

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE DOS AGROQUÍMICOS, ROUNDUP® ACTIVO Y COSMO-FLUX®411F, EN RENACUAJOS DE ANUROS COLOMBIANOS

Toxicity Assessment of Two Agrochemicals, Roundup® Active and Cosmo-Flux®411F, to Colombian Anuran Tadpoles

Liliana Marcela HENAO MUÑOZ¹, Teófila María TRIANA VELÁSQUEZ¹, Manuel Hernando BERNAL BAUTISTA¹

¹ Grupo de Herpetología, Eco-Fisiología y Etología. Departamento de Biología. Universidad del Tolima, Altos de Santa Helena. Ibagué, Colombia.

For correspondence. mhbernal@ut.edu.co

Received: 15 May 2014; **Returned for revision:** 10 September 2014; **Accepted:** 23 September 2014.

Associate Editor: Martha Ramírez Pinilla.

Citation / Citar este artículo como: Heno Muñoz LM, Triana Velásquez TM, Bernal Bautista MH. Evaluación de la toxicidad de dos agroquímicos, Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F, en renacuajos de anuros colombianos. Acta biol. Colomb. 2015;20(2):153-161. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.43492>

RESUMEN

El Roundup® Activo es un herbicida elaborado a base de glifosato ampliamente utilizado en Colombia para el control de malezas. Sin embargo, para su aplicación requiere ser mezclado con un coadyuvante que facilite su acción, tal como el Cosmo-Flux®411F el cual mejora la adherencia y fijación del herbicida en las hojas de las plantas. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración letal media (CL₅₀) y algunos efectos subletales (cambios en el tamaño corporal y en el desempeño natatorio) del Roundup® Activo y del Cosmo-Flux®411F en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos expuestos bajo condiciones controladas de laboratorio y en microcosmos. La especie más sensible a la exposición del Roundup® Activo fue *Hypsiboas crepitans* (Laboratorio: CL₅₀ = 1414 µg a.e. de glifosato/L y microcosmos: CL₅₀ = 4 kg a.e. de glifosato/ha) y para el Cosmo-Flux®411F *Rhinella humboldti* (Laboratorio: CL₅₀ = 319 mg/L y microcosmos: CL₅₀ = 632,3 L/ha). En laboratorio y microcosmos, la exposición al Roundup® Activo no alteró el tamaño corporal ni el desempeño natatorio de los renacuajos, mientras que el Cosmo-Flux®411F generó alteraciones del tamaño corporal pero no afectó el desempeño natatorio. Al comparar los CL₅₀ de los dos agroquímicos con las concentraciones empleadas en campo, el Roundup® Activo generó un riesgo moderado mientras que el Cosmo-Flux®411F no resultó letal. Además, el Roundup® Activo fue notablemente más tóxico que el Cosmo-Flux®411F.

Palabras clave: anfibios, CL₅₀, efectos subletales, glifosato.

ABSTRACT

Roundup® Active is an herbicide based on glyphosate widely used in Colombia for control of illicit crops and weeds. However, it must be mixed with an adjuvant that facilitates its action, such as the Cosmo-Flux®411F which improves the adhesion and fixation of the herbicide into the leaves of the plants. The aim of this study was to determine the median lethal concentration (LC₅₀) and some sublethal effects (changes in body size and swimming performance) of the Roundup® Active and the Cosmo-Flux®411F to tadpoles of four Colombian anuran species exposed under laboratory and microcosm conditions. The most sensitive species to exposure of Roundup® Active was *Hypsiboas crepitans* (Laboratory: LC₅₀ = 1414 µg a.e. glyphosate/L; microcosm: LC₅₀ = 4 kg a.e. glyphosate/ha), and for Cosmo-Flux®411F was *Rhinella humboldti* (Laboratory: LC₅₀ = 319 mg/L; microcosm: LC₅₀ = 632.3 L/ha). In laboratory and microcosms, Roundup® Active did not alter the tadpole body size nor the swimming performance, while the Cosmo-Flux®411F generated changes in the body size but not in the swimming performance. Comparing the LC₅₀ of the two agrochemicals with respect to concentrations used in field, the Roundup® Active exerted a moderate risk whereas the Cosmo-Flux®411F was not lethal. In addition, the Roundup® Active was notably more toxic than the Cosmo-Flux®411F.

Keywords: amphibians, glyphosate, LC₅₀, sublethal effects.

INTRODUCCIÓN

El glifosato es uno de los herbicidas de mayor uso comercial en el mundo (Plötner y Matschke, 2012), el cual es vendido por numerosas casas comerciales bajo diferentes marcas (Woodburn, 2000), entre las que se encuentran: Roundup®, Rodeo®, Ranger®, Glyphos®. Los herbicidas a base de glifosato son ampliamente utilizados en la agricultura colombiana para la erradicación de malezas, y entre el 10 % y el 14 % es utilizado para el programa de erradicación de cultivos ilícitos de coca y amapola (Solomon *et al.*, 2007). Particularmente, el Roundup® Activo es una de las presentaciones de glifosato principalmente empleadas para el control de arvenses en el país (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007).

