

**TOXICIDAD DE TRES INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN EMBRIONES DE ANUROS A DIFERENTES TEMPERATURAS****Toxicity of three organophosphate insecticides in anuran embryos at different temperatures**Liliana Marcela HENAO MUÑOZ¹, Teófila María TRIANA VELÁSQUEZ¹, Carlos Alberto GALINDO MARTINEZ¹, Manuel Hernando BERNAL BAUTISTA¹*¹Grupo 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: 21st March 2019, Returned for revision: 23rd december 2019, Accepted: 14th February 2020.

Associate Editor: John Carr.

Citation/Citar este artículo como: Henaó Muñoz LM, Triana Velásquez TM, Galindo Martínez CA, Bernal Bautista MH. Toxicidad de tres insecticidas organofosforados en embriones de anuros a diferentes temperaturas. Acta Biol Colomb. 2021;26(1):5-11. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.78618>**RESUMEN**

Los efectos de diferentes agroquímicos y de la temperatura han sido temas recurrentes en la investigación en anuros; sin embargo, estas variables se han abordado de manera independiente sin considerar que pueden ejercer una presión simultánea sobre las especies. Por esta razón, este trabajo tiene como objetivo determinar la toxicidad (a través de la Concentración Letal Media - CL_{50}) de los insecticidas organofosforados clorpirifos, diazinón y monocrotofos, bajo tres regímenes térmicos (23 , 28 y 33 ± 1 °C) sobre embriones de tres especies de anuros. De acuerdo a los valores de CL_{50} , el insecticida clorpirifos fue el más tóxico, seguido del diazinón y del monocrotofos. Por su parte, de manera general se encontró un incremento de la toxicidad de los insecticidas organofosforados a la temperatura más alta de experimentación (33 °C). Además, el efecto de la temperatura se hizo más notorio para los organismos expuestos al clorpirifos, el insecticida más letal. Estos resultados sugieren un efecto negativo para la fauna acuática de anuros debido al actual uso desmesurado de este tipo de agroquímicos y a su interacción con la temperatura ambiental.

Palabras clave: anfibios, ecotoxicología, mortalidad, pesticidas.**ABSTRACT**

In anurans, the effects of different agrochemicals and temperature have been recurrent topics in research; however, these variables are addressed independently without considering that they can exert a simultaneous pressure on the species. For this reason, this work aims to determine the toxicity (through the Medium Lethal Concentration - LC_{50}) of the organophosphate insecticides: chlorpyrifos, diazinon and monocrotophos, under three thermal regimes (23 , 28 and 33 ± 1 °C) on embryos of three species of anurans. According to the LC_{50} values, the chlorpyrifos insecticide was the most toxic, followed by diazinon and monocrotophos. On the other hand, an increase in the toxicity of the organophosphate insecticides studied was generally found at the highest experimental temperature (33 °C). In addition, the effect of temperature became more noticeable for the organisms exposed to chlorpyrifos, the most lethal insecticide. These results suggest a negative effect for the aquatic fauna of anurans due to the current excessive use of this type of agrochemicals and their interaction with environmental temperature.

Keywords: amphibians, ecotoxicology, mortality, pesticides.

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha documentado el declive acelerado de muchas poblaciones de anuros a nivel mundial (De Sá, 2005; Hussain, 2012; Catenazzi, 2015). Factores como el aumento de la radiación ultravioleta, la minería, la introducción de especies invasoras y las enfermedades emergentes, se consideran como posibles causas de este declive (Mattoon, 2000; Collins y Storfer, 2003; Beebee y Griffiths, 2005), así como el incremento en la temperatura ambiental (Beebee y Griffiths, 2005; Catenazzi, 2015) y la contaminación por agroquímicos (Collins y Storfer, 2003; Hayes *et al.*, 2006; Ortiz-Santaliestra y Egea-Serrano, 2013).

