



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Efecto de los insecticidas neonicotinoides y diamidas antranílicas sobre la metamorfosis de anfibios anuros”

Tesista:

Bióloga. Shirley V. Daniela Fonseca Peña

Directora:

Dra. Céline Marie Julie Brodeur

Codirector:

Dr. Guillermo Sebastian Natale

Año:

2023

Efecto de los insecticidas neonicotinoides y diamidas antranilicas sobre la metamorfosis de anfibios anuros

RESUMEN

Las familias de insecticidas de los neonicotinoides (NEO) y de las diamidas antranilicas (DIA) son altamente utilizadas en cultivos de importancia nacional en la Argentina como la soja y el maíz. En el país, mayormente son usados los insecticidas tiametoxam (TIA) e imidacloprid (IMI) en el caso de los NEO, y los insecticidas clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) en el caso de las DIA. Como consecuencia del alto uso en campo y en relación con la persistencia en el medio ambiente y el alto potencial de lixiviación de las moléculas, la detección de estas clases de insecticidas en superficies acuáticas ha aumentado, particularmente en la región pampeana. Causando así, un aumento de la contaminación y un posible riesgo en la fauna acuática. Información que se encuentra ampliamente descrita en el Capítulo 1. De acuerdo con esto, se plantea el desarrollo de la presente tesis que tiene como objetivo, evaluar el riesgo que representa la exposición de esta clase de insecticidas en renacuajos de anuros autóctonos de la región pampeana. De esta forma, se realizaron exposiciones agudas y subcronicas hasta la finalización de la metamorfosis en renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum*, quien fue la especie modelo experimental.

Con el fin de iniciar la caracterización toxicológica de los NEO en anuros, se desarrolló el capítulo 2, en el que se evaluó la toxicidad aguda de TIA e IMI en tres especies de anuros autóctonos de la región pampeana (*R. arenarum*, *Rhinella fernandezea* y *Scinax granulatus*), y, además, se evaluaron los efectos de las altas concentraciones (mg/L) de TIA en la exposición subcronica a 21 días y hasta la finalización de la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*. A partir de los valores de toxicidad aguda obtenidos, se logró determinar que los renacuajos de *R. arenarum* en estadio 25 (E25) y estadio 27 (E27) y *S. granulatus* en E25 presentan mayor sensibilidad a la exposición con el NEO, IMI. También se logró observar que la exposición a altas concentraciones de TIA durante 21 días y hasta la finalización de la metamorfosis en renacuajos de *R. arenarum* en E27, ocasionó inicialmente una pérdida en la ganancia de peso en los renacuajos, así como también, una inhibición en el porcentaje de individuos que lograron finalizar la metamorfosis, un peso significativamente menor en los

organismos juveniles y una alteración morfológica en la que los organismos juveniles expuestos a las dos concentraciones mas bajas de TIA (9 y 18 mg/L), resultaron con el brazo izquierdo mas corto.

Asimismo, se inició la caracterización toxicológica de las DIA en anuros. En el Capítulo 3 se evaluó la toxicidad aguda de CLO y CIAN en tres especies de anuros autóctonos de la región pampeana (*R. arenarum*, *R. fernandezea* y *S. granulatus*), y, además, se evaluaron los efectos de las altas concentraciones (mg/L) de CLO en la exposición subcronica a 21 días y hasta la finalización de la metamorfosis del sapo común *R. arenarum*. A partir de los valores de toxicidad aguda obtenidos, se logró ver que en general CLO y CIAN, no mostraron altos valores de toxicidad en las especies expuestas y que, de acuerdo con el rango de valores registrados, los renacuajos de *S. granulatus* en E25 presentaron una mayor sensibilidad a la exposición con la DIA, CLO. También se logró observar que la exposición a altas concentraciones de CLO durante 21 días y hasta la finalización de la metamorfosis en renacuajos de *R. arenarum* en E27, ocasionó una respuesta no-lineal o no-monotonica en los valores correspondientes al tiempo de metamorfosis y proporción de individuos que lograron finalizar el desarrollo metamórfico desde el avance al estadio 42, lo que conllevó a que una menor proporción de individuos lograran finalizar la metamorfosis en las dos concentraciones mas bajas de CLO (20 y 40 mg/L). Por otra parte, los rasgos de peso y largo de los organismos juveniles no se vieron afectados por la exposición al insecticida.

El conocimiento inicial sobre el efecto de los insecticidas NEO en anuros conllevó a evaluar en el Capítulo 4, el efecto de la exposición a bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) incluidas las reportadas en la naturaleza de TIA e IMI en el desarrollo metamórfico del sapo común *R. arenarum*. Entre los resultados mas relevantes, se pudo determinar que la exposición de todos los tratamientos con TIA ocasionaron un retraso significativo en el tiempo que requirieron los individuos para finalizar la metamorfosis, efecto que no repercutió en la proporción de individuos que finalizaron el desarrollo, ni en los rasgos de peso y largo evaluados en los organismos juveniles. Por otra parte, la exposición con IMI no registró mayores efectos, al inicio del desarrollo los individuos expuestos se encontraron en un estado de aceleración, es decir, el requerimiento de menos días para avanzar en la metamorfosis, sin embargo, el efecto no se mantuvo en los siguientes estadios evaluados y finalmente solo ocurrió una disminución significativa en el número de individuos que lograron finalizar la metamorfosis en la concentración de exposición

mas alta (3400 µg/L). Asimismo, los rasgos de peso y largo evualuados en los organismos juveniles, no se vieron afectados por la exposición al insecticida.

De igual forma, el conocimiento inicial sobre el efecto de los insecticidas de las DIA en anuros conllevó a evaluar en el Capítulo 5, el efecto de la exposición a bajas concentraciones (µg/L) incluidas las reportadas en la naturaleza de CLO y CIAN en el desarrollo metamórfico del sapo común *R. arenarum*. Los resultados permitieron determinar que los dos insecticidas actuaron de manera similar, de tal manera, que ocasionaron una disminución significativa en la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis en la mayoría de los tratamientos de exposición, además de registrar una respuesta no-lineal o no-monotonica en la variable correspondiente al tiempo de metamorfosis, y en general, los rasgos de peso y largo evaluados en los organismos juveniles no se vieron afectados por la exposición a los insecticidas.

Finalmente, el conocimiento de los efectos individuales de los insecticidas estudiados en la especie modelo *R. arenarum*, permitió desarrollar en el Capítulo 6, un primer acercamiento a una exposición realista a campo de los insecticidas, de esta manera, se evaluó el efecto de la exposición de las mezclas binarias de los insecticidas TIA, IMI y CLO en el desarrollo metamórfico del sapo común *R. arenarum*. En general, se pudo determinar que la exposición de los insecticidas en la mezcla (TIA-IMI; CLO-TIA; CLO-IMI), disminuye el efecto individual de los insecticidas en la metamorfosis de *R. arenarum*. En cuanto a los rasgos aptitudinales evaluados en los organismos juveniles, se observó que, la exposición en mezcla con los NEO, TIA-IMI ocasionó que los individuos tuvieran un peso significativamente menor, y que, en los individuos expuestos con TIA y CLO, y a las mezclas con TIA-IMI y CLO-IMI disminuyera significativamente la capacidad de salto.

En general, a lo largo de las exposiciones realizadas durante la metamorfosis de *R. arenarum*, se evidenció que la mayoría de los efectos descritos con los insecticidas NEO y DIA sucedieron durante la transición de estadio 39 al estadio E42, esto, permitió discutir a lo largo de los capítulos, el efecto o acción que puede tener estas dos clases de insecticidas en la función tiroidea de *R. arenarum* y de ser esta, la posible vía por la cual se ve alterado el desarrollo metamórfico en los individuos expuestos. En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral indican que, aunque los valores de toxicidad aguda de los insecticidas NEO, TIA e IMI y las DIA, CLO y CIAN en renacuajos de anuros de la región pampeana, no evidenciaron una alta toxicidad, las exposiciones de los

insecticidas a lo largo de la metamorfosis de *R. arenarum* ocasionaron alteraciones relevantes en el desarrollo, efectos que se observaron tanto en las exposiciones individuales como en mezclas binarias y en concentraciones que han sido reportadas en la naturaleza, lo que puede significar un riesgo en las poblaciones naturales. Es por esto, que se recomienda tener en cuenta estos resultados y esta clase de estudios en las evaluaciones de riesgo de los insecticidas NEO y DIA en especies no objetivo.

Palabras claves: Neonicotinoides, Diamidas antranílicas, Insecticidas, Metamorfosis, Anfibios

Effect of neonicotinoid insecticides and anthranilic diamides on the metamorphosis of anuran amphibians.

ABSTRACT

The neonicotinoid (NEO) and anthranilic diamide (AD) families of insecticides are heavily used on crops of national importance in Argentina such as soybean and maize. In the country, the insecticides thiamethoxam (THIA) and imidacloprid (IMI) are mostly used in the case of NEO, and the insecticides chlorantraniliprole (CHLO) and cyantraniliprole (CYAN) in the case of AD. As a consequence of the high field use and in relation to the persistence in the environment and the high leachability potential of the molecules, the detection of these classes of insecticides on aquatic surfaces has increased, particularly in the Pampas region. Thus causing an increase in pollution and a possible risk to aquatic fauna. Information is described in detail in Chapter 1. Accordingly, the aim of this thesis is to evaluate the risk posed by exposure to this class of insecticides in tadpoles of anurans native to the Pampean region. In this manner, acute and sub-chronic exposures were performed until the completion of metamorphosis in tadpoles of the common toad *Rhinella arenarum*, which was the experimental model species.

In order to initiate the toxicological characterisation of NEO in anurans, Chapter 2 evaluated the acute toxicity of THIA and IMI in three species of anurans native to the Pampean region (*R. arenarum*, *Rhinella fernandezea* and *Scinax granulatus*), and the effects of high concentrations (mg/L) of THIA on sub-chronic exposure at 21 days and until the end of metamorphosis of the common toad *R. arenarum* were also evaluated. According to the acute toxicity values obtained, it was determined that the tadpoles of *R. arenarum* at stage 25 (S25) and stage 27 (S27) and *S. granulatus* at S25 are more sensitive to exposure with NEO, IMI. It was also observed that exposure to high concentrations of THIA for 21 days until the completion of metamorphosis in tadpoles of *R. arenarum* in E27, initially caused a loss in weight gain in tadpoles, as well as an inhibition in the percentage of individuals that reached the end of metamorphosis, a significantly lower weight in juvenile organisms and a morphological alteration in which juvenile organisms exposed to the two lowest concentrations of THIA (9 and 18 mg/L), had shorter left arms.

The toxicological characterisation of AD in anurans was also initiated. In Chapter 3, the acute toxicity of CHLO and CYAN was evaluated in three anuran species native to the Pampas region (*R. arenarum*, *R. fernandezea* and *S. granulatus*), and the effects of

high concentrations (mg/L) of CHLO on sub-chronic exposure at 21 days and until the end of metamorphosis of the common toad *R. arenarum* were also evaluated. According to the acute toxicity values obtained, it was observed that in general CHLO and CYAN did not show high toxicity values in the exposed species and that, according to the range of values recorded, the tadpoles of *S. granulatus* at S25 showed a greater sensitivity to exposure with AD, CHLO. It was also observed that exposure to high concentrations of CHLO for 21 days until the completion of metamorphosis in *R. arenarum* tadpoles at S27, caused a non-monotonic response in the values corresponding to the metamorphosis time and proportion of individuals that reached the end of metamorphic development from the advance to stage 42, causing that, a lower proportion of individuals completed metamorphosis at the two lowest CLO concentrations (20 and 40 mg/L). In addition, weight and length traits of juvenile organisms were not affected by insecticide exposure.

Initial knowledge on the effect of NEO insecticides on anurans allowed to evaluate in Chapter 4, the effect of exposure to low concentrations ($\mu\text{g/L}$) including those reported in nature of THIA and IMI on the metamorphic development of the common toad *R. arenarum*. Among the most relevant results, it was determined that exposure to all THIA treatments caused a significant delay in the time required for individuals to complete metamorphosis, an effect that did not affect the proportion of individuals that completed development, nor the weight and length traits assessed in juvenile organisms. While exposure to IMI showed no major effects, at the beginning of development exposed individuals were in an accelerated state, meaning they required fewer days to progress through metamorphosis, however, the effect was not maintained in the following stages evaluated and eventually there was only a significant decrease in the number of individuals reached the metamorphosis at the highest exposure concentration (3400 $\mu\text{g/L}$). Also, weight and length traits, as assessed in juvenile organisms, were not affected by insecticide exposure.

Similarly, initial knowledge of the effect of AD insecticides on anurans allowed to assessment in Chapter 5 of the effect of exposure to low concentrations ($\mu\text{g/L}$) including the reported in nature of CHLO and CYAN on the metamorphic development of the common toad *R. arenarum*. The results showed that the two insecticides acted in a similar manner, causing a significant decrease in the proportion of individuals that reached the end of metamorphosis in most of the exposure treatments, as well as a non-monotonic response in the variable corresponding to metamorphosis time, and in general,

the weight and length traits evaluated in the juveniles were not affected by exposure to the insecticides.

Finally, the knowledge of the individual effects of the studied insecticides on the model species *R. arenarum*, allowed to develop in Chapter 6, a first approach to a realistic field exposure of the insecticides, thus, the effect of the exposure of binary mixtures of the insecticides THIA, IMI and CHLO on the metamorphic development of the common toad *R. arenarum* was evaluated. In general, it could be determined that exposure of the insecticides in the mixture (THIA-IMI; CHLO-THIA; CHLO-IMI), decreases the individual effect of the insecticides on the metamorphosis of *R. arenarum*. Regarding the fitness traits evaluated in juvenile organisms, it was observed that exposure in mixture with NEO, THIA-IMI caused individuals to have a significantly lower weight, and that, in individuals exposed to THIA and CHLO, and to mixtures with THIA-IMI and CHLO-IMI, jumping ability decreased significantly.

In general, throughout the exposures realized during the metamorphosis of *R. arenarum*, it was evidenced that most of the effects described with the insecticides NEO and AD occurred during the transition from stage 39 to stage E42, this allowed to discuss throughout the chapters, the effect or action that these two classes of insecticides can have on the thyroid function of *R. arenarum* and if this is the possible route of alteration in the metamorphic development in the exposed individuals. In conclusion, the results obtained in this doctoral thesis indicate that, although the acute toxicity values of the insecticides NEO, THIA and IMI and the AD, CHLO and CYAN in tadpoles of anurans from the Pampean region did not show high toxicity, the exposures of the insecticides throughout the metamorphosis of *R. arenarum* caused relevant alterations in development, effects that were observed both in individual exposures and in binary mixtures and in concentrations that have been reported in nature, which can represent a risk in natural populations. Therefore, it is recommended to take these results and these classe of studies into account in risk assessments of NEO and DIA insecticides in non-target species.

Key words: Neonicotinoids, Anthranilic Diamides, Insecticides, Metamorphosis, Amphibians.

AGRADECIMIENTOS

Mi mas sincero agradecimiento a mi directora Julie Brodeur, por su confianza en el desarrollo de la presente investigación, su guía a lo largo de todos estos años y constante disposición resolutiva durante mi aprendizaje.

A Nina, que, aunque no la llegué a conocer cercanamente, fue ella quien me contacto con Guillermo Natale, mi co-director. Quien me aconsejo y me permitió tener un primer acercamiento con la ecotoxicología y su estudio con anuros. ¡Gracias!

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET de Argentina, por la beca de formación Doctoral Latinoamérica que me fue otorgada y que me ha permitido crecer profesionalmente.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de la Plata, por su gratuidad y calidad.

A todas las chicas del grupo de Biodiversidad y Ecología Ambiental del INTA Castelar: Brenda, Jimena, Belén, Natalia, Julie, Laura Medero, Laura Solari, Romina, Noelia. Por que desde el dia uno, me hicieron sentir en casa. ¡Gracias por todo lo compartido!

A Belu y a Naty, por el aguante, los consejos en la escritura y ayuda para con mis renacuajitos.

A mi dos grandes amigas, Juanita y Aleja, por acompañarme en la distancia y siempre tener la mejor de las energías para conmigo.

A mi Chuan Chuan, por tu alegría y cuidado para conmigo y total e incondicional compañía a lo largo de este camino y tanto amor. ¡Gracias mi vida!

A mi familia, en especial a mis padres, Aydeé y Raúl, mis hermanos, Laura, Lina y Oscar y mis abuelitos, Mercedes, Cecilia y Daniel. Por el amor y total apoyo que siempre me han brindado. Esto es por y para ustedes. Les amo y les extraño mucho.

Finalmente, quiero agradecer a este bello país llamado Argentina y como lo llamo mi “segundo hogar” por brindarme años, paisajes y personas hermosas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	7
AGRADECIMIENTOS	10
1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Agricultura Argentina	1
1.2. Contaminación de ambientes acuáticos por plaguicidas	2
1.3 Neonicotinoides en ambientes acuáticos.....	4
1.4 Diamidas Antranílicas en ambientes acuáticos.....	5
1.5 Aspectos del desarrollo larval en los anuros	6
1.6 El sapo común <i>Rhinella arenarum</i> como modelo experimental	8
HIPÓTESIS GENERAL.....	9
OBJETIVOS GENERALES	9
2. CAPÍTULO 2. Toxicidad aguda y subcrónica, e impacto sobre la metamorfosis de insecticidas formulados con los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid en renacuajos de anfibios anuros.	11
2.1. INTRODUCCIÓN.....	11
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.2.1. Especies estudiadas	14
2.2.2. Organismos Utilizados	15
2.2.3. Características físico-químicas del agua utilizada en los bioensayos.....	15
2.2.4. Sustancias testeadas	16
2.2.5. Protocolos experimentales	16
2.2.5.1. Preparación de las soluciones de prueba.....	16
2.2.5.2. Bioensayos de toxicidad aguda.....	16
2.2.5.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica.....	17
2.2.5.4. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	18
2.2.6. Verificación analítica de la concentración de las soluciones madres.....	19
2.2.7. Análisis estadísticos	20
2.3 RESULTADOS.....	21
2.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres	21
2.3.2. Toxicidad aguda de los formulados con tiametoxam y imidacloprid	22
2.3.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica.....	23
2.3.3.1. Toxicidad subcrónica de un formulado con tiametoxam.....	23
2.3.3.2. Toxicidad subcrónica de un formulado con imidacloprid.....	24

2.3.4. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	26
2.3.4.1. Supervivencia.....	26
2.3.4.2. Tiempos de Metamorfosis.....	27
2.3.4.3. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	32
2.3.4.4 Alteraciones Morfológicas	33
1.3. DISCUSIÓN.....	36
3. CAPÍTULO 3. Toxicidad aguda y crónica, e impacto sobre la metamorfosis de insecticidas formulados con las diamidas antranilicas clorantraniliprol y ciantraniliprol en renacuajos de anfibios anuros.....	41
3.1. INTRODUCCIÓN.....	41
3.2. MATERIALES Y METODOS.....	43
3.2.1. Especies estudiadas	43
3.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo.....	44
3.2.3. Soluciones de prueba.....	44
3.2.4. Protocolos experimentales	45
3.2.4.1. Bioensayos de toxicidad aguda (96horas).....	45
3.2.4.2. Bioensayos de toxicidad subcrónica.....	45
3.2.4.3 Efecto de clorantraniliprole (CLO) sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	45
3.2.5. Análisis estadísticos.....	46
3.3 RESULTADOS.....	47
3.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres.....	47
3.3.2. Toxicidad aguda de los formulados con clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) en embriones y renacuajos.....	48
3.3.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica.....	49
3.3.3.1. Toxicidad subcrónica de un formulado de clorantraniliprol (CLO).....	49
3.3.3.2. Toxicidad subcrónica de un formulado con ciantraniliprol (CIAN).	50
3.3.4. Efecto de un formulado con clorantraniliprol (CLO) sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	52
3.3.4.1 Supervivencia.....	52
3.3.4.2 Tiempos de Metamorfosis.....	52
3.3.4.3 Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	58
3.4. DISCUSIÓN	59
4. CAPÍTULO 4. Efecto de dos insecticidas formulados con los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid sobre el desarrollo larval y metamorfosis del sapo común <i>Rhinella arenarum</i>: acercamiento a un escenario natural de exposición.	63
4.1 INTRODUCCIÓN.....	63

4.2. MATERIALES Y METODOS.....	65
4.2.1. Organismos Utilizados	65
4.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo.....	65
4.2.3. Soluciones de prueba.....	65
4.2.4 Diseño Experimental.....	66
4.2.5. Análisis estadísticos	66
4.3 RESULTADOS.....	67
4.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres	67
4.3.2. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	68
4.3.2.1. Tiempos de metamorfosis.	68
4.3.2.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	72
4.3.3. Efecto de un formulado de imidacloprid a concentraciones ambientalmente relevantes sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	73
4.3.3.1. Tiempos de metamorfosis	73
4.3.3.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	77
4.4 DISCUSIÓN.....	78
5. CAPÍTULO 5. Efecto de dos insecticidas formulados con las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol sobre el desarrollo larval y metamorfosis del sapo común <i>Rhinella arenarum</i> : acercamiento a un escenario natural de exposición.....	82
5.1 INTRODUCCIÓN.....	82
5.2. MATERIALES Y METODOS.....	84
5.2.1. Especie estudiada y organismos utilizados.....	84
5.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo.....	84
5.2.3 Soluciones de prueba.....	84
5.2.4 Diseño Experimental.....	85
5.2.5. Análisis estadísticos	86
5.3. RESULTADOS.....	86
5.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres	86
5.3.2. Efecto de un formulado con clorantraniliprol sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	87
5.3.2.1. Tiempos de metamorfosis.	87
5.3.2.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	92
5.3.3. Efecto de un formulado con ciantraniliprol sobre la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	93
5.3.3.1. Tiempos de metamorfosis	93
5.3.3.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.....	98
5.4. DISCUSIÓN.....	99

6. CAPITULO 6: Efecto de los insecticidas neonicotinoides, tiametoxam e imidacloprid y la diamida antranílica, clorantraniliprol en la metamorfosis del sapo común <i>Rhinella arenarum</i> en sus exposiciones individuales y mezclas binarias	103
6.1 INTRODUCCIÓN.....	103
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
6.2.1. Especie estudiada y organismos utilizados.....	105
6.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo.....	105
6.2.3 Soluciones de prueba.....	105
6.2.4 Diseño experimental.....	106
6.2.5. Análisis estadísticos.....	107
6.3 RESULTADOS.....	108
6.3.1 Concentración de plaguicidas en las soluciones madres.....	108
6.3.2 Efecto de la exposición individual y mezcla de tiametoxam e imidacloprid en la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	109
6.3.2.1 Tiempos de metamorfosis.....	109
6.3.2.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.....	113
6.3.3 Efecto de la exposición individual y mezcla de clorantraniliprol y tiametoxam en la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	114
6.3.3.1 Tiempos de metamorfosis.....	114
6.3.3.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.....	117
6.3.4 Efecto de la exposición individual y mezcla de clorantraniliprol e imidacloprid en la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i>	119
6.3.4.1 Tiempos de metamorfosis.....	119
6.3.4.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.....	122
6.3.5 Evaluación de la capacidad de salto de los individuos recién metamorfoseados	124
6.4. DISCUSIÓN.....	126
7. CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	136

1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Agricultura Argentina

Desde hace tres décadas, la agricultura industrial argentina adoptó una transformación tecnológica expansionista conocida como la “Segunda Revolución de las Pampas” (Pengue., 2014). En la actualidad, los datos oficiales de la secretaria de agricultura, ganadería y pesca del país indicaron que para la campaña del 2020/21 la superficie sembrada, es de aproximadamente 40 millones de hectáreas. El 51,6% lo comprende los cereales, entre los que se incluyen: maíz, trigo, avena, cebada, centeno, sorgo y arroz; el 46.1% las oleaginosas, que incluye: soja, girasol y maní; y un 2,3% que incluye: poroto y algodón (SAGyP., 2022). La soja y el maíz representan los cultivos con mayor superficie de siembra y por ende los de mayor producción (Figura 1.1). Más del 60% de su producción ocurre en la provincia de Buenos Aires y Córdoba, de hecho, la región conocida como la pampa húmeda, entre los que se incluyen, soporta el 60% del total de la producción agropecuaria nacional (Pórfido., 2014). Particularmente, la adopción de cultivos genéticamente modificados, siembra directa y la adopción de aplicaciones de plaguicidas en mezcla ha aumentado la diversidad de productos y componentes activos que se utilizan (Oerke., 2005; Kahl y Kleisinger., 2016). Aumentando con ello los riesgos de contaminación (Gaona et al., 2019). En el país, cerca de 400 productos fitosanitarios se encuentran habilitados para el uso en cultivos extensivos de cereales y oleaginosas (Guía online de productos fitosanitarios – CASAFE., 2022).



Figura 1.1. Cultivos extensivos de soja y maíz, ubicados en la localidad de Pergamino, provincia de Buenos Aires.

Esta práctica agrícola basada en el monocultivo y en el alto uso de plaguicidas, ha ocasionado profundos cambios en el paisaje (Carrasco et al., 2012), siendo la reducción de la diversidad biológica y las alteraciones en el ecosistema, sus principales consecuencias (Chaudhary et al., 2021; Suarez et al., 2021). Por ejemplo, los cambios en la hidrología regional, se ha descrito como el resultado de la expansión y transformación de la agricultura en la región pampeana (Jobbágy et al., 2021). E incluso, a escala local, se ha comprobado que, en zonas de cultivo, la practica agrícola sostenida e intensiva, la aplicación continua de plaguicidas y el comportamiento de variables climáticas, aumenta la degradación de los suelos y los riesgos de contaminación de acuíferos freáticos (Montico y Di Leo., 2021). Además, a través de la deriva durante las aplicaciones y por flujos de lixiviación, los plaguicidas pueden contaminar otros compartimientos ambientales (Villaamil et al., 2013), como los sedimentos, suelos y cuerpos de agua aledaños a las zonas de cultivo, donde suelen ser muy persistentes (Gaona et al., 2019; Pérez et al., 2021). De esta forma, son cada vez más los reportes de detecciones de plaguicidas en cuencas agrícolas pampeanas (De Gerónimo et al., 2014; Pérez et al., 2017; Corcoran et al., 2020; Mac Loughlin et al., 2022; Peluso et al., 2022).

1.2. Contaminación de ambientes acuáticos por plaguicidas

La producción agrícola a gran escala, con el fin de garantizar el mayor rendimiento y calidad posible, hace uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes (Vieria et al., 2016; Kumar et al., 2021). Potenciando, la degradación física, química y biológica de los suelos (Virto et al., 2014), y, en consecuencia, alterando el tiempo y la movilidad de los plaguicidas en el (Arias-Estévez et al., 2008). De esta manera, ha adquirido importancia el conocimiento sobre el destino medioambiental de los plaguicidas. Pueden encontrarse, en el aire, en suelos y cuerpos de agua aledaños a las zonas agrícolas (Arias-Estévez et al., 2008). Generalmente, los plaguicidas llegan a los cuerpos de agua a través de la escorrentía, lixiviación, deriva de la pulverización e incluso por drenaje subterráneo (Figura 1.2) (Mojiri et al., 2020). La presencia y el comportamiento de las sustancias en ambientes acuáticos, dependen de las características fisicoquímicas de las moléculas y del control en el manejo de cultivos, como los márgenes de siembra, franjas de protección y el tipo y forma en que se realizan las aplicaciones (Reichenberger et al., 2007; Remucal., 2014). De hecho, tras la liberación en el

medio ambiente, los plaguicidas experimentan procesos interdependientes denominados “la quimiodinámica de los plaguicidas”, en el que intervienen las propiedades fisicoquímicas inherentes y parámetros ambientales, en la determinación de la persistencia, distribución y destino final de las moléculas en el ambiente (Zacharia., 2011). Por ejemplo, en ambientes acuosos, una de las características fisicoquímicas más importantes de las moléculas, es la fotodegradación, debido a que brinda información sobre la persistencia que pueden llegar a tener en el medio (Remucal., 2014).



Figura 1.2. Cuenca hídrica aledaña a cultivos extensivos de soja y maíz, ubicado en la localidad de Pergamino, provincia de Buenos Aires.

Monitoreos a escala local en la región pampeana argentina, han podido establecer que la presencia y concentración de plaguicidas en aguas superficiales, varían por las precipitaciones (O’Brien et al., 2016; Mac Loughlin et al., 2022), ciclo de las cosechas y los cambios de manejo en los cultivos (O’Brien et al., 2016). En actividades agrícolas que emplean periodos de inundación, como el arroz, se ha documentado que el uso de plaguicidas puede generar grandes cargas en la zona cultivada y en cuerpos de agua naturales cercanos. Este es el caso del reciente estudio realizado en el Parque Natural de la Albufera en España, en el que se describió que el cultivo de arroz, actividad agrícola dominante de la zona, genera una mayor carga de plaguicidas en el agua y en menor proporción en los sedimentos, tanto en la zona cultivada como en los lagos naturales cercanos (Calvo et al., 2021). En otro caso, el monitoreo de una cuenca fluvial de Costa Rica durante 5 años, identificó que la presencia de plaguicidas en el agua y el sedimento era similar, y, sin embargo, los plaguicidas de mayor uso se detectaron en mayor concentración en los sedimentos (Carazo-Rojas et al., 2018).

La presencia de plaguicidas en ambientes acuáticos ha generado estudios que buscan identificar la vulnerabilidad y efectos sobre la fauna acuática. Globalmente, a través de estudios de análisis de riesgos ecotoxicológicos y bioensayos de exposición a diferentes niveles (micro o meso-cosmos) se ha podido estimar el grado de sensibilidad de distintos taxones (Calamari y Zhang., 2002; Biggs et al., 2007; Arias-Andrés et al., 2016; Stadlinger et al., 2018). Estudios a estos niveles se han documentado en la región pampeana argentina (Peltzer et al., 2008; Brodeur et al., 2014; Solis et al., 2016; Hunt et al., 2016; Brodeur et al., 2017; Solis et al., 2018; Agostini et al., 2020). En el caso de los anfibios, el frecuente uso y no controlado de plaguicidas se ha atribuido como una de las principales causas del fenómeno de disminución mundial de las poblaciones, siendo las especies con estadios larvales, organismos con características biológicas que le confieren gran sensibilidad (Boesten et al., 2007; Sparling y Fellers., 2009; Bishop et al., 2012; Wagner y Viertel., 2017). A partir de estudios realizados con larvas de anuros autóctonos de la región pampeana se ha podido determinar los efectos de los plaguicidas con mayor uso en la región (Boccioni et al., 2021; Aronzón et al., 2016; Bahl et al., 2021; Agostini et al., 2020). El cambio gradual hacia una agricultura moderna e intensiva en el país, ha diversificado el mercado de plaguicidas, que desde un principio ha sido dominado por los herbicidas, siendo el glifosato la molécula más utilizada (Arias et al., 2011). Asimismo, la consolidación de la expansión agrícola aumentó el uso de otros plaguicidas. Según datos oficiales, los insecticidas son los segundos de mayor uso en el país (Pórfido et al., 2014). En un principio, los piretroides fueron los insecticidas más utilizados, seguidos por los organofosforados y ester cíclicos (Bernardos y Zaccagnini., 2011). En la actualidad, el avance en la industria y el desarrollo de nuevas moléculas, catalogan a las familias de insecticidas de los neonicotinoides (NEO) y de las diamidas antranilicas (DIA) como unas de las más usadas en el país. Los principios activos mayormente comercializados son: tiametoxam (TIA) e imidacloprid (IMI), en el caso de los NEO y clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) en el caso de las DIA (Anguiano y Ferrari., 2019).

1.3 Neonicotinoides en ambientes acuáticos

Los NEO son unas de las familias de insecticidas más utilizadas en el mundo (Sánchez-Bayo., 2014; Kundoo et al., 2018). Debido a sus propiedades sistémicas, los NEO

presentan actividad en un amplio número de insectos plaga, y se utilizan para el tratamiento de semillas y cultivos, comúnmente de soja, maíz, algodón, arroz, cereales, hortalizas, frutales y demás (Simon-Delso et al., 2015). Actúan uniéndose a los receptores nicotínicos de acetilcolina en organismos blancos, generando un trastorno nervioso que puede causar la parálisis o la muerte (Mullins., 1993; Maienfisch., 2001). IMI fue el primer insecticida de esta familia en registrarse en el año 1991 (Hladik et al., 2018). TIA por su parte, fue el segundo insecticida NEO registrado en el año 1998. La naturaleza sistémica y las propiedades residuales de estos dos insecticidas han permitido que se utilicen en aplicaciones directas al suelo, foliares y en el tratamiento de semillas (Mullins., 1993; Maienfisch., 2001; Bonmatin et al., 2015).

Las características fisicoquímicas de los insecticidas NEO, particularmente su alta solubilidad en agua (Wood y Goulson., 2017) y el uso continuo en campo, hacen que sean persistentes en el ambiente y que puedan tener un alto potencial de lixiviación y escorrentía (Morrisey et al., 2015; Bonmatin et al., 2019). Lo que hace posible encontrarlas en todos los compartimientos ambientales, sea el agua, el suelo y el aire (Simon-Delso et al., 2015). Contaminación de aguas superficiales por NEO se han documentado en la región pampeana y en países como Estados Unidos, Canadá y China (De Gerónimo et al., 2014; Pérez et al., 2017; Pérez et al., 2021; Craddock et al., 2019; Montiel-León et al., 2019; Yi et al., 2019). Representando un alto riesgo para la fauna acuática y el ecosistema en general (Sanchez-Bayo et al., 2016).

1.4 Diamidas Antranílicas en ambientes acuáticos

Las DIA son una familia de insecticidas de última generación, que actúan uniéndose a los receptores de rianodina, los cuales intervienen en la contracción muscular coordinada, regulando la liberación de las reservas internas de calcio en el retículo sarcoplásmico (Lahm et al., 2005). Al actuar esta clase de insecticidas sobre el receptor, se afecta la liberación de calcio de manera que los canales quedan en un estado parcialmente abiertos, como consecuencia de esto los organismos blancos pueden presentar interrupción de la alimentación, letargo, parálisis y muerte (Lahm et al., 2005). CLO fue el primer insecticida de la familia en registrarse en el año 2007, las formulaciones incluyeron productos: granular dispersable en agua (WG), suspensión concentrada (SC), curasemilla y granular (Bentley et

al., 2010). Está destinado para el control de lepidópteros, coleópteros y algunos dípteros, en su estado larval y en algunos adultos (Bentley et al., 2010). Por sus características residuales actúan mayormente por ingestión y también por contacto (Bentley et al., 2010) y la mayoría de las aplicaciones son foliares (Astor et al., 2009). En cuanto a CIAN, es un insecticida de la familia de segunda generación registrado en el 2014 (EFSA., 2014). Se desarrolló con el fin de mejorar la acción sistémica en la planta, logrando que la acción del insecticida pueda perdurar más tiempo (Selby et al., 2013; Barry et al., 2014). Tiene actividad contra un amplio espectro de insectos chupadores y masticadores (Tiwari y Stelinski., 2013).