Los estudios sobre los efectos del glifosato y sus productos formulados han concluido que resulta mediana a altamente tóxico para las especies de anuros expuestas en condiciones de laboratorio (Relyea, 2004; Wojtaszek *et al.*, 2004; Relyea, 2005; Bernal *et al.*, 2009a), en donde las diferencias en la toxicidad pueden estar relacionadas con las sustancias tensoactivas no iónicas presentes en las formulaciones comerciales (Plötner y Matschke, 2012). También, que su interacción con otros factores como el pH (Edginton *et al.*, 2004) y la disponibilidad del alimento (Chen *et al.*, 2004) potencian su efecto. Sin embargo, cuando los experimentos se han realizado bajo condiciones de microcosmos se ha observado una reducción significativa en la toxicidad del glifosato (Wojtaszek *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2009b), la cual es atribuida a la materia orgánica y macrófitas acuáticas presentes en este tipo de experimentos que favorecen la degradación del glifosato a su principal metabolito, ácido aminometil fosfórico (AMPA) (Plötner y Matschke, 2012). Triana *et al.*, (2013), en un estudio reciente con embriones de anuros colombianos, también encontraron que el Roundup® Activo resultó altamente tóxico en los experimentos de laboratorio, pero que su toxicidad disminuyó ostensiblemente en las pruebas de microcosmos, incluso hasta valores que representarían un riesgo leve (20 % de letalidad) para las especies de estudio.

En los últimos años se han reportado múltiples efectos morfológicos y fisiológicos en anuros expuestos al glifosato (Lajmanovich *et al.*, 2003). Dentro de los efectos morfológicos se encuentran la presencia de deformidades en la cola (Williams y Semlitsch, 2010) y en el intestino de las larvas (Lenkowski *et al.*, 2010), defectos en el desarrollo de la cresta neural y el esqueleto craneofacial (Mann *et al.*, 2009). Cauble y Wagner (2005) también indican que las larvas de *Rana cascadae* al ser expuestas a una concentración de 1 mg/L de glifosato presentan una menor masa corporal en comparación con el grupo control. Dentro de los efectos fisiológicos en anuros se reportan alteraciones en la actividad de las enzimas hepáticas en *Lithobates catesbeianus* (Costa *et al.*, 2008), efectos sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas (Howe *et al.*, 2004; Mann *et al.*, 2009),

alteraciones en el ADN (Mann *et al.*, 2009) y en la síntesis del ARN (Howe *et al.*, 2004).

Numerosos trabajos se han realizado sobre el impacto del glifosato en los anuros; sin embargo, el herbicida glifosato requiere ser aplicado en combinación con un coadyuvante que facilite su fijación y penetración en las hojas, tal como el Cosmo-Flux®411F el cual es ampliamente utilizado en Colombia durante la aspersión de cultivos ilícitos (Solomon *et al.*, 2005). El Cosmo-Flux®411F es un aceite isoparafínico de alta pureza, con muy baja fitotoxicidad, muy bajo contenido de aromáticos y baja tensión superficial que mejora la humectabilidad, promoviendo así la eficacia de los ingredientes activos (Cosmoagro, 2014). Henao *et al.*, (2013) evaluaron la toxicidad del Cosmo-Flux®411F en embriones de anuros encontrando que las concentraciones sugeridas de aplicación en campo no resultan tóxicas, ni afectan la tasa de crecimiento y desarrollo; sin embargo, en este estudio no se tuvieron en cuenta estadíos más avanzados de desarrollo, como los renacuajos, los cuales han sido reportados como muy sensibles a contaminantes del agua (Egea-Serrano *et al.*, 2012). También, Rondón *et al.*, (2007) desarrollaron un trabajo en el pez Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) en donde concluyeron que el Cosmo-Flux®411F era letal a concentraciones mayores a las aplicadas en campo, y los reportes de Bernal *et al.*, (2009b), quienes evaluaron el efecto tóxico de la mezcla glifosato (Glyphos®) y Cosmo-Flux®411F en anuros bajo condiciones de microcosmos, la cual no resultó ecológicamente letal. De acuerdo con lo anterior, este trabajo pretende determinar la toxicidad y algunos efectos subletales generados por la aplicación individual del herbicida glifosato, en su presentación comercial como Roundup® Activo, y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F, en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos bajo condiciones experimentales de laboratorio y microcosmos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de estudio

Este trabajo se realizó con renacuajos en estadio 25 (Gosner, 1960) de cuatro especies de anuros colombianos: *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758), *Rhinella humboldti* (Gallardo, 1965), *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824) y *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864), las cuales se seleccionaron por encontrarse frecuentemente en áreas de cultivo donde podrían estar expuestas al contacto con estos agroquímicos, no encontrarse en ninguna categoría de amenaza y ovopositar un número elevado de huevos (Guayara-Barragán y Bernal, 2012).

Las posturas de huevos de las especies fueron colectadas en diferentes lugares del departamento del Tolima, Colombia: *R. marina* en el municipio de San Luis (04°17' N, y 75°05' W); *R. humboldti*, en los alrededores de la ciudad de Ibagué (04°25' N, y 75°12' W); *H. crepitans* y *E. pustulosus* en el municipio de Coello (04°15' N, y 74°58' W). Las posturas colectadas fueron transportadas separadamente en contenedores

plásticos y con agua del lugar de colecta al laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima, y allí se trasladaron a recipientes con agua previamente dechlorada por aireación continua, a una temperatura de 23-24 °C, hasta que alcanzaron el estadio 25 (Gosner, 1960). Los renacuajos no fueron alimentados previamente ni durante los experimentos.

Agroquímicos evaluados

Roundup® Activo. Herbicida sistémico con una concentración de 363 g/L de ácido de glifosato de formulación a 20 °C, equivalente a 416 g/L de sal de N-(fosfometil)-glicina (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007). El producto cuenta con licencia de venta número 470 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Cosmoagro, 2014). De acuerdo con la clasificación del Ministerio de Salud de Colombia, este producto se encuentra en la categoría toxicológica III (ligeramente peligroso para la salud humana). La concentración de glifosato sugerida para su aplicación en la agricultura es de 1,77 kg a.e./ha (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007) y para el control de cultivo ilícitos en Colombia es de 3,69 kg a.e./ha (Solomon *et al.*, 2007).