Los anuros son organismos particularmente sensibles a la aplicación de productos de uso agrícola, lo cual se atribuye a su piel altamente permeable que facilita la difusión del contaminante al interior de los organismos, haciéndolos más vulnerable en comparación con otros vertebrados. Además, durante sus primeros estadios de desarrollo como embriones y renacuajos, muchas especies se desarrollan en cuerpos de agua contaminados por agroquímicos, de los cuales no pueden escapar (Plötner y Matschke, 2012; Ortiz-Santaliestra y Egea-Serrano, 2013). Entre los contaminantes químicos más usados en la agricultura se encuentran los insecticidas organofosforados, los cuales se consideran compuestos altamente tóxicos para numerosos organismos (Gallo-Delgado *et al.*, 2006), incluyendo animales acuáticos, aves y mamíferos. Especialmente en anuros generan altos porcentajes de mortalidad (Snawder y Chambers, 1989; Sparling y Fellers, 2007; 2009; Wijesinghe *et al.*, 2011; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2017). Su mecanismo de acción se debe particularmente a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, una molécula común en los organismos con un sistema nervioso desarrollado (Richards y Kendall, 2002; Kavitha y Rao, 2007; Robles-Mendoza *et al.*, 2011). Como resultado de esa inhibición, la acetilcolina acumulada en la sinapsis provoca una estimulación repetida e incontrolada en las neuronas, lo que causa la muerte del animal (Giesy y Solomon, 2014).

Por su parte, la temperatura es uno de los factores abióticos que más influye en los procesos fisiológicos de los organismos, debido a los efectos termodinámicos sobre las reacciones bioquímicas (Randall *et al.*, 2002). En ectotermos, como los anuros, la temperatura corporal está determinada por la temperatura ambiental (Randall *et al.*, 2002), de manera que los cambios en la temperatura del ambiente afectan directamente su fisiología y alteran aspectos tan importantes como la supervivencia, el crecimiento, el rendimiento y el desarrollo (Angilletta y Angilletta, 2009). Varias investigaciones indican que la temperatura juega un rol importante en la toxicidad de muchos contaminantes químicos presentes en el medio acuático (Ferrando *et al.*, 1987; Harwood *et al.*, 2009; Rumschlag *et al.*, 2014; Alza *et al.*, 2016; Baier *et al.*, 2016), ya

sea aumentando o disminuyendo su toxicidad. Para el caso de los insecticidas organofosforados, se ha encontrado que la toxicidad en algunas especies de dípteros (Clase: Insecta) se correlaciona positivamente con la temperatura (Lydy *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 2009); no obstante, factores como la sensibilidad térmica del organismo y la estabilidad térmica de la presentación comercial influyen de manera directa en el riesgo de exposición. En anuros, la toxicidad de los insecticidas organofosforados y la sensibilidad a las temperaturas altas se han estudiado individualmente, sin considerar que en el ambiente pueden ejercer un efecto interactivo sobre las especies.

Debido a que los insecticidas organofosforados son los agroquímicos más usados en Colombia (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017), y que además se pronostica un aumento de la temperatura de hasta 2,14 °C en las próximas décadas en este territorio (IDEAM, 2017), resulta importante evaluar su efecto interactivo sobre la fauna anura, especialmente en aquellos estadios como los embriones, que están sometidos a cuerpos de agua contaminados. Por lo anterior, el presente estudio evaluó la toxicidad de los insecticidas organofosforados clorpirifos, diazinón y monocrotofos, los cuales son ampliamente comercializados en el país, bajo tres regímenes térmicos, en embriones de tres especies de anuros comúnmente asociados a agroecosistemas. En este sentido, se espera que a mayor temperatura los agroquímicos aumenten su efecto letal en los embriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de estudio