La distribución o destino de un plaguicida está determinado por el método y tasa de aplicación, tipo de vegetación, cubierta vegetal, topografía del terreno y condiciones climáticas (Tiryaki y Temur., 2010). Así mismo, la presencia de un plaguicida en sitios no objetivo ocurre mayormente a través de la escorrentía superficial y la lixiviación (Corcoran et al., 2020; Pandey et al., 2020). Investigaciones en laboratorio y campo han evidenciado el potencial de lixiviación de CLO y CIAN (Vela et al., 2017; Kolupaeva et al., 2019; Pandey et al., 2020) y que su persistencia en el medio acuoso está condicionado a las características fisicoquímicas y al comportamiento que puede tener las moléculas bajo distintas condiciones ambientales (Tiryaki y Temur., 2010; Kerle et al., 2007). Por ejemplo, la degradación del CLO y CIAN en agua sucede bajo una combinación de reacciones químicas y fotoquímicas, que dependen en gran medida del pH del medio en que se encuentra (Lavtižar et al., 2014; Redman et al., 2020). Contaminación de aguas superficiales por DIA se han reportado en países como estados unidos, malasia e indonesia (USEPA., 2008; CDPR., 2019; Elfikrie et al., 2020; Utami et al., 2020). Recientemente, en aguas agrícolas de la región pampeana argentina se ha detectado a los insecticidas CLO y CIAN (Brodeur et al., comunicación personal), e incluso, hay registros de detecciones de residuos de CLO en tejidos de anuros adultos autóctonos de la región pampeana (Brodeur et al., 2022).

1.5 Aspectos del desarrollo larval en los anuros

El desarrollo larval en anuros ha sido ampliamente estudiado en numerosas especies, por lo general, en aspectos relacionados al desarrollo ontogenético, morfo-fisiológico, ecológico, filogenético y evolutivo (Gomez et al., 2016). Durante la etapa larval y metamorfosis ocurren en simultaneo procesos morfogenéticos que incluyen: diferenciación

embrionaria, desarrollo y desaparición de estructuras larvales y diferenciación y desarrollo de estructuras propias del adulto (Fabrezi et al., 2012; Gomez et al., 2016). Los trabajos de Gosner, (1960) y Nieuwkoop y Faber, (1967) estandarizaron el desarrollo larval en función de los cambios morfológicos más representativos por medio de etapas o estadios y hasta la fecha siguen siendo los más utilizados.

En anuros, el desarrollo larval ocurre bajo el estricto control del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT), mediante la acción de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Boorse y Denver., 2004; Tata., 2006; Buchholz y Shi., 2018). Cada tejido del renacuajo responde de manera diferente a las HT (Tata., 2006). Funcionalmente, T4 es transportada de la glándula tiroideas al tejido destino, allí, por la actividad enzimática de las desyodasas, se convierte en T3, su forma más activa (Thambirajah et al., 2019). T3 es considerado como el precursor de la metamorfosis y su respuesta está determinada en función a los receptores nucleares o los transcritores TR, en su forma TR α ó TR β (Tata., 2006). De esta forma, T3 se une a los TR para regular la transcripción de genes diana (Paul et al., 2022), a través de estudios in vitro se ha demostrado que los TR funcionan como represores de los genes en ausencia de T3 y como activadores de esos mismos genes en presencia de T3 (Buchholz et al., 2018).

A partir de estudios pioneros, se han reconocido tres fases, durante la metamorfosis: 1) premetamorfosis, 2) prometamorfosis y 3) clímax metamórfico, atribuidos en función de los cambios morfológicos y de los niveles de las hormonas tiroideas en circulación (Etkin., 1936; Etkin., 1968). En ese sentido y según lo ilustrado por Thambirajah et al., (2019), la primera etapa es independiente de HT y ocurre el mayor crecimiento larval (Choi et al., 2017), incluye los estadios de Gosner (G) del 25 al 34. En la segunda fase, las HT aumentan progresivamente y va acompañada del desarrollo de las extremidades posteriores, incluye los estadios G del 35 al 39 y finalmente, a mediados de la tercera se registra el máximo pico de las HT y el desarrollo de los cambios morfológicos más abruptos, incluye los estadios G 40 y 46, durante esta misma etapa se registra un descenso de los niveles hormonales al finalizar la metamorfosis.

El conocimiento sobre los diversos procesos que ocurren durante la metamorfosis en anuros y su estandarización en etapas o estadios, hacen que estos organismos sean modelos

adecuados en la determinación de efectos por la exposición a plaguicidas. Entre los objetivos más estudiados, incluyen la alteración de las etapas de desarrollo en condiciones de alta y baja (concentraciones ambientales) toxicidad y efectos sobre el sistema endocrino (Wagner y Viertel., 2017). Recientemente, lo revisado por Stoks et al., (2022), indica que las tasas de crecimiento y desarrollo larvario suelen ser los efectos que mayormente se registran tras la exposición a plaguicidas.

1.6 El sapo común *Rhinella arenarum* como modelo experimental

Los anuros con etapa larval se consideran organismos con una alta plasticidad adaptativa, en la que, la variabilidad en su sensibilidad se relaciona con las características morfológicas de las especies y con el hábitat en el que se desarrollan (McDiarmid y Altig., 1999; Natale., 2006). *Rhinella arenarum* es una especie con comportamientos gregarios, “resistente”, abundante y fácil de encontrar en el medio natural por su estrategia reproductiva, suelen estar en lugares fácilmente localizables e incluso en aquellos que han sido altamente degradados o modificados (Panigo et al., 2022), por lo general se reproducen por periodos prolongados durante la primavera y el verano, tiempo del más alto pico en su actividad por el aumento de las precipitaciones y la temperatura (Natale., 2006). Trabajos pioneros como el de, Del Conde y Sirlin., (1952) describieron morfológicamente los primeros estadios de la especie hasta que alcanzan su inicio en la alimentación (Estadio 25). Las puestas se caracterizan por ser cordones gelatinosos en las que los huevos se encuentran alineados individualmente y en la que puede haber más de 2000 huevos, los cuales poseen altas tasas de desarrollo (Figura 1.3), asimismo, por su desarrollo larval gregario y sus necesidades nutricionales de fácil obtención, su mantenimiento en el laboratorio no presenta inconvenientes. Por lo general, su tasa de supervivencia es del 50 al 75% (Natale., 2006). Estas características hacen que los renacuajos de *R. arenarum* sean adecuados como modelos experimentales en la realización de bioensayos.

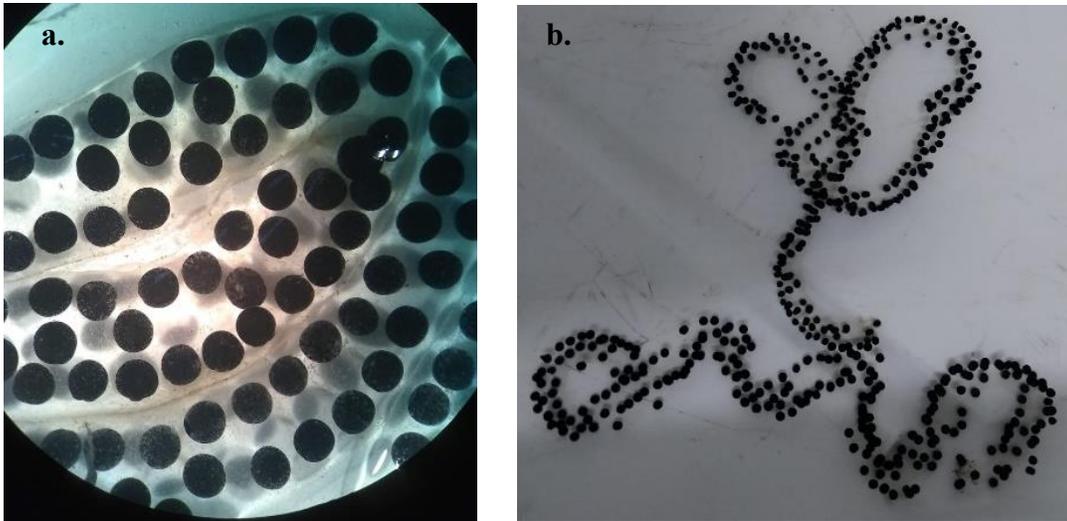


Figura 1.3. Puesta de huevos de la especie *Rhinella arenarum* **a.** Puesta de huevos vista a través de la lupa. **b.** Parte de una puesta de huevos mantenida en el laboratorio.

HIPÓTESIS GENERAL

Mediante la evaluación ecotoxicológica de los insecticidas neonicotinoides y diamidas antranilicas se determina que la exposición individual y en mezcla de los insecticidas afecta negativamente la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.

OBJETIVOS GENERALES

- Establecer la toxicidad aguda de los insecticidas neonicotinoides, tiametoxam e imadacloprid en estadios larvales de *Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezae* y *Scinax granulatus*.
- Establecer el efecto de los neonicotinoides, tiametoxam e imadacloprid en concentraciones a escala mg/L sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.
- Establecer la toxicidad aguda de los insecticidas de las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol en estadios larvales de *Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezae* y *Scinax granulatus*.

- Conocer el efecto de los insecticidas de las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol en concentraciones a escala mg/L sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.
- Conocer el efecto de los neonicotinoides, tiametoxam e imadacloprid en concentraciones que incluyen las ambientales sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.
- Conocer el efecto de los insecticidas de las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol en concentraciones que incluyen las ambientales sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.
- Conocer el efecto de las mezclas binarias con los insecticidas tiametoxam, imidacloprid y clorantraniliprol sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*.

2. CAPÍTULO 2. Toxicidad aguda y subcrónica, e impacto sobre la metamorfosis de insecticidas formulados con los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid en renacuajos de anfibios anuros.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los Neonicotinoides (NEO) son unas de las familias de insecticidas más utilizadas en el mundo (Sánchez-Bayo., 2014; Kundoo et al., 2018). Son altamente solubles en agua (Wood y Goulson., 2017) y poseen características potenciales de lixiviación y escorrentía (Bonmatin et al., 2019). Lo que hace posible encontrarlas en todos los compartimientos ambientales, sea el agua, el suelo y el aire (Simon-Delso et al., 2015).

Valores de toxicidad aguda se han documentado en renacuajos por la exposición a NEO (Tabla 2.1). Se ha encontrado un mayor número de registros para imidacloprid (IMI) a diferencia de un único dato en tiametoxam (TIA). El valor más alto de toxicidad se encontró con el único valor reportado en TIA (CL2mg/L), correspondiente a un testeo con un producto formulado (Tabla 2.1), Optigard Flex en *Lithobates sylvaticus* (Pochini y Hoverman., 2017). Similar a esto, en el caso de IMI, el valor de toxicidad más alto se encontró también en el testeo con productos formulados (Tabla 2.1), Glacoxan en *Boana pulchella* (Perez-iglesias et al., 2014).

En general, se considera que TIA e IMI presentan una baja toxicidad aguda en los vertebrados acuáticos (Thunnissen et al., 2020). En el caso de los peces, algunos valores sobre la toxicidad de TIA se encuentran por encima de los 100 mg/L (Finnegan et al., 2017; Rosado-Berrios., 2018; Kocamaz y Oruc., 2018), y otros autores reportan valores

² Capítulo publicado.

Fonseca Peña, S. V. D., Natale, G. S., Brodeur, J. C. (2022). Toxicity of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam and imidacloprid to tadpoles of three species of South American amphibians and effects of thiamethoxam on the metamorphosis of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. Vol 85:1019-1039. <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2147113>

bajos de 10 y 83,71 mg/L (El Euony et al., 2020; Yang et al., 2020). En IMI, ocurre de manera similar, se han obtenido valores superiores a 100 mg/L (Qadir et al., 2014; Xia et al., 2016; Wang et al., 2016; Chang et al., 2020) y otros por debajo de 1 mg/L (Desai y Parikh., 2014; Islam et al., 2019; Naiel et al., 2020). En anfibios, como se mencionó previamente, un único valor de 2 mg/L ha sido reportado para TIA en renacuajos de *Lithobates sylvaticus* expuestos a una formulación comercial (Pochini y Hoverman., 2017). Mientras que en el caso de IMI se han informado valores de CL50 superiores a los 50 mg/L (Perez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcuate et al., 2014; Feng et al., 2004; Saka y Tada., 2021). En algunos casos, la combinación de factores de estrés ha llegado a aumentar significativamente la mortalidad de renacuajos en exposiciones a concentraciones bajas de IMI (Sievers et al., 2018; Kenko et al., 2017).

Estudios que detallan los efectos de NEO en el desarrollo larval en anfibios son escasos. Actualmente se tiene conocimiento de nueve trabajos que examinaron el tema. Regularmente analizan efectos directos por la exposición a los insecticidas en aspectos de supervivencia, crecimiento y tiempo en el que ocurre la metamorfosis. Exposiciones a altas concentraciones de NEO han reportado efectos en renacuajos. En individuos de *Lithobates pipiens* la exposición a 8,5 mg/L de IMI ocasionó un retraso en el desarrollo y juveniles con un menor tamaño (Moe., 2017), así mismo, en renacuajos de *Xenopus laevis* expuestos a 20 mg/L de TIA se observó un retraso en el desarrollo y juveniles con menor peso (Jenkins et al., 2021). Por otra parte, los organismos expuestos a concentraciones ambientales de NEO, en su mayoría no reportan efectos (Robinson et al., 2019; Saka y Tada., 2021; Danis y Marlatt., 2021; Robinson et al., 2021). Sin embargo, se conocen dos estudios que sí reportan efectos con relación a la exposición con IMI (Moe., 2017; Robinson et al., 2017). Además, se ha comprobado que la combinación de factores de estrés puede alterar la metamorfosis. Por ejemplo, una exposición a concentraciones ambientales de IMI junto a la rápida disminución del volumen de agua en el estanque, conduce a una menor supervivencia durante la metamorfosis en renacuajos de *Lithobates sylvaticus* (Sweeney et al., 2021).

Actualmente no se tiene conocimiento de estudios que hayan evaluado los efectos de los NEO en el desarrollo larval de especies de anuros autóctonos de la región pampeana, a pesar de que el uso de TIA e IMI es amplio y que existen registros de la presencia de estos

plaguicidas en aguas superficiales e incluso en tejidos de anuros adultos (De Gerónimo et al., 2014; Pérez et al., 2017; Pérez et al., 2021; Brodeur et al., 2022). En este contexto, el objetivo del presente trabajo consiste en determinar la toxicidad aguda (96h) de TIA e IMI en tres especies de anuros (*Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezae* y *Scinax granulatus*) autóctonos de la región pampeana argentina y con amplia distribución en América del Sur. Además, se evaluará la toxicidad crónica (21d) de TIA e IMI y el efecto de TIA durante el desarrollo larval y finalización de la metamorfosis, en renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum*.

Tabla 2.1. Toxicidad aguda (CL50) de neonicotinoides en diferentes especies de anuros en su etapa larval. I.A.: Ingrediente Activo, I.C.: Intervalo de Confianza. G: Estadio Gosner. NF: Estadio Nieuwkoop y Faber. Los trabajos se agrupan por insecticida expuesto.

Especies	Presentación del Compuesto	Estadio	Tiempo de Exposición	CL50 mg/L	I.C. 95%	Referencia
Tiametoxam						
<i>Lithobates sylvaticus</i>	Comercial Optigard Flex 21,6% I.A	G28	48h	~ 2		Pochini y Hoverman 2017
Dinotefuran						
<i>Silurana tropicalis</i>	I.A > 98%	NF 49-50	96h	> 100		Saka y Tada 2021
Acetamiprid						
<i>Silurana tropicalis</i>	I.A > 98%	NF 49-50	96h	> 100		Saka y Tada 2021
Imidacloprid						
<i>Silurana tropicalis</i>	I.A > 98%	NF 49-50	96h	> 100		Saka y Tada 2021
<i>Boana pulchella</i>	Comercial Glacoxan 35 % I.A.	G 35-37	96h	52,622	48,470-58.185	Pérez-Iglesias et al 2014
<i>Boana pulchella</i>	I.A. 95,1%	G 35-37	96h	84,91	77,20-93,04	Ruiz de Arcaute et al 2014
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	I.A. 95%	45 días de edad	96h	129		Feng et al 2004
<i>Rana limnocharis</i>	I.A. 95%	30 días de edad	96h	82		Feng et al 2004
Clotianidina						
<i>Silurana tropicalis</i>	I.A > 98%	NF 49-50	96h	> 100		Saka y Tada 2021
<i>Hyla vesicolor</i>	Comercial Arena 0,25% Granulos		48h	>327		Miles et al 2017
<i>Lithobates clamitans</i>	Comercial Arena 0,25% Granulos		48h	>327		Miles et al 2017
<i>Lithobates pipiens</i>	Comercial Arena 0,25%		48h	>327		Miles et al 2017

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Especies estudiadas

Tres especies de anuros fueron estudiadas: El sapo común *Rhinella arenarum*, el sapito cavador *Rhinella fernandezae* y la ranita roncadora *Scinax granulatus*. Las tres especies presentan poblaciones estables y un estado de preocupación menor (LC) según la IUCN (2022).

Rhinella arenarum tiene amplia distribución en Argentina, desde el norte de la provincia de Jujuy hasta Chubut, esta, además, presente en el sur de Brasil, en Uruguay y Bolivia (Ceí., 1980). Es una especie de gran tamaño (largo hocico-cloaca entre 8 y 11 cm) que presenta hábitos terrestres. Su actividad reproductiva se observa principalmente luego de las lluvias de primavera y principios de verano. La ovoposición tiene lugar en cuerpos de aguas lenticos temporales, pequeños estanques o pantanos presentes en zonas abiertas peri-urbanas, agrícolas, naturales, conservadas, entre otros (Ceí., 1980). Las puestas se adhieren a objetos sumergidos en el agua y los renacuajos se alimentan y se desarrollan en el mismo lugar en donde son puestos los huevos.

Rhinella fernandezae se encuentra en el noreste argentino (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Santa Fe), en Uruguay, así como en el sur de Paraguay y de Brasil (IUCN., 2022). Es una especie de tamaño medio (largo hocico-cloaca entre 5 y 8 cm) de hábitos terrestres y cavadores. Las cuevas pueden llegar a tener 30 cm de profundidad, estas se pueden encontrar en pastizales, pajonales y césped de jardines (Gallardo y Varela de Olmedo., 1992). Su actividad reproductiva se prolonga entre agosto y marzo, mayormente luego de lluvias importantes (Martori et al., 2010). La ovoposición ocurre en charcos temporarios y cuerpos de agua permanentes en zonas peri-urbanas, agrícolas, de pastizales y demás (Gallardo y Varela de Olmedo., 1992).

Con respecto a *Scinax granulatus*, en la Argentina existen registros de su distribución en las provincias de Misiones, Entre Ríos y Buenos Aires (Ceí 1980; Agostini y Roesler., 2011). *S. granulatus* habita áreas abiertas pantanosas boscosas o con árboles dispersos los cuales son utilizados como refugios naturales (Agostini y Roesler., 2011). El periodo reproductivo se da

en la primavera y el verano (Vaira et al 2012). La ovoposición se realiza en el suelo o en la vegetación baja cercana a los márgenes de un cuerpo de agua, el cual puede un charco temporal, un estanque o un pequeño lago.

2.2.2. Organismos Utilizados

Las puestas de huevos de *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae*, fueron recolectadas durante la época de primavera en diversos cuerpos de agua permanentes y temporarios presentes en las 650 hectáreas (34°36'24S, 58°39'56W) del Centro Nacional de Investigación Agrícola (CNIA). Todos los huevos fueron recolectados dentro de las 24h de haber sido puestos y llevados enseguida al laboratorio donde fueron mantenidos en una habitación climatizada a 20 ± 2 °C y con un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad. En el caso de *Scinax granulatus*, en el lugar de muestreo previamente descrito, fue recolectado un amplexo, el cual, se mantuvo en un terrario y con las condiciones de humedad idóneas en el laboratorio, hasta que los huevos fueron depositados; después de que transcurrió un tiempo prudente y en el que se buscaba garantizar la fertilización correcta de los huevos, el amplexo fue liberado en el lugar inicialmente recolectado. Por otra parte, en el caso de *R. arenarum*, algunos de los huevos fueron utilizados para realizar bioensayos agudos con embriones. Todos los demás huevos fueron mantenidos hasta alcanzar los estadios 25 (E25) y 27 (E27) (Según clasificación, Gosner 1960). Los renacuajos fueron alimentados con acelga hervida de manera ad libitum al llegar al estadio 24-25 (Gosner 1960); momento en el cual empiezan a alimentarse.

2.2.3. Características físico-químicas del agua utilizada en los bioensayos

El agua utilizada en los bioensayos presentaba las siguientes características físicoquímicas: pH 8,15; color incoloro; turbiedad (UNT – unidad nefelométrica de turbidez) <5; sólidos disueltos totales 424 mg/L; dureza total 170 mg CaCO₃/L; fluoruros 1,14 mg/L; cloro activo residual 0 mg/L; cloruro 21 mg/L; sulfato <200 mg/L; nitrato 50 mg/L; nitrito <0,200 mg/L; amonio <0,200 mg/L. Todos los valores están dentro de las pautas aceptadas para las pruebas con renacuajos (ASTM, 1998). El agua se mantenía en bidones en la sala de ensayo durante 12h antes de ser utilizado, para que alcance y se estabilice a la temperatura experimental.

2.2.4. Sustancias testeadas

Dos formulados comerciales de insecticidas NEO fueron testeados: Actara® y Confidor®, los cuales son comercializados en la Argentina por las firmas Syngenta y Bayer respectivamente. Actara® es un granulado dispersable que contiene 25% de TIA 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina; CAS No. 153719-23-4. Confidor® es una suspensión concentrada que contiene 20% de IMI 1-(6-Chloro-3-pyridinyl-methyl)-N-nitro-2-imidazolidinimine (C.A.); CAS No. 138261-41-3. Ambos formulados contienen tensioactivos, aditivos o emulsionantes patentados de naturaleza molecular no revelada.

2.2.5. Protocolos experimentales

2.2.5.1. Preparación de las soluciones de prueba.

Para los ensayos realizados con el formulado comercial actara®, se preparó una solución madre que contenía 750 mg/L de TIA, diluyendo 3 gramos del formulado sólido en un litro de agua de ensayo llevada a pH 7. Cada solución madre servía para realizar al menos 2 recambios de soluciones y se conservaba en la oscuridad a 4 °C entre los recambios. Para los bioensayos realizados con el formulado comercial de confidor®, se preparó una solución madre que contenía 200 mg/L de IMI, diluyendo de 1 ml del formulado en un litro de agua de ensayo. Una nueva solución madre de IMI se preparaba inmediatamente antes de cada recambio de soluciones. Las distintas concentraciones experimentales fueron preparadas diluyendo la solución madre en el volumen de agua de ensayo requerido.

2.2.5.2. Bioensayos de toxicidad aguda

Tanto para los distintos tratamientos como para el grupo control, el diseño experimental incluyó cuatro replicas, cada una con diez individuos. En el caso de los bioensayos con *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae*, cada unidad experimental consistía en dos placas de petri de 10 cm de diámetro superpuestas que contenían 100 mL de solución experimental. Para *Scinax granulatus*, los replicados consistían en tubos de ensayos de vidrio de 16 mm de diámetro y 15 cm de largo, que contenían 15 ml de solución

experimental, el motivo de emplear estos tubos se debió a que los renacuajos de esta especie presentan la particularidad de permanecer en posición vertical adheridos al vidrio por el disco oral. Las soluciones de prueba eran renovadas en su totalidad cada 24 horas y la temperatura y el fotoperiodo fueron mantenidos a 20 ± 2 °C y 16:8 h luz:oscuridad durante las 96 horas (h) que duró el bioensayo. La única excepción fue en los bioensayos con *Rhinella arenarum* en estadio 27 (E27), en los cuales las soluciones fueron renovadas cada 48 h, ya que este bioensayo correspondió a los cuatro primeros días de los bioensayos subcrónicos. En todos los bioensayos, se registró la supervivencia de los renacuajos y se removieron los individuos muertos al momento de recambiar las soluciones. Los siguientes bioensayos de toxicidad aguda fueron realizados:

- Toxicidad de formulados de TIA e IMI en embriones estadio 1 (E1) (Gosner 1960) de *Rhinella arenarum*: Para ambos formulados, las concentraciones nominales ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L. Los huevos fueron expuestos con su cubierta gelatinosa presente. Los bioensayos con el formulado de TIA fueron realizados en dos oportunidades distintas: una a 20 °C y la otra a 25 °C.
- Toxicidad de formulados de TIA e IMI en renacuajos de *Rhinella arenarum* estadio 25 (E25) y E27: Las concentraciones nominales ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L y 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L, para TIA e IMI, respectivamente. Los bioensayos con TIA en renacuajos de *R. arenarum* E25 fueron realizados en dos oportunidades distintas: una a 20 °C y la otra a 25 °C.
- Toxicidad del formulado de TIA en renacuajos de *Rhinella fernandezae* E25: Las concentraciones nominales ensayadas fueron 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L.
- Toxicidad del formulado de IMI en renacuajos de *Scinax granulatus* E25: Las concentraciones nominales ensayadas fueron 1, 5, 10, 20 y 40 mg/L.

2.2.5.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica

Este bioensayo representa la continuación por 21 días (d) del ensayo agudo de 96 h en renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27. Como se mencionó anteriormente, el diseño experimental incluyó cuatro replicas por tratamiento, cada una con diez individuos. Cada

unidad experimental consistió en dos placas de petri de 10 cm de diámetro superpuestas, que contenía 100 mL de solución experimental. Las soluciones de prueba eran cambiadas en su totalidad cada 48 horas y la temperatura y el fotoperiodo fueron mantenidos respectivamente a 20 ± 2 °C y 16:8 h luz:oscuridad durante los 21 días que duró el ensayo. Un trozo de acelga hervida de aproximadamente 1 cm² era añadido a las unidades experimentales luego de cada recambio de solución con el fin de alimentar de manera ad libitum a los renacuajos. Las concentraciones ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L en el caso del formulado de TIA y 0,5, 1, 5, 10, 20, 40 y 60 mg/L para el formulado de IMI. Ambos ensayos se iniciaron con renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27. Cada 48 h, antes del recambio de las soluciones, se registraba la supervivencia de los renacuajos y los individuos muertos eran retirados. En el día en que se inició el bioensayo, antes de que empezará la exposición al insecticida, los diez individuos pertenecientes a cada replica fueron pesados en conjunto luego de apoyar brevemente los animales en un papel absorbente para eliminar el excedente de agua. El peso de los renacuajos volvió a ser determinado de la misma manera luego de los 21 días de exposición. Con estos valores, se determinó la ganancia de peso en los individuos. El porcentaje de aumento de peso individual se obtuvo mediante la siguiente operación:

$$\frac{(\text{Peso grupal final} - \text{Peso grupal inicial}) / n}{\text{Peso grupal inicial} / n} \times 100$$

en donde n representa el número de individuos presente en la réplica por la cual se calcula el peso de los renacuajos.

2.2.5.4. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*

Este bioensayo representó la continuación hasta la culminación de la metamorfosis del bioensayo agudo de 4 d y del bioensayo subcrónico de 21 d con un formulado de TIA iniciado con renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27. Luego de completado los 21 d de exposición, se aumentó gradualmente la temperatura de 20 a 25 °C (1°C por día), para simular un aumento de temperatura primaveral y llegar a una temperatura más representativa de las condiciones naturales de metamorfosis. Se continuó la exposición de los renacuajos a TIA a las mismas concentraciones nominales, con las mismas unidades experimentales por tratamiento y cantidad de individuos, y bajo las mismas condiciones descritas en la sección

2.2.5.3. Al momento de recambiar las soluciones (cada 48 h), se retiraban los individuos muertos y se registraba la supervivencia y estadio de desarrollo en el que se encontraban los renacuajos. De acuerdo con la clasificación de Gosner (1960), los estadios de desarrollo utilizados fueron: estadio 39 (E39) individuos con patas posteriores completas; estadio 42 (E42) individuos con patas posteriores y anteriores completas y finalización de la metamorfosis, estadio 46 (MET) individuos con reabsorción completa de la cola. Se eligió registrar estos estadios por su facilidad en la identificación y por los claros cambios morfológicos que caracterizan a cada uno. A lo largo del bioensayo los individuos expuestos fueron observados detalladamente con el fin de identificar posibles alteraciones morfológicas. Asimismo, los juveniles o sapos que completaron la metamorfosis fueron examinados detalladamente en busca de malformaciones, enseguida fueron anestesiados y sacrificados en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222). Con el fin de poder medir variables morfológicas, cada individuo fue fotografiado dorsal y ventralmente y pesado por medio de una balanza digital Mettler Toledo, modelo PL303, precisión de 0.001 g, luego fueron preservados en una solución de formol al 10%. Finalmente, a través de las fotografías tomadas, se midió la longitud hocico cloaca (LHC) y la longitud de los brazos y antebrazos izquierdo y derecho. La medición de los brazos y antebrazos se determinó debido a que a lo largo del bioensayo se observó que, durante el avance del desarrollo, particularmente entre el E42 y MET algunos de los individuos expuestos a las dos concentraciones más bajas de TIA (9 y 18 mg/L), parecían tener una postura incorrecta. La medición de los parámetros morfológicos mencionados (LHC, brazos y antebrazos), se realizó mediante el programa Imagej desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés) (Schneider et al., 2012).

2.2.6. Verificación analítica de la concentración de las soluciones madres.

La concentración de IMI presente en la solución madre fue determinada mediante cromatografía líquida de ultraperformancia y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). Se utilizó un equipo de cromatografía Acquity equipado con una columna BEH C18 (1,7 μm , 100 x 2,1 mm) (Waters). El flujo era de 0,2 mL min⁻¹. Las fases móviles consistían en agua (fase A) y metanol (fase B) ambas con 0,1% de ácido fórmico. Se utilizó un gradiente donde el porcentaje de la fase B variaba de la siguiente manera: 0 min, 0%; 0,5 min, 0%; 3,5 min,

100%; 4,5 min, 100%; 5,0 min, 0%; and 6 min, 0%. La columna era mantenida a 35°C. Para el análisis de MS/MS, el modo de ionización se realizó utilizando un voltaje cepillar de 3,5 kV. El gas de colisión era Argon 99,995% con una presión de $4,04 \times 10^{-3}$ mbar en la célula T-Wave. Los flujos de gas cónico y de desolvatación eran optimizados a 60 L h⁻¹ y 600 L h⁻¹, respectivamente. La temperatura del gas de desolvatación era 400°C y la temperatura de la fuente 120°C. Tiempos de permanencia de 0,10 s/escaneo fueron empleados.

Por su parte, las determinaciones de TIA fueron realizadas utilizando una columna BEH C18 (2,5 µm, 150 x 2,1 mm). Al igual que para IMI, las fases móviles consistían en agua (fase A) y metanol (fase B) ambas con 0,1% de ácido fórmico. Se utilizó el siguiente gradiente: (90:10)-(90:10) 0-0,5 min, (90:10)-(50:50) 0,5-2 min, (50:50)-(0:100) 2-6 min, (0:100)-(0:100) 6-7 min, (0:100)-(90:10) 7-8 min, (90:10)-(90:10) 8-10 min. La columna era mantenida a 45 °C y el flujo era de 0,25 ml/min. Para el análisis de MS/MS, se utilizó el ion 292 m/z para la confirmación y el ion: 211 m/z para la cuantificación. El tiempo de retención fue de 4,2 min.

2.2.7. Análisis estadísticos

En los bioensayos agudos (96h) y subcrónicos a 21 d, las concentraciones de plaguicidas que causaron la mortalidad del 50% de los individuos (CL50) fueron calculadas ajustando una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a los datos de supervivencia con el programa GraphPad Prim Versión 5.03. En los bioensayos subcrónicos de 21 d el incremento de peso corporal de los renacuajos en conjunto, es decir, por replica, fueron comparados entre tratamientos mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos.

El impacto de TIA sobre la proporción de individuos que lograron avanzar en el desarrollo metamórfico y el tiempo que necesitaron para hacerlo, fueron analizados según los métodos previamente descritos por Brodeur *et al.* (2009; 2013). Para cada tratamiento, así como para los controles se ajustó, con el programa GraphPad Prim Version 5.03, una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a la variable “número acumulado de individuos que alcanzaron E39, E42, y a los que completaban la MET”. Además, para cada

curva de ajuste se calculó el tiempo para que el 50% de los individuos alcancen T39 (T50-E39), T42 (T50-E42), o MET (T50-MET). Las proporciones de renacuajos que alcanzaron los diferentes estadios durante el proceso de metamorfosis (E39, E42 y MET) en los distintos tratamientos, así como, los valores de T50-E39, T50-E42, T50-MET, los porcentajes de supervivencia general al momento de alcanzar los estadios (E39, E42 y MET), además del peso promedio, la LHC y el largo de brazos y antebrazos de los juveniles, fueron comparados con el grupo control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos. Todos los análisis de ANOVA y comparaciones múltiples se realizaron mediante el uso del software SigmaStat 12.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres

La concentración analítica de TIA determinada en la solución madre fue de 416 ± 66 mg/L (N = 5, promedio \pm desviación estándar (D.E.)), lo que representa el 55,5 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 80% del valor nominal, se usaron los valores de concentraciones correspondientes al 55,5 % de los valores nominales para el análisis de los resultados y el cálculo de las CL50, tal como es recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). Las concentraciones nominales de TIA que tenían valores correspondientes a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L correspondieron entonces a concentraciones reales de 9, 18, 26,7, 35,6, 44,5, 53,4, 62,3 y 71,2 mg/L, respectivamente.

Por su parte, la concentración analítica de IMI determinada en la solución madre fue de 206 ± 45 mg/L (N = 3, promedio \pm D.E.), lo que representa el 103 % del valor nominal. Como el valor obtenido es muy cerca del valor nominal, se usaron las concentraciones nominales para los distintos cálculos y análisis.