Cosmo-Flux®411F. El Cosmo-Flux®411F es un coadyuvante estereoespecífico de carácter no-iónico, cuyo ingrediente activo constituye una mezcla de ésteres de hexitan (17 %) e isoparafinas líquidas como ingredientes aditivos (83 %). El producto cuenta con la licencia de venta número 2186 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA

(Cosmoagro, 2014) y se encuentra clasificado por el Ministerio de Salud de Colombia en la categoría toxicológica IV (ligeramente tóxico para la salud humana). Cosmoagro®, empresa que se encarga de la comercialización del Cosmo-Flux®411F, sugiere su aplicación en un volumen de 0,5 a 1 L/ha, o entre 1,5 y 10 mL/L, equivalente a 255 y 1700 mg/L.

Evaluación de la toxicidad

Experimentos en condiciones controladas de laboratorio.

Durante 96 horas, diez renacuajos de cada especie más su réplica (n = 20 por tratamiento) fueron expuestos por separado a cinco concentraciones del herbicida Roundup® Activo: 325; 750; 1500; 3000 y 6000 µg a.e. de glifosato/L; y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F: 106,25; 212,5; 425; 850 y 1700 mg/L. Cada réplica contó con un control negativo (agua dechlorada). Los renacuajos se expusieron en un litro de la solución experimental (diez renacuajos/litro) dentro de peceras de vidrio con capacidad para 2 litros. El agua utilizada para preparar las soluciones fue previamente dechlorada por aireación. El experimento consistió en un sistema semiestático en donde las soluciones fueron renovadas totalmente cada 24 horas, esto con el fin de mantener constantes las concentraciones de los agroquímicos evaluados, y antes y después de los recambios se registraron a una profundidad media los parámetros fisicoquímicos de conductividad, oxígeno disuelto, alcalinidad, dureza, temperatura y pH (Tabla 1). Los experimentos se realizaron con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 horas, mantenida a

Tabla 1. Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones en las pruebas de laboratorio, y a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos.

LABORATORIO				
Fisicoquímicos	Roundup® Activo		Cosmo-Flux®411F	
	Antes del recambio	Después del recambio	Antes del recambio	Después del recambio
pH	7,43 (0,88)	7,56 (0,62)	7,54 (5,72)	7,17 (0,61)
Temperatura (°C)	24,8 (1,09)	23,0 (0,86)	24,4 (1,10)	22,3 (0,62)
Oxígeno (ppm)	6,04 (0,83)	6,63 (0,92)	5,01 (1,54)	6,70 (0,56)
Alcalinidad (mg/L)	59,2 (12,58)	64 (14,32)	81,8 (38,23)	102,8 (50,55)
Dureza (ppm)	94,2 (26,18)	93,3 (21,07)	93,4 (22,71)	89,6 (13,62)
Conductividad (µS/cm)	257,0 (45,02)	234,9 (37,38)	256,8 (42,64)	238,9 (36,43)
MICROCOSMOS				
Fisicoquímicos	Roundup® Activo		Cosmo-Flux®411F	
	0 horas	96 horas	0 horas	96 horas
pH	7,11 (0,57)	7,11 (0,68)	7,26 (0,56)	7,05 (0,50)
Temperatura (°C)	23,2 (0,95)	22,3 (0,88)	23,4 (0,87)	22,8 (0,93)
Oxígeno (ppm)	6,86 (0,76)	4,96 (0,70)	6,44 (1,01)	3,08 (1,83)
Alcalinidad (mg/L)	63,7 (17,54)	46,4 (16,48)	63,1 (16,15)	45,6 (11,53)
Dureza (ppm)	98,4 (41,21)	92,2 (33,84)	91,7 (20,71)	93,9 (22,65)
Conductividad (µS/cm)	267,3 (58,32)	257,4 (32,83)	245,7 (59,29)	252,2 (38,02)

través de lámparas de luz blanca (Phillips TLT 20W/54RS) conectadas a un temporizador digital (General Electric PM621). La toxicidad de cada agroquímico se determinó a través de la concentración letal media (CL₅₀) para cada una de las especies. Estos valores se calcularon de acuerdo a la mortalidad acumulada en las concentraciones experimentales a las 96 horas, a través del método TSK Trimmed Spearman-Kärber (Versión 1.5) (Hamilton *et al.*, 1977).

Experimentos en condiciones de microcosmos. Los microcosmos son montajes experimentales que se pueden realizar en el laboratorio incluyendo componentes de los sistemas naturales para evaluar los efectos de contaminantes ambientales (Van Leeuwen y Vermeire, 2007). Para el presente estudio, los microcosmos se elaboraron con recipientes de polietileno de 70 cm de diámetro y 13 cm de profundidad (área experimental = 0,1520 m²), a los que se adicionó una capa de tierra (450 g) y arena (647 g) obtenidas del jardín botánico de la Universidad del Tolima. Luego, los recipientes se cubrieron internamente con una tela blanca (muselina), para facilitar la posterior observación y el conteo de los organismos, y se les adicionó diez litros de la solución experimental (2,5 renacuajos/litro), preparada con agua previamente clorada, más hojarasca (dos hojas secas), piedras (cuatro a cinco piedras de tamaño pequeño, 100 g) y una macrófita. Estos microcosmos se ubicaron aleatoriamente en un área ventilada del laboratorio con una temperatura ambiental promedio de 24 ± 2 °C y un fotoperiodo fluctuante de 12 horas luz-12 horas oscuridad, aproximadamente, donde se dejaron en reposo durante una hora antes de colocar los organismos de experimentación en el centro de los recipientes.