Se evaluaron tres especies de anuros del departamento del Tolima, Colombia: *Rhinella horribilis* (Wiegmann, 1833), *Boana xerophylla* (Duméril y Bibron, 1841) y *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864), las cuales se caracterizan por ser abundantes y reproducirse en hábitats acuáticos en donde se desarrollan sus embriones y larvas (Guayara-Barragán y Bernal, 2012). Diferentes masas de huevos de estas especies se colectaron en los meses de septiembre a diciembre del año 2017 en el corregimiento de Potrerillo, municipio de Coello (04°15' N, y 74°58' W; altitud 430 m. s. n. m), en una charca temporal (con las siguientes características fisicoquímicas: oxígeno= 3 - 6 ppm, temperatura= 22 - 37 °C y pH= 6 - 8), la cual se encuentra libre de intervención agrícola desde hace al menos doce años. Luego, dichas posturas se mezclaron y se transportaron en contenedores plásticos con agua del lugar de colecta al Laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima, donde se mantuvieron en agua de clorada a 23 ± 1 °C y con aireación continua hasta que los organismos alcanzaron el estadio diez (embriones) (Gosner, 1960).

Insecticidas de estudio

Se eligieron tres presentaciones comerciales de los insecticidas organofosforados más usados en Colombia, de acuerdo a Fernández *et al.* (2010): clorpirifos (nombre comercial: Lorsban™ 4 EC, producido por Dow AgroSciences en Estados Unidos), diazinón (nombre comercial: Diazol® E. C, producido por Quimor S. A. en Colombia), y monocrotofos (nombre comercial: Monocrotofos 600, producido por Fedearroz en Colombia).

Determinación de la toxicidad de los insecticidas organofosforados bajo tres regímenes térmicos

El desarrollo de las pruebas de toxicidad aguda realizadas en este trabajo siguió las recomendaciones propuestas por la US Environmental Protection Agency (US EPA, 2002). Para esto, en peceras de vidrio de 2 L de capacidad se agregó un litro de la solución experimental de cada insecticida organofosforado con cinco diferentes concentraciones (clorpirifos: 0,9; 1,8; 3,6; 7,2 y 14,4 mg/L; diazinón: 1,8; 3,6; 7,2; 14,4 y 28,8 mg/L; y monocrotofos: 131,25; 262,5; 525; 1050 y 2100 mg/L) y un control negativo (agua de clorada). El agua utilizada para preparar las soluciones se dechloró previamente por aireación. Durante 96 horas se expuso aleatoriamente un total de 25 embriones por especie a cada una de las concentraciones experimentales y el control, más su respectiva réplica (total: 50 embriones por tratamiento). Los embriones se expusieron tal y como se encontraban dentro de su postura en campo, así: los embriones de *E. pustulosus* dentro de un halo de su nido de espuma, los de *R. horribilis* dentro de la membrana elongada, tipo cadena, que los recubre, y los de *B. xerophylla* dentro de su gel hialino sobre el agua. Adicionalmente, estos mismos embriones se sometieron a tres regímenes térmicos constantes (23, 28 y 33 ± 1 °C) ajustados con termostatos graduados mediante baños de agua y monitoreados continuamente con termómetros digitales (HTC-2, ± 1 °C). Estas temperaturas se seleccionaron porque no resultan letales para las especies de estudio y se pueden encontrar frecuentemente en su hábitat (Turriago *et al.*, 2015).

Las soluciones experimentales se renovaron cada 24 horas, pero previo y posterior al recambio se registraron los parámetros fisicoquímicos de pH, oxígeno disuelto y conductividad (pHmetro Hanna Ref. HI 9126, Oxímetro Hanna Ref. HI 9146 y Multiparámetros Consort Ref. C 5020, respectivamente). En la Tabla 1 se muestra la media y la desviación estándar de los parámetros tomados antes y después del recambio para cada insecticida. El montaje experimental se ubicó en un estante metálico iluminado con lámparas de luz blanca (Phillips TLT 20W/54RS) conectadas a un temporizador digital (General Electric PM621), que permitió mantener un fotoperiodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad.

Tabla 1. Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones en las pruebas de toxicidad de los tres insecticidas organofosforados de estudio.