2.3.2. Toxicidad aguda de los formulados con tiametoxam y imidacloprid

Según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (ONU., 2019), la toxicidad aguda de ambos formulados se encuentra en la categoría 3 de menor toxicidad ($CL_{50} > 10$ y ≤ 100 mg/L) para todos los estadios de desarrollo y las especies de anuros examinadas (Tabla 2.2). En cuanto a la comparación entre plaguicida/especie/estadio, se encontró que el formulado IMI es más tóxico que el de TIA en los E25 y E27, pero la toxicidad de ambos productos es similar en los embriones (E1) (Tabla 2.2). Los renacuajos E25 de *Scinax granulatus* expuestos al formulado de IMI fueron los más sensibles con una CL_{50} de 11,28 mg/L. Teniendo en cuenta los intervalos de confianza obtenidos, los bioensayos conducidos a 20 o 25 °C con *R. arenarum* demostraron que la toxicidad varía poco en este rango de temperaturas. Además, los bioensayos realizados con *R. arenarum* demostraron que la sensibilidad de los embriones (E1) al formulado de TIA es similar a la de los renacuajos en E25; contrario a lo encontrado con IMI, donde los renacuajos en E25 son más sensibles que los embriones (E1) (Tabla 2.2). La sensibilidad de los renacuajos de *R. arenarum* a ambos plaguicidas tiende a disminuir entre los E25 y E27. Finalmente, los ensayos con el formulado de TIA demostraron que los renacuajos en E25 de *R. fernandezae* son menos sensibles que los renacuajos de *R. arenarum* en el mismo estadio. En el caso de IMI, los renacuajos de *Scinax granulatus* en E25 son más sensibles que los de *R. arenarum* (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Toxicidad aguda de insecticidas formulados con tiametoxam e imidacloprid para los estadios 1, 25 y 27 (según Gosner, 1960) de *Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezae* y *Scinax granulatus*. La toxicidad se expresa en términos de las concentraciones que causan la muerte del 50% de los individuos en 96h (CL_{50-96h}). Los intervalos de confianza 95% (I.C.) están indicados en paréntesis.

Estadio de desarrollo	Tiametoxam		Imidacloprid	
	<i>Rhinella arenarum</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>Rhinella arenarum</i>	<i>Scinax granulatus</i>
Embriones E1	<u>25°C</u> 50,5 mg/L (I.C. 36,47-67,72) <u>20°C</u> 62,92 mg/L (I.C. 62,03-63,81)		62,35 mg/L (I.C. no calculado)	
Estadio 25	<u>25°C</u> 61,45 mg/L	>71,2 mg/L	25,98 mg/L	11,28 mg/L (I.C. 7,67-16,60)

	(I.C. 58,74-64,3) 20°C 53,8 mg/L (I.C. 52,19-55,44)		(I.C. no calculado)	
Estadio 27	>71,2 mg/L		27,15 mg/L (I.C. 9,68-44,62)	

2.3.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica

2.3.3.1. Toxicidad subcrónica de un formulado con tiametoxam

La tasa de supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* en E27 expuestos durante 21 días a concentraciones de TIA de hasta 71,2 mg/L fue mayor al 90% (Figura 2.1), ubicando la CL50-21 días a un valor superior a 71,2 mg/L (Figura 2.1). En cuanto al incremento del peso corporal de los renacuajos expuestos a TIA durante 21 días, se evidenció una tendencia en la que los renacuajos expuestos al insecticida presentaron un menor incremento de peso corporal, en comparación con el grupo control, a partir de la concentración 18 mg/L, resultando las exposiciones a partir de 53,4 mg/L significativamente diferentes al grupo control (Figura 2.2).

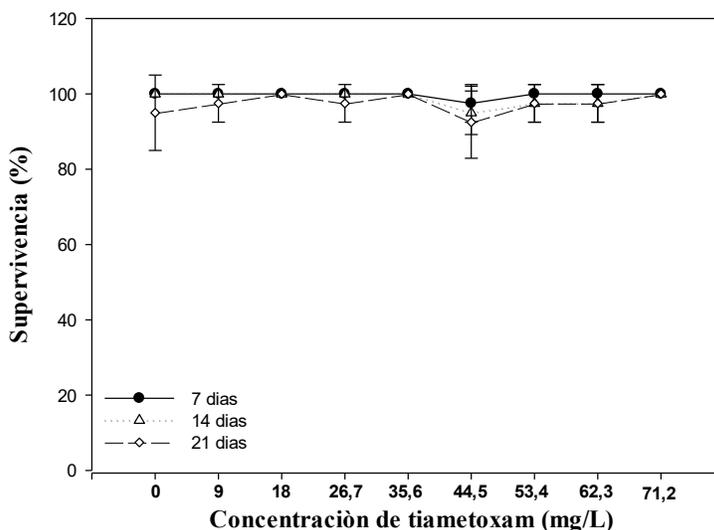


Figura 2.1. Supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam durante 7, 14 y 21 días a partir del estadio 27. Los valores de las concentraciones letales 50 (CL50) para 7, 14 y 21 días fue mayor a 71,2 mg/L.

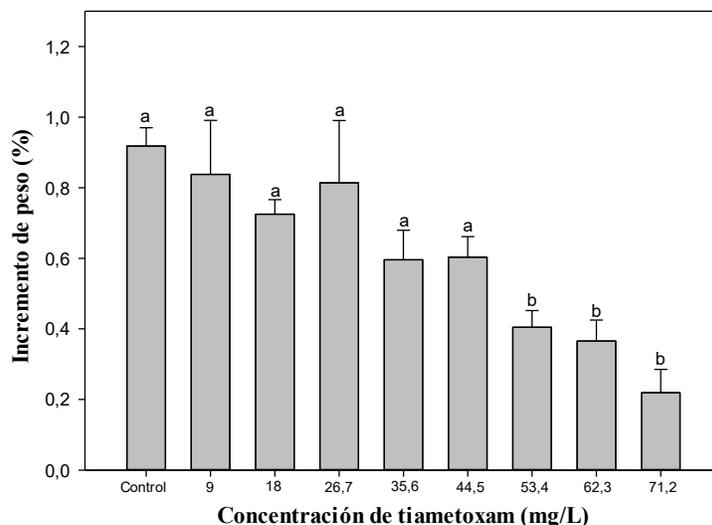


Figura 2.2. Porcentaje del incremento del peso corporal (media \pm E.S.) de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam durante 21 días a partir del estadio 27.

2.3.3.2. Toxicidad subcrónica de un formulado con imidacloprid.

La tasa de supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* en E27 expuestos durante 21 días a concentraciones de IMI de hasta 20 mg/L fue mayor al 95%, mientras que todos los individuos expuestos a 40 y 60 mg/L murieron durante las primeras 24 horas de exposición; las CL50 calculadas a 7, 14 y 21 días fueron iguales con un valor de 27,15 mg/L (Figura 2.3). En cuanto al aumento de peso corporal de los renacuajos expuestos al formulado de IMI, se encontró que en las concentraciones 1, 10 y 20 mg/L el aumento fue significativamente superior al control, mientras que en 0,5 y 5 mg/L fue equivalente y no presentó diferencias significativas con el grupo control (Figura 2.4).

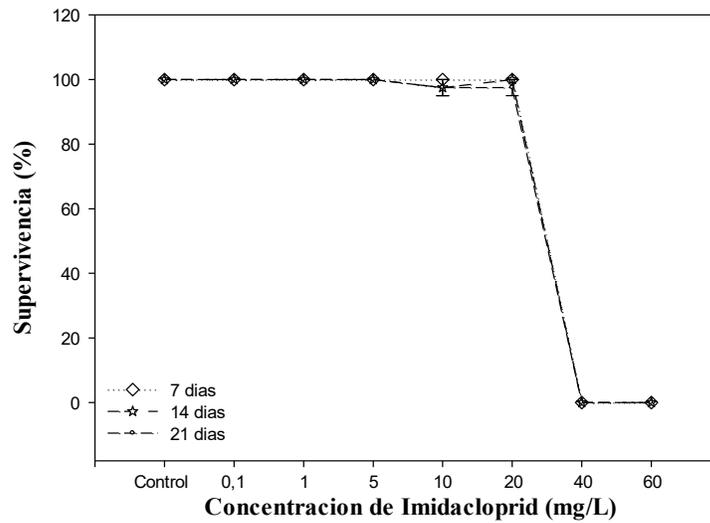


Figura 2.3. Supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con imidacloprid durante 7, 14 y 21 días a partir del estadio 27. Los valores de las concentraciones letales 50 (CL50) para 7, 14 y 21 días fue mayor a 27,15 mg/L (i.c 9,68-44,62).

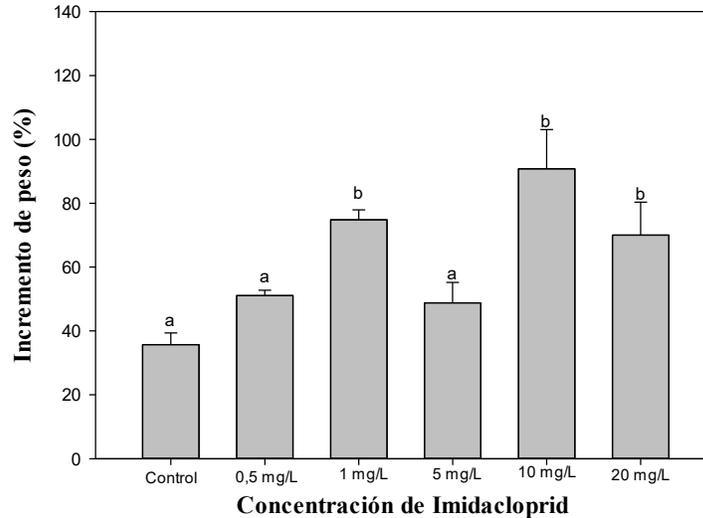


Figura 2.4. Porcentaje del incremento del peso corporal (media \pm E.S.) de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de imidacloprid durante 21 días a partir del estadio 27.

2.3.4. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*

2.3.4.1. Supervivencia

La Figura 2.5 ilustra la supervivencia de los renacuajos expuestos a un formulado de TIA hasta alcanzar la metamorfosis. Menos del 20% de los renacuajos expuestos a la concentración más alta (71,2 mg/L) sobrevivieron. El tratamiento (71,2 mg/L) después del día 25 de exposición presentó una mortalidad significativa que se mantuvo hasta la culminación del bioensayo (Figura 2.5), registrándose el mayor porcentaje de mortalidad entre los días 26 y 50 de exposición. El resto de los grupos para el día 75 registraba una supervivencia superior al 80% a excepción de la concentración 53,4mg/L quien registraba una supervivencia aproximada al 60%. Como se puede analizar en las Tablas 2.3, 2.4 y 2.5 el tiempo para que el 50% de los individuos logran su proceso de metamorfosis ocurrió antes de los 100 días, incluso para el día 100 el 75% de los individuos que se metamorfosearon ya lo habían logrado. La Tabla 2.5 permite evidenciar que del 80% de los individuos vivos en los controles el 44% lograron la metamorfosis, así mismo aproximadamente el 25% de los individuos vivos en los grupos expuestos se metamorfosearon a excepción de la concentración 53,4 mg/L en la cual el 50% de los individuos vivos completaron su desarrollo.

Con lo anterior, se puede analizar que la aceleración en la mortalidad registrada a partir del día 100 (Figura 2.5), se relaciona con los individuos que no iniciaron la metamorfosis o aquellos que se quedaron en el E39, ya que aproximadamente el 90% de los individuos expuestos lo alcanzaron (Tabla 2.3), esto se registró tanto en el grupo control y en mayor proporción en los grupos expuestos (Figura 2.5). Por otra parte, si bien el ensayo crónico a 21 d en renacuajos E27, dio un valor de CL50 mayor a 71,2 mg/L de TIA, indicando una muy baja toxicidad, una exposición más larga en cuanto al tiempo demuestra que los renacuajos no sobreviven a una exposición mayor a 44,5 mg/L de TIA.

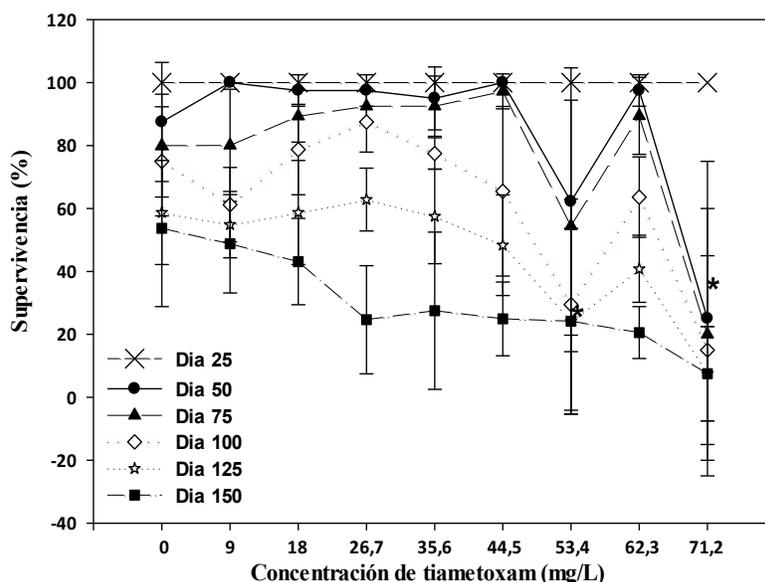


Figura 2.5. Supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio 27 a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam durante los 25, 50, 75, 100, 125 y 150 días de transcurso del ensayo. La línea roja corresponde al día 100, tiempo en el cual el 75% de los individuos que se metamorfosearon ya lo habían logrado. * indica diferencias significativas respecto al grupo control.

2.3.4.2. Tiempos de Metamorfosis

Las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta el E39 (patas posteriores completas), E42 (patas posteriores y anteriores completas) y MET (absorción completa de la cola) están ilustradas en las Figuras 2.6, 2.7 y 2.8 respectivamente. Los primeros individuos en alcanzar el E39 lo hicieron después de 20 días de exposición y para el día 60, ya se había completado la transformación (Figura 2.6). Todas las concentraciones de exposición a excepción de 53,4 y 71,2 mg/L tuvieron un porcentaje superior de individuos que alcanzaron el E39 en comparación al grupo control (Tabla 2.3). El menor porcentaje de transformación al E39 observado con 53,4 y 71,2 mg/L se relaciona a la mayor mortalidad registrada para estos tratamientos entre los días 20 y 60 (Figura 2.5 y 2.6). El tiempo medio para que el grupo control alcanzara el E39 fue de 33 días, sin embargo, grupos tratados con 18, 35,6, 53,4 y 62,3 mg/L necesitaron significativamente más tiempo que los controles, en promedio 10 días más. Este retraso en la metamorfosis a E39 se debió a que el proceso de

transformación empezó más tarde en estos tratamientos, ya que la tasa de transformación (pendiente) fue igual para todos los grupos (Tabla 2.3).

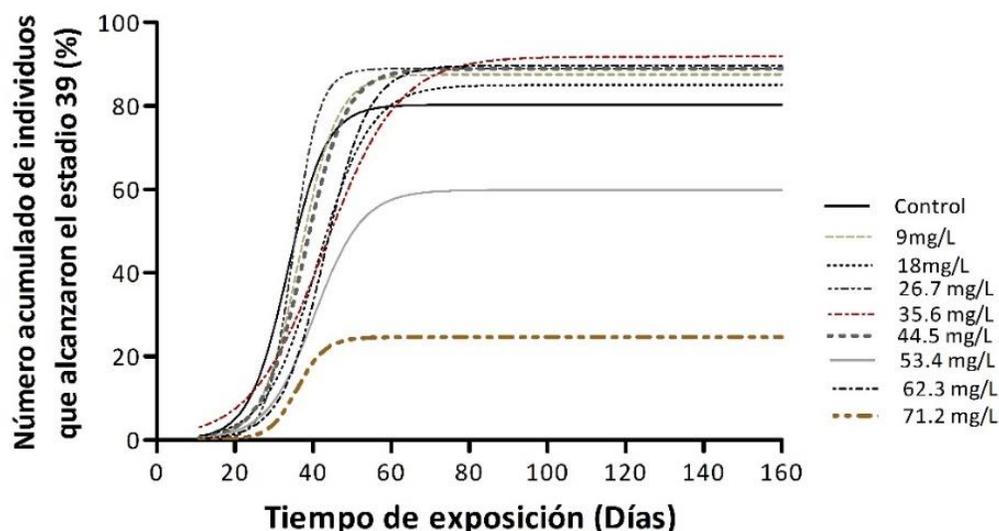


Figura 2.6. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron el estadio 39 de acuerdo con el tiempo de exposición transcurrido para el grupo control y grupos expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 2.3. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam alcanzan el estadio 39 (T50-E39), supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50-E39, tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el estadio 39. Los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

	T50 – E39 (días)	Supervivencia T50 – E39	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	33,41±0,75	90±10	0,08±0,01	80,18±1,02
9mg/l	36,59±0,44	90±7,07	0,09±0,007	*87,47±0,68
18mg/l	*41,22±0,45	92,5±4,78	0,06±0,003	*84,91±0,59
26,7mg/l	34,89±0,30	90±7,07	0,13±0,01	*88,80±0,56
35,6mg/l	*42,99±0,71	97,5±2,5	0,04±0,003	*91,82±0,87
44,5mg/l	37,87±0,24	92,5±4,78	0,08±0,003	*88,93±0,36
53,4mg/l	*40,38±2,02	72,5±17,96	0,07±0,02	*59,84±1,93
62,3mg/l	*43,10±0,68	97,5±2,5	0,07±0,008	*89,71±1,03
71,2mg/l	36,04±3,99	*25±25	0,12±0,11	*24,60±1,96

Contrario a lo que se venía registrando, donde la mayoría de los tratamientos se estaban metamorfoseando de manera similar, incluso con algo más de éxito que el grupo control, la proporción de individuos que alcanzaron el E42 fue significativamente menor en todos los grupos tratados con el formulado de TIA que en el grupo control (Figura 2.7). Efectivamente, el 50% de los individuos del grupo control alcanzaron el E42, mientras que ese valor varió sistemáticamente entre 15 y 38% en los grupos expuestos a TIA, sin que se pudiera observar una relación concentración-respuesta (Tabla 2.4). El avance en el desarrollo de los individuos para alcanzar el E42 se extendió durante un mayor periodo que lo registrado en el E39, ocurriendo entre los días 30 y 100 (Figura 2.7). El menor porcentaje de alcance al E42 por parte de los individuos tratados, no puede relacionarse con la tasa de mortalidad registrada. Como se menciona en la sección 2.3.4.1., el mayor registro de mortalidad en los grupos tratados ocurre principalmente a partir del día 100, momento en el cual el avance en el desarrollo a E42 ya había alcanzado su máximo en la mayoría de los tratamientos (Figura 2.7). El efecto de TIA sobre el tiempo para alcanzar el E42 no fue tan claro. Los tratamientos a 9, 18 y 62,3 mg/L resultaron equivalentes con el grupo control, mientras que el tratamiento a 26,7 mg/L registró un T50-E42 significativamente mayor y los tratamientos restantes 35,6, 44,5 y 53,4 mg/L registraron un T50-E42 significativamente menor. Es probable que la variabilidad ocurriera por la inhibición que estaba ocurriendo en el número de individuos tratados durante el alcance al E42 y que en algunos casos se extendió en un mayor tiempo.

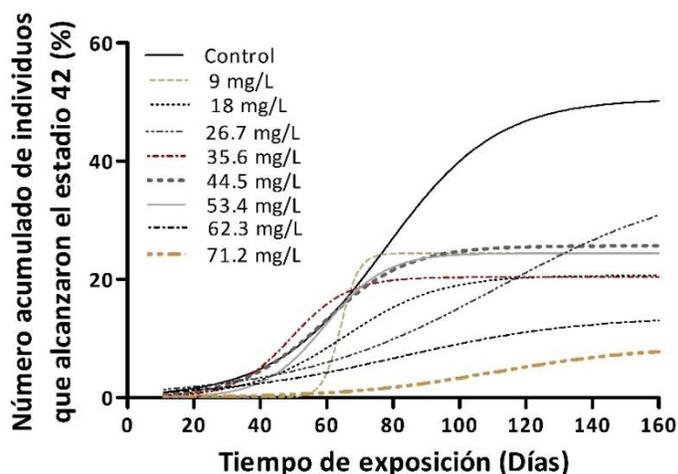


Figura 2.7. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron el estadio 42 de acuerdo con el tiempo de exposición transcurrido para el grupo control y grupos expuestos a distintas concentraciones de un formulado tiametoxam. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 2.4. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam alcanzan el estadio 42 (T50-E42 supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50-E42, tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el estadio 42. Los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

	T50 – E42 (días)	Supervivencia T50- E42	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	77,73±2,63	80±8,16	0,02±0,003	50,61±1,81
9mg/l	64,33±0,95	77,5±11,08	*0,16±0,05	*24,43±0,59
18mg/l	65,55±3,40	87,5±7,5	0,03±0,006	*20,71±0,91
26,7mg/l	*113,25±11,2	67,5±7,5	0,01±0,001	*38,07±5,41
35,6mg/l	*49,55±4,5	97,5±2,5	0,05±0,02	*20,41±1,29
44,5mg/l	*59,44±3,03	92,5±4,78	0,03±0,007	*25,72±1
53,4mg/l	*59,52±4,9	55±20,20	0,04±0,02	*24,44±1,73
62,3mg/l	83,33±10,11	71,3±5,78	0,01±0,003	*14,05±1,68

Similar a lo ocurrido en el E42, la proporción de individuos que alcanzaron MET fue significativamente menor en todos los tratamientos en comparación al grupo control (Figura 2.8). El 44% de individuos del grupo control finalizaron la metamorfosis, mientras que ese valor se situó entre el 10 y 22% en los grupos expuestos al formulado de TIA. El pase de E42 a la culminación de la metamorfosis tardó en promedio 2 días (datos no ilustrados) y ocurrió entre los días 30 y 100; es decir que se superpuso en el tiempo con el pase entre E39 y E42 si se considera la totalidad de los individuos (Figura 2.8). Igual a lo ocurrido en el avance al E42, los tratamientos con 35,6, 44,5 y 53,4 mg/L de TIA requirieron de menos tiempo que el grupo control para finalizar la metamorfosis (MET), mientras que el tratamiento con 26,7 mg/L de TIA tardó más (Tabla 2.5).

Estas observaciones indican que el efecto de TIA en los renacuajos expuestos ocurrió durante la transición del E39 al E42. Si bien no se registró una mortalidad importante durante los tiempos en el que los individuos alcanzaron el punto máximo para el E39, E42 y MET, es clara la inhibición en cuanto el número de individuos que lo lograron.

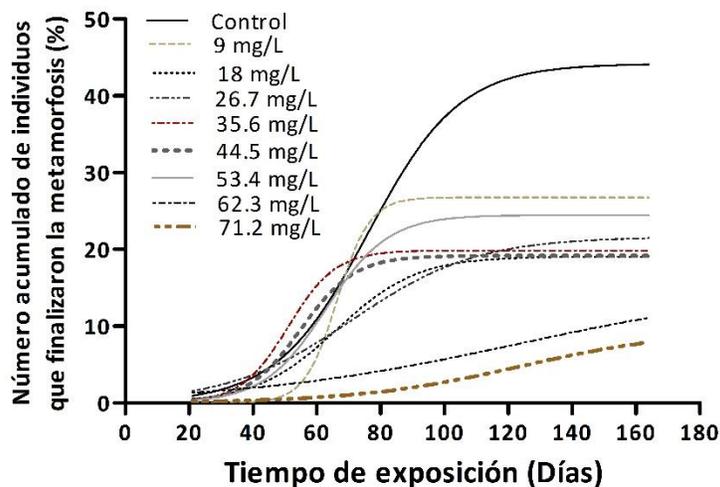


Figura 2.8. Numero acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que lograron finalizar el proceso de metamorfosis de acuerdo con el tiempo de exposición transcurrido para el grupo control y grupos expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 2.5. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam completen la metamorfosis (T50-MET), supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50-MET, tasa de transformación y porcentaje de individuos que completaron la metamorfosis. Los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$). Los datos con N.D. se refiere a datos no determinables.

	T50 – MET (días)	Supervivencia T50 - MET	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	76,01±2,77	80±8,16	0,03±0,004	44,17±1,71
9mg/l	66,95±0,94	77,5±11,08	*0,15±0,04	*23,65±0,56
18mg/l	70,6±1,84	87,5±7,5	0,04±0,008	*15,68±0,44
26,7mg/l	77,06±5,46	85±5	0,02±0,005	*19,38±1,37
35,6mg/l	*51,12±3,98	95±5	0,05±0,02	*19,86±1,19
44,5mg/l	*55,07±3,42	92,5±4,78	0,05±0,01	*19,17±0,96
53,4mg/l	*61,85±5,82	55±20,20	0,04±0,02	*21,91±1,79
62,3mg/l	N.D	55±20,20	0,01±0,003	*14,72±5,44
71,2mg/l	N.D	71,3±5,78	0,01±0,009	*9,53±4,7

2.3.4.3. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados

El peso promedio de los individuos que finalizaron la metamorfosis se puede ver en la figura 2.9. En general, el peso de los individuos recién metamorfoseados que fueron expuestos al formulado de TIA durante su desarrollo fue significativamente menor a la del grupo control, indistintamente de la concentración de exposición (Figura 2.9). De manera similar, la longitud hocico cloaca (LHC) de los individuos recién metamorfoseados luego de ser expuestos al formulado de TIA durante su desarrollo resultaron significativamente más cortos respecto al grupo control, a excepción de la concentración 9 mg/L que, aunque mantuvo la tendencia no presentó diferencias significativas (Figura 2.10).

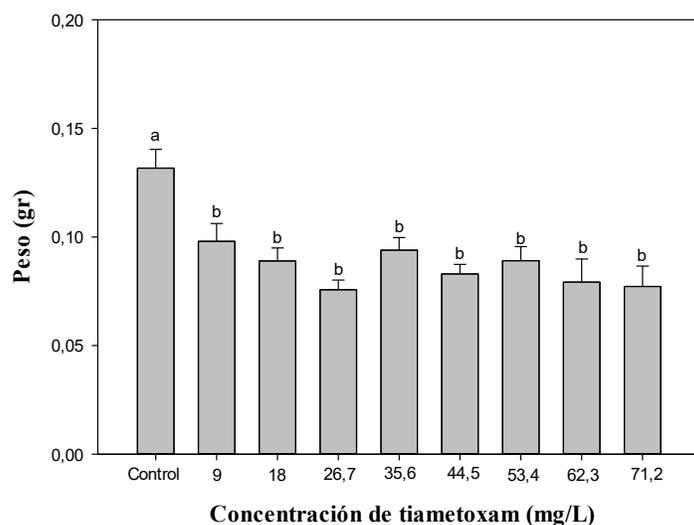


Figura 2.9. Peso promedio de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de tiametoxam durante su desarrollo. Las barras con la misma letra no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

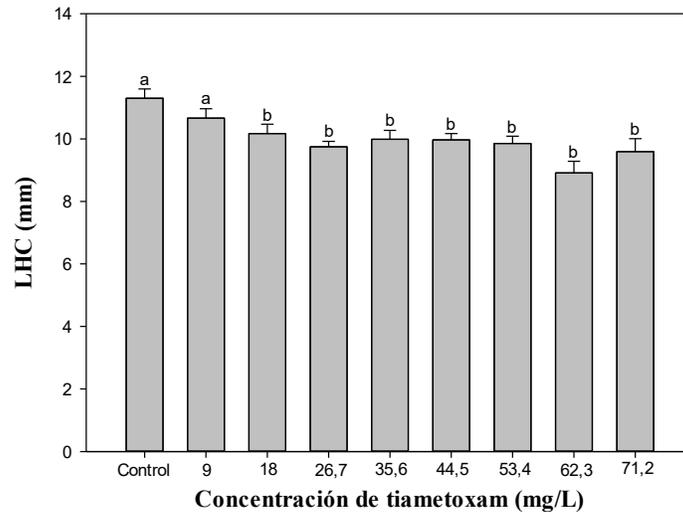


Figura 2.10. Longitud hocico cloaca de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de tiametoxam durante su desarrollo. Las barras con la misma letra no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

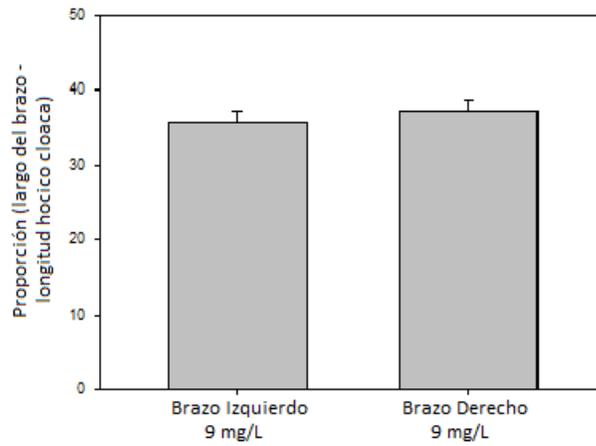
2.3.4.4 Alteraciones Morfológicas

Observaciones de alteración en la postura en los individuos expuestos a las dos concentraciones más bajas de TIA (9 y 18 mg/L) (Figura 2.11), durante la transición del E42 a MET, dio indicios de posibles alteraciones en el largo de los brazos. Tal alteración se pudo evidenciar de acuerdo a las diferencias significativas encontradas en la proporción del largo del brazo izquierdo y la longitud hocico cloaca de los individuos en comparación con el grupo control (Figuras 2.12C y 2.13C).

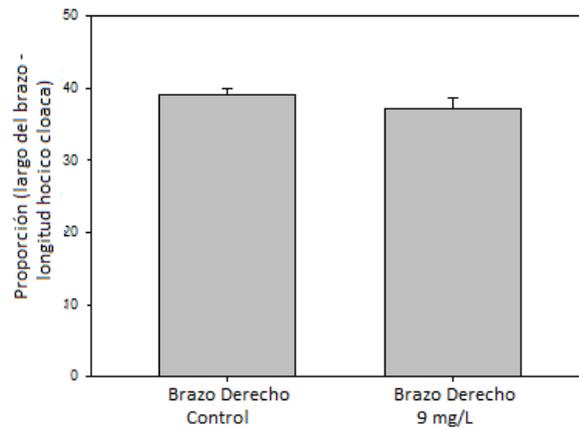


Figura 2.11. Alteración de la postura de un individuo juvenil recién metamorfoseado expuesto a la concentración de 9 mg/L de tiametoxam durante su desarrollo.

A.



B.



C.

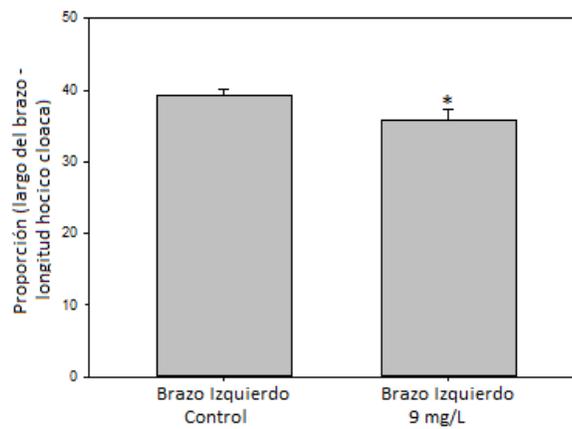
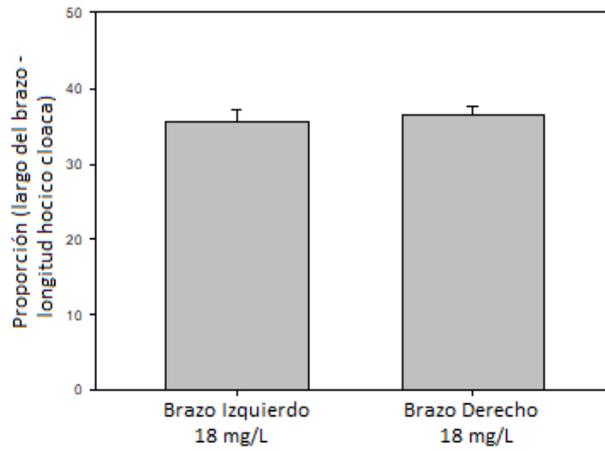
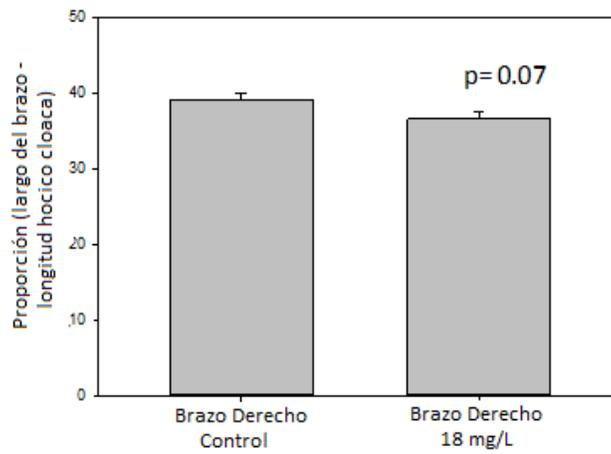


Figura 2.12. Proporción: largo del brazo y longitud hocico cloaca de metamorfos de *R. arenarum* expuestos a 9 mg/L de tiametoxam. A. brazo izquierdo y brazo derecho B. brazo derecho control y brazo derecho C. brazo izquierdo control y brazo izquierdo. *diferencias significativas.

A.



B.



C.

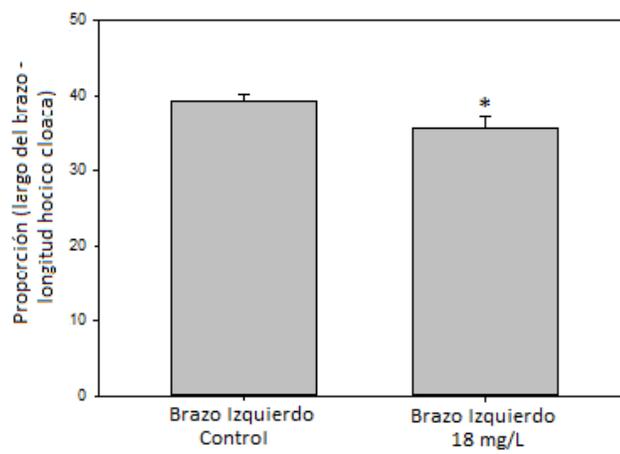


Figura 2.13. Proporción: largo del brazo y longitud hocico cloaca de metamorfos de *R. arenarum* expuestos a 18 mg/L de tiametoxam. A. brazo izquierdo y brazo derecho B. brazo derecho control y brazo derecho C. brazo izquierdo control y brazo izquierdo. *diferencias significativas.

1.3. DISCUSIÓN

De manera general, los datos de toxicidad obtenidos en este trabajo son coherentes con la literatura disponible e indican que TIA e IMI no presentan un riesgo de mortalidad directa para los anuros en estadios larvales por la exposición aguda o subcrónica a estos insecticidas, debido a que los valores que causan mortalidad (CL50) (Tabla 2.1 y Tabla 2.2) se encuentran muy por encima de las concentraciones reportadas en ambientes acuáticos que varían entre 0,004-9140 ng/L (media 119,5 ng/L) para IMI y 0,002-3820 ng/L (media 59,7 ng/L) para TIA, según un reciente meta análisis de datos globales (Wang et al., 2022). Por otra parte, el valor de toxicidad más alto para NEO reportado en renacuajos corresponde a 2000 µg/L, el cual fue obtenido a partir de individuos de *Lithobates sylvaticus* expuestos a TIA (Pochini y Hoverman, 2017). El presente trabajo es el segundo en estimar la toxicidad aguda de TIA en renacuajos, y el primero en examinar efectos subcrónicos. Con los valores obtenidos para *Rhinella arenarum* se demuestra que los renacuajos pueden sobrevivir hasta los 21 días en concentraciones de hasta 71,2 mg/L. Resultados que se asemejan a los valores reportados en peces (El Euony et al., 2020; Yang et al., 2020).

