40, 60, 80, 100 y 200  $\mu\text{g/L}$  del plaguicida. Además, se utilizó un control negativo (agua filtrada) como referencia, donde los individuos no estaban expuestos al plaguicida y también se aplicó un control solvente (acetona), utilizado para descartar un efecto del solvente utilizado para disolver el endosulfan en el agua, la acetona se agregó en un volumen igual al utilizado en el tratamiento 200  $\mu\text{g/L}$ , ya que el plaguicida estaba disuelto en acetona. Las soluciones de exposición se prepararon mediante la adición de una alícuota (tomada con microjeringa) de una solución madre al medio de exposición (agua UV). Esta solución madre (984.57  $\mu\text{g/ml}$ ) se preparó a partir de endosulfan puro al 99 % (Dr. Ehrenstorfer) disuelto en acetona al 99.8 % (JT Baker).

Los renacuajos se expusieron individualmente en recipientes de vidrio con 500 ml de la solución de exposición. Para cada tratamiento se establecieron nueve réplicas y los renacuajos fueron distribuidos aleatoriamente entre los tratamientos y las réplicas. Los organismos no fueron alimentados durante el ensayo y cada 24 horas se revisó la mortalidad de la prueba; aquellos individuos muertos se descartaban del ensayo y se trataban como desecho tóxico. Al final del experimento todos los sobrevivientes se sacrificaron y se desecharon.

**Efectos crónicos:** Se evaluaron los efectos crónicos como diferencias en el peso corporal, la longitud total y el estadio de desarrollo de renacuajos expuestos a concentraciones subletales de  $\beta$ -endosulfan, utilizando para ello, una balanza analítica, una regla milimétrica y la clasificación de Gosner (1960) para los estadios de desarrollo, respectivamente. Estas variables se registraron semanalmente desde el inicio del ensayo y hasta que los renacuajos del control negativo llegaron a la etapa 42 o murieron, lo cual marcó el final del experimento. Se utilizaron las concentraciones de 10, 20, 30 y 50  $\mu\text{g/L}$  del insecticida, más los controles negativo y el solvente, cada tratamiento tuvo nueve repeticiones. Las soluciones de exposición se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior. Durante la prueba, los renacuajos se alimentaron tres veces por semana con 15 mg de TetraVeggie/individuo aproximadamente. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente y fue semiestático, lo que quiere decir que una vez a la semana, los 500 ml de cada solución de exposición se cambiaron por una nueva solución

con la misma concentración. Esto para tratar la posible pérdida de plaguicida por evaporación, acumulación, descomposición u otras razones. Los recipientes también se cambiaron durante el recambio de la solución de exposición.

**Biomarcadores:** Para determinar los posibles efectos bioquímicos producidos por el  $\beta$ -endosulfan, se tomaron los renacuajos que sobrevivieron una vez transcurridas las 96 horas de exposición del ensayo agudo y se sacrificaron por decapitación, posterior a ello se les extrajo el hígado para evaluar un cambio en la actividad de la GST y el nivel de LPO. También, se tomó la cola con el fin de evaluar un cambio en la actividad de la ChE en músculo. El método para estas cuantificaciones se hizo siguiendo a Mena et al. (2014). Primero, se homogenizaron las muestras de hígado y de músculo por sonicación en frío a 1:5 w/v, en presencia de 700  $\mu$ L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 100 mM con un pH de 7.4 para el hígado y de 7.2 para el músculo. El contenido de proteína se midió en todas las muestras mediante el método de Bradford (1976), usando  $\gamma$ -globulina bovina como estándar.

Se tomaron 250  $\mu$ L del homogenizado del hígado para analizar la LPO y se agregó 0.2 mM de butilhidroxitolueno (BHT) para evitar la oxidación de los lípidos. El resto del homogenizado se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para medir la actividad de la conjugación GST, la cual se midió usando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzoceno (CDNB), según el método de Habig, Pabst & Jakoby (1974). La mezcla de reacción se hizo en microplacas y contenía 200 mM de buffer de fosfato (pH= 6.5), 1 mM de CDBN y 1 mM de glutatión reducido (GSH). Esta reacción se basa en la conjugación del GSH a un sustrato CDBN por parte de la GST. La formación del conjugado S-2, 4-dinitrofenilo-glutatión se evaluó siguiendo el aumento en la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en el lector de microplacas y se expresó como nmol/min/mg de proteína.

El nivel LPO se midió mediante el ensayo de especies reactivas tiobarbitúricas (TBARS), lo cual mide la producción de malonaldehído (MDA) que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (Oakes & Van Der Kraak, 2003). La medición de TBARS se llevó a cabo siguiendo el método de Mena et al. (2014). Para la mezcla de reacción se añadió al homogeneizado del hígado 1 ml de ácido tricloroacético al 12 % (TCA), 0.8 ml de 60 mM Tris-HCl (pH= 7.4) con ácido dietileno triaminopentaacético (DTPA) a 0.1 mM y 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.73 %. Después, la mezcla se pasó a un baño de incubación

por 60 minutos a 100 °C. Posteriormente, la solución se centrifugó a 11 500 rpm durante cinco minutos y se determinaron los niveles de LPO a 535 nm, utilizando un espectrofotómetro Genesys Termo 20, lo que se expresó como nmol de TBARS por mg de proteína.

Las muestras homogenizadas del músculo se centrifugaron a 10 000 rpm durante cinco minutos. La actividad de la ChE se determinó mediante una modificación del método de Ellman, Courtney, Andres & Featherstone (1961) en presencia de 1 mM de acetiltiocolina y 0.1 mM de ácido 5,5' ditiobis-2-dinitrobenzoico (DTNB). El aumento de la absorbancia se midió a 415 nm en el lector de microplacas y se expresó como nmol/min/mg de proteína.

**Cuantificación de las concentraciones reales de los tratamientos con plaguicida:** Para obtener las concentraciones reales del plaguicida a las cuales se expusieron los individuos, tanto las utilizadas al inicio cómo al final del ensayo agudo y al inicio y después de siete días durante el ensayo crónico, se realizaron las cuantificaciones de los diferentes tratamientos. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP) del IRET-UNA. Al momento de la preparación de la solución de exposición en los 5 L y al final de los siete días de exposición, se tomó una muestra de  $\pm 20$  ml de los diferentes tratamientos en tubos de ensayo de 25 ml prepesados, los mismos se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

*Extracción líquido-líquido:* Previo a la extracción, el tubo con la muestra se temperó y se pesó. Posterior a ello, se agregaron 2 ml de hexano (SupraSolv®) al 98 % y 3 g de cloruro de sodio (para ayudar a la separación) y se agitó manualmente por dos minutos hasta obtener la separación del agua y el hexano, esta última fase se recogió en un tubo de concentración. La extracción con el hexano se hizo dos veces. Una vez obtenidos los  $\pm 4$  ml de hexano, se centrifugaron los tubos a 3 000 rpm por cinco minutos, para lograr una mejor separación. Seguidamente, se recogió la fase con hexano en tubos de concentración prepesados.