Durante 96 horas, 25 renacuajos más su réplica (n=50 por tratamiento) fueron expuestos separadamente a cinco concentraciones del herbicida Roundup® Activo: 1,845; 3,69; 7,38; 14,76 y 29,52 kg a.e. de glifosato/ha; y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F: 205,5 (= 53,1 mg/L); 410,9 (= 106,2 mg/L); 821,9 (= 212,4 mg/L); 1643,9 (= 424,8 mg/L) y 3287,9 L/ha (= 849,6 mg/L), ajustadas de acuerdo con el área experimental. Cada réplica contó con un control negativo (agua clorada). Este experimento consistió en un sistema estático sin recambio de las soluciones experimentales ni del control, donde los parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto se registraron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas a una profundidad media. También se registró la alcalinidad y dureza de las concentraciones experimentales al iniciar y finalizar la exposición. Los valores promedio y la desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas se resumen en la Tabla 1. La toxicidad del Roundup® Activo y del Cosmo-Flux®411F se determinó a través de la CL₅₀ de la misma manera que en las pruebas de laboratorio.

Evaluación de efectos subletales

El análisis de los efectos subletales generados por el herbicida Roundup® Activo y el coadyuvante Cosmo-Flux®411F se realizó con los individuos sobrevivientes de las dos primeras concentraciones experimentales y el control, donde la sobrevivencia fue superior al 50 % en todas las especies, tanto para los experimentos de laboratorio como los de microcosmos. Para esto, al finalizar las 96 horas de exposición, por cada concentración se seleccionaron diez renacuajos sin deformidades aparentes provenientes de las

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad, valores de CL₅₀ e intervalos de confianza (IC) al 95 % de las especies expuestas al Roundup® Activo bajo condiciones de laboratorio y microcosmos.

LABORATORIO						
Especies	Concentraciones [µg a.e. de glifosato/L]					CL ₅₀ (IC) [µg a.e. de glifosato/L]
	325	750	1500	3000	6000	
<i>R. marina</i>	0	25	40	90	100	1423 (1129-1794)
<i>R. humboldti</i>	5	10	0	75	100	2437 (2095-2834)
<i>H. crepitans</i>	20	10	55	100	100	1414 (1157-1728)
<i>E. pustulosus</i>	0	5	10	45	100	2789 (2295-3389)
MICROCOSMOS						
Especies	Concentraciones [kg a.e. de glifosato/ha]					CL ₅₀ (IC) [kg a.e. de glifosato/ha]
	1,845	3,69	7,38	14,76	29,52	
<i>R. marina</i>	2	6	8	20	100	16,9 (15,2-18,9)
<i>R. humboldti</i>	24	4	92	100	100	5,1 (4,9-5,4)
<i>H. crepitans</i>	30	48	92	96	100	4,0 (3,4-4,7)
<i>E. pustulosus</i>	12	0	22	98	100	9,4 (8,7-10,2)

pruebas de laboratorio, y veinte renacuajos de las pruebas de los microcosmos, los cuales fueron fotografiados para medir el ancho corporal, longitud corporal, longitud de la cola y longitud total con la ayuda del programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Estos datos fueron analizados a través de un análisis multivariado de varianza (MANOVA) y luego con análisis de varianza factoriales (ANOVAS) para establecer diferencias entre las medidas morfométricas de las especies por cada concentración experimental. Adicionalmente, los renacuajos se sometieron a una prueba de capacidad natatoria, que consistió en estimular con un pincel la parte posterior de la cola del renacuajo hasta que este se desplazara a través de una pista de agua de 50 cm de largo x 1 cm de ancho x 1 cm de alto, construida con un canal de plástico que incluía lateralmente una cinta métrica. El agua de la pista fue agua de cloro con una temperatura promedio de $23 \pm 1,4$ °C. Por cada organismo se realizaron tres pruebas y entre estas se escogió el registro de la máxima distancia recorrida (cm) y la máxima velocidad alcanzada (cm/s). Estos datos fueron comparados a través de un análisis multivariado de covarianza (MANCOVA) y posteriores análisis de covarianzas (ANCOVAS), teniendo en cuenta la longitud total de los organismos como covariable.

RESULTADOS

La especie más sensible a la exposición del Roundup® Activo bajo condiciones de laboratorio y microcosmos fue

H. crepitans (Laboratorio: $CL_{50} = 1414$ µg a.e. de glifosato/L y microcosmos: $CL_{50} = 4$ kg a.e. de glifosato/ha) y la más resistente en laboratorio fue *E. pustulosus* ($CL_{50} = 2789$ µg a.e. de glifosato/L) y en microcosmos *R. marina* ($CL_{50} = 16,9$ kg a.e. de glifosato/ha) (Tabla 2). Para el caso de la exposición al Cosmo-Flux®411F, *R. humboldti* presentó la mayor sensibilidad bajo condiciones de laboratorio ($CL_{50} = 319$ mg/L) y microcosmos ($CL_{50} = 632,3$ L/ha), mientras que *H. crepitans* mostró la mayor tolerancia en condiciones de laboratorio ($CL_{50} = 1457$ mg/L) y en microcosmos, en donde el valor CL_{50} no pudo ser calculado por el programa debido a la baja mortalidad presentada (Tabla 3).

Las especies expuestas al Roundup® Activo bajo las dos condiciones experimentales no presentaron alteraciones significativas en el tamaño corporal (Laboratorio: Hotelling $T^2 = 0,02$; $p = 0,8433$ y microcosmos: Hotelling $T^2 = 0,04$; $p = 0,3647$), ni en la capacidad natatoria (Laboratorio: Hotelling $T^2 = 0,08$; $p = 0,9469$ y microcosmos: Hotelling $T^2 = 0,18$; $p = 0,8956$). Por el contrario, los organismos expuestos al Cosmo-Flux®411F sí presentaron diferencias significativas en las medidas morfométricas bajo las dos condiciones experimentales (Laboratorio: Hotelling $T^2 = 0,11$; $p = 0,0041$ y microcosmos: Hotelling $T^2 = 0,11$; $p = 0,0020$). En las pruebas de laboratorio, el ancho corporal fue la variable que generó la diferencia entre las concentraciones evaluadas del Cosmo-Flux®411F y el control (ANOVA, $F = 3,52$; $p = 0,0315$) (Fig. 1), mientras

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad, valores de CL_{50} e intervalos de confianza (IC) al 95 % de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio y microcosmos.