En exposiciones con IMI, hasta la fecha se tenía a 52,62 mg/L como el valor de toxicidad aguda más alto reportado en renacuajos (Pérez-Iglesias et al., 2014), sin embargo, el presente estudio identificó que los renacuajos de *R. arenarum* y *Scinax granulatus* son algo más sensibles, ya que se obtuvieron valores de toxicidad aguda a 96h de 25,98 y 11,28 mg/L respectivamente. Para *R. arenarum*, este valor de CL50 es similar al encontrado en la exposición subcrónica a 21 días en renacuajos (Figura 2.1), lo que significa que la concentración crítica para la letalidad se define en los primeros días y luego se estabiliza. Uno de los factores que puede estar involucrado en la sensibilidad de las especies a IMI es el estadio y el tamaño de los individuos expuestos. Por ejemplo, Pérez-Iglesias et al., (2014) expuso renacuajos de *Boana pulchella* en estadios de desarrollo avanzado 35-37 (Gosner, 1960), cuando los individuos suelen tener un mayor tamaño. Los expuestos en este estudio se encontraban en E25, momento en el que los renacuajos empiezan alimentarse y a crecer (Gosner, 1960). Por otra parte, los renacuajos de *S. granulatus* eran más pequeños y delgados que los de *R. arenarum*, lo que pudo influir en el valor de la CL50. En general, se puede

concluir que los anfibios presentan una sensibilidad a IMI similar a la de los peces más sensibles (Desai y Parikh, 2014; Islam et al., 2019; Naiel et al., 2020).

En anfibios, algunos registros sugieren que la etapa de embrión es menos sensible que la etapa larval en la exposición aguda a plaguicidas (Brodeur et al., 2009; Svartz et al., 2014; Wagner et al., 2015a; 2015b; Macagnan et al., 2017). En este estudio, los embriones de *Rhinella arenarum* fueron menos sensibles a las exposiciones agudas de TIA e IMI (Tabla 2.2), y representan el primer registro de exposición de NEO en embriones de anuros. La menor sensibilidad ha estado relacionada a la función protectora que presenta la capa gelatinosa que los recubre (Pauli et al., 1999) y que difiere en su composición entre especies (Marquis et al., 2006), es decir, que la susceptibilidad puede estar influenciada por la especie y al compuesto que se expone, lo que hace necesario conocer la sensibilidad de otras especies a los NEO.

La exposición a TIA durante la metamorfosis de *R. arenarum* registró efectos en todas las etapas estudiadas. Inicialmente se observó que la proporción de individuos que alcanzaron el E39 era mayor en casi todos los tratamientos y que, además, desde los primeros 21 días de exposición el insecticida afectaba negativamente el peso de los renacuajos (Figura 2.2). También se observó que, algunas concentraciones requirieron de 10 días más para alcanzar el E39 (Tabla 2.3) debido a que iniciaron más tarde el proceso de metamorfosis y no porque la tasa de transformación hubiera cambiado. La transición del E39 al E42 marco la tendencia hasta el final de la metamorfosis. Sin registrarse una mortalidad significativa, se observó una inhibición en el avance del proceso metamórfico de los renacuajos expuestos al insecticida. Significativamente, cerca de un 30% menos, alcanzaron el E42 y finalizaron la metamorfosis. Además, los juveniles obtuvieron significativamente un menor peso en todas las concentraciones de exposición y un menor tamaño (LHC) a partir de 18 mg/L.

Efectos directos de los NEO sobre la metamorfosis ha sido evaluado también en otros anuros. Resultados semejantes a los de este estudio se han descrito en *Lithobates pipiens* y *Xenopus laevis*, exposiciones a 8,5 mg/L de IMI y 20 mg/L de TIA, respectivamente, redujeron el número de renacuajos que finalizaron la metamorfosis y los metamorfos registraron un menor tamaño (Moe, 2017; Jenkins et al., 2021). Cuando la exposición a NEO se realiza a concentraciones ambientales, la mayoría de las veces no reportan efectos

(Robinson et al., 2019; Robinson et al., 2017; Saka y Tada, 2021; Boone, 2018). Se tiene conocimiento de dos estudios que sí, uno, en renacuajos de *Lithobates sylvaticus* que a concentraciones de 10 y 100 µg/L de IMI se atrasó la metamorfosis (Robinson et al., 2017), y el segundo, en *Lithobates pipiens* que al exponerse a 250 ng/L de IMI se registró un menor tamaño en los metamorfos y además se relacionó con la reducción en el porcentaje de individuos que lograron metamorfosearse (Moe, 2017). Teniendo en cuenta los efectos encontrados en *R. arenarum*, se hace necesario poder conocer la implicancia que puede tener la exposición a concentraciones ambientales de TIA en la especie estudiada.

La alteración del entorno en el que se desarrolla un organismo puede modificar los tiempos de desarrollo, la morfología, fisiología o comportamiento de los individuos (Denver, 2009). Lo ilustrado en el día 21 de exposición (Figuras 2.2 y 2.4) permitió identificar que la exposición de TIA e IMI en los renacuajos afectaba la ganancia de peso de los individuos. Observaciones a lo largo del bioensayo identificaron la falta de apetito por parte de los renacuajos expuestos a TIA, reflejándose en un menor peso y tamaño de los metamorfos (Figura 2.9 y 2.10). Efectos relacionados a la alteración del comportamiento alimenticio han sido descrito en abejas y aves tras la exposición del NEO, IMI (Menon y Mohanraj, 2018). Por otra parte, observaciones en la postura a partir del E42, permitió identificar que el brazo izquierdo era más corto en los juveniles expuestos a 9 y 18 mg/L de TIA, este efecto, encontrado a partir de la concentración más baja, puede influir en la capacidad de huida y en la supervivencia de los sapos en la naturaleza. Curiosamente, esta observación representa un ejemplo típico de asimetría fluctuante (AF), que se denota como un cambio a largo plazo en el estado corporal de los organismos cuando las temperaturas extremas o los contaminantes causan inestabilidad durante la autogenia (Gondim et al., 2020). La asimetría fluctuante se observa con frecuencia en el desarrollo de los anfibios y se ha propuesto como herramienta para evaluar la estabilidad en el desarrollo de las poblaciones y calidad medioambiental del hábitat de estos organismos (Zhelev et al., 2022).

Aunque este estudio no fue diseñado para examinar los posibles mecanismos por los que TIA podría influir en la metamorfosis, se pueden proponer hipótesis generales sobre el posible modo de acción mediante el cual TIA pudo haber inhibido el proceso metamórfico. En anuros, la metamorfosis se realiza bajo el estricto control del eje hipotálamo-pituitaria-

tiroides (HPT), mediante la acción de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Boorse y Denver, 2004; Tata, 2006; Buchholz y Shi, 2018), y su acción sinérgica con los ejes hipotálamo-pituitario-adrenal/interrrenal (HPA/HPI) ó hormonas del estrés, mediante la activación del factor liberador de corticoprina (CRF) hormona encargada de estimular la tirotopina pituitaria (TSH), quien regula directamente la acción correcta de las HT (Denver., 2021; Kikuyama et al., 2021). Miranda y Pisano (1996), evaluaron la actividad de la glándula tiroides de *Rhinella arenarum* a través de parámetros morfológicos y determinaron que al final de la prometamorfosis (Ver Figura 1 en Thambirajah et al., 2019), la glándula alcanza el mayor almacenamiento de HT y a mediados del clímax metamórfico ocurre la mayor liberación de las HT, evento relacionado a los cambios morfológicos más abruptos que suceden en la metamorfosis. Es muy probable que la disminución significativa del porcentaje de renacuajos que lograron transitar del E39 al E42 por la exposición a TIA esté relacionado a un efecto del insecticida sobre la función tiroidea.

Las afectaciones de los NEO sobre la función tiroidea en otros organismos vertebrados indican que TIA pudo haber intervenido en la acción tiroidea durante la prometamorfosis en *R. arenarum*. Estudios han demostrado que los NEO afectan la transformación de T4 a T3 en las glándulas tiroideas en lagartos (Wang et al., 2020) y también, las concentraciones de T4 en el plasma en aves, ratas y peces (Pandey y Mohanty., 2015; 2017; Ibrahim et al., 2015; El Okle et al., 2016; Wu et al., 2018). Las formas por las que TIA pudo haber afectado la acción tiroidea en los renacuajos son desconocidas, sin embargo, lo encontrado en otros estudios pueden ser referencia en futuras investigaciones. Se ha descrito que exposiciones de TIA en lagartos ocasionan daños morfológicos en la glándula tiroides (Wang et al., 2020). Por otra parte, la inapetencia observada en los renacuajos pudo haber ocasionado un déficit en la captación de yoduro, alterando su función.

En Conclusión, TIA posee efectos sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*, lo que se evidencia por la disminución del porcentaje de organismos que logran finalizar la metamorfosis desde la dosis más baja estudiada (9mg/L), además de ocasionar una disminución del peso y del tamaño en los individuos metamorfoseados. Lo encontrado indica que el insecticida puede causar alteraciones en el comportamiento alimenticio de los renacuajos y de la función tiroidea durante la prometamorfosis. Es necesario conocer el

alcance que pueden tener los efectos encontrados en *R. arenarum* en una exposición de TIA a concentraciones ecológicamente relevantes.

3. CAPÍTULO 3. Toxicidad aguda y crónica, e impacto sobre la metamorfosis de insecticidas formulados con las diamidas antranilicas clorantraniliprol y ciantraniliprol en renacuajos de anfibios anuros.

3.1. INTRODUCCIÓN

Clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) fueron los primeros insecticidas de la familia de las diamidas antranilicas (DIA) en ser registrados (Bentley et al., 2010; EPA, 2014). Se caracterizan por ser altamente persistentes y móviles en los suelos (EFSA., 2013), lo que hace posible su ingreso a ambientes acuáticos (Pandey et al., 2020). por medio de la escorrentía superficial y lixiviación (Vela et al., 2017; Kolupaeva et al., 2019), En Argentina, estas moléculas son muy utilizadas en numerosos cultivos entre los que se incluye la soja y maíz, considerados los de mayor producción nacional (CASAFE, 2022; SAGyP 2022).

Valores de toxicidad aguda en organismos no blanco han sido documentados. La Tabla 3.1 informa los valores correspondientes a las concentraciones letales 50 (CL50) de un grupo de organismos acuáticos tras la exposición a insecticidas pertenecientes a las DA. Entre los valores informados, se observa que los invertebrados acuáticos son altamente sensibles a esta clase de insecticidas (Tabla 3.1). En peces, los valores de CL50 son superiores a 10 mg/L, lo que indica una toxicidad baja (Tabla 1). Hasta la fecha, un único valor de toxicidad aguda ha sido informado para anfibios (CL50 4,68 mg/L) y corresponde a la exposición de renacuajos de *Hoplobatrachus chinensis* (G34-36) a un producto comercial que contiene CLO (Wei et al., 2014) (Tabla 3.1). En general, el mayor número de registros se han obtenido con CLO a diferencia de solamente dos con CIAN y uno único con flubendiamida (FLU) (Tabla 3.1).

³ Capítulo publicado.

Fonseca Peña, S. V. D., Brodeur, J. C. 2023. Toxicity and effects on anuran tadpole metamorphosis of the anthranilic diamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-16.

Tabla. 3.1. Toxicidad aguda (CL50) de las diamidas en diferentes especies acuáticas. I.A.: Ingrediente Activo. G: Estadio Gosner.

Especies	Presentación del Compuesto	Estadio	Tiempo de Exposición	CL50 mg/L	Referencia
<u>Clorantraniliprol</u>					
Renacuajos					
<i>Hoplobatrachus chinensis</i>	Coragen®	G34-36	72h	4,68	Wei et al 2014
Peces					
<i>Cirrhinus mrigala</i>	Coragen®		96h	16,465	Rathnamma y Nagaraju 2014a
<i>Channa punctatus</i>	Coragen®		96h	14,424	Nagaraju y Rathnamma 2013
<i>Ctenopharingodon idella</i>	Coragen®		96h	11,008	Rathnamma y Nagaraju 2014b
<i>Oreochromis niloticus</i>	Ferterra®		96h	11,008	Mondal et al 2019
<i>Labeo rohita</i>	Coragen®		96h	12,7	Rathnamma y Nagaraju 2013
Invertebrados					
<i>Procambarus clarkii</i>	Rynaxypyr® 97.1%		96h	0,951	Barbee et al 2010
<i>Daphnia magna</i>	I.A. 95%		48h	0,0085	Cui et al 2017
<i>Daphnia magna</i>	Rynaxypyr® 95.3%		96h	0,0116	USEPA 2008, EFSA 2014
<i>Centropetulum triangulifer</i>	Rynaxypyr® 95.3%		96h	0,0116	USEPA 2008, EFSA 2014
<i>Chimarra atterima</i>	Rynaxypyr® 95.3%		96h	0,0117	USEPA 2008, EFSA 2014
<i>Chironomus riparius</i>	Rynaxypyr® 95.3%		96h	0,0859	USEPA 2008, EFSA 2014
<i>Chironomus riparius</i>	I.A.		48h	0,0775	Rodrigues et al 2015
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Rynaxypyr® 95.3%		96h	0,0351	USEPA 2008, EFSA 2014
<i>Oronectes virilis</i>	Rynaxypyr® 95.3%		48h	1,42	USEPA 2008, EFSA 2014
<u>Ciantraniliprol</u>					
Peces					
<i>Oreochromis mossambicus</i>	I.A. 95%		96h	38	Xu et al 2020
Invertebrados					
<i>Daphnia magna</i>	I.A. 95%		48h	0,0239	Cui et al 2017
<u>Flubendiamida</u>					
Invertebrados					
<i>Daphnia magna</i>	I.A. 95%		48h	0,0635	Cui et al 2017

Las DIA, actúan uniéndose a los receptores de rianodina (RyR), alterando las liberaciones de calcio e interviniendo en la contracción muscular coordinada de los organismos blanco (Lahm et al., 2005). De acuerdo con las diferencias moleculares de los RyR en insectos y vertebrados (Sattelle et al., 2008) fueron diseñadas las DIA, caracterizadas por tener gran afinidad con los insectos y representar un bajo riesgo para mamíferos, aves y peces (Cordova et al., 2006, Oberemok et al., 2015, Hadiatullah et al., 2022; Stinson et al., 2022). Sin embargo, interacciones a nivel celular y molecular entre CLO y los RyR de mamíferos y peces, han sido documentados (Chen et al., 2018; Truong y Pessah, 2019; Stinson et al., 2022).

Hasta la fecha, no se tiene conocimiento de estudios que hayan evaluado los efectos de las DIA sobre el desarrollo metamórfico de especies de anfibios, y como lo demuestra la Tabla 3.1, son escasos los trabajos donde se evaluó la toxicidad en anfibios. En Argentina, nuestro grupo de trabajo recientemente detectó CLO y CIAN en respectivamente 43,2 y 4,5% de las muestras de aguas analizadas en un arroyo agrícola de la región pampeana (Brodeur et al. comunicación personal). Asimismo, Brodeur et al. (2022) recientemente reportó la presencia de CLO en tejidos de ranas adultas provenientes de una zona cultivada. En este contexto, el objetivo del presente capítulo consistió en obtener los primeros registros de toxicidad aguda y subcrónica de CLO y CIAN en especies de anfibios neotropicales de la región pampeana argentina, además de evaluar el efecto de CLO sobre la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Especies estudiadas

Tres especies de anuros fueron estudiadas: El sapo común *Rhinella arenarum*, el sapito cavador *Rhinella fernandezae* y la ranita roncadora *Scinax granulatus*. La descripción detallada sobre la distribución y características del ciclo biológico de las especies, así como la obtención y mantenimiento de huevos y renacuajos fueron descriptas en las secciones 2.2.1 y 2.2.2, respectivamente, de materiales y métodos del Capítulo 2.

3.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo

Se utilizaron dos formulados comerciales de insecticidas de la familia de las DIA: Coragen® y Fortenza® semillero. Estos productos son comercializados en la Argentina por las firmas FMC Química S.A. y Syngenta, respectivamente. Coragen es una suspensión concentrada que contiene 20% de CLO (CAS No. 500008-45-7). Fortenza semillero es una suspensión concentrada que contiene 60% de CIAN (CAS No. 736994-63-1). Ambos formulados contienen, tensioactivos, aditivos o emulsionantes patentados de naturaleza molecular no revelada. Características del agua utilizada en los ensayos, control y tratamiento, esta descrito en la sección 2.2.3 de materiales y métodos del capítulo 2.

3.2.3. Soluciones de prueba

En el caso de CLO, se preparó una solución madre de 200 mg/L de CLO, diluyendo 1 ml del formulado en un litro de agua de ensayo. Mientras que para CIAN se preparó una solución madre de 600 mg/L de CIAN, diluyendo 1 ml del formulado en un litro de agua de ensayo. Las soluciones madre se prepararon antes de cada renovación de las soluciones de prueba y el diluyente utilizado para las soluciones de exposición fue el agua de ensayo descrita anteriormente.

La concentración de CLO presente en la solución madre fue determinada mediante cromatografía líquida de ultraperformancia y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). Se utilizó un equipo de cromatografía Waters Acquity equipado con un detector de masa cuádruple simple y una columna BEH C18 (2,5 µm, 150 x 2,1 mm). Las fases móviles consistieron en agua (fase A) y metanol (fase B) ambas con 0.1% de ácido fórmico. Se utilizó el siguiente gradiente: (90:10)-(90:10) 0-0,5 min, (90:10)-(50:50) 0,5-2 min, (50:50)-(0:100) 2-6 min, (0:100)-(0:100) 6-7 min, (0:100)-(90:10) 7-8 min, (90:10)-(90:10) 8-10 min. La columna era mantenida a 45 °C y el flujo era de 0,25 ml/min. Para el análisis de MS/MS, se utilizó el ion 543 m/z para la cuantificación y el ion: 484 m/z para la confirmación. El tiempo de retención fue de 6,7 min. En el caso de CIAN, no fue posible verificar la concentración en la solución madre.

3.2.4. Protocolos experimentales

3.2.4.1. Bioensayos de toxicidad aguda (96horas)

Los procedimientos específicos y los recipientes de bioensayo fueron descritos previamente en la sección 2.2.5.2 de materiales y métodos del Capítulo 2. Se realizaron los siguientes bioensayos de toxicidad aguda.

- Toxicidad de un formulado de CLO en embriones estadio 1 (E1) de *Rhinella arenarum*: Las concentraciones nominales ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg de ingrediente activo (I.A.)/L; los huevos fueron expuestos con su cubierta gelatinosa presente.
- Toxicidad de formulados de CLO y CIAN en renacuajos de *Rhinella arenarum* estadio 25 (E25) y E27: Las concentraciones ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg I.A./L para ambos insecticidas y estadio de desarrollo.
- Toxicidad de un formulado de CLO en renacuajos de *Rhinella fernandezae* E25: Las concentraciones ensayadas fueron 80, 100, 120, 140 y 160 mg I.A./L.
- Toxicidad de formulados de CLO y CIAN en renacuajos de *Scinax granulatus* E25: Las concentraciones ensayadas fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg I.A./L para ambos insecticidas.

3.2.4.2. Bioensayos de toxicidad subcrónica

Las pruebas se realizaron según lo descrito en la sección 2.2.5.3 de materiales y métodos del Capítulo 2, incluyendo la evaluación del incremento de peso corporal. Las concentraciones ensayadas de CLO y CIAN fueron 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg I.A./L. Los bioensayos iniciaron con renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27 según Gosner (1960). Cada 48 h, antes del recambio de las soluciones, se retiraron los renacuajos muertos y se registró la supervivencia.

3.2.4.3 Efecto de clorantranilprole (CLO) sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

Este bioensayo representó la continuación hasta la finalización de la metamorfosis del bioensayo agudo de 96h y del bioensayo subcrónico de veintiún (21) días de renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27 expuestos a CLO. Tras completar los primeros veintiún (21)

días de exposición, se aumentó gradualmente la temperatura de 20 a 25 °C (1°C por día), para simular un aumento de temperatura primaveral y llegar a una temperatura más representativa de las condiciones naturales de la metamorfosis. La exposición a CLO continuó bajo las condiciones anteriormente descritas: cuatro réplicas por tratamiento dispuestas en dos placas de Petri superpuestas de 10 cm de diámetro, cada una con diez individuos y 100 ml de solución de exposición, además, un trozo de acelga hervida de aproximadamente 1 cm² fue adicionado como alimento ad libitum. Las concentraciones nominales ensayadas fueron mantenidas (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg/L). Cada 48 h se realizó el recambio de las soluciones experimentales, el retiro de los individuos muertos, el registro actualizado de la supervivencia y estadio de desarrollo en el que se encontraban los renacuajos.

De acuerdo con la clasificación de Gosner (1960), los estadios de desarrollo registrados fueron: estadio 39 (E39) individuos con patas posteriores completas; estadio 42 (E42) individuos con patas posteriores y anteriores completas y finalización de la metamorfosis, estadio 46 (MET) individuos con reabsorción completa de la cola. Se eligió registrar estos estadios por su facilidad en la identificación y por los claros cambios morfológicos que caracterizan a cada uno. Los sapos que completaron la metamorfosis fueron examinados detalladamente en busca de malformaciones, enseguida fueron anestesiados y sacrificados en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222). Con el fin de poder medir variables morfológicas, cada individuo fue fotografiado dorsal y ventralmente y pesado por medio de una balanza digital Mettler Toledo, modelo PL303, precisión de 0.001 g, luego fueron preservados en una solución de formol al 10%. Finalmente, a través de las fotografías tomadas, se midió la longitud hocico cloaca (LHC), mediante el uso del programa Imagej desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés) (Schneider et al 2012).

3.2.5. Análisis estadísticos.

En los bioensayos agudos (96h) y subcrónicos a 21 d, las concentraciones de plaguicidas causantes de la mortalidad del 50% de los individuos (CL50) fueron calculadas ajustando una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a los datos de supervivencia con el programa GraphPad Prim Version 5.03. En los bioensayos subcrónicos de 21 d el incremento de peso corporal de los renacuajos en conjunto, es decir, por replica,

fueron comparados entre tratamientos mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos.

El impacto de CLO sobre la proporción de individuos que logran avanzar en el desarrollo metamórfico y el tiempo que necesitan para hacerlo, fueron analizados según los métodos previamente descritos por Brodeur et al. (2009; 2013). Para cada tratamiento, así como para los controles se ajustó, con el programa GraphPad Prim Version 5.03, una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a la variable “número acumulado de individuos que alcanzaron E39, E42, y a los que completaban la MET”. Además, para cada curva de ajuste se calculó el tiempo para que el 50% de los individuos alcancen T39 (T50-E39), T42 (T50-E42), o MET (T50-MET). Las proporciones de renacuajos que alcanzaron los diferentes estadios durante el proceso de metamorfosis (E39, E42 y MET) en los distintos tratamientos, así como, los valores de T50-E39, T50-E42, T50-MET, los porcentajes de supervivencia general al momento de alcanzar los estadios (E39, E42 y MET), además, el peso promedio y la LHC de los juveniles, fueron comparados con el grupo control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos. Todos los análisis de ANOVA y comparaciones múltiples se realizaron mediante el uso del software SigmaStat 12.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres.

La concentración analítica de CLO determinada en la solución madre fue de 185.7 ± 110 mg/L (N = 6), lo que representa el 92.86 % del valor nominal. Como el valor obtenido es cercano al valor nominal, se usaron las concentraciones nominales para los distintos cálculos y análisis. También se usaron los valores nominales para CIAN, ya que no se pudo verificar las concentraciones analíticamente, por la falta de estándares disponibles.

3.3.2. Toxicidad aguda de los formulados con clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) en embriones y renacuajos.

Los valores de CL50 agudas (96h) obtenidos para CLO y CIAN en los distintos estadios de desarrollo y las distintas especies de anfibios están descriptas en la Tabla 3.2. De todas las combinaciones formulado/especie/estadio ensayadas, la toxicidad del formulado de CLO en *S. granulatus* en E25 fue la mayor registrada con una CL50 de 46,78 mg/L. Según el sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (ONU, 2019), este valor de toxicidad corresponde a la categoría 3 de menor toxicidad (CL50 >10 y ≤ 100 mg/L). Todas las otras combinaciones de formulado, especie y estadio ensayadas presentaron una toxicidad aguda aún menor, con valores de CL50 superiores a 100 mg/L. Los bioensayos realizados con *R. arenarum*, demostraron que los renacuajos en E25 son ligeramente más sensibles a CLO que los embriones E1 y los renacuajos en E27.

En el caso de CIAN, todas las combinaciones formulado/especie/estadio ensayadas (Tabla 3.2) registraron CL50 superiores a los 100 mg/L, valores que según el sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (ONU, 2019), corresponden a la categoría 4 de productos que normalmente no ofrecen peligros (CL50 >100 mg/L).

Tabla 3.2. Toxicidad aguda de insecticidas formulados con clorantraniliprol y ciantraniliprol para los estadios 1, 25 y 27 de *Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezae* y *Scinax granulatus*. La toxicidad se expresa en términos de las concentraciones que causan la muerte del 50% de los individuos en 96h (CL50-96h). los intervalos de confianza 95% (I.C.) están indicados en paréntesis.

Estadio de desarrollo	Clorantraniliprol			Ciantraniliprol	
	<i>Rhinella arenarum</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>Scinax granulatus</i>	<i>Rhinella arenarum</i>	<i>Scinax granulatus</i>
Estadio 1	>160 mg/L				
Estadio 25	138,1mg/L (I.C. 132 – 144,5)	>160 mg/L	46,78 mg/L (I.C. 44,28 – 49,41)	>160 mg/L	138,4 mg/L (I.C. 125,4 – 152,9)
Estadio 27	>160 mg/L			>160 mg/L	

3.3.3. Bioensayos de toxicidad subcrónica

3.3.3.1. Toxicidad subcrónica de un formulado de clorantraniliprol (CLO)

La exposición subcrónica por 21 días a concentraciones de CLO de hasta 160 mg/L en renacuajos de *R. arenarum* en E27, registró una supervivencia superior al 90% durante los primeros 14 días de exposición en todas las concentraciones evaluadas (Figura 3.1) y recién a los 21 días de exposición se observó una mortalidad significativa en la concentración más alta testada (160 mg/L), ubicando la CL50-21 días a un valor de 151.4 mg/L (Figura 3.1). Durante los 21 días de exposición, todos los individuos expuestos a CLO e incluso los del grupo control, aumentaron su peso corporal a un valor cercano al 70% de su peso inicial, sin que se observaran diferencias significativas (Figura 3.2).

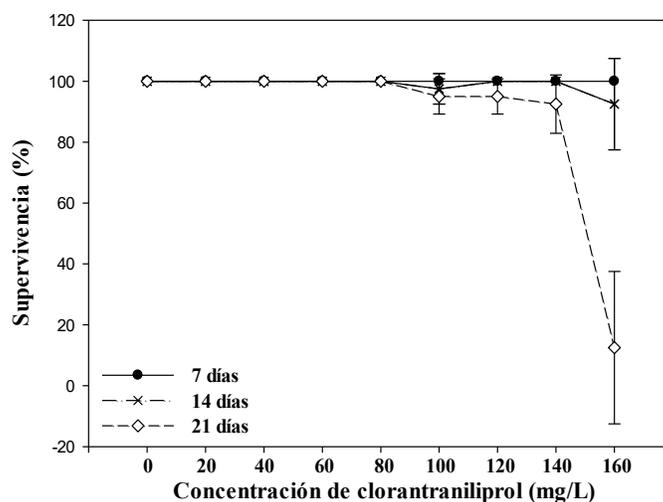


Figura 3.1. Supervivencia de *R. arenarum* en estadio 27 luego de una exposición a 7, 14 y 21 días a distintas concentraciones de un insecticida formulado con clorantraniliprol. Los valores de las concentraciones letales 50 fueron: CL50-7 días: >160mg/L, CL50-14 días: >160mg/L y CL50-21 días: 151,4mg/L (I.C. 147,8 – 155).

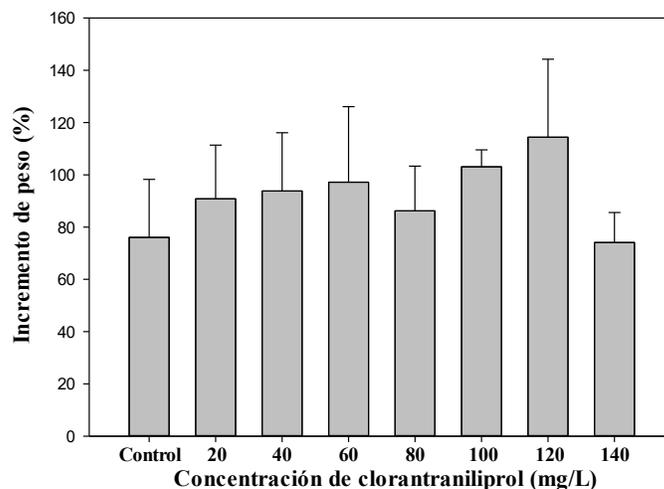


Figura 3.2. Porcentaje de aumento del peso corporal (promedio \pm E.S.) de renacuajos de *R. arenarum* en estadio 27 luego de 21 días de exposición a distintas concentraciones de un insecticida formulado con clorantraniliprol.

Es interesante notar que, luego de cada recambio de soluciones, los renacuajos en E25 y E27 expuestos a concentraciones de CLO mayores o iguales a 80 mg/L presentaban una letargia temporaria que se revertía luego de 5 horas.

3.3.3.2. Toxicidad subcrónica de un formulado con ciantraniliprol (CIAN).

La tasa de supervivencia de renacuajos de *R. arenarum* en E27 expuestos durante 21 días a concentraciones de CIAN de hasta 160 mg/L fue mayor al 95% (Figura 3.3), ubicando la CL50-21 días a un valor mayor a 160 mg/L. El aumento de peso corporal de los renacuajos expuestos a CIAN durante 21 días varió entre 40 y 80% del peso inicial, por la variabilidad de los datos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (Figura 3.4).

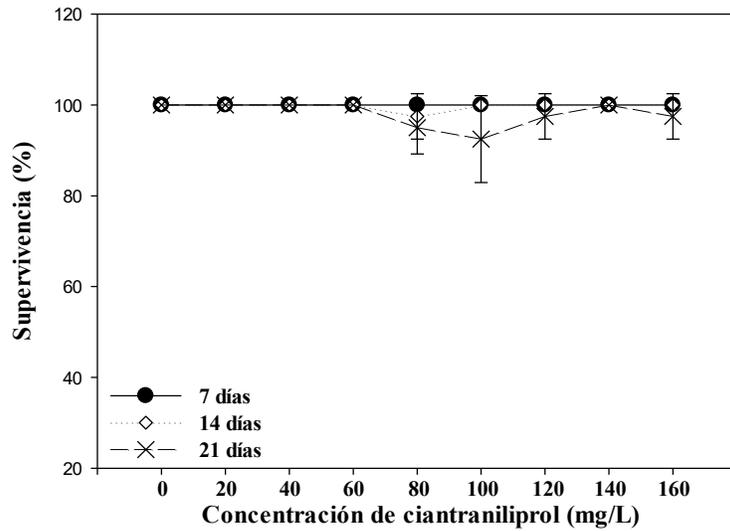


Figura 3.3. Supervivencia de *R. arenarum* en estadio 27 luego de una exposición a 7, 14 y 21 días a distintas concentraciones de un insecticida formulado con ciantraniliprol.

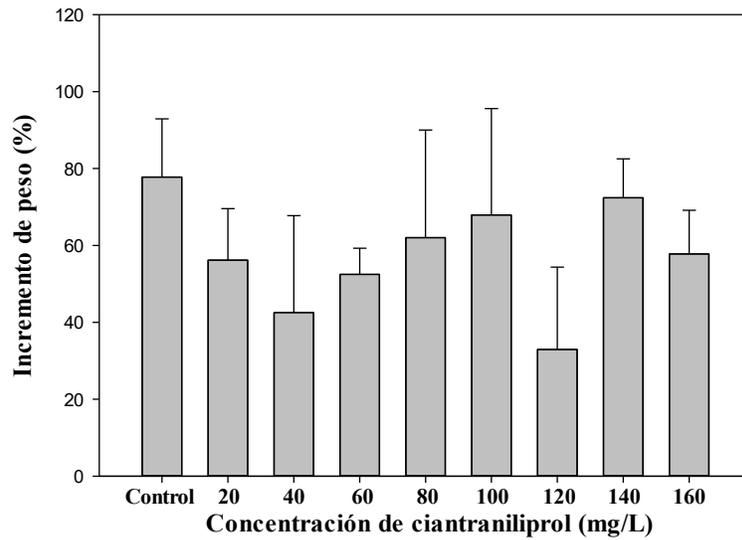


Figura 3.4. Porcentaje de incremento del peso corporal (promedio \pm E.S.) de renacuajos de *R. arenarum* en estadio 27 luego de 21 días de exposición a distintas concentraciones de un insecticida formulado con ciantraniliprol.

3.3.4. Efecto de un formulado con clorantraniliprol (CLO) sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

3.3.4.1 Supervivencia.

La Figura 3.5 ilustra la supervivencia de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a CLO desde el E27 hasta la finalización de la metamorfosis. Las tres concentraciones más altas, correspondientes a 120, 140 y 160 mg/L evidenciaron una mortalidad superior a la del grupo control durante los días 50 y 75 de exposición. Mientras que los tratamientos restantes, presentaron una mortalidad gradual, no significativa con el grupo control, a lo largo del experimento. Si bien el bioensayo subcrónico a 21 días, dio un valor de CL50 de 151,4 mg/L, un tiempo de exposición más largo, demuestra que los renacuajos no sobreviven a una exposición mayor a 120 mg/L de CLO.