	Clorpirifos	
	Antes del recambio	Después del recambio
pH	7,06 (0,25)	7,06 (0,22)
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	392,39 (54,16)	350,84 (42,14)
Oxígeno disuelto (ppm)	7,05 (0,56)	7,96 (0,35)
	Diazinón	
	Antes del recambio	Después del recambio
pH	7,04 (0,41)	7,03 (0,29)
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	325,48 (40,03)	296,12 (28,23)
Oxígeno disuelto (ppm)	6,34 (0,67)	7,84 (0,31)
	Monocrotofos	
	Antes del recambio	Después del recambio
pH	6,29 (1,03)	6,01 (1,09)
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	360,45 (110)	321,14 (86,26)
Oxígeno disuelto (ppm)	5,91 (0,50)	7,93 (0,27)

Con la mortalidad acumulada a las 96 horas se calculó la concentración letal media (CL_{50}) y sus intervalos de confianza al 95 %, a través del método TSK Trimmed Spearman-Kärber (Versión 1.5) (Hamilton *et al.*, 1977), para cada insecticida y régimen térmico. Además, con el fin de comparar el efecto letal entre los tres regímenes térmicos se realizó una regresión logística por insecticida, empleando la prueba de Wald para el contraste de hipótesis debido al tamaño de la muestra y el tipo de datos de supervivencia obtenidos (1= muerto, 0= vivo). Este análisis se realizó en el programa estadístico Statistica (Versión 13.3).

Esta investigación fue avalada por el Comité de Bioética de la Universidad del Tolima (acta 2 del 2017) y contó con el Permiso Marco de Recolección otorgado por la Corporación Autónoma Regional del Tolima, CORTOLIMA, mediante la Resolución 3758 del 16 de Noviembre de 2016.

RESULTADOS

El clorpirifos fue el insecticida organofosforado más tóxico para las tres especies de estudio, con los valores de CL_{50} notablemente más bajos (rango CL_{50} para las tres especies a las tres temperaturas: 0,97 - 6,19 mg/L), seguido del diazinón (rango: 6,41 - 16,35 mg/L), y del monocrotofos (rango: 313,27 - 666,37 mg/L) (Tabla 2).

La mortalidad generada por los tres insecticidas varió de manera positiva y significativa en función de la temperatura (clorpirifos: Wald $X^2 = 214,183$, $p = 0,000$; diazinón: Wald

Tabla 2. Valores de CL₅₀ e intervalos de confianza al 95 % (mg/L) en los embriones de tres especies de anuros expuestos al clorpirifos, diazinón y monocrotofos bajo tres regímenes térmicos.

Especies	Clorpirifos			Diazinón			Monocrotofos		
	23°C	28°C	33°C	23°C	28°C	33°C	23°C	28°C	33°C
<i>E. pustulosus</i>	5,54 (4,88-6,29)	2,74 (2,28-3,30)	0,97 (0,81-1,16)	15,20 (13,31-17,34)	8,47 (7,31-9,82)	6,41 (5,70-7,21)	537,48 (450,44-641,35)	530,54 (474,73-592,91)	498,99 (409,36-608,25)
<i>B. xerophylla</i>	4,96 (4,57-5,39)	3,99 (3,61-4,40)	1,61 (1,39-1,87)	11,07 (9,72-12,61)	9,67 (8,83-10,59)	9,53 (8,76-10,37)	353,12 (335,65-371,49)	350,81 (332,47-370,15)	313,27 (287,94-340,83)
<i>R. horribilis</i>	6,19 (5,53-6,93)	1,86 (1,61-2,14)	1,57 (1,39-1,77)	16,35 (14,78-18,09)	9,37 (8,45-10,38)	9,66 (9,11-10,24)	666,37 (617,48-719,13)	627,62 (576,43-683,36)	521,30 (467,82-580,90)