LABORATORIO						
Especies	Concentraciones en mg/L					CL_{50} (IC)
	106,25	212,5	425	850	1700	mg/L
<i>R. marina</i>	0	0	15	10	85	1216 (1096-1350)
<i>R. humboldti</i>	5	50	65	70	100	319 (239-425)
<i>H. crepitans</i>	0	0	0	15	60	1457 (1114-1905)
<i>E. pustulosus</i>	5	5	0	25	80	1160 (853-1578)
MICROCOSMOS						
Especies	Concentraciones					CL_{50} (IC)
	205,5	410,9	821,9	1643,9	3287,9	L/ha
	53,1	106,2	212,4	424,8	849,6	mg/L
<i>R. marina</i>	0	4	6	2	60	2905,2 (2522-3346,7) 750,7 (651,7-864,7)
<i>R. humboldti</i>	14	26	78	70	100	632,3 (516,2-774,8) 163,4 (133,4-200,2)
<i>H. crepitans</i>	8	10	10	18	32	*
<i>E. pustulosus</i>	30	28	20	66	74	1304,9 (1035,2-1644,3) 337,2 (267,5-424,9)

*Valores no calculados por el programa

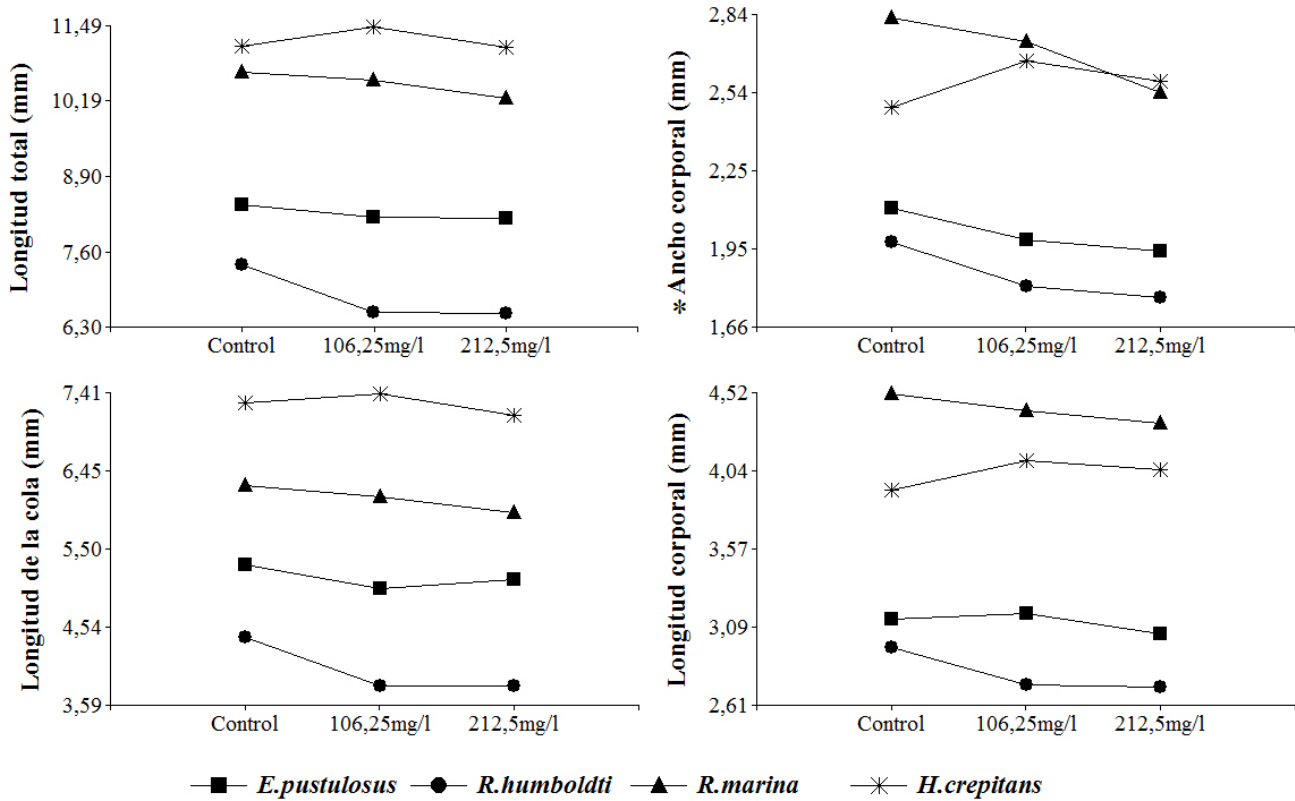


Figura 1. Promedio de las medidas morfométricas en las cuatro especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio. *El ancho corporal presentó diferencias significativas entre el control y las dos concentraciones subletales.

que en las pruebas de microcosmos todas las variables morfométricas presentaron diferencias significativas con respecto al control (ANOVA, $p < 0,05$ para todos los casos) (Fig. 2). La capacidad natatoria en las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F tampoco se vio afectada significativamente (Laboratorio: Hotelling $T^2 = 0,18$; $p = 0,7969$ y microcosmos: Hotelling $T^2 = 0,12$; $p = 0,9430$).