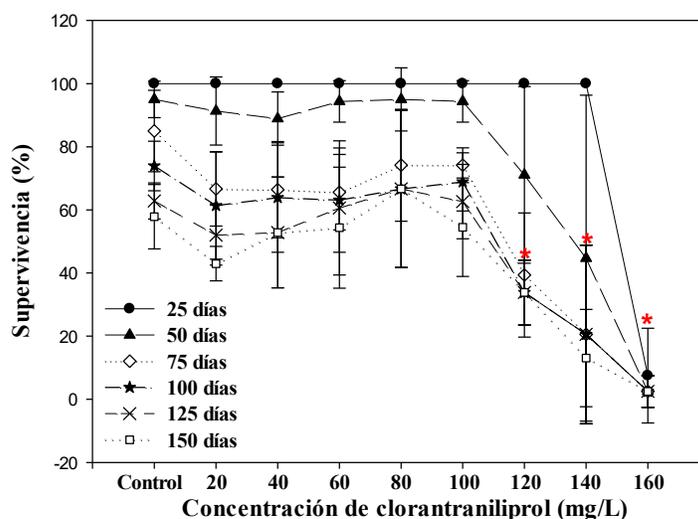


Figura 3.5. Supervivencia de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de clorantraniliprol desde el estadio 27 hasta la culminación de la metamorfosis. * indica diferencias significativas respecto al grupo control.

3.3.4.2 Tiempos de Metamorfosis

Las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta E39 (patas posteriores completas), E42 (patas posteriores y anteriores completas) y MET (absorción completa de la cola) se ilustran en las figuras 3.6, 3.7 y 3.10, respectivamente. Los primeros

individuos que alcanzaron E39 lo hicieron después de 25 días de exposición (contando desde E27) y para el día 77, todos los individuos que iban alcanzar el E39 lo habían logrado en todos los tratamientos y el grupo control (Figura. 3.6). La proporción de renacuajos que alcanzaron el E39 fue significativamente inferior a la de los controles en todos los grupos de exposición, excepto en el de 60 mg/L, que no presentó diferencias significativas (Tabla 3.3). Este menor porcentaje de alcance al E39, por parte de los individuos, no se debió a una mayor mortalidad, ya que la supervivencia en los grupos de tratamiento no fue significativamente diferente del grupo control durante el T50-E39 (Tabla 3.3). En general, los tratamientos tuvieron poco efecto sobre la tasa de transformación a E39 y el tiempo necesario para alcanzar el estadio, debido a que el T50-E39 de los grupos tratados no difirió significativamente de los controles, excepto en los individuos tratados con 100 mg/L, que tardaron unos días más en alcanzar el E39 (Tabla 3.3).

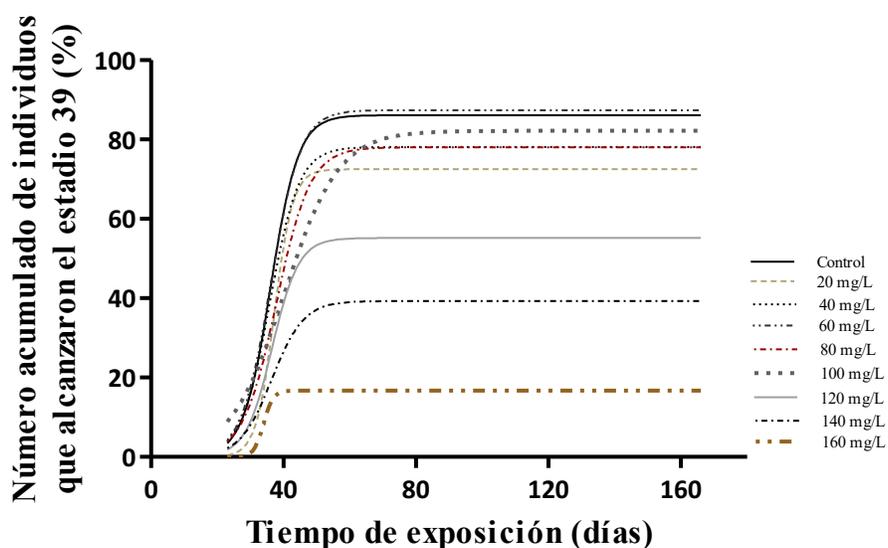


Figura 3.6. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron el estadio 39 luego de una exposición a distintas concentraciones de clorantraniliprol. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 3.2. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con clorantraniliprol alcancen el estadio 39 (T50–E39), supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50–39, tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E39 (días)	Supervivencia T50 - E39 (%)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	36,18±0,37	97,5±2,5	0,1±0,008	86,1±0,58
20mg/l	37,31±0,6	94,44±5,55	0,15±0,03	*72,53±0,96
40mg/l	35,98±0,35	93,92±3,61	0,1±0,007	*78,08±0,48
60mg/l	36,22±0,37	100±0	0,09±0,007	87,37±0,57
80mg/l	37,97±0,71	97,5±2,5	0,08±0,01	*78,01±0,92
100mg/l	*40,3±0,56	100±0	0,05±0,003	*82,03±0,64
120mg/l	36,59±0,8	87,5±12,5	0,1±0,01	*55,18±0,81
140mg/l	36,56±2,13	83,75±9,86	0,09±0,03	*39,28±1,43
160mg/l	34±3,4	*7,5±7,5	0,3±0,62	*16,68±1,69

En general, menos del 50% de los renacuajos presentes al inicio del bioensayo alcanzaron el E42, incluso en el grupo de control. La transformación al E42 ocurrió entre los días 46 y 82 de exposición (Figura 3.7), tiempo en el que se produjo la mayor mortalidad en todos los grupos, incluidos los controles (Figura 3.5). Es probable que el alto porcentaje de mortalidad, este relacionado con el menor porcentaje de individuos que alcanzaron el E42, en comparación al porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. No obstante, esta mortalidad no impide comparar el impacto de los tratamientos sobre el desarrollo, ya que se produjo de forma similar en todos los grupos, incluidos los controles, como lo muestra la supervivencia equivalente durante el T50-E42 (Tabla 3.4).

Durante la transformación al E42, se observó una relación dosis-respuesta no-monotónica en forma de U invertida entre las concentraciones de exposición, el porcentaje de individuos que alcanzaron E42 y el tiempo que necesitaron para lograrlo (T50-E42) (Figuras 3.8 y 3.9). De esta forma, en los tratamientos más bajos (20 - 40 mg/L), el T50-E42 y la proporción de individuos que alcanzaron el E42 fueron significativamente menores que el grupo control, mientras que en los tratamientos con concentraciones medias (60 – 80 mg/L), el T50-E42 y el porcentaje de individuos que alcanzaron el E42 fue semejante al grupo control, e incluso, significativamente mayor, en el caso del porcentaje de individuos

que alcanzaron el E42 en la tratamiento a 80 mg/L (Figuras 3.8, 3.9 y Tabla 3.3). Así, en los tratamientos con las concentraciones más altas, el T50-E42 y la proporción de individuos que alcanzaron E42, fueron significativamente menores que el grupo control, como ocurrió en los tratamientos de exposición más bajos (Figuras 3.8, 3.9 y Tabla 3.3).

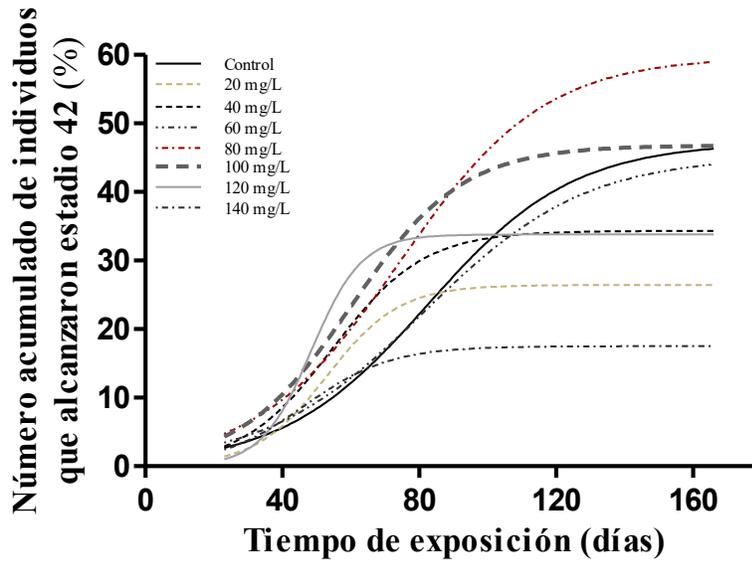


Figura 3.7. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron el estadio 42 luego de una exposición a distintas concentraciones de clorotraniliprol. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

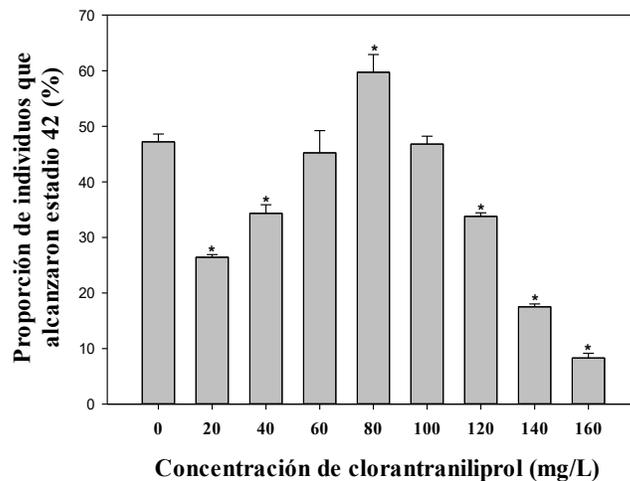


Figura 3.8. Proporción de individuos expuestos a clorotraniliprol que alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

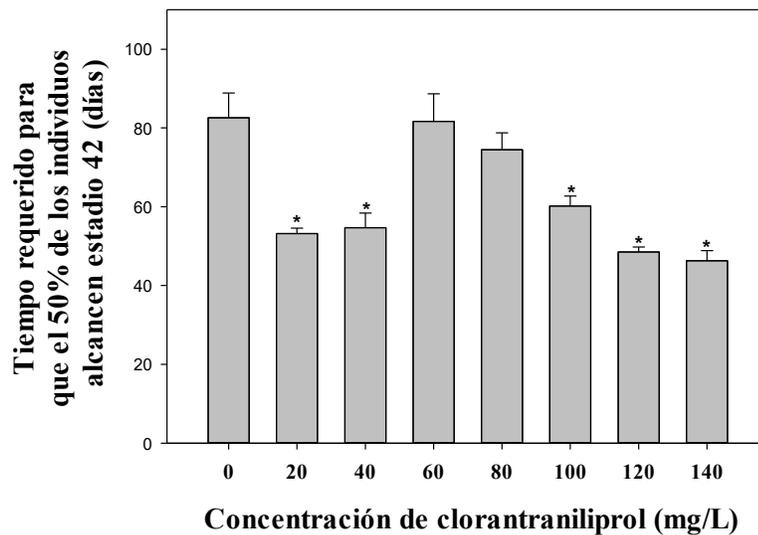


Figura 3.9. Tiempo en el que el 50% de los individuos expuestos a clorraniliprol alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

Tabla 3.3. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con clorraniliprol alcancen el estadio 42 (T50-E42), supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50-E42, tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E42. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$). ND* no disponible.

	T50 – E42 (días)	Supervivencia T50 – E42 (%)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	82,59±2,25	82,5±6,29	0,02±0,002	47,22±1,39
20mg/l	*53,18±1,38	88,19±4,55	0,04±0,005	*26,43±0,48
40mg/l	*54,69±3,70	88,92±4,22	0,03±0,008	*34,33±1,56
60mg/l	81,67±7,03	65,62±5,98	0,019±0,004	45,22±4,01
80mg/l	74,46±4,30	74,16±8,85	0,02±0,004	*59,72±3,20
100mg/l	*60,19±2,52	82,84±3,26	0,02±0,004	46,79±1,42
120mg/l	*48,51±1,26	73,61±15,27	*0,05±0,009	*33,80±0,63
140mg/l	*46,29±2,56	47,22±27,3	0,03±0,007	*17,51±0,53
160mg/l	ND	ND	ND	*8,33±0,83

La finalización de la metamorfosis se produjo entre los días 50 y 87 de exposición (Figura 3.10). La mayoría de los individuos que alcanzaron el E42 completaron la metamorfosis poco tiempo después (Tabla 3.4 vs. Tabla 3.5). La relación dosis-respuesta no-monotónica observada entre los tratamientos de exposición, el porcentaje de individuos que lograron alcanzar el E42 y el tiempo requerido para lograrlo, se mantuvo igual hasta el final de la metamorfosis MET (Tabla 3.5).

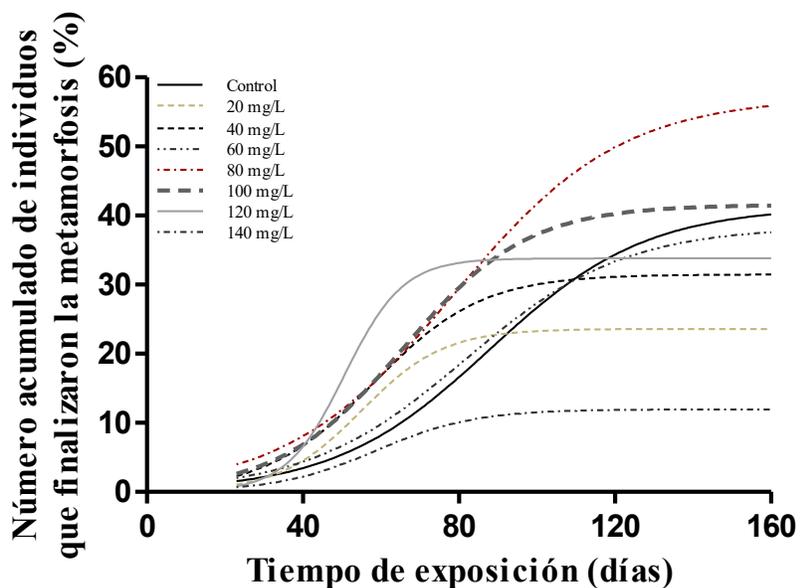


Figura 3.10. Número acumulado de renacuajos de *R. arenarum* que finalizaron la metamorfosis de acuerdo al tiempo transcurrido para el grupo control y los grupos expuestos a clorantraniliprol. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 3.4. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con clorantraniliprol finalicen la metamorfosis (T50-MET), supervivencia general registrada al momento de alcanzar T50-MET, tasa de transformación y porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis. Los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – MET (días)	Supervivencia T50 – MET (%)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	87,91±2,99	82,5±6,29	0,02±0,003	41,25±1,70
20mg/l	*55,13±1,86	88,19±4,55	0,04±0,007	*23,60±0,58
40mg/l	*58,11±3,76	86,42±6,24	0,03±0,008	*31,47±1,46
60mg/l	81,70±5,52	65,62±5,90	0,02±0,005	38,38±2,79
80mg/l	78,67±5,08	74,16±8,85	0,02±0,004	*57,11±3,68
100mg/l	*65,69±3,60	80,06±2,68	0,027±0,006	41,55±1,87
120mg/l	*50,65±1,26	71,11±13,98	*0,058±0,009	*33,80±0,63
140mg/l	*58,71±6,15	41,94±24,34	0,03±0,015	*11,94±0,93

3.3.4.3 Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados

Los individuos recién metamorfoseados que fueron expuestos a CLO durante su desarrollo, mostraron un peso promedio y una longitud hocico-cloaca (LHC) semejante a los valores encontrados en los individuos del grupo control, es decir, no se registraron diferencias significativas (Figuras 3.11 y 3.12).

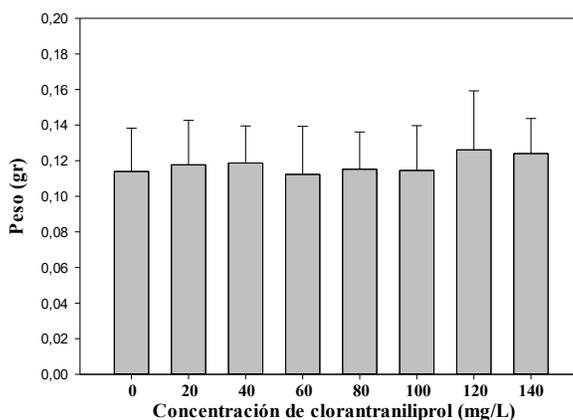


Figura 3.11. Peso promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con clorantraniliprol (P<0.05).

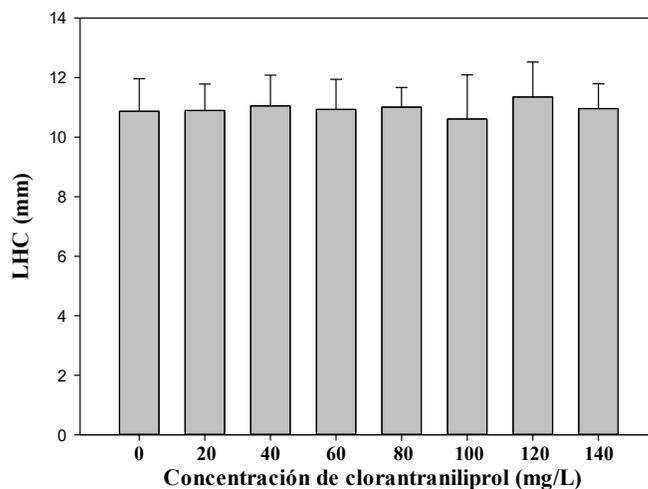


Figura 3.12. Longitud hocico cloaca promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con clorantraniliprol. ($P < 0.05$).

3.4. DISCUSIÓN

Los datos de toxicidad obtenidos en este estudio indican que igual a lo considerado para peces, CLO y CIA no presentan un riesgo de mortalidad directa para los anuros en estadios larvales por la exposición aguda o subcrónica a estos insecticidas, debido a que las concentraciones que causan mortalidad (Tabla 3.2), están muy por encima de las que se han registrado en ambientes acuáticos y de las que suelen oscilar entre 0,04 – 950 $\mu\text{g/L}$ en CLO (Jayasiri et al 2022, Utami et al 2020, CDPR 2019, Elfikrie et al 2020, Song et al 2019, Redman et al 2020, Lalonde y Garron 2020) y entre 0,1 y 12,5 $\mu\text{g/L}$ en CIA (Kolupaeva et al 2019, EFSA 2014, Zhang et al 2013). En las evaluaciones realizadas a 96 horas y 21 días, los organismos tratados lograron sobrevivir a concentraciones superiores de 130 mg/L de CLO y CIAN, a excepción de *Scinax granulatus* (E25), quien resultó ser la especie más sensible a la exposición con CLO. Previo a este trabajo, existía en la literatura científica un solo registro de toxicidad aguda en renacuajos expuestos a CLO documentado en larvas E34 - E36 de *Hoplobatrachus chinensis* (Wei et al., 2014).

La exposición de CLO durante el proceso metamórfico de *R. arenarum*, evidenció una relación dosis-respuesta no-monotónica en forma de “U” invertida, en el alcance al E42 y MET. De esta forma, se redujo significativamente la proporción de individuos que

avanzaron en el desarrollo y el tiempo que necesitaron para lograrlo, en las dos concentraciones más bajas (20 y 40 mg/L) y más altas evaluadas (120 y 140 mg/L) (Figuras 3.8 y 3.9), mientras que, en los tratamientos intermedios, la proporción de individuos que avanzaron en el desarrollo fue semejante al grupo control e incluso significativo y superior en 80 mg/L.

Las curvas dosis/respuesta no-monotónicas (CDRNM) se han asociado a alteraciones endocrinas (Vandenberg et al., 2012, Hill et al., 2018) que pueden estar mediadas por receptores celulares (Calabrese et al., 2013; Shi et al., 2016) o por vías de señalización celular (Calabrese et al., 2013). Recientemente, Greenwood et al., (2022) describió un mecanismo conservado de hormesis o respuesta no-lineal a nivel molecular, basado en la capacidad y respuesta de los homo-multímeros proteicos en la interacción simultánea con el sustrato y un competidor (estresor). Aunque la información es limitada por el desconocimiento del mecanismo, efectos no-monotónicos de CLO han sido descritos en aspectos reproductivos de insectos no-blanco (Tuelher et al., 2017; Santos et al., 2018); y este trabajo representa el primer hallazgo en anfibios.

Existen registros de que la exposición de otros plaguicidas en anuros ha ocasionado afectaciones en el proceso metamórfico de forma no-monotónica. Este ha sido el caso de los herbicidas, atrazina (Brodeur et al., 2013), butaclor (Shuman-Goodier et al., 2021) y el ácido aminometilfosfónico, metabolito del glifosato (Cheron and Brischoux., 2020), y el caso de los insecticidas, tiametoxam (Jenkins et al., 2021) y clorpirifos (McClelland and Woodley., 2022). En el caso de atrazina, Brodeur *et al.*, (2013) evidenció que en renacuajos de *R. arenarum*, la exposición al herbicida ocasionaba una respuesta no-monotónica sobre los tiempos de metamorfosis, al igual que ocurrió con CLO, sin embargo, los efectos sucedieron en momentos diferentes, mientras que la exposición con atrazina aceleró el desarrollo metamórfico entre el E25 y el E42, la exposición con CLO aceleró el desarrollo metamórfico entre el E42 y MET. Lo que sugiere que atrazina y CLO afectan el proceso metamórfico de *R. arenarum* por diferentes vías. De hecho, se cree que atrazina actúa a través de receptores endocrinos (Brodeur et al., 2013).

Es posible, que la respuesta no-monotónica observada durante la transición del E39 al E42 en *R. arenarum* haya sido ocasionada por la alteración en la función sinérgica del eje

hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal/interrrenal (HPA/HPI) ó hormonas del estrés. En los anuros, el avance en la metamorfosis durante el E39 y E42 sucede bajo el estricto control de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Tata., 2006; Thambirajah et al., 2019). La estimulación correcta de las HT depende de la acción de la tiotropina pituitaria (TSH) hormona controlada y estimulada por la hormona del estrés conocida como el factor liberador de corticoprina (CRF) (Denver., 2021). De esta forma, los plaguicidas pueden llegar a alterar el desarrollo metamórfico de los anfibios por diferentes vías. Por ejemplo, en renacuajos de *Osteopilus septentrionalis* (E25) la exposición al herbicida atrazina ocasionó niveles no-monotónicos de corticosterona (CORT), un glucocorticoide estimulado por CRF, que en anfibios actúa sinérgicamente con las HT promoviendo el desarrollo de tejidos, el crecimiento de los individuos y el tiempo en el que ocurre la metamorfosis (Denver., 2009; Kulkarni y Buchholz., 2014; McMahon et al., 2017; Kikuyama et al., 2019). En la actualidad, no se conoce a CLO como disruptor endocrino, aunque hay reportes de que pueden llegar a intervenir el HPT en los vertebrados. Por ejemplo, se evidenció que la exposición de CLO en ratas disminuye significativamente los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas T3 y T4 (Hassan et al., 2021), además, se han observado adenomas tiroides en ratas hembra expuestas crónicamente a 156 mg de CLO por kg de peso corporal al día (EFSA, 2013).

Hasta la fecha, CLO es la única diamida antranilica en tener registro sobre el impacto que puede tener en larvas de anuros. Efectos descritos indican que la exposición al insecticida durante 20 días, puede alterar la supervivencia y crecimiento de *Fejervarya limnocharis* y *Microhyla fissipes* (Wei et al., 2021). Mientras que la exposición durante el avance de la metamorfosis realizada en este trabajo causó una respuesta no-monotónica sobre los tiempos del desarrollo y una disminución significativa del número de individuos que lograron finalizar la metamorfosis en *R. arenarum*, específicamente en la transición de E39 al E42, evidenciando un posible impacto en la acción sinérgica de los ejes HPT y HPI/HPA.

En conclusión, el presente estudio demostró que, si bien es poco probable que los insecticidas de las diamidas antranilicas causen toxicidad aguda sobre las larvas de anuros de especies neotropicales en el medio natural, los resultados descritos y en los que se detallan respuestas no-monotónicas sobre los aspectos evaluados en la metamorfosis de *R. arenarum*,

sugieren un efecto endocrino sobre el sistema hormonal tiroideo de forma directa o a través de la interacción con el sistema hormonal del estrés. Estas observaciones son importantes debido a que actualmente esta clase de insecticidas no son conocidos como disruptores endocrinos. Se necesitan más investigaciones para aclarar las vías que conducen a estos efectos, además, de evaluar si las concentraciones acuáticas y relevantes para el medio ambiente de las DIA están afectando a las poblaciones de anfibios naturales.

4. CAPÍTULO 4. Efecto de dos insecticidas formulados con los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid sobre el desarrollo larval y metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*: acercamiento a un escenario natural de exposición.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los neonicotinoides (NEO) son una familia de insecticidas sistémicos altamente utilizados en la industria agrícola y en el campo de la veterinaria en el control de parásitos (Ensley, 2018). En los sistemas agrícolas, se aplican en diversos cultivos y en productos de importancia mundial como los cereales y oleaginosas, a través, del recubrimiento de semillas, fumigaciones foliares, empapado del suelo y aplicaciones en el tronco (Van der Sluijs et al., 2015). La combinación entre el continuo uso y las propiedades fisicoquímicas de estos insecticidas, han generado la contaminación de suelos y su frecuente presencia en cuerpos de agua dulce (Van der Sluijs et al., 2015). En ambientes acuáticos, se han encontrado concentraciones de NEO que varían entre 0,08 y 320 µg/L (Gibbons et al., 2015, Sánchez-Bayo et al., 2016, Casillas et al., 2022) y, en consecuencia, algunos estudios analizan los posibles riesgos que pueden estar causando sobre las comunidades biológicas naturales que los habitan (Cavallaro et al., 2019, Casillas et al., 2022).

En organismos acuáticos como las larvas de anuros, el efecto de los NEO ha sido estudiado. Las evaluaciones de exposición aguda, indican que los insecticidas de esta familia no presentan valores de toxicidad alarmantes, de acuerdo, a las concentraciones letales 50 (CL50) obtenidas (Feng et al., 2004; Perez-Iglesias et al., 2014; Pochini y Hoverman, 2017; Miles et al., 2017; Saka y Tada, 2021; Fonseca et al., 2022), sin embargo, en exposiciones subletales se han encontrado efectos a escalas de genotoxicidad (Feng et al., 2004; Perez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Moe, 2017; Samojeden et al., 2022),

⁴ Capítulo publicado.

Brodeur, J. C. Fonseca Peña, S. V. D. F. (2023). Effects of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam and imidacloprid on metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum* at environmentally-relevant concentrations, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: 10.1080/15287394.2023.2213259.

citotoxicidad (Jenkins et al., 2021), factores enzimáticos (Samojeden et al., 2022) y comportamentales (Sievers et al., 2018, Holtswarth et al., 2019, Samojeden et al., 2022). Otra de las evaluaciones realizadas, es el que corresponde al efecto de los NEO sobre la metamorfosis. Resultados a exposiciones a altas concentraciones de NEO indican que concentraciones superiores a 8 mg/L de imidacloprid (IMI) o tiametoxam (TIA) pueden disminuir el número de individuos que logran finalizar la metamorfosis y que además los metamorfos pueden resultar con un menor peso y tamaño, en renacuajos de *Lithobates pipiens* y *Xenopus laevis* (Moe 2017; Jenkins et al., 2021). Hasta la fecha, seis estudios han evaluado el efecto de concentraciones ambientales de los NEO sobre la MET en anfibios, de los cuales tres no registraron efectos (Robinson et al., 2019; 2021; Saka y Tada, 2021), los siguientes estudios reportaron efectos sobre los tiempos de metamorfosis. Se encontró que, renacuajos de *Lithobates sylvaticus* tras la exposición a 10 y 100 µg/L de IMI atrasaron la finalización de la MET (Robinson et al., 2017). Mientras que, en otro estudio, la exposición a 10 µg/L de IMI en esta misma especie, registró una ligera aceleración en la MET (Thompson et al., 2022), y, por último, en larvas de *Ambystoma gracile* la exposición a 100 µg/L de IMI aceleró el desarrollo (Danis y Marlatt, 2021). Algunos registros han sugerido que la exposición de NEO durante la metamorfosis puede generar efectos en los organismos juveniles. Por ejemplo, las exposiciones realizadas por Robinson et al., (2017) y (2019), ocasionaron una alteración en la respuesta de escape en juveniles de *Lithobates sylvaticus* (Lee-Jenkins y Robinson, 2018) y efectos hematológicos y metabólicos en juveniles de *L. sylvaticus* y *Lithobates pipiens* (Gavel et al., 2019; 2021), respectivamente.

Fonseca et al, (2022), describieron la primera evaluación del efecto del NEO, TIA sobre la metamorfosis del sapo común, *Rhinella arenarum*, autóctono de la región pampeana argentina. El efecto más importante observado, fue la disminución del número de individuos que lograron finalizar la metamorfosis y la reducción del peso y tamaño promedio de los juveniles a partir de la concentración más baja trabajada (9 mg/L). En este contexto, y con el fin de acercarse a un posible escenario natural, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de TIA e IMI en concentraciones que incluyeron a las encontradas en la naturaleza sobre el desarrollo metamórfico de *R. arenarum*.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Organismos Utilizados

Puestas de huevos de *Rhinella arenarum* fueron recolectadas durante la primavera del 2019 en diversos cuerpos de agua permanentes y temporarios presentes en las 650 hectáreas (34o36'24S, 58o39'56W) del Centro Nacional de Investigación Agrícola (CNIA), Hurlingham, Buenos Aires. La descripción detallada de la especie y el mantenimiento de los huevos y renacuajos se encuentran en las secciones 2.2.1 y 2.2.2, respectivamente, de materiales y métodos del Capítulo 2.

4.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo

Dos formulados comerciales de insecticidas NEO fueron testeados: Actara® y Confidor®. Las características del agua utilizada en los ensayos, control y tratamiento y la descripción de los formulados comerciales se encuentran descritos en las secciones 2.2.3 y 2.2.4, respectivamente, de materiales y métodos del capítulo 2.

4.2.3. Soluciones de prueba

En el caso de TIA, se preparó una solución madre de 50 mg/L, diluyendo 200 miligramos del formulado sólido en un litro de agua de ensayo previamente equilibrada a pH 7. Mientras que para IMI, se preparó una solución madre 50 mg/L, diluyendo 0.5 ml del formulado en dos litros de agua de ensayo. Las soluciones madres se prepararon y fueron conservadas a 4 °C durante 10 días, las mismas fueron utilizadas para al menos 5 recambios de soluciones. A partir de las soluciones madres, se realizaron las respectivas diluciones seriadas con el fin de obtener las diferentes concentraciones de prueba, el diluyente utilizado fue el agua de ensayo (características detalladas en la sección 2.2.3 de materiales y métodos del capítulo 2).

La concentración de TIA e IMI presente en la respectiva solución madre fue determinada tal como fue descrito en la sección 2.2.6 de materiales y métodos del Capítulo 2.

4.2.4 Diseño Experimental

Renacuajos de *Rhinella arenarum* en E27 (Gosner 1960) fueron expuestos a concentraciones individuales de 5, 50, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de TIA e IMI. Se dispuso de tres replicas por cada tratamiento, con seis individuos cada una. Cada unidad experimental consistió en dos placas de Petri de 10 cm de diámetro superpuestas que contenían 100 mL de solución experimental. Las soluciones de prueba fueron renovadas en su totalidad cada 48 horas. La temperatura y el fotoperiodo fueron mantenidos estables a 25 ± 2 °C y 16:8 h luz:oscuridad, durante todo el bioensayo. Un trozo de acelga hervida de aproximadamente 1 cm^2 fue añadido a las unidades experimentales luego de cada recambio de soluciones, como alimento ad libitum. Durante el recambio de soluciones (cada 48 h), fueron retirados los individuos muertos, se registró la supervivencia y estadio de desarrollo en el que se encontraban los renacuajos, según la clasificación Gosner (1960): 1) estadio 39 (E39), 2) estadio 42 (E42) y 3) finalización de la metamorfosis, estadio 46 (MET), descritos en la sección 2.2.5.4 de materiales y métodos del capítulo 2. Los individuos que completaron la metamorfosis fueron anestesiados en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222) y pesados por medio de una balanza digital Denver TP-214 con una precisión de 0.001 g. Se les examinó detalladamente en busca de malformaciones, y se les tomó una fotografía ventral y dorsal, con los brazos extendidos con el fin de medir la longitud hocico cloaca (LHC), después de realizado el procesamiento, los individuos fueron fijados en bouin, con el fin de poder ser utilizados en posteriores estudios. Asimismo, a partir de las fotografías tomadas se realizó la medición de la LHC mediante el uso del programa Imagej desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés) (Schneider et al 2012).

4.2.5. Análisis estadísticos

El impacto de TIA e IMI sobre la proporción de individuos que logran avanzar en el desarrollo metamórfico y el tiempo que necesitan para hacerlo, fueron analizados según los métodos previamente descritos por Brodeur et al. (2009; 2013). Para cada tratamiento, así como para los controles se ajustó, con el programa GraphPad Prism Versión 5.03, una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a la variable “número acumulado de individuos que alcanzaron E39, E42, y a los que completaban la MET”. Además, para cada curva de ajuste se calculó el tiempo para que el 50% de los individuos alcancen T39 (T50-

E39), T42 (T50-E42), o MET (T50-MET). Las proporciones de renacuajos que alcanzaron los diferentes estadios durante el proceso de metamorfosis (E39, E42 y MET) en los distintos tratamientos, los valores de T50-E39, T50-E42, T50-MET, y el peso promedio y la LHC de los individuos recién metamorfoseados, fueron comparados con el grupo control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos. Todos los análisis de ANOVA y comparaciones múltiples se realizaron mediante el uso del software SigmaStat 12.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres

La concentración analítica de TIA determinada en la solución madre fue de $10,56 \pm 0,28$ mg/L (N = 3, promedio \pm desviación estándar (D.E.)), lo que representa el 21,1 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 80% del valor nominal, se usaron los valores de concentraciones correspondientes al 21,1 % de los valores nominales para el análisis de los resultados, tal como recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). Las concentraciones nominales de TIA que tenían valores correspondientes 5, 50, 500, y 5000 μ g/L correspondieron entonces a concentraciones reales de 1,05, 10,5, 105 y 1050 μ g/L, respectivamente.

Por su parte, la concentración analítica de IMI determinada en la solución madre fue de $34,14 \pm 4,09$ mg/L (N = 3, promedio \pm D.E.), lo que representa el 68,3 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 80% del valor nominal, se usaron los valores de concentraciones correspondientes al 68,3 % de los valores nominales para el análisis de los resultados, tal como recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). Las concentraciones nominales de IMI que tenían valores correspondientes a 5, 50, 500, y 5000 μ g/L correspondieron entonces a concentraciones reales de 3,4, 34, 340, 3400 μ g/L, respectivamente.