X²= 24,297, *p*= 0,000; monocrotofos: Wald X²= 13,260, *p*= 0,001), y de la concentración de exposición (clorpirifos: Wald X²= 2021,069, *p*= 0,000; diazinón: Wald X²= 2021,193, *p*= 0,000; monocrotofos: Wald X²= 2453,208, *p*= 0,000), pero no entre las especies (clorpirifos: Wald X²= 4,827, *p*= 0,089; diazinón: Wald X²= 3,503, *p*= 0,173), con excepción del monocrotofos (Wald X²= 34,425, *p*= 0,000), ante el cual *B. xerophylla* fue más sensible (Tabla 2 y Fig. 1). También se encontró una interacción significativa entre la temperatura y la concentración (clorpirifos: Wald X²= 63,018, *p*= 0,000; diazinón: Wald X²= 77,449, *p*= 0,000; monocrotofos: Wald X²= 26,341, *p*= 0,000), en la cual la temperatura y las concentraciones más altas generaron las mortalidades mayores y los menores valores CL₅₀ (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los efectos tóxicos de los contaminantes químicos presentes en el medio acuático pueden ser influenciados por factores fisicoquímicos como la temperatura (Ferrando *et al.*, 1987; Lydy *et al.*, 1999; Osterauer y Köhler, 2008). En este sentido, la toxicidad puede disminuir al aumentar la temperatura, como en el caso de algunos organoclorados y piretroides (Ferrando *et al.*, 1987; Harwood *et al.*, 2009; Weston *et al.*, 2009; Alza *et al.*, 2016), o puede aumentar al incrementarse la temperatura, como en los organofosforados y carbamatos (Lydy *et al.*, 1990; 1999; Howe *et al.*, 1994; Boone y Bridges, 1999; Osterauer y Köhler, 2008; Harwood *et al.*, 2009; Patra *et al.*, 2015).

La relación directa entre los efectos generados por los contaminantes químicos y la temperatura coincide con los resultados del presente estudio, especialmente para el clorpirifos y el diazinón, puesto que los promedios de los valores CL₅₀ se incrementaron cuatro y 1,6 veces, respectivamente, por un aumento de 10 °C. En el caso del clorpirifos, estudios como el de Lydy *et al.* (1999) y Harwood *et al.* (2009) muestran la misma tendencia, aunque la toxicidad del insecticida en las especies *Chironomus tentans* y *C. dilutus* (Clase: Insecta) se incrementó sólo 1,7 veces frente a un aumento de 10 °C. También, Patra *et al.* (2015) encontraron que el clorpirifos genera mayor letalidad en