*Concentración:* En la siguiente parte del método, se concentró el extracto mediante una corriente de nitrógeno hasta obtener una gota aproximadamente. Luego se agregó 1 ml de isooctano (Merck, SupraSolv®) y se pasó nuevamente por la corriente hasta llegar a una



gota. Posterior a ello se agregó de nuevo 1 ml de isooctano y se trasvasó a frascos de inyección. Los extractos fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Para la cuantificación, se elaboró una curva de calibración externa del  $\beta$ -endosulfan.

**Análisis estadístico:** Se calculó la concentración letal media con intervalos de confianza al 95 % (IC 95%) para analizar la mortalidad a las 96 horas de los renacuajos expuestos al  $\beta$ -endosulfan. Esto se hizo mediante una regresión Probit de variables binomiales, utilizando el software IBM® SPSS® Statistics 22.

Para determinar los efectos del  $\beta$ -endosulfan en la longitud total, el peso corporal y el estado de desarrollo de los renacuajos, se utilizaron modelos lineales de efectos mixtos (LMMs por sus siglas en inglés) según lo sugerido por Cox (2010). La longitud total, el peso corporal y el estado de desarrollo se especificaron como las variables respuesta. Los diferentes tratamientos se especificaron como el factor fijo y el número de individuos como el efecto aleatorio para tener en cuenta las medidas repetidas en cada renacuajo. Durante el análisis, las variables se clasificaron como significativas si los intervalos de confianza no traslaparon el cero (el cual representa al control negativo).

Además, se construyeron modelos lineales para evaluar el efecto del  $\beta$ -endosulfan en cada biomarcador. Los modelos se compararon a un modelo nulo (el cual hipotetiza una diferencia de 0) y se clasificaron de acuerdo a su Criterio de Información de Akaike ajustado para muestras de tamaños pequeños (AICc por sus siglas en inglés). Cuando se detectó un efecto del tratamiento, se realizaron modelos promediados por el tamaño del efecto (Mazerolle, 2014), esta es una alternativa de información teórica para comparaciones múltiples (por ejemplo, Burnham, Anderson & Huyvaert, 2011). Las variables respuesta que no presentaban normalidad se les realizó una transformación logarítmica.

Los análisis de los efectos crónicos y biomarcadores fueron hechos en R, versión 3.1.2 (R Development Core Team 2014), utilizando el paquete “lme4” (Bates, Mächler, Bolker & Walker, 2014) para los LMMs, y el paquete “AICcmodavg” para calcular AICc y los modelos promediados por el tamaño del efecto (Mazerolle, 2014).

## RESULTADOS

**Efectos letales:** El valor de CL50 a las 96 horas fue de 123.6  $\mu\text{g/L}$  (95 % IC: 111.3, 135.9). No se dio mortalidad de individuos en el control negativo ni en el control solvente, además, en 20  $\mu\text{g/L}$  y en 40  $\mu\text{g/L}$  no se observaron muertes. En las concentraciones 60 y 80  $\mu\text{g/L}$  murió un individuo a las 24 horas y otro a las 72 horas en cada una, para un 22 %. Por su parte, en el tratamiento 100  $\mu\text{g/L}$  murieron dos individuos a las 24 horas y uno a las 72 horas, alcanzando un 33 %. Finalmente, el tratamiento 200  $\mu\text{g/L}$  fue el que presentó mayor pérdida, ya que murieron cuatro renacuajos a las 24 horas, dos a las 48 horas y uno más a las 96 horas, representando un 77 % de muertes (Fig. 2.1).

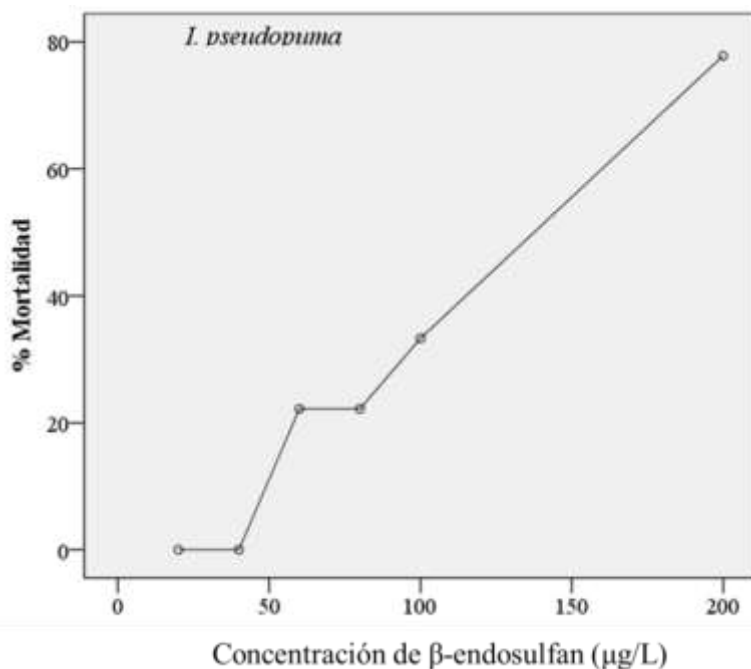


Figura 2.1. Mortalidad en renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* a las 96 h de exposición a  $\beta$ -endosulfan

**Efectos subletales:** Se encontraron diferencias entre los controles negativo y solvente, en las variables de longitud total y peso corporal, por lo que el análisis de las comparaciones se hicieron versus control solvente (se descartó el control negativo). En el caso del estadio de desarrollo no se encontró diferencia entre controles.