4.3.2. Efecto de un formulado de tiametoxam sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

4.3.2.1. Tiempos de metamorfosis.

Las curvas ilustradas en la Figura 4.1 describen la progresión de la metamorfosis hasta E39 (patas traseras completas) en los distintos grupos experimentales incluido el control. En general, todos los individuos expuestos a TIA y los del grupo control alcanzaron el E39 (Tabla 4.1). Sin embargo, lo hicieron en momentos diferentes. La Figura 4.1 permite evidenciar que los renacuajos tratados a 1050 $\mu\text{g/L}$ de TIA, iniciaron más tarde el proceso de transformación, lo que le significó un T50-E39 superior al del grupo control (Tabla 4.1). Contrario, ocurrió en las concentraciones a 1,05 y 10,5 $\mu\text{g/L}$, que por el inicio temprano en el avance al E39, registraron un T50-E39 significativamente menor (Figura 4.1 y Tabla 4.1), valor que posiblemente compensó la menor tasa de transformación registrada en el tratamiento a 10,5 $\mu\text{g/L}$. Finalmente, el tratamiento a 105 $\mu\text{g/L}$ registró un T50-E39 semejante al grupo control, debido a que el avance hacia E39 ocurrió simultáneamente (Figura 4.1 vs Tabla 4.1).

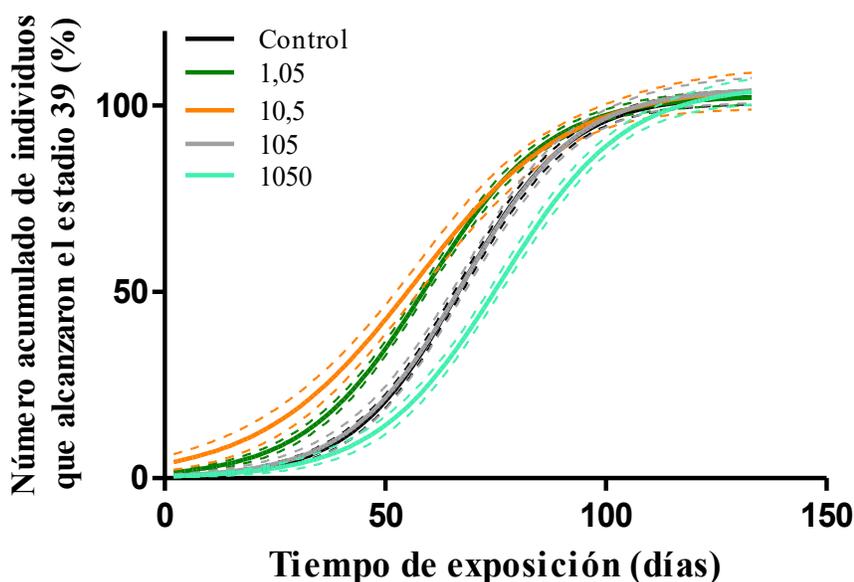


Figura 4.1. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 39 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 1,05 y 1050 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 4.1. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam alcancen el estadio 39 (T50–E39), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

	T50 – E39 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	67,19±0,58	0,03±0,001	100±1,05
1,05 µg/L	*59,28±0,67	0,03±0,001	100±1,1
10,5 µg/L	*56,74±1,89	*0,02±0,002	100±2,68
105 µg/L	67,65±1,01	0,03±0,002	100±1,82
1050 µg/L	*76,16±1,05	0,03±0,001	100±1,95

En el avance, Las curvas ilustradas en la Figura 4.2 describen la progresión de la metamorfosis hasta el E42 (4 patas completas) en los distintos grupos experimentales, incluido el grupo control. Los renacuajos del grupo control en promedio tardaron entre 4 y 6 días para avanzar del E39 al E42. La proporción de individuos que alcanzaron el E42 en los grupos de exposición a TIA, no registraron diferencias significativas con el grupo control. En general, más del 85% de los renacuajos alcanzaron el estadio (Tabla 4.2). Según los valores encontrados en el T50-E42, los tratamientos a 105 y 1050 µg/L de TIA requirieron de manera significativa, más días para alcanzar el E42 (Tabla 4.2), debido a que iniciaron más tarde la transformación (Figura 4.2). Mientras que, 1,05 y 10,5 µg/L resultaron con un T50-E42 semejante al grupo control (Tabla 4.2). En este caso, a pesar de que el tratamiento 1,05 µg/L tardó en iniciar el avance al estadio, la mayor tasa de transformación registrada, compensó el tiempo que requirió, a diferencia de 10,5 µg/L, que fue el inicio temprano en el desarrollo, lo que compensó la menor tasa de transformación registrada y el tiempo que necesitó para alcanzar el estadio (Figura 4.2 vs Tabla 4.2).

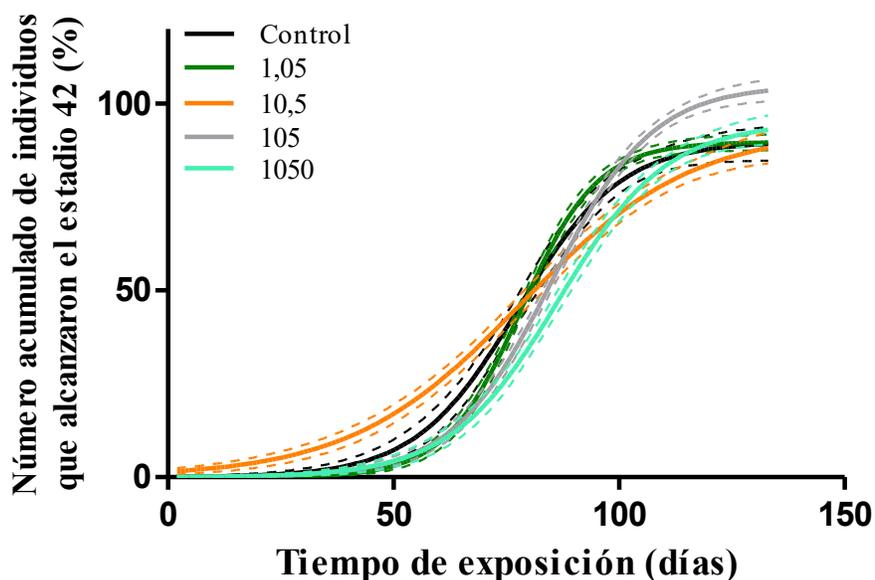


Figura 4.2. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 42 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 1,05 y 1050 µg/L de tiametoxam. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 4.2. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam alcancen el estadio 42 (T50–E42), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E42. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E42 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	77,56±1,32	0,03±0,002	89,92±2,52
1,05 µg/L	78,28±0,52	*0,05±0,002	89,76±1,07
10,5 µg/L	78,37±2,13	*0,02±0,001	93,08±3,40
105 µg/L	*85,07±0,70	0,03±0,001	100±1,64
1050 µg/L	*86,62±1,13	0,03±0,002	94,97±2,47

Finalmente, las curvas ilustradas en la Figura 4.3 describen la progresión de la metamorfosis hasta su finalización (MET) (absorción completa de la cola) en los distintos grupos experimentales, incluido el grupo control. Los renacuajos del grupo control, tardaron en promedio 4 días para pasar de E42 a MET. Igual a lo ocurrido en E42, la proporción de individuos que finalizaron la MET en los grupos expuestos a TIA, no registraron diferencias significativas con el grupo control. En general, más del 80% de los renacuajos lograron

finalizar el proceso metamórfico (Tabla 4.3). En cambio, los valores correspondientes al T50-MET mostraron que todos los grupos expuestos a TIA requirieron de significativamente más días para completar el desarrollo, en comparación con el grupo control (Tabla 4.3). Esto pudo deberse a que los tratamientos correspondientes a 1,05; 105 y 1050 $\mu\text{g/L}$ de TIA, iniciaron tarde la transformación al estadio, y que en el caso del tratamiento a 10,5 $\mu\text{g/L}$ de TIA, el registro de una tasa de transformación mucho menor que la registrada en el E42 (Tabla 4.2) no le permitió compensar el inicio temprano de transformación a lo largo del desarrollo metamórfico (Figura 4.3 vs Tabla 4.3).

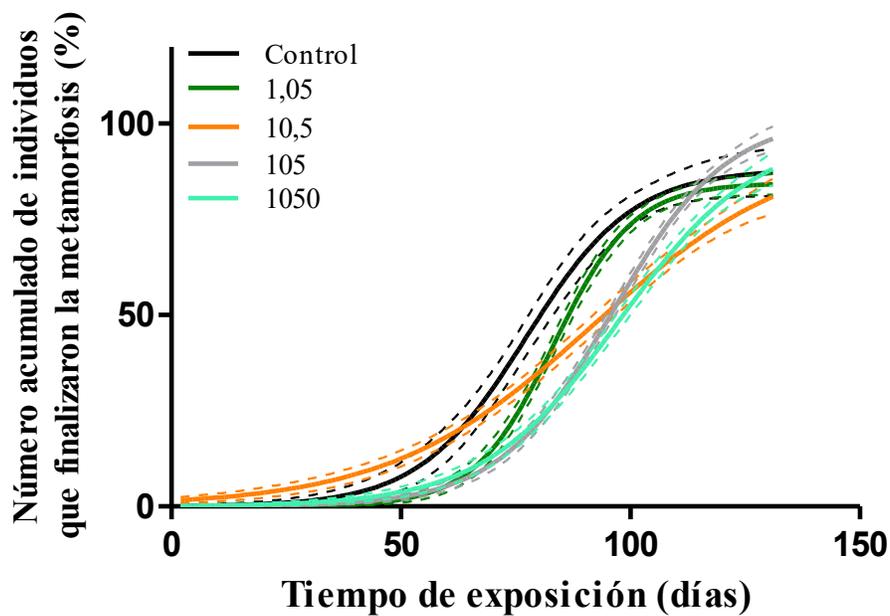


Figura 3.3. Número acumulativo de individuos que finalizaron la metamorfosis a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 1,05 y 1050 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 3.3. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de tiametoxam finalicen la metamorfosis MET (T50–MET), tasa de transformación y porcentaje de individuos que finalizaron la MET. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – MET (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	77,23±1,84	0,03±0,004	88,09±3,58
1,05 µg/L	*83,3±0,68	0,04±0,003	84,50±1,44
10,5 µg/L	*92±3,94	*0,01±0,001	93±6,15
105 µg/L	*96,18±1,02	0,03±0,001	100±2,57
1050 µg/L	*97,70±1,97	0,02±0,002	94±4,10

4.3.2.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados

El peso promedio de los individuos que finalizaron la metamorfosis está ilustrado en la figura 4.4. En general, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del peso promedio de los metamorfos expuestos a TIA y los del grupo control (Figura 4.4). En cuanto a los valores de longitud hocico cloaca (LHC) (Figura 4.5), el grupo expuesto a 10,5 µg/L de TIA fue el único en registrar valores significativamente menores que el grupo control, lo que indica que los metamorfos de este grupo de exposición (10,5 µg/L) resultaron con un menor tamaño (Figura 4.5).

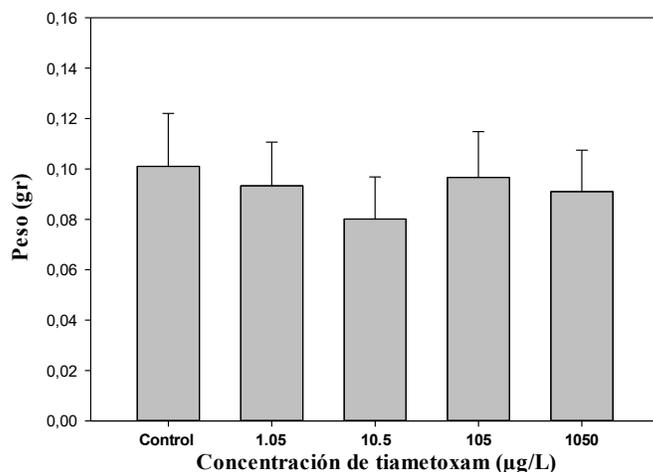


Figura 4.4. Peso promedio de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de tiametoxam durante su desarrollo.

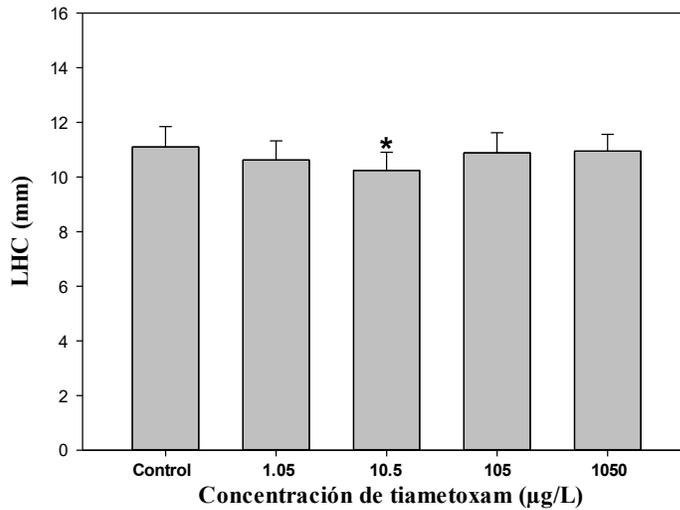


Figura 4.5. Longitud hocico cloaca de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de tiametoxam durante su desarrollo. La barra con el * mostró diferencias significativas con el grupo control ($P < 0.05$).

4.3.3. Efecto de un formulado de imidacloprid a concentraciones ambientalmente relevantes sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*

4.3.3.1. Tiempos de metamorfosis

Las curvas ilustradas en la Figura 4.6 describen la progresión de la metamorfosis hasta E39 (patas traseras completas) en los distintos grupos experimentales incluido el control. Todos los individuos expuestos a IMI y los del grupo control alcanzaron el E39 (Tabla 4.4). Según los valores correspondientes al T50-E39, todos los tratamientos de exposición a IMI necesitaron significativamente menos tiempo para alcanzar el E39 (Tabla 4.4), en relación a que iniciaron antes la transformación al estadio, que en el caso del tratamiento de exposición a 3400 µg/L de IMI, le permitió compensar la menor tasa de transformación registrada (Figura 4.6 vs Tabla 4.4).

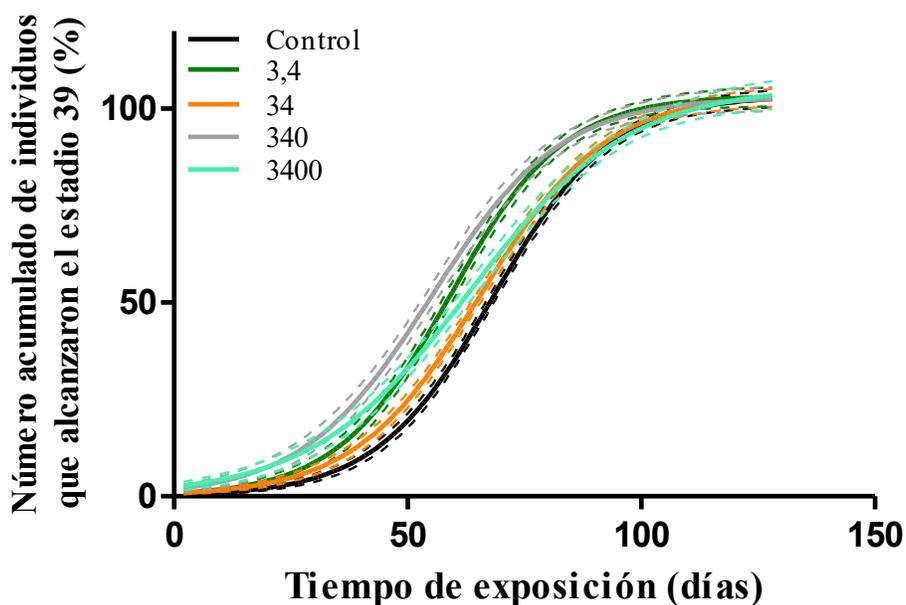


Figura 4.6. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 39 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 3,4 y 3400 µg/L de imidacloprid. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 4.4. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de imidacloprid alcancen el estadio 39 (T50–E39), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E39 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	68,41±0,63	0,03±0,001	100±1,20
3.4 µg/L	*59,04±0,72	0,03±0,001	100±1,30
34 µg/L	*65,57±0,69	0,03±0,001	100±1,28
340 µg/L	*55,03±1	0,03±0,001	100±1,62
3400 µg/L	*63,29±1,34	*0,02±0,001	100±2,13

En el avance, las curvas ilustradas en la Figura 4.7 describen la progresión de la metamorfosis hasta E42 (4 patas completas) en los distintos grupos experimentales, incluido el grupo control. En general, los individuos del grupo control en promedio tardaron entre 4 y 6 días para pasar de E39 a E42. En cuanto a la proporción de individuos que alcanzaron el E42, los grupos expuestos a 3,4, 34 y 340 µg/L de IMI no presentaron diferencias significativas con el grupo control, mientras que el grupo expuesto a 3400 µg/L de IMI, si

registró diferencias significativas con el control, debido a la menor proporción de individuos que avanzaron al E42 (Tabla 4.5). En cuanto a los valores correspondientes al T50-E42, contrario a lo registrado en E39, los tratamientos de exposición a 3,4, 34 y 3400 µg/L de IMI no registraron diferencias significativas con el grupo control, mientras que el tratamiento a 340 µg/L de IMI, registró un valor significativamente menor (Tabla 4.5), en relación a que fue el único tratamiento que inició temprano la transformación al estadio (Figura 4.7 vs Tabla 4.5).

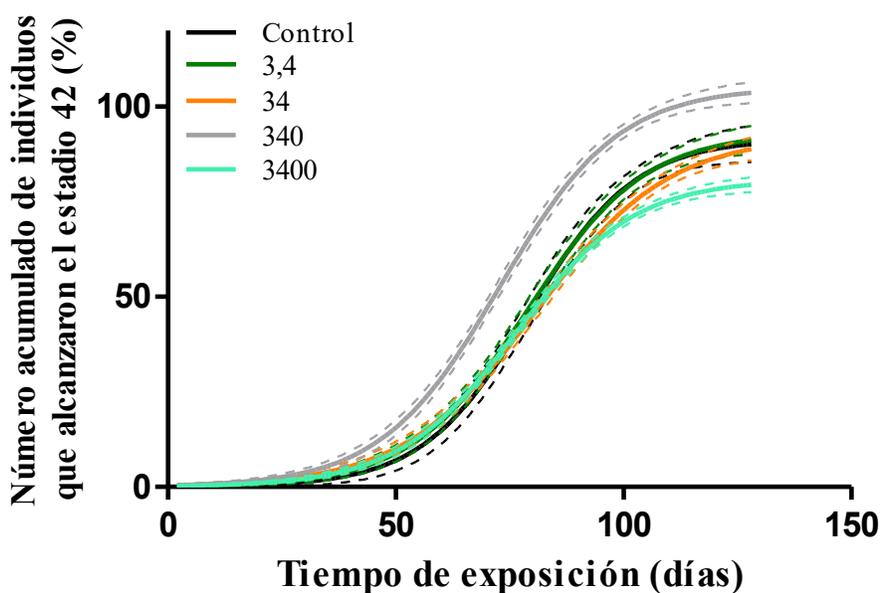


Figura 4.7. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 42 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 3,4 y 3400 µg/L de imidacloprid. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 4.5. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de imidacloprid alcancen el estadio 42 (T50–E42), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E42. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E42 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	79,18±1,10	0,03±0,003	91,57±2,93
3.4 µg/L	79±1,18	0,03±0,002	93,2±2,38
34 µg/L	80,77±1,16	0,02±0,001	92,42±2,24
340 µg/L	*72,82±0,78	0,03±0,001	100±1,59
3400 µg/L	76,34±0,71	0,03±0,001	*80,92±1,20

Finalmente, las curvas ilustradas en la Figura 4.8 describen la progresión de la metamorfosis hasta su finalización (MET) (absorción completa de la cola) en los distintos grupos experimentales, incluido el grupo control. En promedio, los individuos del grupo control tardaron 4 días para pasar de E42 a MET. Además, igual a lo que ocurrió durante el E42, la proporción de individuos que lograron finalizar el proceso de metamorfosis en los grupos de exposición a 3,4, 34, y 340 $\mu\text{g/L}$ de IMI no registraron diferencias significativas con el grupo control, en general, más del 90% de los individuos lo lograron. Mientras, que en el caso del tratamiento de exposición a 3400 $\mu\text{g/L}$ de IMI, la proporción de individuos que finalizaron el proceso metamórfico fue significativamente menor (Tabla 4.6). Los valores correspondientes al T50-MET en los grupos de exposición a IMI no presentaron diferencias significativas con el grupo control, tampoco se encontraron efectos sobre las tasas de transformación (Tabla 4.6).

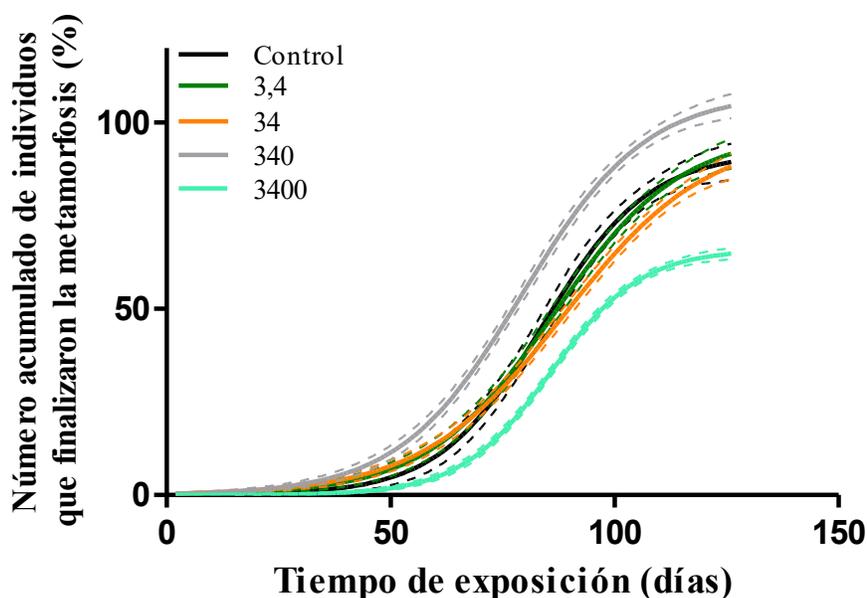


Figura 4.8. Número acumulativo de individuos que finalizaron la metamorfosis a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 3,4 y 3400 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 4.6. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de imidacloprid finalicen la metamorfosis (T50–E42), tasa de transformación y porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – MET (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	84,19±1,49	0,03±0,003	91,95±3,38
3.4 µg/L	86,49±1,53	0,03±0,002	93±3,01
34 µg/L	88,73±1,64	0,02±0,001	92±2,99
340 µg/L	79,44±0,98	0,03±0,001	100±2,1
3400 µg/L	85,78±0,53	0,04±0,001	*66,01±0,94

4.3.3.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados

El peso promedio de los individuos que finalizaron la metamorfosis se puede ver en la figura 4.9. En general, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del peso promedio de los metamorfos expuestos a IMI y los del grupo control (Figura 4.9). De la misma forma ocurrió con los valores de longitud hocico cloaca (LHC), no se registraron efectos ni diferencias significativas entre los valores de los metamorfos expuestos a IMI y el grupo control (Figura 4.10).

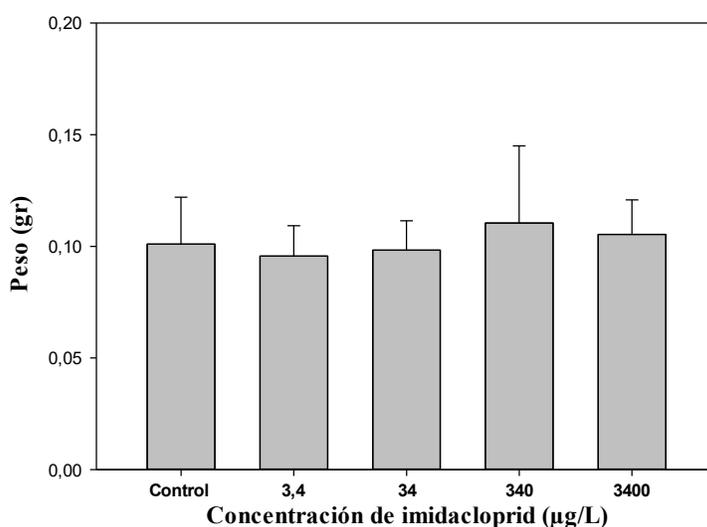


Figura 4.9. Peso promedio de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de imidacloprid durante su desarrollo.

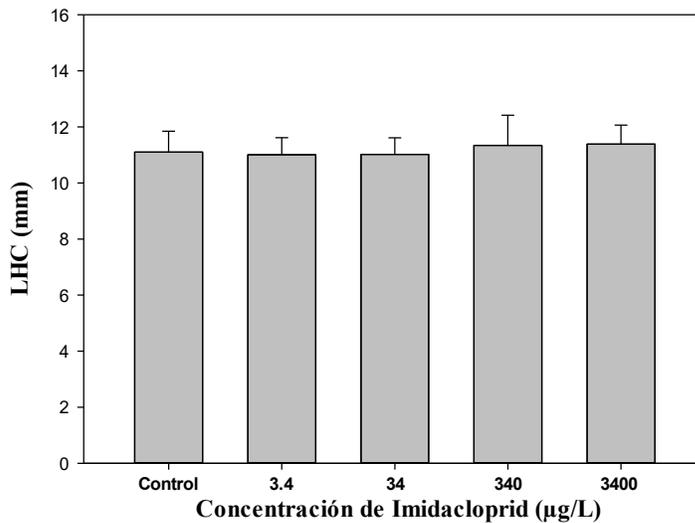


Figura 4.10. Longitud hocico cloaca de individuos de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado de imidacloprid durante su desarrollo. La barra con el * mostró diferencias significativas con el grupo control ($P < 0.05$).

4.4 DISCUSIÓN

Renacuajos de *Rhinella arenarum* (E27) fueron expuestos a concentraciones relevantes para el medio ambiente de TIA e IMI a lo largo de su desarrollo metamórfico, con el fin de poder evaluar el posible impacto que la presencia generalizada de los insecticidas NEO en ambientes acuáticos naturales puede tener en el desarrollo de anfibios con estadios larvales. TIA causó un retraso significativo en la transición de E39 a E42, generando un aumento del tiempo necesario para que los renacuajos completaran su desarrollo, efecto que hacía MET se observó desde la concentración más baja probada, 1,05 µg/L. En cambio, IMI no causó mayor incidencia en el desarrollo de *R. arenarum*, y en general, ambos insecticidas no afectaron el tamaño del cuerpo y el peso de los individuos al finalizar la metamorfosis.

En anfibios, rasgos como la edad y el tamaño de la metamorfosis intervienen en la aptitud de los adultos (Earl and Whiteman., 2015; Székely et al., 2020). Es común, que, por diversos factores de estrés, esos rasgos sean alterados. Por ejemplo, es bien conocido que la desecación de un estanque larvario, disminuya el tiempo de desarrollo, resultando metamorfos de menor tamaño, y en algunos casos, ocasionando una alteración en la función inmunitaria de los individuos (Gervasi and Foufopoulos., 2008; Crespi y Warne., 2013;

Brannelly et al., 2019; Kohli et al., 2019). En otros casos, un incremento en el tiempo de desarrollo se relaciona a una estrategia de adaptación que evitaría metamorfos de menor tamaño al tener más tiempo de forrajeo (Thompson and Popescu., 2021; Stoks et al., 2022), aunque pueden existir riesgos involucrados a la depredación y a la imposibilidad de completar el desarrollo, sobre todo en los individuos que se reproducen en estanques efímeros (Mann et al., 2009). En un mayor número de casos, la exposición a plaguicidas como factor de estrés, ocasiona un retraso en la metamorfosis de insectos y anfibios semiacuáticos (Stoks et al., 2022).

Los resultados obtenidos a bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de TIA en este estudio, difieren de los obtenidos previamente, en el que expusimos renacuajos de *R. arenarum* a altas concentraciones (mg/L) de TIA (Fonseca Peña et al., 2022). En las altas concentraciones, TIA no tuvo mayor efecto sobre el tiempo de metamorfosis en los organismos, y en cambio, se observó una disminución sistemática en la proporción de individuos que lograron finalizar el desarrollo metamórfico y, además, los metamorfos resultaron de menor tamaño. Es posible, que los efectos de TIA sobre el proceso metamórfico de los anuros en etapa larval dependa de la concentración. Por lo general, la exposición a altas concentraciones afecta principalmente la proporción de individuos que logran avanzar en el proceso metamórfico, mientras que las bajas concentraciones intervienen retrasando el proceso. Esto posiblemente explica, los resultados contradictorios existentes en la bibliografía científica en la que se han detallado retrasos, aceleraciones o ausencia de efecto, en el desarrollo metamórfico en anfibios, tras la exposición de NEO (Moe, 2017; Robinson et al., 2017; 2019; 2021; Boone, 2018; Jenkins et al., 2021; Danis y Marlatt, 2021; Thompson et al., 2022).

A pesar de las diferencias, la exposición de TIA a altas concentraciones (Fonseca Peña et al., 2022) y bajas (presente capítulo) presentan una similitud, en ambos casos, la afectación en el proceso metamórfico de *R. arenarum* ocurrió durante la transición de E39 a MET, lo que sugiere un efecto sobre la acción sinérgica de los ejes hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HPT) e hipotálamo-pituitario-adrenal/interrrenal (HPA/HPI) o hormonas del estrés. De hecho, los cambios morfológicos más abruptos en la metamorfosis de los anfibios ocurren durante la transición de los E39, E42 y MET, y, suceden bajo la regulación de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Thambirajah et al., 2019). En

consecuencia, los resultados de estos dos estudios evidencian que los insecticidas NEO posiblemente impactan el sistema hormonal tiroideo de *R. arenarum*. Así mismo, existe en la bibliografía científica otros reportes de que, durante el desarrollo metamórfico de anfibios, la exposición a NEO altera específicamente a las HT. Recientemente, Zhou et al., (2023) describió que en renacuajos de *Rana nigromaculata* expuestos a IMI (1,74 y 4,27 mg/L) se observó una supresión significativa en el desarrollo de los individuos en paralelo a una inhibición en la síntesis de las HT, T4 y T3. En otro caso, en larvas de la salamandra del noroeste *Ambystoma gracile* expuestas a 750 y 2250 µg/L de IMI, disminuyeron significativamente los niveles de expresión del ARNm del receptor β de la tiroides (TRβ) (Danis y Marlatt., 2021). También, en otros organismos vertebrados como peces, aves y mamíferos, se ha demostrado que los NEO alteran los niveles plasmáticos de TSH, T4 y T3 (Pandey y Mohanty 2015; Ibrahim et al., 2015; Mohanty et al., 2017; El Okle et al., 2016). Incluso, se ha reportado que esta clase de insecticidas produce daños morfológicos y alteran la transformación de T4 a T3 en la glándula tiroides en los reptiles (Wang et al., 2020).

Los resultados de este estudio son los primeros en evaluar el efecto de IMI en el desarrollo metamórfico de *R. arenarum*. IMI disminuyó significativamente la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis solo en el tratamiento más alto, lo que se asemeja a los efectos descritos en nuestro estudio previo con *R. arenarum* tras la exposición a altas concentraciones de TIA (Fonseca Peña et al., 2022). Esto pudo deberse, a que, en el capítulo actual, las concentraciones de exposición de IMI son tres veces mayores que las de TIA. De todos modos, los datos obtenidos en el presente capítulo demuestran que TIA puede afectar el desarrollo de los renacuajos a partir de concentraciones muchos menores (LOEC de 1,05 µg/L), en comparación con IMI, que no presentó ningún efecto en concentraciones de hasta 340 µg/L.

Los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazado y en rápido declive (Stuart et al., 2004; Roelants et al., 2007). Es preocupante que el aumento del tiempo necesario para que *R. arenarum* completara la metamorfosis ocurriera a partir de la concentración más baja probada de TIA (1,05µg/L), la cual se encuentra en el rango de las concentraciones reportadas en ambientes acuáticos naturales (Sánchez-Bayo et al., 2016; CDPR, 2019; Wang et al., 2022; Jayasiri et al., 2022). Es necesario seguir investigando los impactos de los NEO en el

desarrollo metamórfico de esta clase de organismos. En este caso, determinar la manera en que los retrasos de la metamorfosis pueden influir negativamente en la aptitud de las poblaciones de anfibios en la naturaleza, es importante determinar el impacto de las concentraciones ambientales en una gama más amplia de especies, con el fin de poder realizar una evaluación rigurosa del riesgo. Además, debe prestarse especial atención a la determinación de los posibles modos de acción de los NEO sobre los ejes HPT e HPA/HPI de los anfibios y otros animales, debido a que se sigue acumulando en la literatura pruebas de su accionar sobre estos sistemas, en especial el tiroideo.

5. CAPÍTULO 5. Efecto de dos insecticidas formulados con las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol sobre el desarrollo larval y metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*: acercamiento a un escenario natural de exposición.

5.1 INTRODUCCIÓN

Los insecticidas de la familia “Diamidas antranilicas” (DIA) actúan sobre los receptores de rianodina, interviniendo en la contracción muscular coordinada en los organismos blanco (Lahm et al., 2005). Esta clase de insecticidas se han presentado como una alternativa prometedora frente a los neonicotinoides y los piretroides (Schmidt-Jeffris y Nault., 2016). Debido a que son altamente selectivos por su modo de acción y presentan un bajo impacto en insectos beneficiosos (Larson et al., 2012; Larson et al., 2013; Hadiatullah et al., 2022). Aspectos relacionados con la química ambiental, indican que son altamente persistentes en el ambiente (EFSA., 2013) y que pueden ingresar a ambientes acuáticos por lixiviación y escorrentía (Vela et al., 2017; Pandey et al., 2020; Kumar et al., 2021). En cuerpos de agua superficiales se han encontrado concentraciones de DI

A que varían entre 0,0635 y 950 µg/L (Tabla 1).

Tabla 5.1. Concentraciones de los insecticidas con las diamidas antranilicas, clorantraniliprol y ciantraniliprol detectados en aguas superficiales.