Los parámetros fisicoquímicos de las soluciones registrados antes y después de los recambios en las condiciones de laboratorio y durante las 96 horas en las pruebas de microcosmos no variaron drásticamente (Tabla 1), aunque en los microcosmos el oxígeno disuelto mostró una reducción significativa a lo largo de las 96 horas, tanto para los experimentos con el Roundup® Activo (Pearson $r = -0,508$; $p = 0,000$) como con el Cosmo-Flux®411F (Pearson $r = -0,162$; $p = 0,012$) (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El Roundup® Activo resultó letal para las especies de estudio expuestas bajo condiciones de laboratorio, a excepción de *E. pustulosus*, ya que los CL_{50} experimentales fueron menores en comparación con la concentración de glifosato estimada para su aplicación, de acuerdo con el

programa de erradicación de cultivos ilícitos (5392,92 μg a.e. de glifosato/L = 3,69 kg a.e. de glifosato/ha), o para la agricultura (2586,84 μg a.e. de glifosato/L = 1,77 kg a.e. de glifosato/ha) (Tabla 2). Por su parte, los CL_{50} de las especies expuestas bajo las condiciones de microcosmos fueron notablemente mayores a la concentración empleada de glifosato para la erradicación de cultivos ilícitos y en la agricultura, con la excepción de *H. crepitans* cuyo CL_{50} fue 4 kg a.e. de glifosato/ha, un valor muy cercano a la concentración usada en el programa de erradicación de cultivos ilícitos y que representa una mortalidad aproximada del 50 %.

Para el caso de la exposición al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio, al comparar los CL_{50} hallados para las especies con la concentración máxima sugerida para su aplicación por Cosmoagro (2014), de 10 mL/L = 1700 mg/L, estos valores fueron menores, indicando que el coadyuvante es tóxico para las especies de estudio (Tabla 3). Por el contrario, los valores CL_{50} obtenidos en los microcosmos (Tabla 3) resultaron mayores comparados con la dosis de aplicación recomendada por Cosmoagro (0,5 a 1 L/ha), mostrando que este coadyuvante no resulta tóxico para los renacuajos de ninguna de las especies. Incluso, en la especie *H. crepitans* la mortalidad acumulada

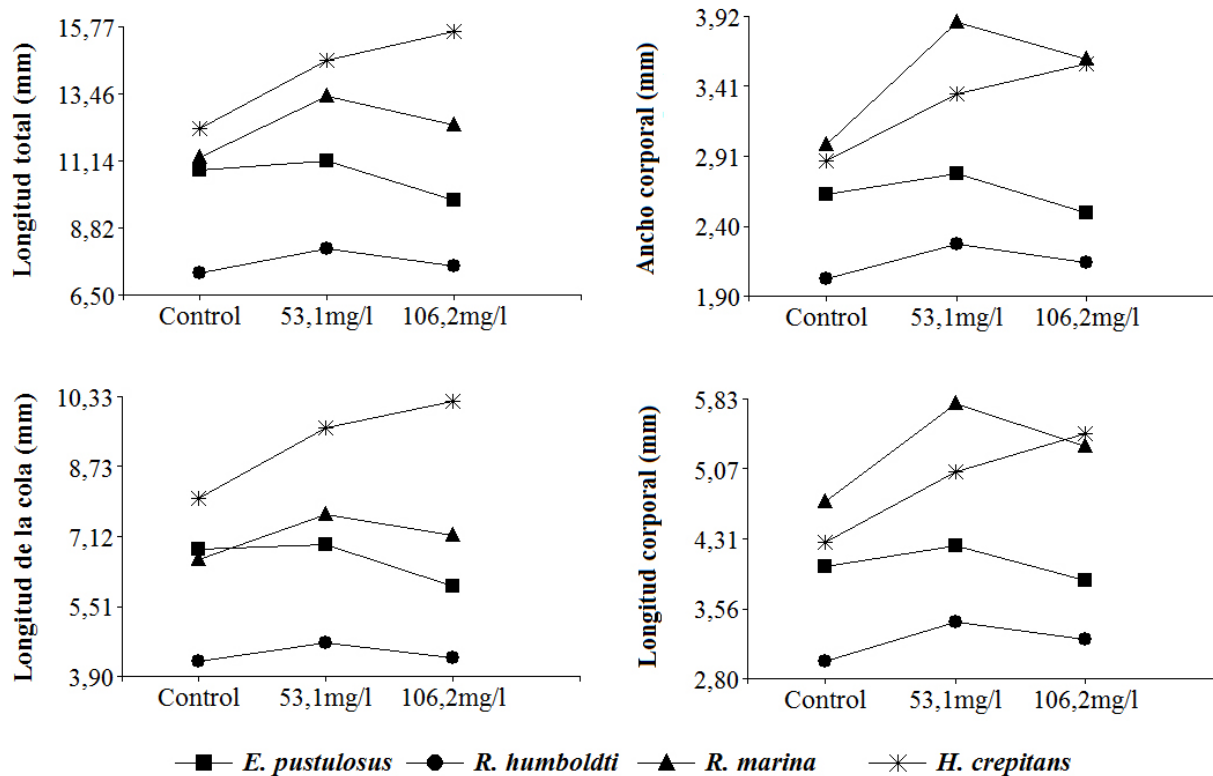


Figura 2. Promedio de las medidas morfométricas de las especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.

en cada concentración experimental fue tan baja que no se pudo calcular el valor CL_{50} .