Los renacuajos del control negativo alcanzaron el estadio 42 a las ocho semanas con un 100 % de sobrevivencia, lo que correspondió con la duración de la prueba. Los resultados de las variables tuvieron un patrón dosis-respuesta, ya que las concentraciones altas fueron las que presentaron mayor efecto en sus valores. Tanto en longitud total como en el peso corporal (Fig. 2.2) los individuos del tratamiento 50  $\mu\text{g/L}$  presentaron una respuesta negativa con respecto al control. En el caso del estado de desarrollo, los tratamientos 20  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$  y el control solvente no fueron afectados por el plaguicida (todos los valores sobrelaparon el valor cero), pero las concentraciones 30  $\mu\text{g/L}$  y 50  $\mu\text{g/L}$  sí se afectaron negativamente (Fig. 2.2).

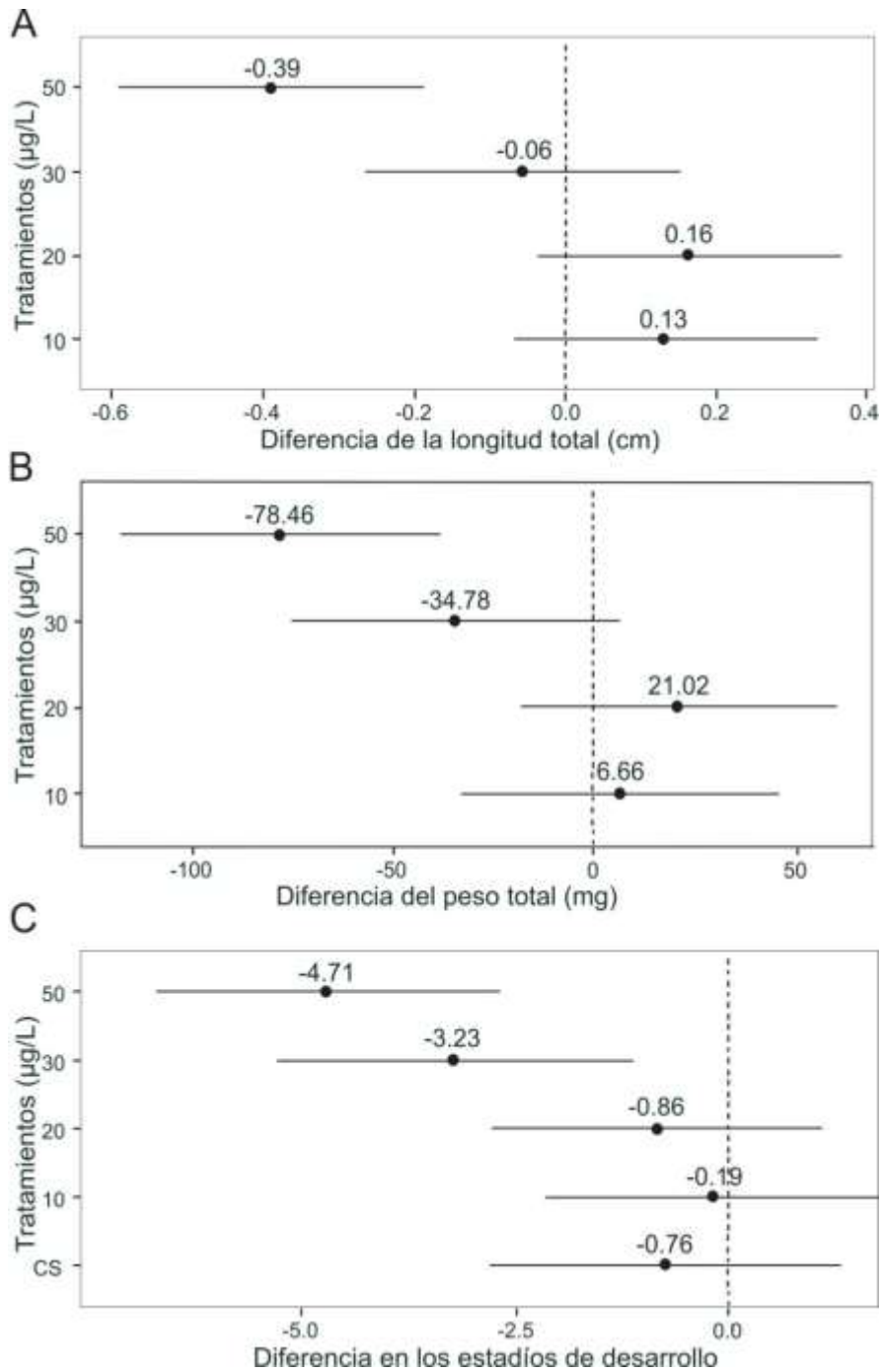


Figura 2.2. Estimaciones de la longitud total (A), el peso total (B) y el estadio de desarrollo (C) en renacuajos de *Isthmohyla pseudopopuma* expuestos a cuatro concentraciones subletales de  $\beta$ -endosulfan. Los valores ( $\pm$  95 % IC) que no contemplan el cero representan un efecto debido a la concentración del plaguicida con respecto al control negativo. CS= control solvente.

**Biomarcadores:** La selección del mejor modelo comprobó que en las mediciones de los tres biomarcadores no se presentó un efecto por los tratamientos con plaguicida (Cuadro 2.1), en ninguna comparación de las concentraciones del plaguicida se obtuvo diferencia contra el control negativo (Fig. 2.3).

Cuadro 2.1. Modelos lineales candidatos para los biomarcadores GST, LPO y ChE medidos en *Isthmohyla pseudopuma*. Con su respectivo modelo nulo y modelo tratamiento, número de parámetros ( $K$ ), valores del Criterio de Información de Akaike (AICc), diferencia en AICc respecto al mejor modelo ( $\Delta$ AICc) y pesos de AICc ( $w$ ).