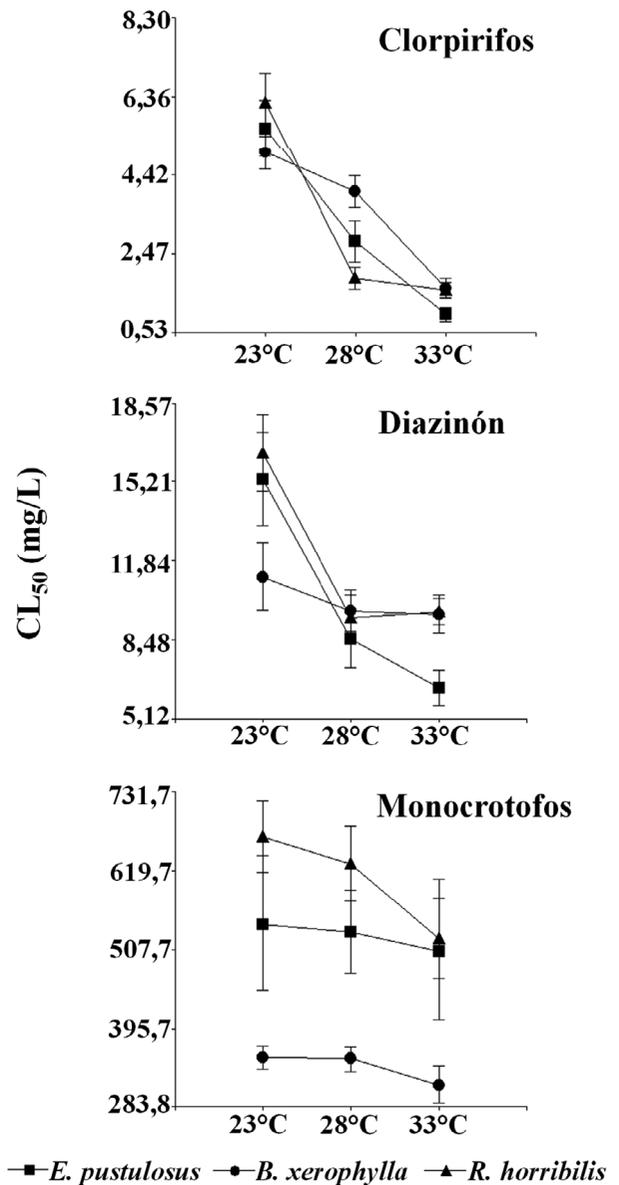


Figura 1. Comparación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de los embriones de anuros expuestos al clorpirifos, diazinón y monocrotofos bajo tres regímenes térmicos. Las barras de error representan los intervalos de confianza al 95 %.

los peces *Bidyanus bidyanus* (Mitchell, 1838) y *Onchorynchus mykiss* (Walbaum, 1792) a las temperaturas más altas de exposición, con valores de Concentración Media Efectiva (EC_{50}) significativamente más altos a 15 °C que a 20 y 35 °C. Además, ellos establecieron que las concentraciones subletales de clorpirifos generan la reducción de la tolerancia térmica de los peces en 2,5 y 5,8 °C. Para el Diazinón se encontró sólo un estudio, en el que a concentraciones de 2000 y 3000 µg/L la mortalidad embrionaria del pez cebra (*Danio rerio*) aumentó cerca al 100 % a una temperatura de 33,5 °C, en comparación con la registrada a 28 y 30 °C (Osterauer y Köhler, 2008). Finalmente, para el insecticida monocrotofos no se tiene conocimiento de estudios que relacionen su toxicidad con la temperatura.

Los valores CL_{50} para el clorpirifos y el diazinón se incrementaron hasta cuatro veces por una diferencia en la temperatura de diez grados centígrados, lo cual concuerda con el trabajo de Mayer y Ellersiek (1988), quienes mencionan que muchos químicos inorgánicos u orgánicos (Lydy *et al.*, 1999) presentan un coeficiente de temperatura Q_{10} entre dos y cuatro, lo que indica un incremento en la toxicidad entre dos a cuatro veces por un cambio de 10 °C en la temperatura del agua. La mayor toxicidad de los insecticidas evaluados (especialmente del clorpirifos y diazinón) a la temperatura experimental más alta se podría atribuir al aumento de la tasa metabólica, de absorción y posiblemente de biotransformación de los insecticidas por parte de los organismos (Lydy *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 2009), lo cual puede aumentar la permeabilidad cutánea a los insecticidas (Restrepo y Guerrero, 1979; Harwood *et al.*, 2009) e incrementar el riesgo de los organismos expuestos. También, puede acelerar la degradación de los contaminantes químicos (Weston *et al.*, 2009), de manera que sus productos pueden llegar a ser más tóxicos que sus formas iniciales, como en el caso del clorpirifos y del diazinón (Restrepo y Guerrero, 1979; Snawder y Chambers, 1989; Sparling y Fellers, 2007). Esto explicaría el notable aumento de la mortalidad encontrado para estos dos insecticidas a 33 °C. No obstante, la degradación del monocrotofos no genera compuestos de alta toxicidad (Guth, 1994), lo que también explicaría porque no fue tan tóxico como el clorpirifos y diazinón.