Los valores de toxicidad obtenidos para el Roundup® Activo en condiciones de laboratorio, entre 1414 y 2789 μg a.e. de glifosato/L, se encuentran dentro del rango reportado para otras especies expuestas a diferentes presentaciones comerciales de glifosato (Edginton *et al.*, 2004; Relyea y Jones, 2009; Moore *et al.*, 2012). Particularmente, los intervalos de confianza de los CL_{50} encontrados para el Roundup® Activo no se diferenciaron significativamente con los reportados por Bernal *et al.*, (2009a) para la mezcla del glifosato (Glyphos®) y el Cosmo-Flux®411F, a excepción de *H. crepitans* que resultó ser la especie más sensible, y de los hallados por Triana *et al.*, (2013) en embriones de estas especies expuestas al Roundup® Activo. Por su parte, la alta toxicidad del coadyuvante Cosmo-Flux®411F encontrada en las pruebas de laboratorio (valores CL_{50} menores a la concentración máxima sugerida de aplicación = 1700 mg/L), concuerda con los resultados hallados para los embriones en tres de las cuatro especies evaluadas por Henao *et al.*, (2013), *R. humboldti*, *R. marina* y *H. crepitans*, en donde los valores de CL_{50} (desde 495,18 hasta 858,26 mg/L) también resultaron inferiores a la concentración de aplicación en campo.

Los renacuajos expuestos al Roundup® Activo presentaron una sensibilidad menor en condiciones de microcosmos que bajo las pruebas de laboratorio, como ha sido reportado en otros estudios (Relyea, 2004; Tsui y Chu, 2004; Wojtaszek *et al.*, 2004; Triana *et al.*, 2013), probablemente por la disminución en la concentración del glifosato en este medio a partir de las primeras 24 horas (Trumbo, 2005). Por el contrario, el Cosmo-Flux®411F presentó una toxicidad mayor en condiciones de microcosmos que en las pruebas de laboratorio (Tabla 3). Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Henao *et al.*, (2013), quienes encontraron una mayor mortalidad en embriones de anuros expuestos al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos que en laboratorio, atribuido a la falta de renovación de las soluciones experimentales. Aunque los renacuajos en estadíos tempranos pueden nadar hacia la superficie, como fue observado frecuentemente, la mayor parte del intercambio gaseoso lo realizan a través de su piel (McDiarmid y Altig, 1999), ya que la función primaria de los pulmones está relacionada con la flotabilidad más que con la respiración (McDiarmid y Altig, 1999). Así, la disminución del oxígeno probablemente pudo ser un factor crítico que contribuyó a la mayor sensibilidad de los renacuajos ante la exposición del Cosmo-Flux®411F.

En las pruebas de toxicidad del Roundup® Activo bajo las condiciones de microcosmos, la concentración del oxígeno en las soluciones experimentales también disminuyó significativamente (Tabla 1), no obstante estos valores no decayeron tan drásticamente como en el caso del Cosmo-Flux®411F y se encuentran dentro del rango tolerante para algunas especies de anuros (Bernal *et al.*, 2011).

A diferencia del trabajo realizado por Cauble y Wagner (2005), quienes encontraron que las larvas de *R. cascadae* al ser expuestas al glifosato aceleraban su metamorfosis reduciendo significativamente su tamaño, en este estudio la exposición al Roundup® Activo no afectó el tamaño corporal de los renacuajos de las especies expuestas, incluso dicha exposición tampoco afectó la capacidad natatoria. Estos resultados contradicen estudios como el de Relyea (2012) quien señala que la exposición al Roundup® en *R. sylvatica* y *R. pipiens* induce cambios en la cola de los renacuajos, los cuales podrían interferir en su desempeño natatorio afectando su capacidad de respuesta ante depredadores (Kats *et al.*, 2000; Belden y Blaustein, 2002). Para el caso de la exposición al Cosmo-Flux®411F, este sólo generó alteraciones en el tamaño corporal de las especies a partir de una concentración de 106,25 mg/L en laboratorio y de 205,5 L/ha (53,1 mg/L) en microcosmos, correspondiente a más de 205 veces la dosis mayor empleada en campo (Figs. 1 y 2).

CONCLUSIONES

Comparando las concentraciones sugeridas de aplicación de los dos agroquímicos con los valores CL₅₀ obtenidos en las condiciones de microcosmos, las cuales reflejan en mejor medida las condiciones reales de campo, el Roundup® Activo representa un riesgo moderado, ya que puede causar una mortalidad hasta del 50 % en dos de las cuatro especies de estudio, en tanto que el Cosmo-Flux®411F no resulta letal. Los datos de laboratorio y microcosmos también confirman la diferencia en el efecto tóxico entre estos dos agroquímicos, en donde el Roundup® Activo resultó aproximadamente 700 veces más tóxico que el Cosmo-Flux®411F. De acuerdo con estos resultados, y a reportes sobre el efecto combinado del glifosato y el Cosmo-Flux®411F (Bernal *et al.*, 2009a; Bernal *et al.*, 2009b), la toxicidad generada por la mezcla utilizada en campo podría ser atribuida al herbicida glifosato.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo hace parte de la beca pasantía otorgada a Liliana Marcela Henao y Teófila María Triana como Jóvenes Investigadoras de Colciencias durante el año 2013. El proyecto fue financiado por el Fondo de investigaciones de la Universidad del Tolima (código 220212) y obtuvo el permiso de investigación científica en diversidad biológica de la Corporación Autónoma Regional del Tolima, CORTOLIMA (Resolución N° 2886 de 2011). Los autores agradecen a Jorge Luis Turriago González por su apoyo en el montaje de los experimentos.