<b>Modelo</b>	<b><math>K</math></b>	<b>AICc</b>	<b><math>\Delta</math>AICc</b>	<b><math>w</math></b>
LPO-1	2	38.35	0.00	1
LPO tratamiento	8	54.13	15.78	0
GST-1	2	18.5	0.0	1
GST tratamiento	8	37.69	19.2	0
ChE-1	8	408.39	0.00	1
ChE tratamiento	2	440.24	31.85	0

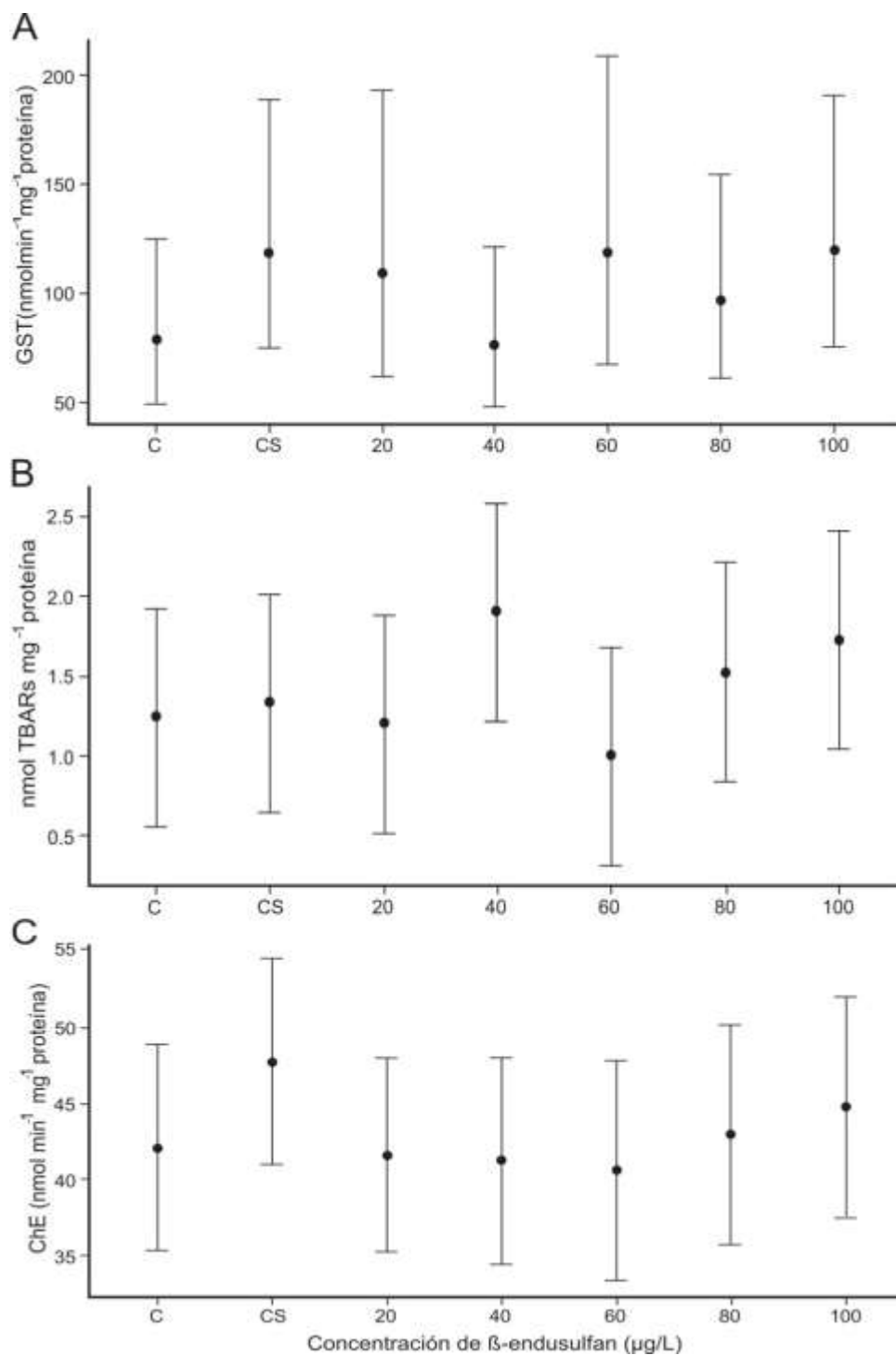


Figura 2.3. Actividad de la GST (A) y nivel de LPO (B) en hígados y actividad de ChE (C) en colas de renacuajos de *Isthmohyla pseudopuma* expuestos a concentraciones subletales de  $\beta$ -endosulfan. Las barras representan las medias  $\pm$  95 % IC para cada tratamiento. C= control negativo, CS= control solvente.

## DISCUSIÓN

El  $\beta$ -endosulfan es un insecticida mortal para las etapas tempranas de *I. pseudopuma* a concentraciones  $\geq 123.6 \mu\text{g/L}$  ( $\pm 111.3, 135.9$ ), además reduce el tiempo de desarrollo y el crecimiento en renacuajos expuestos por un periodo prolongado. Aunque se han observado efectos similares con otros anuros, los resultados demuestran el impacto que puede ocasionar el plaguicida y las consecuencias que pudo o pueden tener relación con los declives de poblaciones locales de ranas.

**Efectos letales:** El valor de CL50 para *I. pseudopuma* es un resultado relevante de mortalidad causada por  $\beta$ -endosulfan, ya que existe poca información acerca de los efectos tóxicos de este químico con especies silvestres nativas de Costa Rica y para todo el trópico (Ghose et al., 2014). Johnson et al. (2013) reportaron un valor de 3.26-8.67  $\mu\text{g/L}$  para *A. callydrias*, pero se utilizó un formulado del plaguicida y no el ingrediente activo como en el presente estudio. En otras regiones se han estudiado los efectos en especies que resultaron ser más sensibles al insecticida (Agostini, Natale & Ronco, 2009; Brunelli et al., 2009; Jones, Hammond & Relyea, 2009; Sparling & Fellers, 2009; Lavorato et al., 2013), sin embargo, la sensibilidad comúnmente es un dato variable en pruebas con plaguicidas (Boone & James 2003; Baker, Bancroft & Garcia, 2013), siendo unas más o menos resistentes a diferentes concentraciones. Por lo que no es recomendable asumir los mismos valores de concentraciones letales para diferentes especies. La CL50 registrada en este estudio está por encima de algunos reportes de concentraciones ambientales para el país (Ramírez-Muñoz, 2009; Shunthirasingham et al., 2011). Con relación a esto, la cantidad del plaguicida que llega al ambiente podría ser mayor y dispersarse a diferentes matrices, donde es degradado o bioacumulado (Barron, 2003; Harrison, Harrad & Lead, 2003), y debido a estos procesos una medición puntual puede no ser el total dispersado.