CONCLUSIONES

El presente estudio encontró que el clorpirifos fue el insecticida más tóxico para los embriones de las tres especies de anuros evaluadas, seguido del diazinón y el monocrotofos. También, que la toxicidad de los insecticidas organofosforados es afectada por la temperatura, con un efecto más evidente en el clorpirifos, ya que un aumento de 10 °C, que ambientalmente puede registrarse en un mismo día, hace que la mortalidad en los embriones de los anuros estudiados se incremente hasta cuatro veces. Teniendo

en cuenta que la temperatura es una variable que afecta la toxicidad de estos compuestos, se recomienda tenerla en cuenta cuando se estudien dichas sustancias, ya sea para mantener un ambiente térmico controlado durante las pruebas de toxicidad en laboratorio o para hacer evaluaciones más realistas en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima (código: 340120516) y al Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación, Colciencias (código 110574558312) por la financiación de esta investigación. También, al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias por la beca de pasantía otorgada a C.A.G. (Resolución 0305 del 16 de Marzo de 2018).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alza CM, Donnelly MA, Whitfield SM. Additive effects of mean temperature, temperature variability, and chlorothalonil to red-eyed treefrog (*Agalychnis callidryas*) larvae. *Environ Toxicol Chem.* 2016;35(12):2998-3004. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.3484>
- Angilletta Jr MJ, Angilletta MJ. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. New York: Oxford University Press; 2009. p. 290.
- Baier F, Jedinger M, Gruber E, Zaller JG. Temperature-Dependence of glyphosate-based herbicide's effects on egg and tadpole growth of common toads. *Front Environ Sci.* 2016;4:1-10. Doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00051>
- Beebe TJ, Griffiths RA. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biol Conserv.* 2005;125(3):271-285. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>
- Boone MD, Bridges CM. The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). *Environ Toxicol Chem.* 1999;18(7):1482-1484. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620180720>
- Catenazzi A. State of the world's amphibians. *Annu Rev Environ Resour.* 2015;40:91-119. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>
- Collins JP, Storfer A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers Distrib.* 2003;9(2):89-98. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x>
- De Sá RO. Crisis global de biodiversidad: importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. *Agrociencia.* 2005;9(1-2):513-522.

- Fernández DG, Mancipe LC, Fernández DC. Intoxicación por organofosforados. *Revista Med.* 2010;18(1):84-92. Doi: <https://doi.org/10.18359/rmed.1295>
- Ferrando MD, Andreu-Moliner E, Almar MM, Cebrian C, Nunez A. Acute toxicity of organochlorinated pesticides to the European eel, *Anguilla anguilla*: the dependency on exposure time and temperature. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1987;39(3):365-369. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01688297>
- Gallo-Delgado SM, Palacio-Baena JA, Gutiérrez PDA. Efectos del insecticida Clorpirifos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae). *Actual Biol.* 2006;28(84):51-58.
- Giesy JP, Solomon KA. Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in North America. Giesy JP, Solomon KA, editors. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* Vol 231. New York: Springer; 2014. p. 1-269.
- Gosner KL. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica.* 1960;16(3):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. Doi: <https://doi.org/10.15446/caldasia>
- Guth JA. Monocrotophos - Environmental Fate and Toxicity. In: Ware GW, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* Vol 139. New York: Springer; 1994. p. 75-136.
- 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: <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- Harwood AD, You J, Lydy MJ. Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: toxicokinetic confirmation. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(5):1051-1058. Doi: <https://doi.org/10.1897/08-291.1>
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, *et al.* Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environ Health Perspect.* 2006;114(1):40-50. Doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>
- Howe GE, Marking LL, Bills TD, Rach JJ, Mayer Jr FL. Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2, 4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem.* 1994;13(1):51-66. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620130109>
- Hussain QA. Global amphibian declines: a review. *Int J Biodivers Conserv.* 2012;4(10):348-357. Doi: <https://doi.org/10.5897/IJBC12.008>
- IDEAM. Cambio Climático en Colombia. Análisis de Vulnerabilidad y Riesgo por Cambio Climático en Colombia. Tercera Comunicación Nacional de Cambio Climático. IDEAM, PNUD, MADS, DNP, CANCELLERÍA, FMAM. Bogotá D.C., Colombia. [Serial online] 2017. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=38186>. Citado: 17 Mar 2018.
- Instituto Colombiano Agropecuario. Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2016. [Serial online] 2017 Diciembre. Disponible en: https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos/Estadisticas/Cartilla-Plaguicidas-2016_22-01-18.aspx. Citado: 17 Mar 2018.
- Kavitha P, Rao JV. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic Biochem Physiol.* 2007;87(2):182-188. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.008>
- Lydy MJ, Lohner TW, Fisher SW. Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquat Toxicol.* 1990;17(1):27-44. Doi: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90010-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90010-M)
- Lydy MJ, Belden JB, Ternes MA. Effects of temperature on the toxicity of M-parathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1999;37(4):542-547. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002449900550>
- Mattoon A. Amphibia fading. *World Watch.* 2000;13(4):12-23. Doi: <https://doi.org/10.1088/2058-7058/13/12/29>
- Mayer F, Ellersieck M. Experiences with single-species tests for acute toxic effects on freshwater animals. *Ambio.* 1988;17(6):367-375.
- Ortiz-Santaliestra ME, Egea-Serrano A. Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Bol Asoc Herpetol Esp.* 2013;24(1):1-34.
- Ortiz-Santaliestra ME, Maia JP, Egea-Serrano A, Brühl CA, Lopes I. Biological relevance of the magnitude of effects (considering mortality, sub-lethal and reproductive effects) observed in studies with amphibians and reptiles in view of population level impacts on amphibians and reptiles. *EFSA Supporting Publications.* 2017;14(7):1-151. Doi: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1251>
- Osterauer R, Köhler HR. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2008;86(4):485-494. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>