REFERENCIAS

- Belden LK, Blaustein AR. Exposure of red-legged frog embryos to ambient UV-B radiation in the field negatively affects larval growth and development. *Oecologia*. 2002;130(4):551-554. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-001-0843-y>
- Bernal M, Solomon K, Carrasquilla G. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs 1. Laboratory Acute Toxicity. *J Toxicol Environ Health A*. 2009a;72(15):961-965. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/15287390902929709>
- Bernal M, Solomon K, Carrasquilla G. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux to larval and juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *J Toxicol Environ Health A*. 2009b;72(15):966-973. Doi: [10.1080/15287390902929717](http://dx.doi.org/10.1080/15287390902929717)
- Bernal MH, Alton LA, Cramp RL, Franklin CE. Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on developing anuran embryos and larvae?. *J Comp Physiol B*. 2011;181(7):973-980. Doi: [10.1007/s00360-011-0581-3](http://dx.doi.org/10.1007/s00360-011-0581-3)
- Cauble K, Wagner RS. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2005;75:429-435. Doi: [10.1007/s00128-005-0771-3](http://dx.doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3)
- Chen CY, Hathaway KM, Folt CL. Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(4):823-831. Doi: [10.1897/03-108](http://dx.doi.org/10.1897/03-108)
- Cosmoagro. [Internet]. 2014. [Consulted 30 April 2014]. Available from: <http://www.cosmoagro.com>
- Costa MJ, Montairo DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*. 2008;17(3):153-163. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>
- Edginton A, Sheridan P, Stephenson G, Thompson D, Boermans H. Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(4):815-822. Doi: [10.1897/03-115](http://dx.doi.org/10.1897/03-115)
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecol Evol*. 2012;2(7):1382-1397. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.249>
- Gosner KL. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 1960;16:183-190.
- Guayara-Barragán MG, Bernal MH. Fecundidad y fertilidad en once especies de anuros colombianos con diferentes modos reproductivos. *Caldasia*. 2012;34(2):483-496.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal

- concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 1977;11(7):714-719. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/es60130a004>
- Henao LM, Arango VA, Bernal MH. Toxicidad aguda y efectos subletales del Cosmo-Flux®411F en embriones de cuatro especies de anuros colombianos. *Actual Biol*. 2013;35(99):209-218.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoe N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(8):1928-1938. Doi: <http://dx.doi.org/10.1897/03-71>
- Kats LB, Kiesecker JM, Chivers DP, Blaustein AR. Effects of UV-B radiation on anti-predator behavior in three species of amphibians. *Ethology*. 2000;106(10):921-931. Doi: [10.1046/j.1439-0310.2000.00608.x](http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00608.x)
- Lajmanovich R, Lorenzatti E, Maitre M, Enrique S, Peltzer P. Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Fresen Environ Bull*. 2003;12(4):364-367.
- Lenkowski JR, Sanchez-Bravo G, Mclaughlin KA. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *J Environ Sci*. 2010;22(9):1305-1308. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60254-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60254-0)
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risk in a complex environment. *Environ Pollut*. 2009;157(11):2903-2927. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>
- McDiarmid RW, Altig R. Tadpoles: the biology of anuran larvae. 1 ed. United States: University of Chicago Press; 1999. p. 104-106.
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución Número 1435. [Internet]. 2007. [Consulted 30 April 2014]. Available from: http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_1435_150807.pdf
- Moore LJ, Fuentes L, Rodgers JH, Boweman WW, Yarrow GK, Chao WY, et al. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;78:128-133. Doi: [10.1016/j.ecoenv.2011.11.025](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.025)
- Plötner J, Matschke J. Acute and sublethal toxicity and indirect effects of glyphosate and its formulations on amphibians – a review. *Z Feldherpetol*. 2012;19:1-20.
- Relyea RA. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(7):1737-1742. Doi: <http://dx.doi.org/10.1897/03-493>
- Relyea RA. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol Appl*. 2005;15:1118-1124. Doi: <http://dx.doi.org/10.1890/04-1291>
- Relyea RA, Jones DK. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environ Toxicol Chem*. 2009;28(9):2004-2008. Doi: [10.1897/09-021.1](http://dx.doi.org/10.1897/09-021.1)
- Relyea RA. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecol Appl*. 2012;22(2):634-647. Doi: [10.1890/11-0189.1](http://dx.doi.org/10.1890/11-0189.1)
- Rondón I, Ramírez W, Eslava P. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux®411F sobre juveniles de Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). *Rev Col Cienc Pec*. 2007;20:431-446.
- Solomon KR, Anadón A, Cerdeira AL, Marshall J, Sanin LH. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), 2005. p. 5.
- Solomon KR, Anadón A, Carrasquilla G, Cerdeira A, Marshall J, Sanin LH. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2007;190:43-125. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-36903-7_2
- Triana TM, Montes CM, Bernal MH. Efectos letales y subletales del glifosato (Roundup® Activo) en embriones de anuros colombianos. *Acta biol Colomb*. 2013;18(2):271-278.
- Trumbo J. An assessment of the hazard of a mixture of the herbicide Rodeo® and the non-ionic surfactant R-11® to aquatic invertebrates and larval amphibians. *Calif Fish Game*. 2005;91(1):38-46.
- Tsui MT, Chu LM. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment pore water exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004;46(3):316-323. Doi: [10.1007/s00244-003-2307-3](http://dx.doi.org/10.1007/s00244-003-2307-3)
- Van Leeuwen CJ, Vermeire TG. Risk assessment of chemicals: An introduction. 2 ed. Dordrecht. Springer. Netherlands; 2007. p. 311.
- Williams BK, Semlitsch RD. Larval responses of three midwestern anurans to chronic low-dose exposures of four herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2010;58(3):819-827. Doi: [10.1007/s00244-009-9390-z](http://dx.doi.org/10.1007/s00244-009-9390-z)
- Wojtaszek B, Staznik B, Chartrand D, Stephenson G, Thompson D. Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidanceresponse, and growth of Amphibian larvae in two forest wetlands. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(4):832-842. Doi: <http://dx.doi.org/10.1897/02-281>
- Woodburn AT. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag Sci*. 2000;56:309-312. Doi: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4%3C309::AID-PS143%3E3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4%3C309::AID-PS143%3E3.0.CO;2-C)