Los datos obtenidos por Daly et al. (2007) demostraron que el endosulfan se movió hasta las montañas por la acción de los vientos y se dispersó a diferentes matrices probablemente. En relación con esto, debido a los ciclos de vida de los anfibios, es probable que se dé un contacto directo con el aire, el agua o el sedimento contaminado en alguna de sus etapas (Smith et al., 2007; Sparling, 2010) y se expongan incluso a concentraciones más

altas que las reportadas. La exposición y los efectos también podrían ocurrir en etapas terrestres, así se demostró con *Bufo regularis* cuando se obtuvo una CL50 de 0.730 mg/L en adultos expuestos a endosulfan, (Ezemonye & Tongo, 2010a). De igual manera, muestras de tejidos de adultos de *Hyla regilla* en California presentaron niveles detectables del endosulfan y de endosulfan sulfato (Sparling, Fellers & McConnell, 2001). Cabe señalar que el riesgo de exposición aumenta para aquellas especies que se encuentran cerca de los sitios de aplicación (Brühl, Schmidt, Pieper & Alscher, 2013) y donde las concentraciones ambientales incluso podrían ser más altas.

Para este ensayo las cuantificaciones de las concentraciones reales estuvieron distantes de las nominales (Anexo 1), sin embargo, a pesar de la baja recuperación de la sustancia, los efectos en la mortalidad fueron evidentes. Con estos datos se podría pensar que dichos efectos se dieron a menores concentraciones del plaguicida que las nominales reportadas. No obstante es un dato que se debe manejar con cuidado, ya que no es claro el motivo de la pérdida del  $\beta$ -endosulfan. Debido a que la cuantificación se trató de muestras que no habían estado en contacto con el animal, la pérdida del compuesto pudo darse por distintos factores, ya sea cierta afinidad con las paredes de los instrumentos utilizados durante la preparación (Escher & Hermens, 2004), por descomposición del compuesto o pérdida en algún paso del mismo método empleado en la cuantificación.

**Efectos crónicos:** Esta investigación determinó que después de un periodo prolongado de exposición a concentraciones subletales de  $\beta$ -endosulfan, tanto la longitud total, el peso corporal y el desarrollo de los renacuajos se vieron afectados negativamente. Estos hallazgos demuestran que este insecticida tiene las propiedades para reducir el tamaño y retrasar el desarrollo en especies del trópico. Efectos comparables se han encontrado con *A. callidryas*, especie local (Johnson et al., 2013) y con anuros de otras latitudes, por ejemplo *Limnodynastes peroni* (Broomhall, 2004), *Pseudacris regilla* y *Rana boylei* (Sparling & Fellers, 2009), *Bufo bufo* (Brunelli et al., 2009), *Rana dalmatina* (Lavorato et al., 2013) y *Xenopus laevis* (Yu et al., 2015).

Los resultados presentes determinaron con más precisión los efectos a partir de una prueba durante un amplio periodo de la metamorfosis de *I. pseudopuma*, por lo que la exposición a un mayor tiempo es un buen indicador. Con otras especies se observaron los



efectos por periodos de cuatro o más días después de traspasar los renacuajos en agua sin endosulfan, esto para demostrar los efectos acumulativos, lo que resultó en mortalidad de los individuos (Jones et al., 2009), en alteraciones del comportamiento (Bernabo et al., 2013) y en aumento de la vulnerabilidad a la depredación (Broomhall & Shine, 2003).

La obtención de menores tamaños de los renacuajos expuestos de *I. pseudopuma* es un efecto directo del plaguicida, ya que es probable que se les haya dificultado consumir el alimento suministrado. Aunque no se evaluó en este trabajo, una menor tasa de alimentación (Broomhall, 2004), las deformaciones corporales, incluida la boca (Brunelli et al., 2009), así como las irregularidades en el comportamiento de nado (Bernabo et al., 2013; Donoël et al., 2013), son efectos presentados después de periodos de exposición al endosulfan. Estas alteraciones consecuentemente repercuten en la capacidad de alimentación y en la obtención de energía necesaria para el crecimiento (Broomhall & Shine, 2003; Rohr et al., 2003; Mann, Hyne, Choung & Wilson, 2009). A la vez, se suma un efecto por el estrés generado durante la desintoxicación, lo que repercute en el tamaño (Egea-Serrano, Relyea, Tejedo & Torralva, 2012).

También, después del periodo prolongado de exposición al endosulfan se obtuvo un retraso en el desarrollo de los individuos de *I. pseudopuma*, lo cual se puede vincular con una disfunción de la glándula tiroides. Este efecto también fue observado con *B. bufo* a una concentración de 0.05 y 0.1 mg endosulfan/L y se relacionó con una alteración de la tiroides provocada por el insecticida (Brunelli et al., 2009). Fort et al. (2000) ya habían observado que después de exponer renacuajos de *X. laevis* por 14 días a 0.05 mg endosulfan/L, se produjo una inhibición de la reabsorción de la cola y una disminución en la producción de la hormona triyodotironina ( $T_3$ ), la forma activa de la tiroxina ( $T_4$ ), ambos procesos vinculados durante la metamorfosis de los anfibios. Aunque el mecanismo por el cual los plaguicidas intervienen en los procesos endocrinos de la metamorfosis no es del todo claro, algunas evidencias observadas después de periodos de exposición son la inhibición de la síntesis de la  $T_4$  o la  $T_3$  y de la enzima que convierte la  $T_4$  en  $T_3$  (5-deiodinasa), así como cambios morfológicos de la glándula, la conjugación de los contaminantes con los receptores de las hormonas en los tejidos diana y afectación en la expresión de los genes de los receptores, entre otros (Miyata & Keiko, 2012). En el caso del

endosulfan, se necesitan más estudios que evalúen la forma en que afecta el proceso de la metamorfosis.

Con lo obtenido en esta investigación, es posible argumentar que las deficiencias observadas provocan que los individuos sean menos aptos para sobrevivir, lo que en consecuencia podría incidir en las poblaciones locales de anuros. El retraso en el desarrollo resulta en un periodo más prolongado de la etapa larval y tanto los renacuajos, los metamorfos y los juveniles se exponen por más tiempo a ser depredados (Baker et al., 2013) y a sequías o disminuciones de los niveles de agua, lo que podría ser mortal para los individuos (Sparling & Fellers, 2009). Aún si los renacuajos expuestos a la contaminación alcanzaran la etapa adulta y la madurez sexual, la menor longitud y menor peso logrado durante el desarrollo, podría reducir su éxito reproductivo, fecundidad y sobrevivencia (Boone & Semlitsch, 2002; Linder, Lehman & Bidwell, 2010; Egea-Serrano et al., 2012; Lavorato et al., 2013). Situación que se agrava por las deformaciones y los comportamientos anormales en los individuos expuestos (Mann et al., 2009), los cuales también son efectos observados con el endosulfan.