- Patra RW, Chapman JC, Lim RP, Gehrke PC, Sunderam RM. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environ Toxicol Chem.* 2015;34(8):1809-1817. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.2990>
- 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.
- Randall D, Burggren W, French K. *Eckert fisiología animal mecanismos y adaptaciones.* 4 ed. Madrid: Editorial Edigrafos S. A.; 2002. p. 738-739.
- Restrepo M, Guerrero E. Plaguicidas organofosforados revisión de sus aspectos médicos. *Acta Med Colomb.* 1979;4(1):23-47.
- Richards SM, Kendall RJ. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem.* 2002;21(9):1826-1835. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210910>
- Robles-Mendoza C, Zúñiga-Lagunes SR, de León-Hill CAP, Hernández-Soto J, Vanegas-Pérez C. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquat Toxicol.* 2011;105:728-734. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.001>
- Rumschlag SL, Boone MD, Fellers G. The effects of the amphibian chytrid fungus, insecticide exposure, and temperature on larval anuran development and survival. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(11):2545-2550. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.2707>
- Snawder JE, Chambers JE. Toxic and developmental effects of organophosphorus insecticides in embryos of the South African clawed frog. *J Environ Sci Heal B.* 1989;24(3):205-218. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/03601238909372644>
- Sparling DW, Fellers G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. *Environ Pollut.* 2007;147(3):535-539. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.036>
- Sparling DW, Fellers GM. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(8):1696-1703. Doi: <https://doi.org/10.1897/08-336.1>
- Turriago JL, Parra CA, Bernal MH. Upper thermal tolerance in anuran embryos and tadpoles at constant and variable peak temperatures. *Can J Zool.* 2015;93(4):267-272. Doi: <https://doi.org/10.1139/cjz-2014-0254>
- US Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012. Washington D.C, U.S: Environmental Protection Agency Office of Water; 2002. p. 275.
- Weston DP, You J, Harwood AD, Lydy MJ. Whole sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: III. Temperature manipulation. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(1):173-180. Doi: <https://doi.org/10.1897/08-143.1>
- Wijesinghe MR, Bandara MGDK, Ratnasooriya WD, Lakraj GP. Chlorpyrifos-induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011;60(4):690-696. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9577-3>