Concentración µg/L	País	Referencia
<u>CLORANTRANILIPROLE</u>		
20 - 950	Sri Lanka	Jayasiri et al 2022
9,12	Unión Europea	EFSA 2013
4,47	EE.UU	CDPR 2019
1,35	China	Song et al 2019
0,98	EE.UU	Redman et al 2020
0,155	Canadá	Lalonde y Garron 2020
0,0635	Malasia	Elfikrie et al 2020

0,04	Indonesia	Utami et al 2020
0,012	China	Zhang et al 2012

CIANTRANILIPROL

12,5	Rusia	Kolupaeva et al 2019
2,6	Rusia	Kolupaeva et al 2019
2,8	China	Zhang et al 2013
0,1	Unión Europea	EFSA 2014

En organismos acuáticos como los peces, el efecto de clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) se ha estudiado. Las evaluaciones de exposición aguda indican que los insecticidas de esta familia no presentan valores de toxicidad alarmantes, de acuerdo, a las concentraciones letales 50 (CL50) obtenidas (Tabla 3.1 - capítulo 2), sin embargo, efectos por exposiciones subletales han sido reportadas. La exposición a CLO en especies como *Labeo rohita*, *Ctenopharyngodon idella*, *Channa punctuatus*, *Cyprinus carpio*, *Cirrhinus mrigala* y *Oreochromis niloticus* han provocado alteraciones bioquímicas a nivel enzimático y por estrés oxidativo (Jipsa and Logaswamy, 2013; Nagaraju et al., 2013; Rathnamma and Nagaraju, 2014; Nagaraju et al., 2017; Clasen et al., 2018; Pawar y Bhilave, 2019; 2020; 2021; Temiz et al., 2018). También, se ha evidenciado el potencial de bioacumulación de CLO en tejidos de branquias, hígado, cerebro y músculo en peces de las especies *Labeo rohita* y *Cyprinus carpio* (Nagaraju et al., 2016; Clasen et al., 2018). Alteraciones al nivel del sistema endocrino en *Rhamdia quelen* (Seben et al., 2021) y alteraciones en aspectos de locomoción en larvas de *Denio rario* tras la exposición a 1 mg/L de CLO por 24h (Hussain et al., 2020). En el caso de CIAN, larvas de tilapia *Oreochromis mossambicus* expuestas durante 28 días presentaron genotoxicidad a nivel hepático e inhibición del crecimiento (Xu et al., 2020). En anuros en etapa larval, hasta la fecha, solo hay dos estudios que reportan efectos subletales (Wei et al., 2021; Fonseca y Brodeur., 2023). En renacuajos de *Fejervarya limnocharis* y *Microhyla fissipes* expuestos durante 20 días a concentraciones de 1 y 2 mg/L de CLO, se encontró que el insecticida interviene en la supervivencia y en parámetros de crecimiento y desarrollo de los organismos (Wei et al., 2021).

En el capítulo 3 (Fonseca y Brodeur., 2023), se describió el primer estudio que evaluó el efecto de la diamida antranilica, CLO sobre la metamorfosis del sapo común, *Rhinella arenarum*, autóctono de la región pampeana argentina. El efecto más importante observado, fue la disminución en la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis y el requerimiento de menos tiempo para completar el desarrollo en las dos concentraciones más bajas trabajadas (20 – 40 mg/L) como respuesta a la relación dosis-respuesta no-monotónica en forma de “U” invertida, encontrada. En este contexto, y con el fin de acercarnos a un posible escenario natural, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de CLO y CIAN en concentraciones que incluyeron a las encontradas en la naturaleza sobre el desarrollo metamórfico de *R. arenarum*.

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1. Especie estudiada y organismos utilizados

Puestas de huevos de *Rhinella arenarum* fueron recolectadas durante la primavera del 2019 en diversos cuerpos de agua permanentes y temporarios presentes en las 650 hectáreas (34o36'24S, 58o39'56W) del Centro Nacional de Investigación Agrícola (CNIA), Hurlingham, Buenos Aires. La descripción detallada de la especie y el mantenimiento de los huevos y renacuajos se encuentran en las secciones 2.2.1 y 2.2.2, respectivamente, de materiales y métodos del Capítulo 2.

5.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo

Dos formulados comerciales de insecticidas de las DA fueron testeados: Coragen® y Fortenza® semillero. La descripción de los formulados comerciales y las características del agua utilizada en los ensayos, control y tratamiento, se encuentra descrito en la sección 2.2 de materiales y métodos del capítulo 3 y en la sección 2.2.3 de materiales y métodos del capítulo 2, respectivamente.

5.2.3 Soluciones de prueba

En el caso de CLO, se preparó una solución madre de 50 mg/L, diluyendo 500 µl del formulado en dos (2) litros de agua de ensayo. Mientras que, para CIAN, se preparó una

solución madre de 150 mg/L, diluyendo 500 µl del formulado en dos (2) litros de agua de ensayo. Las soluciones madres se prepararon y fueron conservadas a 4 °C durante 10 días, las mismas fueron utilizadas para al menos 5 recambios de soluciones. A partir de las soluciones madres, se realizaron las respectivas diluciones seriadas con el fin de obtener las diferentes concentraciones de prueba, el diluyente utilizado fue el agua de ensayo descrita anteriormente.

La concentración de CLO y CIAN presente en la respectiva solución madre fue determinada tal como fue descrito en la sección 2.3 de materiales y métodos del Capítulo 3.

5.2.4 Diseño Experimental

Renacuajos de *Rhinella arenarum* en estadio 27 (E27) (Gosner 1960) fueron expuestos a concentraciones individuales de 5, 50, 500 y 5000 µg/L de CLO y CIAN. Se dispuso de tres replicas por cada tratamiento, con seis individuos cada una. Cada unidad experimental consistió en dos placas de Petri de 10 cm de diámetro superpuestas que contenían 100 mL de solución experimental. Las soluciones de prueba fueron renovadas en su totalidad cada 48 horas. La temperatura y el fotoperiodo fueron mantenidos estables a 25 ± 2 °C y 16:8 h luz:oscuridad, durante todo el bioensayo. Un trozo de acelga hervida de aproximadamente 1 cm² fue añadido a las unidades experimentales luego de cada recambio de soluciones, como alimento ad libitum. Durante el recambio de soluciones (cada 48 h), fueron retirados los individuos muertos, se registró la supervivencia y estadio de desarrollo en el que se encontraban los renacuajos, según la clasificación Gosner (1960): 1) estadio 39 (E39), 2) estadio 42 (E42) y 3) finalización de la metamorfosis, estadio 46 (MET), descritos en la sección 2.2.5.4 de materiales y métodos del capítulo 2. Los individuos que completaron la metamorfosis fueron anestesiados en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222) y pesados por medio de una balanza digital Denver TP-214 con una precisión de 0.001 g. Se les examinó detalladamente en busca de malformaciones, y se les tomó una fotografía ventral y dorsal, con los brazos extendidos con el fin de medir la longitud hocico cloaca (LHC), después de realizado el procesamiento, los individuos fueron fijados en bouin, con el fin de poder ser utilizados en posteriores estudios. Asimismo, a partir de las fotografías tomadas se realizó la medición de la LHC mediante el uso del programa Imagej desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés) (Schneider et al 2012).

5.2.5. Análisis estadísticos

El impacto de CLO y CIAN sobre la proporción de individuos que logran avanzar en el desarrollo metamórfico y el tiempo que necesitan para hacerlo, fueron analizados según los métodos previamente descritos por Brodeur et al. (2009; 2013). Para cada tratamiento, así como para los controles se ajustó, con el programa GraphPad Prism Versión 5.03, una ecuación de regresión logística de cuatro parámetros a la variable “número acumulado de individuos que alcanzaron E39, E42, y a los que completaban la MET”. Además, para cada curva de ajuste se calculó el tiempo para que el 50% de los individuos alcancen T39 (T50-E39), T42 (T50-E42), o MET (T50-MET). Las proporciones de renacuajos que alcanzaron los diferentes estadios durante el proceso de metamorfosis (E39, E42 y MET) en los distintos tratamientos, los valores de T50-E39, T50-E42, T50-MET, y el peso promedio y la LHC de los individuos recién metamorfoseados, fueron comparados con el grupo control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples, luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedácea de los datos. Todos los análisis de ANOVA y comparaciones múltiples se realizaron mediante el uso del software SigmaStat 12.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Concentración de plaguicidas en las soluciones madres

La concentración analítica de CLO determinada en la solución madre fue de $61,41 \pm 3,5$ mg/L (N = 2), lo que representa el 122,82 % del valor nominal. Como el valor obtenido es cercano al valor nominal, se usaron las concentraciones nominales para los distintos cálculos y análisis. También se usaron los valores nominales para CIAN, ya que no se pudo verificar las concentraciones analíticamente, por la falta de estándares disponibles.

5.3.2. Efecto de un formulado con clorantraniliprol sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

5.3.2.1. Tiempos de metamorfosis.

Las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta el E39 (patas posteriores completas) se ilustra en la Figura 5.1. Todos los individuos del grupo control y los expuestos a los tratamientos con CLO alcanzaron E39 (Tabla 5.2). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el tiempo que requirieron para lograrlo (T50-E39). A pesar de que la mayoría de los tratamientos iniciaron antes que el control la llegada al estadio, solo los renacuajos expuestos a la concentración 5000 $\mu\text{g/L}$ lo hicieron en un tiempo significativamente menor al del grupo control, mientras que, los tratamientos restantes (5, 50 y 500 $\mu\text{g/L}$), registraron un T50-E39 significativamente mayor al del grupo control, debido a que registraron una tasa de transformación significativamente menor (Figura 5.1 vs Tabla 5.2).

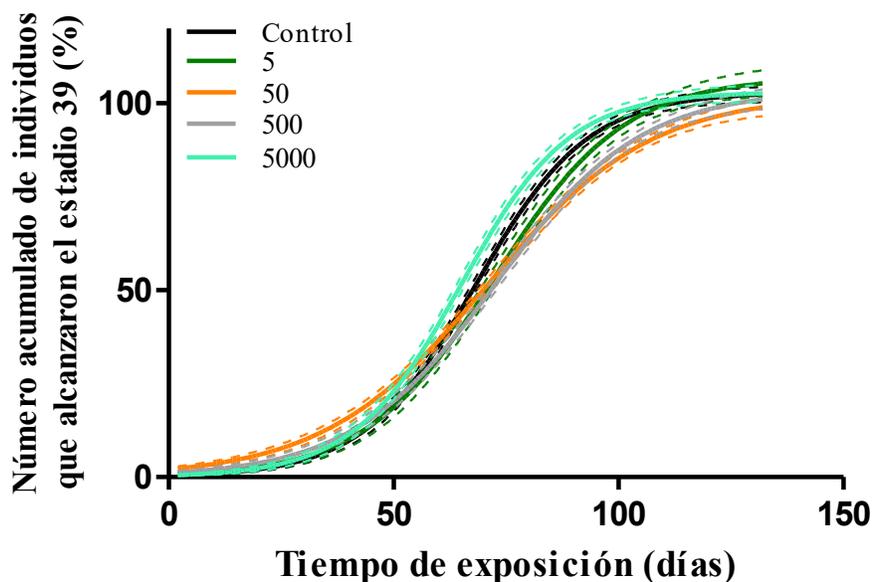


Figura 5.1. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 39 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.2. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de clorantraniliprol alcancen el estadio 39 (T50–E39), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E39 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	68,26±0,60	0,03±0,001	100±1,01
5 µg/L	*72,47±1,09	*0,03±0,001	100±2,02
50 µg/L	*70,67±0,98	*0,02±0,0009	100±1,57
500 µg/L	*72,73±0,97	*0,02±0,001	100±1,66
5000 µg/L	*65,04±0,64	0,03±0,001	100±1,18

En el avance, las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta E42 (cuatro patas completas) se ilustra en la Figura 5.2. Un número significativamente menor de individuos expuestos a 50, 500 y 5000 µg/L de CLO, alcanzaron el E42, mientras que la proporción de individuos que alcanzaron el estadio fue superior al 90% en el grupo control y en el tratamiento a 5 µg/L (Tabla 5.3 y Figura 5.3). Además, se encontró una respuesta no-monotónica en los valores correspondientes al T50-E42 (Tabla 5.3), en ese sentido, los individuos expuestos al tratamiento de exposición 5 µg/L requirieron significativamente más días para alcanzar el estadio, mientras que los individuos de los tratamientos a 50 y 500 µg/L requirieron de un tiempo significativamente menor (Tabla 5.3 y Figura 5.4), y, en el caso de los individuos del tratamiento a 5000 µg/L, el valor T50-E42 que registraron, no presentó diferencias significativas con el grupo control. Es interesante destacar que, estos valores no estuvieron relacionados a las tasas de transformación.

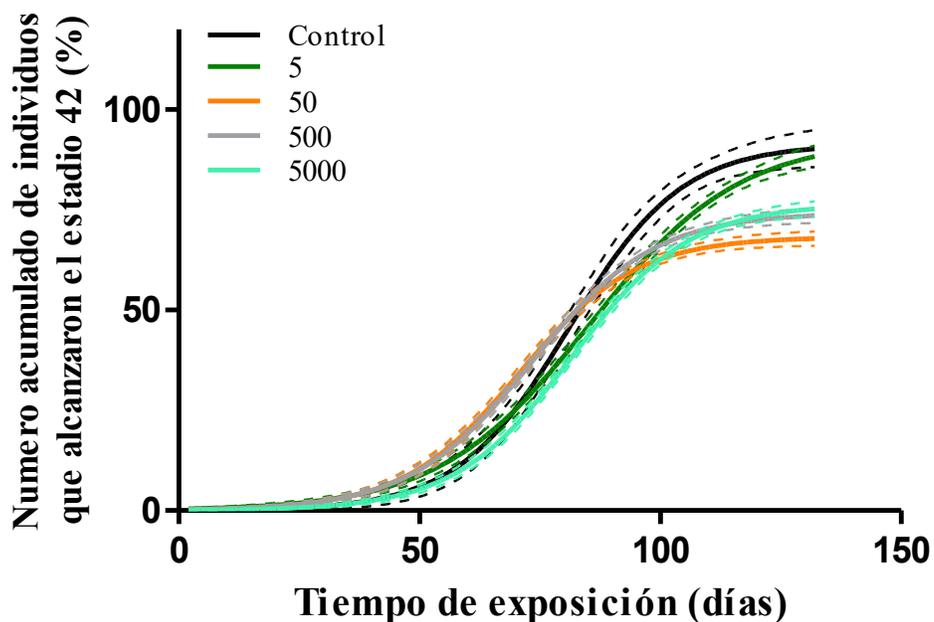


Figura 5.2. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 42 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 µg/L de clorantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.3. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con clorantraniliprol alcancen el estadio 42 (T50-E42), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E42. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

	T50 – E42 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	81,11±1,38	0,03±0,003	91,38±2,76
5 µg/L	*85,26±1,16	0,02±0,001	92,71±2,19
50 µg/L	*70,61±0,75	0,03±0,001	*68,27±0,98
500 µg/L	*73,35±0,73	0,03±0,001	*74,28±1,04
5000 µg/L	81,55±0,68	0,03±0,001	*76,44±1,13

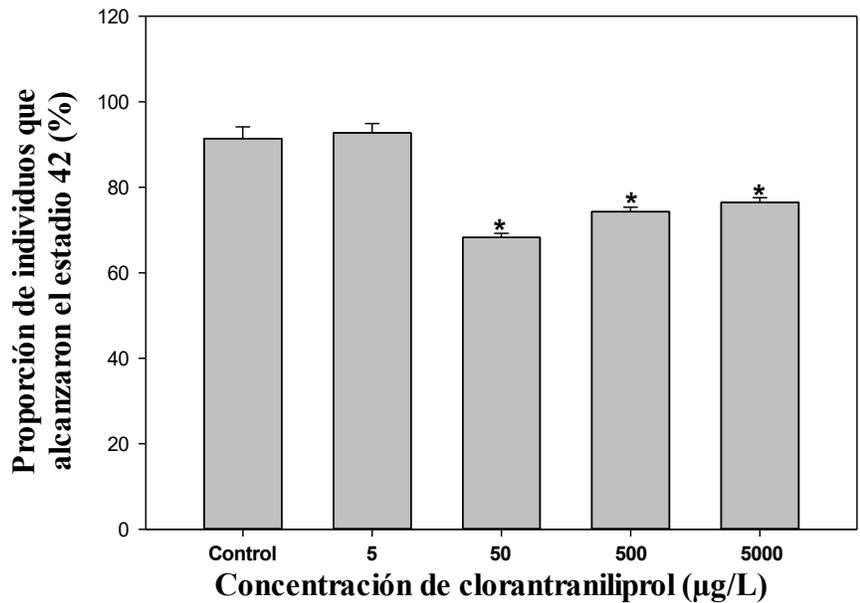


Figura 5.3. Proporción de individuos expuestos a clorraniliprol que alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

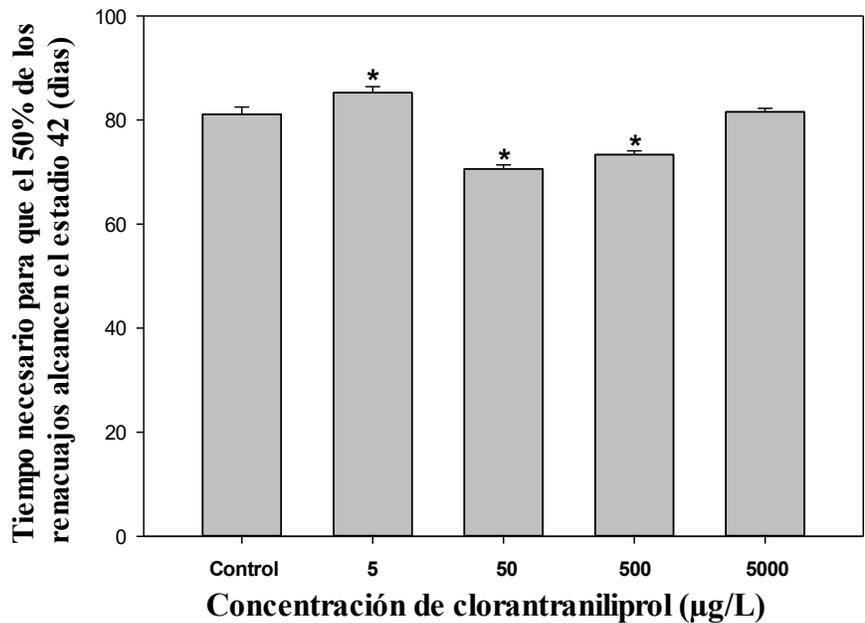


Figura 5.4. Tiempo en el que el 50% de los individuos expuestos a clorraniliprol alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

Finalmente, las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta su finalización MET (absorción completa de la cola) se ilustra en la Figura 5.5. Igual a lo ocurrido en E42, un número significativamente menor de individuos expuestos a los tratamientos 50, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de CLO lograron finalizar el desarrollo metamórfico (Tabla 5.4). En general, se mantuvieron las proporciones de individuos entre el E42 y MET, tanto en el grupo control como en los tratamientos de exposición a CLO, es decir, que más del 90% de los renacuajos del grupo control y los expuestos al tratamiento 5 $\mu\text{g/L}$ llegaron a MET (Tabla 5.4). Por otra parte, la respuesta no-monotónica descrita en los valores de T50-E42, se reportó de la misma manera en los valores correspondientes al T50-MET (Tabla 5.4). En este caso, el requerimiento de un tiempo (T50-MET) significativamente mayor en el tratamiento a 5 $\mu\text{g/L}$, se relacionó al registro de una tasa de transformación significativamente menor (Tabla 5.4).

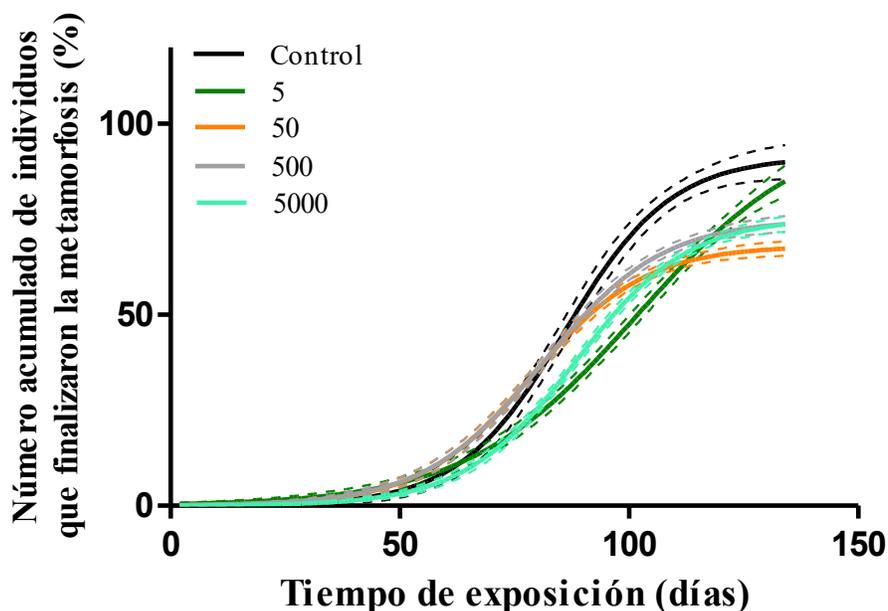


Figura 5.5. Número acumulativo de individuos que finalizaron la metamorfosis a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.4. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con clorantraniliprol finalicen la metamorfosis (T50-MET), tasa de transformación y porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – MET (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	86±1,33	0,03±0,003	91,42±2,76
5 µg/L	*102±2,87	*0,02±0,001	92±4,62
50 µg/L	*78,79±0,79	0,03±0,001	*68,12±1,10
500 µg/L	*81,27±0,84	0,03±0,001	*74±1,25
5000 µg/L	88,35±0,75	0,03±0,001	*75,49±1,29

5.3.2.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.

El peso promedio y la longitud hocico cloaca (LHC) de los individuos que finalizaron la metamorfosis se puede ver en las Figuras 5.6 y 5.7. En términos generales y de acuerdo a los valores obtenidos, no se encontraron diferencias significativas entre el peso promedio y la LHC de los metamorfos expuestos a CLO y los del grupo control.

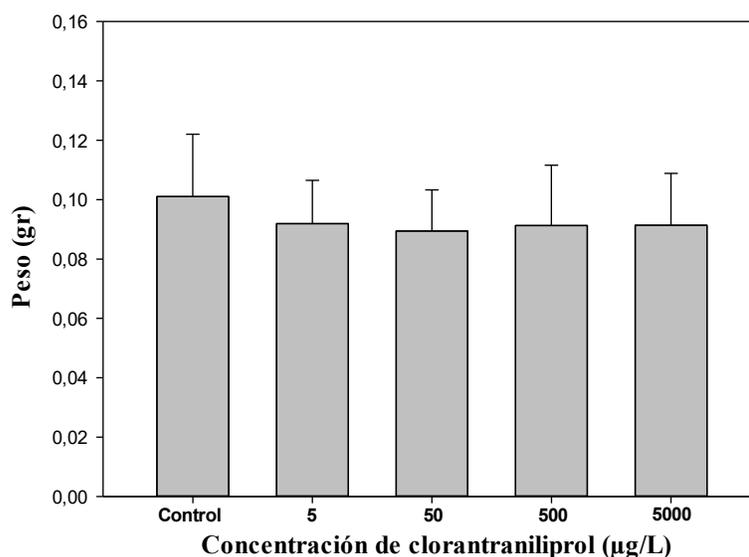


Figura 5.6. Peso promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con clorantraniliprol (P<0.05).

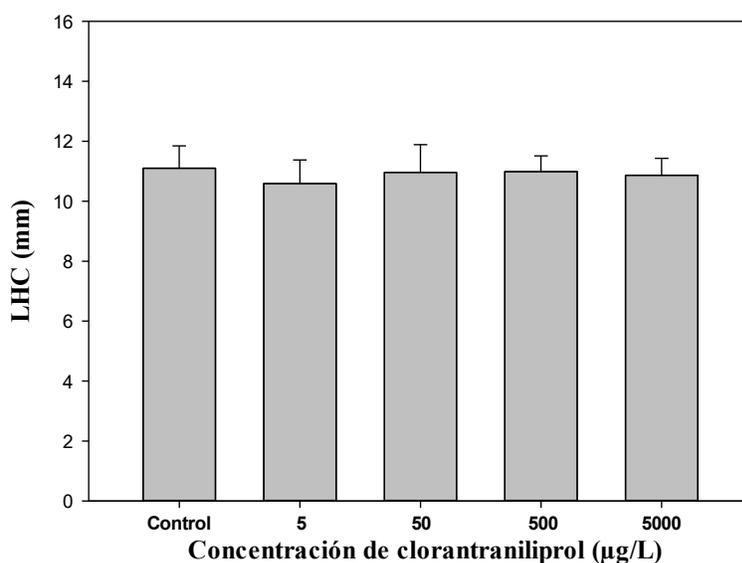


Figura 5.7. Longitud hocico cloaca promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con clorantraniliprol. ($P < 0.05$).

5.3.3. Efecto de un formulado con ciantraniliprol sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*

5.3.3.1. Tiempos de metamorfosis

Las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta el E39 (patas posteriores completas) se ilustra en la figura 5.8. Todos los individuos del grupo control y los expuestos a los tratamientos con CIAN alcanzaron el estadio (Tabla 5.5). Los valores correspondientes al T50-E39 mostraron una respuesta no-monotónica. En general, los individuos expuestos a los tratamientos 5, 500 y 5000 µg/L de CIAN registraron valores significativamente menores en comparación al grupo control, a diferencia de los individuos expuestos al tratamiento 50 µg/L de CIAN que registraron un T50-E39 significativamente mayor (Tabla 5.5). En el caso de los tratamientos a 5 y 5000 µg/L los valores obtenidos se relacionaron con el inicio temprano hacia el estadio y a la mayor tasa de transformación registrada, respectivamente (Figura 5.8 vs Tabla 5.5).

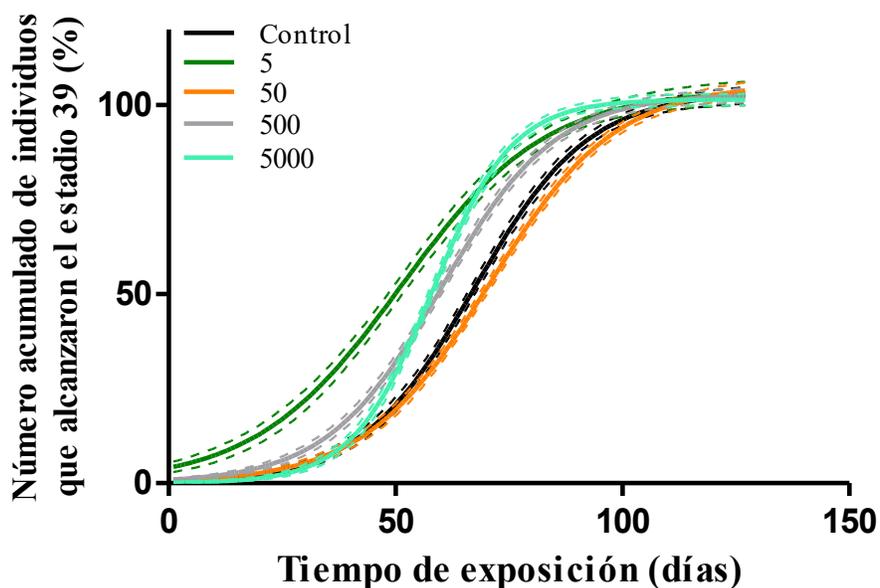


Figura 5.8. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 39 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 µg/L de ciantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.5. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado de ciantraniliprol alcancen el estadio 39 (T50–E39), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E39. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – E39 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	67,41±0,63	0,03±0,001	100±1,20
5 µg/L	*51,11±1,11	*0,02±0,001	100±1,69
50 µg/L	*70,76±0,64	0,03±0,001	100±1,33
500 µg/L	*60±0,55	0,03±0,001	100±1,02
5000 µg/L	*58,08±0,40	*0,04±0,001	100±0,79

En el avance, las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta E42 (cuatro patas completas) se ilustra en la Figura 5.9. La proporción de individuos que alcanzaron el E42 fue significativamente menor en los tratamientos de exposición a 50, 500 y 5000 µg/L de CIAN, mientras que la proporción de individuos que alcanzaron el estadio fue superior al 90% en el grupo control y en el tratamiento a 5 µg/L (Tabla 5.6 y Figura 5.10).

Así mismo, la respuesta no-monotónica descrita en los valores correspondientes al T50-E39, se reportó de la misma manera en los valores correspondientes al T50-E42 (Tabla 5.6 y Figura 5.11). De esta forma, los tratamientos de exposición a 5, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de CIAN registraron un T50-E42 significativamente menor en comparación con el grupo control, a diferencia del tratamiento a 50 $\mu\text{g/L}$ de CIAN que registró un T50-E42 significativamente mayor (Figura 5.11). Por otra parte, igual a lo descrito en E39, el inicio temprano hacia el estadio en el tratamiento de exposición a 5 $\mu\text{g/L}$ de CIAN, compensó el registro de la tasa de transformación significativamente menor (Figura 5.9 vs Tabla 5.6).

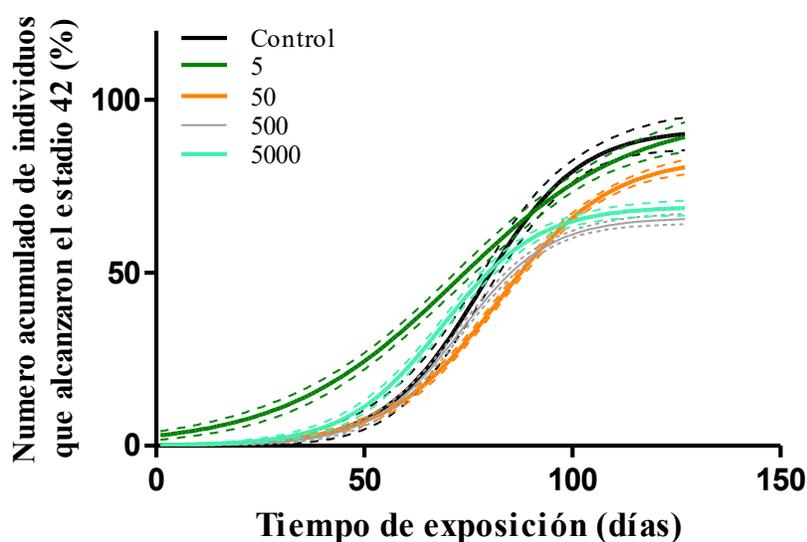


Figura 5.9. Número acumulativo de individuos que alcanzaron el estadio 42 a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de ciantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.6. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con ciantraniliprol alcancen el estadio 42 (T50-E42), tasa de transformación y porcentaje de individuos que alcanzaron el E42. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

	T50 – E42 (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	78,18±1,43	0,03±0,003	91,57±2,93
5 $\mu\text{g/L}$	*72,25±2,49	*0,02±0,001	95,67±3,89
50 $\mu\text{g/L}$	*82,15±0,80	0,03±0,001	*83,46±1,50
500 $\mu\text{g/L}$	*73,07±0,57	0,04±0,001	*65,95±0,82
5000 $\mu\text{g/L}$	*68,71±0,85	0,03±0,002	*69,17±1,17

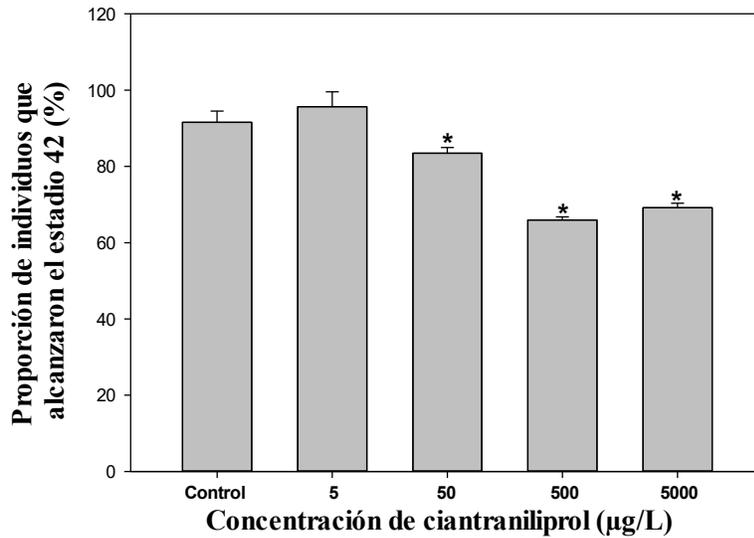


Figura 5.10. Proportión de individuos expuestos a ciantraniliprol que alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

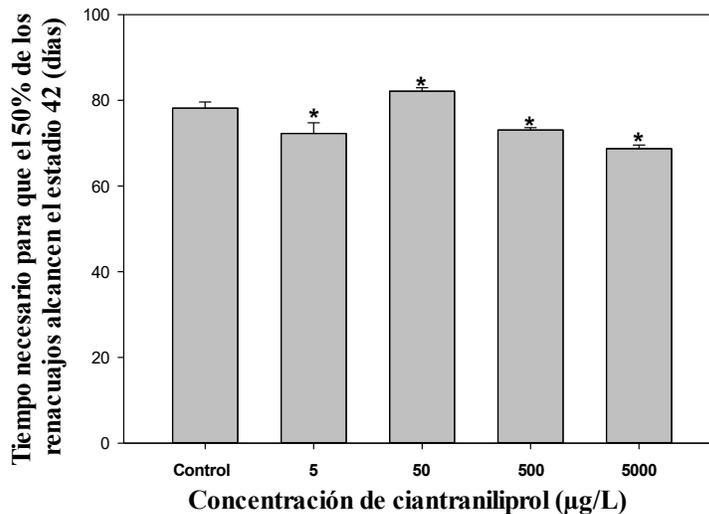


Figura 5.11. Tiempo en el que el 50% de los individuos expuestos a ciantraniliprol alcanzaron el estadio 42. Las columnas con * presentaron diferencias significativas con el grupo control.

Finalmente, las curvas que describen la progresión de la metamorfosis hasta su finalización MET (absorción completa de la cola) se ilustra en la Figura 5.12. Solo los tratamientos de exposición a 500 y 5000 µg/L de CIAN mantuvieron la disminución significativa en la proporción de individuos que lograron finalizar el desarrollo metamórfico

(Tabla 5.7). En promedio, más del 80% de los renacuajos alcanzaron a MET en el grupo control y en los grupos de exposición a 5 y 50 $\mu\text{g/L}$. Así mismo, la respuesta no-monotónica descrita en los valores correspondientes al T50-E39 y T50-E42, no se observó en esta instancia del desarrollo. En general, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del T50-MET registrados en los tratamientos de exposición y el grupo control, a excepción del tratamiento 5000 $\mu\text{g/L}$ que fue el único en registrar un T50-MET significativamente menor (Tabla 5.7). Por otra parte, curiosamente el inicio temprano hacia los estadios registrados (E39, E42 y MET) en el tratamiento a 5 $\mu\text{g/L}$, compensó el registro de las tasas de transformación significativamente menores a lo largo de los estadios, y que, en este caso, resultó ser mucho menor que las anteriores (Figura 5.12 vs Tabla 5.7).