Es importante resaltar que el control solvente (acetona), produjo una diferencia de la longitud y el peso con respecto al control negativo (para lo cual se hizo la corrección correspondiente en el análisis). Sin embargo, no se tiene una explicación para este resultado ni se encontró alguna referencia con respecto al endosulfan. Por lo tanto, se recomienda para futuros estudios probar otros solventes, aunque un posible efecto puede variar según la especie de estudio. Marquis, Millery, Guittonneau & Miaud (2006) recomiendan, a partir de sus resultados con *Rana temporaria*, utilizar acetona en concentraciones menores a 0.01ml/L para disolver Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's), mientras Donoël et al. (2013) y colaboradores utilizaron etanol como solvente del endosulfan y no observaron efecto negativo alguno.

En el caso de la cuantificación de las concentraciones reales de las muestras, hubo pérdida del plaguicida por más del 80% en muestras iniciales (Anexo 1), para lo cual no es claro la razón, sin embargo, es una posibilidad que las concentraciones a las que se observaron los efectos sean menores. Para las concentraciones reales de las muestras finales, también hubo un alto porcentaje de pérdida (Anexo 1), pero era un dato esperado, ya que el plaguicida al estar en contacto el animal y por siete días, pudo ingresar en el

cuerpo del renacuajo, absorberse con la materia orgánica, como heces y restos de comida (Escher & Hermens, 2004), también pudo evaporarse o descomponerse. Cabe resaltar la recuperación del endosulfan sulfato, el cual es un metabolito también considerado tóxico.

**Biomarcadores:** En esta investigación se hizo una evaluación de la GST, la ChE y LPO, como un complemento a las pruebas agudas y crónicas, sin embargo, no hubo evidencia de alteración bioquímica. Los biomarcadores se utilizan ya que son indicadores tempranos de contaminación, incluso una alteración se observa antes que se manifieste un efecto morfológico en el individuo o daño en la población.

En los anfibios no es común la desintoxicación mediante la fase I o llamada fase de biotransformación, en la que el metabolismo del xenobiótico se relaciona con la formación de especies reactivas del oxígeno generadas por el mismo estrés oxidativo. En este proceso operan las enzimas de función mixta, como el Citocromo P450, las que se encargan de transformar el agente exógeno, sin embargo, para los anfibios se conoce una baja actividad de este conjunto de enzimas (Venturino et al., 2003; Sparling, 2010). En el caso específico de *I. pseudopuma*, no hubo diferencia de los niveles de LPO. Con el endosulfan se tienen antecedentes de aumento del nivel de LPO en diferentes tejidos del pez de agua dulce *Channa punctatus*, después de exponerse por 24 horas al insecticida (Pandey et al., 2001) y en este caso, el aumento se relacionó con daños provocados por el estrés oxidativo.

La GST es una enzima involucrada en el proceso de desintoxicación de los contaminantes, ya que al conjugarse el xenobiótico o sus metabolitos con el glutatión endógeno, los hace hidrosolubles para ser fácilmente desechados (Venturino et al., 2003). No obstante, para *I. pseudopuma* no hubo respuesta en este biomarcador, probablemente no fue un mecanismo de desintoxicación utilizado por los individuos expuestos. No obstante, se tienen antecedentes de aumento en la actividad de esta enzima en renacuajos de *Bufo regularis* en presencia del endosulfan (Ezemonye & Tongo, 2010b). La literatura también indica un incremento de la GST en la especie local *S. baudinii* en presencia de clorotalonil (Méndez et al., 2016). Por el contrario, con el insecticida clorpirifos, se observó una inhibición de la actividad de la enzima en la rana *Lysapsus limellium* (Attademo et al., 2015).

Por su parte, la medición de la actividad de la ChE en muestras de músculo (cola) de *I. pseudopuma*, no mostró una alteración causada por el endosulfan. Empero, la exposición a este insecticida sí se ha relacionado a una inhibición en la actividad de la colinesterasa en cerebro (Maynard et al., 2012) y en músculo (Ballesteros et al., 2009) de peces. Lo anterior a pesar de que el endosulfan no pertenece al grupo de los compuestos organofosforados (Of) y carbamatos (Cb), los cuales sí tienen un efecto negativo para esta enzima en los anfibios y otros grupos (Sparling et al., 2001; Venturino et al., 2003). Aun así, la información para los anfibios es escasa y se ha supuesto que el endosulfan no es inhibidor de la ChE, sin embargo, es necesario aportar evidencia para asumir un criterio con este plaguicida. En el caso de *I. pseudopuma*, como recomendación se podría ampliar el tiempo de exposición a más de 96 horas, analizar otros tejidos (Attademo et al., 2015) y evaluar los productos formulados.

Debido a los eventos de declinación de anfibios ocurridos en Costa Rica, se deben estudiar más rigurosamente las posibles causas, entre estas la contaminación, ya que la exposición a los plaguicidas puede repercutir en los organismos y posiblemente en una población. Esta investigación demuestra las consecuencias para una especie de anfibio local al exponerse tanto a concentraciones letales como subletales del  $\beta$ -endosulfan. Por lo tanto, la recomendación es continuar esta línea de investigación, además de buscar y ser constantes en alternativas dentro de las prácticas agrícolas que causen menos impactos a los anfibios en general.

## REFERENCIAS

- Abarca, J. G. (2012). Cambios en la estructura de la comunidad de anuros (Amphibia: Anura) en el Cerro Chompipe, Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 4(1), 9-15.
- Alford, R. A. (2010). Declines and the global status of amphibians. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK. (eds) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 13-45 pp

- Agostini, M.G., Natale, G.S. & Ronco, A. E. (2009). Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *International Journal of Environment and Health*, 3(4), 379-389.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M., Junges, C. M., Lorenzatti, E., Aró, C. & Grenón P (2015). Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 287-294.
- 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. *STOTEN*, 449,150-156.
- Ballesteros, M. L., Durando, P. E., Nores, M. L., Díaz, M. P., Bistoni, M. A. & Wunderlin, D. A. (2009). Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*, 157, 1573-1580.
- Barron, M. G. (2003). Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms. En: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. & Cairns, J. (eds) Handbook of ecotoxicology. Second edition. CRC Press LLC, USA. 877-892 pp
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M. & Walker SC (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*
- Bejarano, G. F. (2009) El endosulfan y sus alternativas en América Latina. RAPAL, IPEN, RAPAM. México. 148 p
- Bernabò, I., Guardia, A., La Russa, D., Madeo, G., Tripepi, S. & Brunelli, E. (2013). Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquatic Toxicology*, 142-143, 164-175.
- Boone, M. D. & Semlitsch, R. D. (2002). Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications*, 12(1), 307-316.
- Boone, M. D. & James, S. M. (2003). Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. *Ecological Applications*, 13(3), 829-841.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Broomhall, S. & Shine, R. (2003). Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 221-226.
- Broomhall, S. D. (2004). Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 105-113.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonaccia, A. & Tripepi, S. (2009). Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behavior in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 9, 135-142.
- Brühl, C., Schmidt, T., Pieper, S. & Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated caused of global decline? *Scientific Reports*, 3, 1135.
- Burnham, K. P., Anderson, D. R. & Huyvaert, K. P. (2011). AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations and comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 23-25.
- Cox, S. B. (2010). Statistical models in wildlife toxicology. En: Kendall, R. J., Lacher, T. E., Cobb, G. P. & Cox, J. P. (eds) *Wildlife toxicology: emerging contaminant and biodiversity issues*. CRC Press. Florida, USA. 173-195 pp
- Crump, M. L. (1989). Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia*, 3, 794-797.
- Daly, G. L., Lei, Y. D., Teixeira, C., Muir, D.C.G., Castillo, L. E. & Wania, F. (2007). Accumulation of current-use pesticides in neotropical montane forests. *Environmental Science & Technology*, 41, 1118-1123.
- de la Cruz, E., Bravo-Durán, V., Ramírez, F. & Castillo, L. E. (2014). Environmental hazards associated with pesticide import into Costa Rica, 1977-2009. *Journal of Environmental Biology*, 35(1), 43-55.

- Denoël, M., Libon, S., Kestemont, P., Brasseur, C., Focant, Jean-François & De Pauw, E. (2013). Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: A video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere*, *90*, 945-951.
- Diepens, N. J., Pfennig, S., Van den Brink, P. J., Gunnarsson, J. S., Ruepert, C. & Castillo, L. E. (2014). Effect of pesticides used in banana and pineapple plantations on aquatic ecosystems in Costa Rica. *Journal of Environmental Biology*, *35*, 73-84.
- 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*(7), 1382-1397.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*, 88-95.
- EPA (2012). Reregistration eligibility decision for endosulfan. United States Environmental Protection Agency. 224 p
- Escher, B. I. & Hermens, J. L. M. (2004). Internal exposure: linking bioavailability to effects. *Environmental Science and Technology*, *45*, 455-462.
- Ezemonye, L. & Tongo, I. (2010a). Acute toxic effects of endosulfan and diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, *2*(5), 73-78.
- Ezemonye, L. & Tongo, I. (2010b). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, *81*, 214-217.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., Morgan, L. A., Miller, M. F., Clark, P. A., White, J. A., Paul, R. R. & Stover, E. L. (2000). Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*, *20*, 419-425.
- Ghose, S. L., Donnelly, M. A., Kerby, J. & Whitfield, S. M. (2014). Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *33*(9), 2114-9.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, *16*(3), 183-90.

- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Harrison, R. M., Harrad, S. & Lead, J. (2003). Global disposition of contaminants. En: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. & Cairns, J. (eds) Handbook of Ecotoxicology. Second edition. CRC Press LLC, USA. 855-876 pp
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) (2015). VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales. 1 edición. INEC. San José, Costa Rica. 146 pp.
- Johnson, L. A., Welch, B. & Whitfield, S. M. (2013). Interactive effects of pesticides mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(10), 2379-2386.
- Jones, D. K., Hammond, J. I. & Relyea, R. A. (2009). Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1939-1945.
- La Gaceta (2015). Decreto Ejecutivo N° 38834-MAG-S-MINAE-MTSS. Imprenta Nacional Costa Rica. San José, Costa Rica. 2-3 pp
- Lavorato, M., Bernabò, I., Crescente, A., Denoël, M., Tripepi, S. & Brunelli, E. (2013). Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: Quantitative developmental and behavioural analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 253-262.
- Lehman, C. M. & Williams, B. K. (2010). Effects of current-use pesticides on amphibians. En: Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A. & Krest, S. K. (eds) Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 167-202 pp
- Linder, G., Lehman, C. M. & Bidwell, J. R. (2010). Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell. En: Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A. & Krest, S. K. (eds) Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 69-103 pp



- 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.
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S. & Miaud, C. (2006). Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae. *Chemosphere*, 63, 889-892.
- Maynard, P. V., Woutheres, B. J., Wilges, K. L., Barbieri, A. M., Seemann, F. R., da Luz, O. R., Carneiro, B. T., Denise, B. C., Ryff, V. M. & Reis, B. M. (2012). Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *NeuroToxicology*, 33, 469-475.
- Mazerolle, M. J. (2014). AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package, version 2.00. <http://cran.rproject.org/web/packages/AICcmodavg/index.html>
- Mena, F., Fernández, M., Campos, B., Sánchez-Ávila, J., Faria, M., Pinnock, M., de la Cruz, E., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M. & Barata, C. (2014). Pesticide residue analyses and biomarker responses of native Costa Rican fish of the Poeciliidae and Cichlidae families to assess environmental impacts of pesticides in Palo Verde National Park. *Journal of Environmental Biology*, 35, 19-27.
- Méndez, M., Obando, P., Pinnock-Branford, M., Ruepert, C., Castillo, L. E., Mena, F. & Alvarado, G. (2016). Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21238-21248.
- Miyata, K. & Ose, K. (2012). Thyroid hormone-disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. *Journal of Toxicologic Pathology*, 25, 1-9.
- Oakes, F. D. & Van Der Kraak, V.D. (2003). Utility of TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catotomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463.
- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. & Raisuddin, S. (2001). Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 345-352.

- Pounds, J. A., Fogden, M.P.L., Savage, J. M. & Gorman, G. C. (1997). Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*, 11(6), 1307-1322.
- Ramírez-Muñoz, F. (2009). El endosulfan y sus alternativas en Costa Rica. En: Bejarano GF (ed) El endosulfan y sus alternativas en América Latina. Segundo reporte. RAP-AL, IPEN, México. 23-32 pp. [http://www.academia.edu/7505909/El\\_Endosulfan\\_y\\_sus\\_Alternativas\\_en\\_Am%C3%A9rica\\_Latina\\_Vol.\\_II](http://www.academia.edu/7505909/El_Endosulfan_y_sus_Alternativas_en_Am%C3%A9rica_Latina_Vol._II). Accesado el 07 de julio del 2016
- Ramírez, F., de la Cruz, E. & Bravo, V. (2015). Importación de plaguicidas por habitante, habitante rural, trabajador y área agrícola. Observatorio Ambiental, UNA. <http://www.observatorioambiental.una.ac.cr/index.php/indicadores-ambientales/143-importacion-de-plaguicidas-por-habitante-habitante-rural-trabajador-y-area-agricola>. Accesado el 15 de mayo del 2017
- Rohr, J. R., Elskus, A. A., Shepherd, B. S., Crowley, P. H., McCarthy, T. M. & Niedzwiecki, J. H., et al. (2003). Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the streamside salamander, *Ambystoma barbouri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2385-2392.
- Savage, J. M. (2002). Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two Continents, between two Seas. The University of Chicago Press. Chicago, Illinois, EUA. 1056 p
- Schiesari, L., Grillitsch, B. & Grillitsch, H. (2007). Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. *Conservation Biology*, 21(2), 465-471.
- Shunthirasingham, C., Guin, T., Lei, Y. D., Ruepert, C., Castillo, L. E. & Wania, F. (2011). Current-use pesticide transport to Costa Rica's high-altitude tropical cloud forest. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12), 2709-2717.
- Smith, P. N., Cobb, G. P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S. T., Rainwater, T. R. & Reynolds, K. D. (2007). Review Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution*, 150, 41-64.
- Solís, F., Ibáñez, R., Chaves, G., Savage, J., Jaramillo, C., Kubicki, B. & Bolaños, F. (2008). *Isthmohyla pseudopuma*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008:

e.T55616A11339521.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T55616A11339521.en>. Accesado el 19 de febrero del 2016

- Sparling, D., Fellers, G. & McConnell, L. (2001). Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1591-1595.
- 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(8), 1696-1703.
- Sparling, D. W. (2010). Ecotoxicology of organic contaminants to amphibians. En: Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A. & Krest, S. K. (eds) Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Second edition. CRC Press. Florida, USA. 261-288 pp
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich, de T. & Pechen, de D'Angelo (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4), 167-186.
- Yu, S., Wages, M., Willming, M., Cobb, G. P. & Maul, J. D. (2015). Joint effects of pesticides and ultraviolet-B radiation on amphibian larvae. *Environmental Pollution*, 207, 248-255.

## Anexo 1

Concentraciones reales de los tratamientos con el insecticida  $\beta$ -endosulfan. En estos datos se visualizan las muestras iniciales del ensayo agudo y las muestras iniciales y finales del ensayo crónico. Cada fila correspondiente al ensayo crónico final representa la cuantificación de las repeticiones para cada uno de los tratamientos.

Descripción de la muestra	Concentración nominal $\beta$ -endosulfan ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración real ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración $\beta$ endosulfan sulfato ( $\mu\text{g/L}$ )	Porcentaje de pérdida
Agudo Control Negativo inicial	0	n.d	n.d	n.d
Agudo 20 inicial	20	12.1	n.d	39.6
Agudo 20 inicial (D5)	20	19.7	n.d	1.3
Agudo 40 inicial	40	12.2	n.d	69.4
Agudo 40 inicial (D5)	40	19.4	n.d	51.4
Agudo 60 inicial	60	15.7	n.d	73.8
Agudo 60 inicial (D5)	60	28.1	n.d	53.2
Agudo 80 inicial	80	15.5	n.d	80.7
Agudo 80 inicial (D5)	80	29.5	n.d	63.2
Agudo 100 inicial	100	14.6	n.d	85.4
Agudo 100 inicial (D5)	100	27.7	n.d	72.3
Agudo 200 inicial	200	17.2	n.d	91.4
Agudo 200 inicial (D5)	200	33.1	n.d	83.4
Crónico Control Negativo inicial	0	n.d	n.d	n.d
Crónico 10 $\mu\text{g/L}$ inicial	10	T	n.d	T
Crónico 20 $\mu\text{g/L}$ inicial	20	2.4	n.d	87.8
Crónico 30 $\mu\text{g/L}$ inicial	30	2.0	n.d	93.5
Crónico 50 $\mu\text{g/L}$ inicial	50	5.2	n.d	89.6
Crónico 50 $\mu\text{g/L}$ inicial (D5)	50	8.6	n.d	82.9
Crónico 10-1 final	10	0.6	2.5	94.1

Crónico 10-2 final	10	0.6	4.3	93.6
Crónico 10-3 final	10	0.6	1.6	94.3
Crónico 10-4 final	10	1.4	4.5	85.7
Crónico 10-5 final	10	0.1	1.0	98.7
Crónico 10-6 final	10	T	7.6	T
Crónico 10-7 final	10	1.1	2.6	88.9
Crónico 20-1 final	20	si	0.1	
Crónico 20-2 final	20	1.5	5.6	92.3
Crónico 20-2 final (D5)	20	2.6	6.7	87.2
Crónico 20-3 final	20	1.1	2.8	94.6
Crónico 20-4 final	20	1.3	5.0	93.4
Crónico 20-4 final (D4)	20	n.d	23.2	n.d
Crónico 20-5 final	20	0.7	4.7	96.7
Crónico 20-5 final	20	0.0	7.5	100.0
Crónico 20-6 final	20	0.4	3.9	98.0
Crónico 20-7 final	20	2.4	7.8	88.1
Crónico 20-7 final	20	7.9	18.2	60.3
Crónico 30-1 final	30	0.0	0.0	100.0
Crónico 30-5 final	30	0.5	3.3	98.2
Crónico 30-5 final (D5)	30	1.0	5.7	96.8
Crónico 30-6 final	30	0.5	3.3	98.4
Crónico 30-6 final (D5)	30	n.d	5.2	n.d
Crónico 30-8 final	30	1.1	3.8	96.3
Crónico 30-8 final	30	3.5	5.6	88.3
Crónico 50-1 final	50	T	n.d	T
Crónico 50-2 final	50	2.3	3.5	95.5
Crónico 50-3 final	50	0.8	1.3	98.4
Crónico 50-4 final	50	2.5	12.2	95.0
Crónico 50-4 final	50	7.1	19.4	85.9
Crónico 50-5 final	50	1.2	1.4	97.7

n.d. = no detectado

T = Trazas

D5 = Diluido 5 veces

## **Anexo 2**

Guía de autores de la Revista Biología Tropical



### **Anexo 3**

Guía de Autores de la Revista Environmental Science and Pollution Research