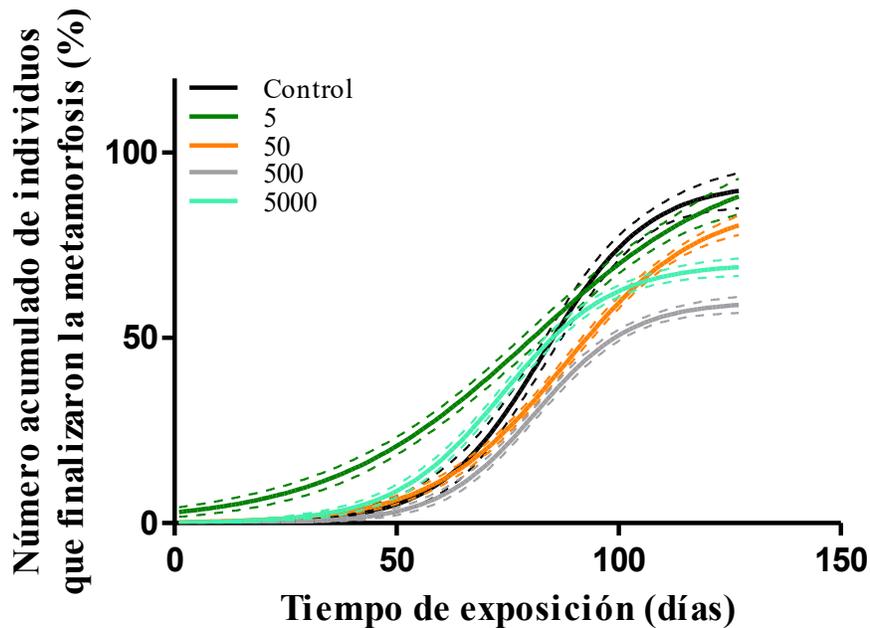


Figura 5.12. Número acumulativo de individuos que finalizaron la metamorfosis a lo largo del tiempo en renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de ciantraniliprol. Las líneas representan la curva sigmoidea calculadas para cada tratamiento.

Tabla 5.7. Tiempo para que el 50% de los renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a distintas concentraciones de un formulado con ciantraniliprol finalicen la metamorfosis (T50-MET), tasa de transformación y porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis. los datos de las columnas sombreadas y con * presentaron diferencias significativas respecto al control (P<0,05).

	T50 – MET (días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	83,13±1,43	0,03±0,003	91,78±3,15
5 µg/L	80,45±3,62	*0,01±0,001	95±5,05
50 µg/L	88,09±1,19	0,02±0,001	83±2,09
500 µg/L	81,36±0,90	0,04±0,002	*59,76±1,30
5000 µg/L	*73,90±0,95	0,03±0,002	*69,98±1,39

5.3.3.2. Peso y longitud hocico cloaca de los individuos recién metamorfoseados.

El peso promedio y la longitud hocico cloaca (LHC) de los individuos que finalizaron la metamorfosis se puede ver en las figuras 5.13 y 5.14. En términos generales y de acuerdo a los valores obtenidos, no se encontraron diferencias significativas entre el peso promedio y la LHC de los metamorfos expuestos a CIAN y los del grupo control.

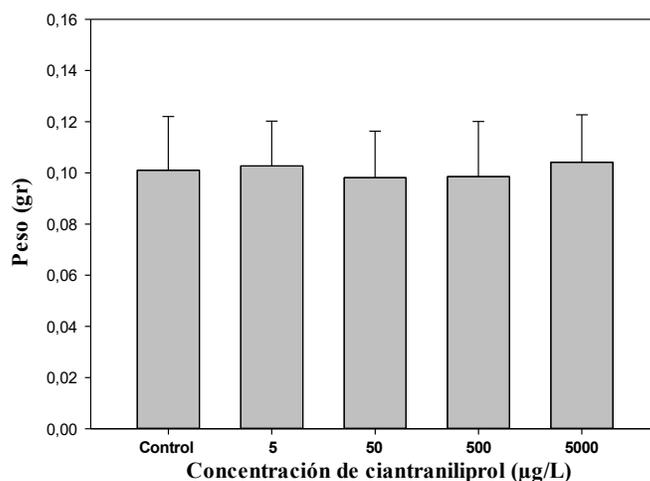


Figura 5.13. Peso promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con ciantraniliprol (P<0.05).

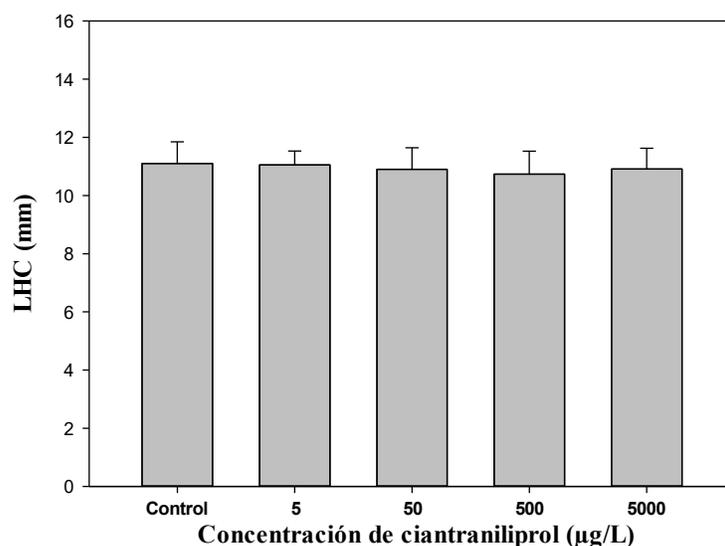


Figura 5.14. Longitud hocico cloaca promedio de los individuos de *Rhinella arenarum* que finalizaron el proceso de metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a concentraciones de un formulado con clorantraniliprol. ($P < 0.05$).

5.4. DISCUSIÓN

Renacuajos de *Rhinella arenarum* (E27) fueron expuestos a concentraciones relevantes para el medio ambiente de CLO y CIA a lo largo de su desarrollo metamórfico, con el fin de poder estimar los posibles impactos de los insecticidas de las diamidas antranilicas presentes en cuerpos de agua naturales en el desarrollo de los anfibios. Ambos insecticidas causaron una disminución significativa en la proporción de individuos que lograron completar su desarrollo (MET) y una relación dosis-respuesta no-monotónica (RDRNM) en el tiempo requerido para el avance del desarrollo, a partir de la progresión de E39 al E42 a excepción de CIAN que registró la relación no-monotónica desde más temprano, hacia la llegada a E39. La disminución de la proporción de individuos que alcanzaron a MET ocurrió en un mayor número de tratamientos con CLO y la respuesta no-monotónica se mantuvo hasta el final del proceso metamórfico solo en la exposición con ese mismo insecticida. El tamaño del cuerpo y el peso de los metamorfos no se vieron afectados por la exposición a las concentraciones probadas de CLO y CIAN.

La abundancia de anfibios en un escenario de exposición a contaminantes ambientales durante la metamorfosis puede determinar dinámicas de la etapa adulta o terrestre de las especies (Wesner et al., 2020). A partir de monitoreos, ensayos de exposición y meta-análisis, se ha podido conocer que los plaguicidas están involucrados en la disminución global de los anfibios, principalmente por los efectos que tienen en los organismos en etapa larval (Sparling y Fellers., 2009; Baker et al., 2013; Figueiredo y Rodrigues., 2014). Siendo los cambios poblacionales y la alteración de las funciones ecológicas, las principales consecuencias en las comunidades naturales (Relyea y Diecks., 2008; Hayes et al., 2010; Köhler y Triebkorn., 2013; Agostini et al., 2020). A pesar de la limitada información sobre los efectos de las diamidas antranílicas en anfibios, este trabajo es el primero en reportar que concentraciones ambientales de CLO (50 µg/L) (Jayasiri et al., 2022), insecticida recientemente detectado en aguas agrícolas de la región pampeana argentina (Brodeur et al., comunicación personal), disminuye la proporción de individuos que logran finalizar la metamorfosis en *R. arenarum*, efecto que ya fue reportado en exposiciones a altas concentraciones de CLO (Fonseca y Brodeur., 2023).

Las exposiciones a bajas (µg/L) y altas (mg/L) concentraciones de CLO que causaron una disminución significativa en la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis en *R. arenarum* (Presente capítulo; Fonseca y Brodeur., 2023), presentaron otra similitud, en ambos casos, se observó una RDRNM en el tiempo que requirieron los individuos para avanzar en el desarrollo, efecto que también se observó a bajas concentraciones de CIAN. Aunque en los tres casos las RDRNM se distinguieron, el reporte de este efecto, da indicios de que CLO y CIAN podrían estar asociados a alteraciones endocrinas (Hill et al., 2018), las cuales según investigaciones recientes pueden estar mediadas por vías celulares o moleculares (Calabrese et al., 2013; Shi et al., 2016; Greenwood et al., 2022), e incluso, hay evidencia de que esta respuesta o estímulo podría deberse a un condicionamiento previo que se transmite generacionalmente, catalogado recientemente como “transhormesis” (Constantini., 2022). En este caso, es conveniente aumentar las concentraciones de exposición con CLO en el rango de 500 y 5000 µg/L con el fin de poder distinguir si la RDRNM se mantiene, teniendo en cuenta que la concentración 5000 µg/L durante E42 y MET no se diferenció con el grupo control.

El retraso o la aceleración en la metamorfosis en anfibios causado por la exposición a plaguicidas, se ha descrito como adaptaciones estratégicas que en el primer caso se evita tener individuos juveniles de menor tamaño y en el segundo, se evita estar mayor tiempo en un ambiente desfavorable o contaminado (Stoks et al., 2022). En uno de nuestros trabajos más recientes observamos que tras la exposición a concentraciones ambientales del neonicotinoide tiametoxam se retrasó el desarrollo metamórfico de *R. arenarum*, sin llegar a alterarse la proporción de individuos que finalizan la metamorfosis y tamaño y peso de los individuos juveniles (Brodeur y Fonseca., 2023). En este caso, a pesar de que las exposiciones de CLO y CIAN no afectaron el peso ni el tamaño de los metamorfos, la RDRNM de CLO permitió observar que los renacuajos expuestos a la concentración más baja (5µg/L) requirieron más tiempo para alcanzar E42 y MET, lo que le significó ser el único tratamiento en el que no se disminuyó la proporción de individuos que finalizaron la metamorfosis, es decir, que la disminución observada en los demás tratamientos puede relacionarse a la aceleración descrita (Tabla 5.3 y Tabla 5.4), a excepción del tratamiento 5000 µg/L que ante la ausencia de efecto en el tiempo de desarrollo, se le atribuye a la concentración, la disminución significativa en la proporción de individuos que finalizaron la metamorfosis, de hecho, en trabajos anteriores, la exposición a concentraciones similares se ha relacionado con la disminución en la supervivencia y proporción de individuos que lograron completar el desarrollo metamórfico en anuros (Wei et al., 2021; Fonseca y Brodeur., 2023).

En general, igual que lo discutido en el capítulo 3, los efectos descritos sugieren que la exposición a bajas concentraciones de CLO y CIAN en *R. arenarum* intervinieron en la acción sinérgica de los ejes hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) e hipotálamo-hipófisis-adrenal/interrenal (HPA/HPI) ó hormonas del estrés, quienes son los encargados de regular el desarrollo metamórfico en anfibios (Rousseau et al., 2021; Paul et al., 2022). Numerosos estudios detallan que la metamorfosis ocurre durante la transición de E39 al E42 (Gosner., 1960), bajo la producción y acción coordinada de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Navarro-Martín et al., 2012; Thambirajah et al., 2019). La función correcta de las HT inicia con el factor liberador de corticoprina (CRF) una hormona del estrés que regula y activa a la tirotrópina pituitaria (TSH) quien finalmente es la hormona encargada

de controlar y estimular directamente a las HT (CRF) (Denver., 2021). De manera que el eje HPA/HPI puede regular el inicio y la tasa general de la metamorfosis (Rousseau et al., 2021; Paul et al., 2022).

Factores como la exposición a plaguicidas pueden alterar el desarrollo de anfibios, interviniendo por múltiples vías en la función normal de los ejes HPT e HPA/HPI (Trudeau et al., 2020). Hasta la fecha ningún estudio abordó el posible efecto de las diamidas antranílicas sobre la función de los ejes HPT e HPA/HPI en anfibios, sin embargo, algunos evaluaron el posible efecto de esta clase de insecticidas en la función del eje HPT en vertebrados. Los registros disponibles indican que la exposición a los insecticidas flubendamina y CIA pueden generar afectaciones histológicas leves como hipertrofia en la glándula tiroidea en mamíferos (EFSA et al., 2019) y que la exposición de CLO en ratas, puede disminuir significativamente los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas T3 y T4 (Hassan et al 2021).

Uno de los principales factores que contribuye al declive mundial de anfibios, es la presencia de plaguicidas en ambientes acuáticos (Sparling y Fellers 2009, Bishop et al., 2012). Sin embargo, el conocimiento sobre los efectos de nuevos plaguicidas es muy limitado, este es el caso de los insecticidas de las diamidas antranílicas. Los resultados obtenidos en el presente estudio son un primer aporte que indican la necesidad de seguir investigando los impactos de esta nueva clase de insecticidas sobre el desarrollo metamórfico en anfibios. En este caso, sería relevante poder estimar el alcance que puede tener la disminución de la proporción de individuos que logran completar el desarrollo metamórfico y la forma en que la RDRNM obtenida en el tiempo de desarrollo, pueden llegar a influir directamente en las poblaciones naturales. Es urgente poder conocer el impacto que pueden tener las concentraciones más críticas en otras especies y así, poder realizar una efectiva evaluación del riesgo. Hasta el momento se cuenta con dos reportes que dan indicios de una posible alteración endocrina y afectación de la acción sinérgica de los ejes HPT y HPA/HPI en renacuajos por parte de las diamidas antranílicas (Fonseca y Brodeur., 2023, presente capítulo), es importante conocer si el efecto se encuentra con otras especies y poder examinar los posibles mecanismos en los anfibios y otros animales.

6. CAPITULO 6: Efecto de los insecticidas neonicotinoides, tiametoxam e imidacloprid y la diamida antranílica, clorantraniliprol en la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum* en sus exposiciones individuales y mezclas binarias

6.1 INTRODUCCIÓN

En cuerpos de aguas superficiales se encuentran complejas mezclas de plaguicidas que comúnmente incluyen herbicidas, insecticidas y fungicidas (De Souza et al., 2020). Debido al gran número de posibles combinaciones que pueden darse y a las dificultades en la estimación de efectos sobre la biota, se han desarrollado modelos que tienen como objetivo poder caracterizar los plaguicidas con mayor potencial de toxicidad para las especies (Nowell et al., 2018; Munaron et al., 2023) y otros que buscan poder predecir la toxicidad e interacción de las mezclas. Desde un punto de vista teórico, las sustancias químicas en mezclas pueden interactuar de tres formas: adición, sinergia o antagonismo. La adición de efectos es característica de sustancias que presentan el mismo modo de acción y el efecto de la mezcla puede, en teoría, estimarse por adición por dosis o concentración. Por otro lado, cuando las sustancias presentes en la mezcla presentan diferentes modos de acción es más difícil estimar su efecto final, ya que puede resultar en adición, sinergia o antagonismo (Hernández et al., 2017). Por lo general, la interacción de los plaguicidas en ambientes acuáticos está influenciado por las concentraciones, tiempo de exposición y el organismo en particular (Maloney et al., 2017; Liu., 2018; Freitas et al., 2022). Los dos primeros, suelen ser variables, por el régimen climático estacional (Munaron et al., 2023) y la persistencia diferencial de los plaguicidas en la mezcla (Rico et al., 2018).

Los neonicotinoides (NEO) y las diamidas antranílicas (DIA), son dos familias de insecticidas muy utilizadas en la Argentina (CASAFE 2022), se caracterizan por ser altamente solubles y móviles en el agua (EFSA., 2013; Morrissey et al., 2015), por lo que es frecuente su detección en aguas superficiales (Borsuah et al., 2020; Jayasiri et al., 2022; Egan et al., 2023; Peluso et al., 2022). Los NEO, actúan sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina en organismos blancos, generándoles un trastorno nervioso que le puede causar parálisis o la muerte (Mullins 1993, Maienfisch 2001). Mientras que las DIA, actúan sobre los receptores de rianodina, los cuales intervienen en la contracción muscular coordinada

(Lahm et al 2005). Los organismos afectados pueden presentar interrupción de la alimentación, letargo, parálisis y muerte (Lahm et al 2005). En organismos acuáticos, el efecto de la mezcla de estas dos familias ha sido poco estudiada, hasta el momento se cuenta con dos registros que reportaron una interacción sinérgica entre los insecticidas (Stinson et al., 2022; Egan et al., 2023). En cambio, se cuenta con un mayor número de estudios sobre los efectos de las mezclas de NEO en organismos como los invertebrados acuáticos. Por ejemplo, en *Daphnia magna* se han denotado interacciones sinérgicas y antagónicas (Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011), mientras que, en *Chironomus dilutus* se han reportado respuestas aditivas e incluso interacciones sinérgicas que dependen de la concentración de exposición a los insecticidas NEO (Maloney et al., 2017; Rico et al., 2018; Maloney et al., 2018; Schmidt et al., 2022).

Efectos de la mezcla de NEO y/o DIA en anuros en etapa larval no ha sido estudiado, sin embargo, hay registro de exposiciones en mezcla que incluyeron un NEO y una DIA, respectivamente (Uçkun et al., 2021; Wei et al., 2021). En trabajos previos, reportamos los efectos individuales de los NEO, tiametoxam (TIA) e imidacloprid (IMI) y las DIA, clorraniliprol (CLO) y ciantraniliprol, en un rango de concentraciones que incluyeron las reportadas en la naturaleza, sobre el proceso metamórfico del sapo común *Rhinella arenarum*, especie autóctona de la región pampeana Argentina. Los efectos más importantes observados fue el retraso del proceso metamórfico tras la exposición al NEO, TIA y la disminución significativa de individuos que lograron finalizar el proceso metamórfico tras la exposición a las DIA, CLO y CIAN (Brodeur y Fonseca 2023; Capítulo 5). En este contexto y con el fin de seguir acercándonos a un posible escenario natural, el objetivo del presente trabajo consistió en generar los primeros registros en la evaluación del efecto de las mezclas binarias de dos insecticidas con igual modo de acción, los NEO, TIA e IMI, moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina y el insecticida CLO, modulador del receptor de la rianodina, perteneciente a la familia de las DIA, sobre el desarrollo metamórfico del sapo común *R. arenarum*.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Especie estudiada y organismos utilizados

El sapo común *Rhinella arenarum* fue la especie estudiada. En la sección 2.2.1 de materiales y métodos del capítulo 2, se encuentra en detalle la descripción de la especie.

Puestas de huevos de *Rhinella arenarum* fueron recolectadas durante la primavera en diversos cuerpos de agua permanentes y temporarios ubicados en zonas libres de aplicación de plaguicidas a las afueras de la ciudad de La Plata, Buenos Aires. Todos los huevos fueron recolectados dentro de las primeras 24 horas de haber sido puestas y llevadas enseguida al laboratorio, donde fueron mantenidos en una habitación climatizada a 23 ± 2 °C y con un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad. En total, los huevos de cuatro (4) puestas fueron combinados. Una vez los renacuajos alcanzaron el estadio 24-25 (E 24-25) (Gosner 1960) momento en el cual empiezan a alimentarse, se les ofreció acelga hervida de manera ad libitum. Los renacuajos fueron mantenidos en estas condiciones hasta alcanzar el estadio 35 (E35) (Gosner 1960).

6.2.2. Sustancias testeadas y agua de ensayo

Tres formulados comerciales de insecticidas fueron testeados: Actara® y Confidor®, que contienen los NEO, TIA e IMI respectivamente, y, Coragen® que contiene la DIA, CLO. La descripción de los formulados comerciales se encuentra, en la sección 2.2.4 del capítulo 2, en el caso de los NEO y en la sección 3.2.2 del capítulo 3 en el caso de la DIA. Así mismo, en la sección 2.2.3 del capítulo 2, se encuentra descrito las características físico-químicas del agua de pozo utilizada en los bioensayos.

6.2.3 Soluciones de prueba

Con cada insecticida se preparó una solución madre (SM) de 50 mg/L y a partir de esta se realizó la respectiva dilución hasta obtener la concentración de prueba que correspondía a (50 µg/L) para los tres insecticidas. En el caso de TIA, se preparó una SM de 50 mg/L, diluyendo 200 miligramos del formulado sólido en un litro de agua de ensayo previamente equilibrada a pH 7 con ácido clorhídrico, cada SM alcanzaba para realizar al menos cinco (5) recambios de soluciones de exposición y se conservaba en la oscuridad a 4 °C entre los recambios por un máximo de 10 días. En el caso de CLO e IMI, se preparó una

SM para cada insecticida de 50 mg/L, diluyendo 500 µl del respectivo formulado en dos (2) litros de agua de ensayo, cada SM alcanzaba para realizar al menos siete (7) recambios de soluciones de exposición y se conservaba en la oscuridad a 4 °C entre los recambios por un máximo de 14 días.

La concentración de los NEO y de la DIA presentes en la respectivas SM fue determinada por cromatografía líquida acoplada a un detector de masa, descrito en la sección 2.2.6 y 3.2.3 de los capítulos 2 y 3, respectivamente

6.2.4 Diseño experimental

Renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum* en estadio 35 (E35) según la clasificación Gosner (1960), fueron expuestos a la concentración nominal de 50 µg/L de TIA, IMI y CLO respectivamente, y a la concentración nominal de 25 µg/L, correspondientes, a las mezclas binarias TIA-IMI, CLO-TIA y CLO-IMI, de forma que, cada insecticida presente en la mezcla tenía una concentración individual de 25 µg/L. Todas las exposiciones se realizaron en simultáneo y cada bioensayo en mezcla tuvo la exposición individual de los insecticidas, lo que significa que los compuestos en estudio tuvieron una exposición individual por duplicado (Tabla 6.1). Se dispuso de tres réplicas para cada tratamiento, cada una con ocho individuos. Cada unidad experimental consistió en dos placas de Petri de 10 cm de diámetro superpuestas conteniendo un volumen de 100 ml de solución experimental. Las soluciones fueron renovadas en su totalidad cada 48 horas y la temperatura y el fotoperiodo se mantuvieron estables a 25 ± 2 °C y 16:8 h luz:oscuridad, respectivamente, durante todo el bioensayo. Antes de cada recambio, de ser el caso, se retiraban los individuos muertos y se procedía a registrar la supervivencia y estadio de desarrollo de los individuos. Los estadios de desarrollo registrados fueron (3) tres y se establecieron según la clasificación de Gosner (1960): 1) Estadio 39 (E39); 2) Estadio 42 (E42), y 3) la finalización de la metamorfosis (MET), ampliamente descritos en la sección 2.2.5.4 del capítulo 2. Con el fin de alimentar a los renacuajos, un trozo de acelga hervida de aproximadamente de 1 cm² fue añadido a las unidades experimentales inmediatamente después de cada recambio.

Tabla 6.1. Descripción de las mezclas binarias expuestas en renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum*, con las respectivas exposiciones individuales de los insecticidas.

Bioensayos en mezcla (25µg/l)	Exposición individual de los insecticidas (50µg/L)			
	Control	Tiametoxam	Imidacloprid	Clorantraniliprol
Tiametoxam-Imidacloprid	X	X	X	
Clorantraniliprol-Tiametoxam	X	X		X
Clorantraniliprol-Imidacloprid	X		X	X

Los individuos que completaron la metamorfosis fueron sometidos a una prueba de capacidad de salto. En un inicio, en la zona ventral de las patas de los metamorfos se colocó pintura de agua diluida con el fin de marcar con mayor exactitud los saltos. Cada metamorfo se ubicó sobre una hoja en la que se marcó el punto de inicio, y se procedió a estimular el salto, mediante el contacto dorsal en la zona cercana al urostilo-cloaca por medio de un palillo. El registro se realizó por triplicado y en cada estimulación se marcó los primeros tres (3) saltos, entre las repeticiones hubo un “descanso” de 5 minutos. Después, los individuos fueron anestesiados en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222) y pesados por medio de una balanza digital Denver TP-214 con una precisión de 0.001 g. Se les examinó detalladamente en busca de malformaciones y se les tomó una fotografía ventral y dorsal, con los brazos extendidos con el fin de medir la longitud hocico cloaca (LHC), mediante el programa Imagej desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés) (Schneider et al 2012).

6.2.5. Análisis estadísticos

El impacto de TIA, IMI y CLO y de sus mezclas binarias, sobre la proporción de individuos que logran avanzar en el desarrollo metamórfico y el tiempo que necesitan para hacerlo, fue analizado según los métodos previamente descritos por Brodeur *et al.* (2009; 2013)., y detallados en la sección 2.2.7 del capítulo 2. Luego de comprobar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea de los datos, las proporciones de renacuajos que alcanzaron los diferentes estadios durante el proceso de metamorfosis (E39, E42 y MET) en los distintos tratamientos, los valores correspondientes al tiempo en el que el 50% de los individuos expuestos alcanzan el E39, E42 y MET (T50-E39, T50-E42, T50-MET), el peso promedio, la LHC y la capacidad de salto promedio de los individuos recién

metamorfosados, fueron comparados con el grupo control mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Todos los análisis de ANOVA y comparaciones múltiples se realizaron mediante el uso del software SigmaStat 12.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Concentración de plaguicidas en las soluciones madres

La concentración analítica de TIA determinada en la solución madre fue de $10,83 \pm 0,87$ mg/L (N = 3, promedio \pm desviación estándar (D.E.)), lo que representa el 21,7 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 80% del valor nominal, se usó el valor correspondiente al 21,7 % del valor nominal para el análisis de los resultados, tal como es recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). La concentración nominal de TIA que tenía el valor correspondiente a 50 μ g/L correspondió entonces a la concentración real de 11 μ g/L.

Por su parte, la concentración analítica de IMI determinada en la solución madre fue de $34,69 \pm 1,15$ mg/L (N = 2, promedio \pm D.E.), lo que representa el 69,39 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 70% del valor nominal, se usó el valor correspondiente al 69,39 % del valor nominal para el análisis de los resultados, tal como es recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). La concentración nominal de IMI que tenía el valor correspondiente a 50 μ g/L correspondió entonces a la concentración real de 35 μ g/L.

Finalmente, la concentración analítica de CLO determinada en la solución madre fue de $42,85 \pm 4,9$ mg/L (N = 2, promedio \pm D.E.), lo que representa el 85,71 % del valor nominal. Como este valor es inferior a 90% del valor nominal, se usó el valor correspondiente al 85,71 % del valor nominal para el análisis de los resultados, tal como es recomendado en varios protocolos estandarizados (OECD, 1992; USEPA, 2012). La concentración nominal de CLO que tenía el valor correspondiente a 50 μ g/L correspondió entonces a la concentración real de 43 μ g/L.

6.3.2 Efecto de la exposición individual y mezcla de tiametoxam e imidacloprid en la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

6.3.2.1 Tiempos de metamorfosis

En general, se registró una supervivencia superior al 80% a lo largo de la exposición, en el grupo control y en los grupos de exposición a los insecticidas de forma individual y en mezcla, sin que se encontraran diferencias significativas entre los grupos de exposición incluido el control (Figura 6.1). El número acumulado de individuos que lograron alcanzar el E39, el E42 y que completaron la metamorfosis (MET) se encuentra ilustrado en la Figura 6.2. Entre los días 20 y 37 de exposición, el 50% de los individuos del grupo control y los expuestos a los tratamientos individuales a 11 y 35 $\mu\text{g/L}$ de TIA e IMI respectivamente y su correspondiente mezcla con 5,5 $\mu\text{g/L}$ de TIA y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de IMI, alcanzaron los estadios evaluados (Figura 6.2 y Tabla 6.2). El porcentaje de organismos que alcanzaron E39, E42 y MET, fue significativamente menor en los tratamientos individuales a diferencia de los organismos expuestos a la mezcla y el grupo control. Asimismo, se observó que, a lo largo del desarrollo, los grupos de exposición a los NEO de manera individual estuvieron retrasados, es decir, requirieron de significativamente más tiempo para alcanzar los tres estadios evaluados (Tabla 6.2). En general, valores registrados en las variables expuestas anteriormente (porcentaje de individuos y tiempo de alcance a los E39, E42 y MET) en los tratamientos de exposición y el grupo control, presentaron diferencias significativas (Tabla 6.2). Por ejemplo, todos los valores registrados con TIA presentaron diferencias significativas con el grupo control y con la mezcla, mientras que, los valores de la mezcla no registraron diferencias significativas con el grupo control y la mayoría de los valores registrados con IMI (Tabla 6.2).

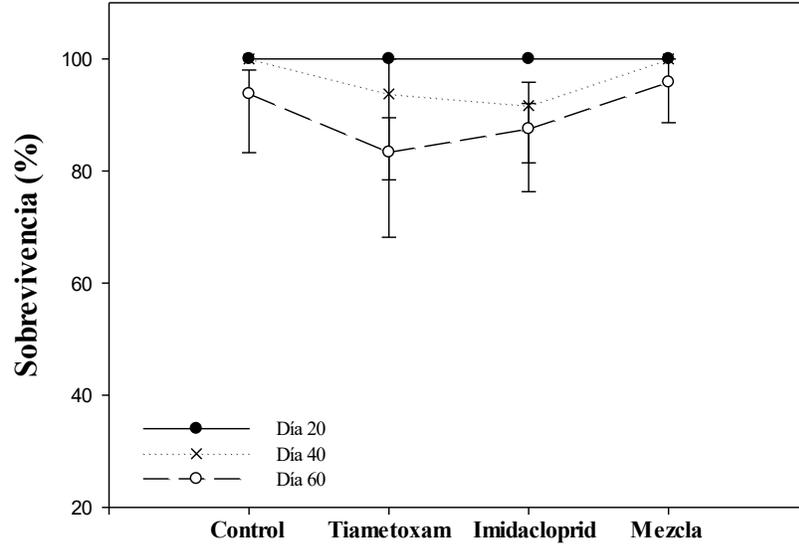


Figura 6.1: Supervivencia registrada durante los días 20, 40 y 60 de exposición de los insecticidas tiametoxam e imidacloprid de manera individual a 11 y 35 $\mu\text{g/L}$, respectivamente y su correspondiente mezcla con 5,5 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid, sobre renacuajos de *Rhinella arenarum*.

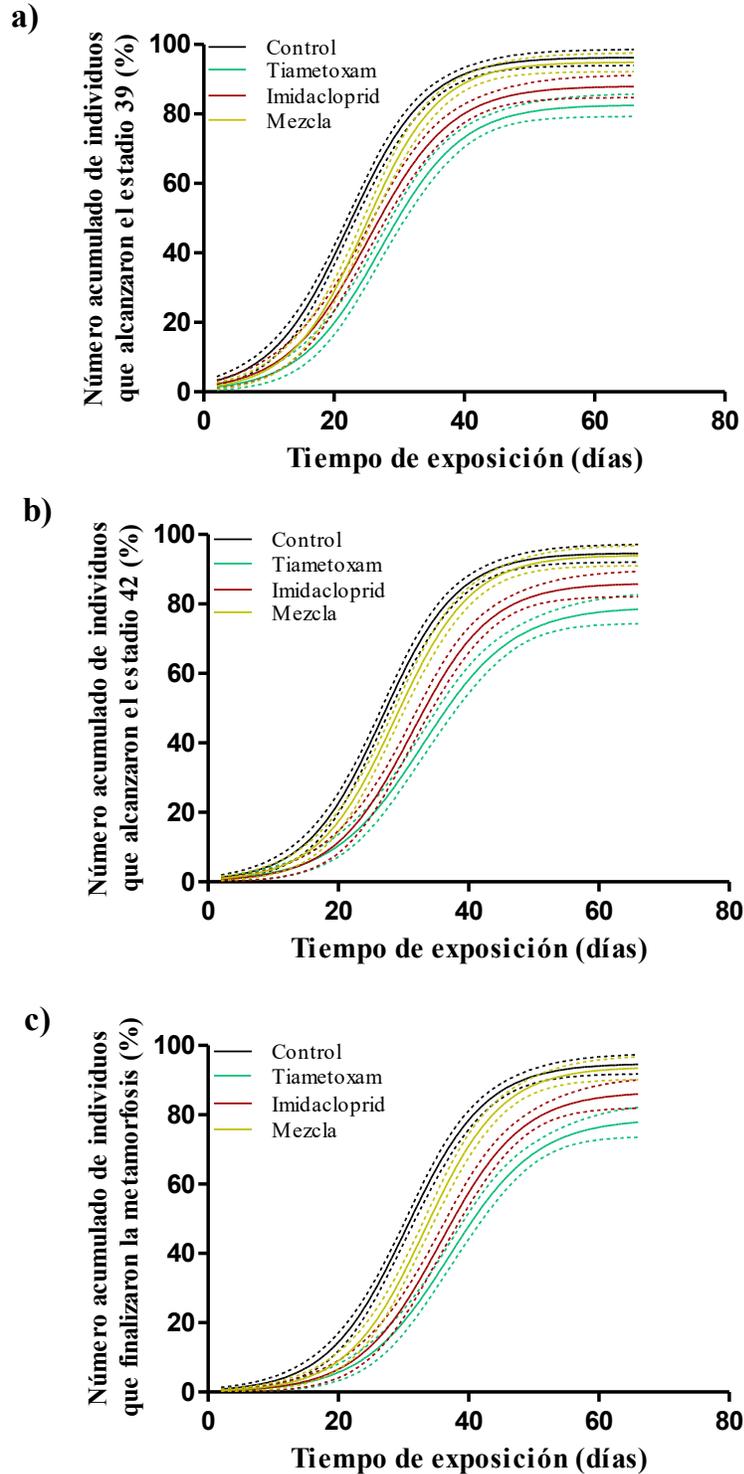


Figura 6.2. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron: a) Estadio 39 b) Estadio 42 y que c) Finalizaron la metamorfosis, en el grupo control y los grupos expuestos a concentraciones individuales de 11 y 35 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam e imidacloprid, respectivamente y su correspondiente mezcla con 5,5 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 6.2. Tiempo requerido para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum*, alcancen a) Estadio 39 (T50-E39), b) Estadio 42 (T50-E42) y c) Completan la metamorfosis (T50-MET). Tasa de transformación y proporción de individuos que alcanzan cada estadio, en renacuajos expuestos a 11 µg/L de tiametoxam, 35 µg/L de imidacloprid y una mezcla binaria conteniendo 5,5 µg/L tiametoxam y 17,5 µg/L imidacloprid. Los datos de las columnas que no contienen la misma letra presentaron diferencias significativas (P<0,05).

a)

	T50- E39 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	21,75±0,69 ^a	0,06±0,006	96,70±1,29 ^a
Tiametoxam	27,03±0,84 ^b	0,06±0,008	82,84±1,82 ^b
Imidacloprid	25,25±0,86 ^b	0,06±0,008	88,11±1,78 ^{bc}
Mezcla	24,33±0,64 ^a	0,07±0,006	95,30±1,46 ^{ac}

b)

	T50- E42 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	26,21±0,58 ^a	0,06±0,005	95,31±1,44 ^a
Tiametoxam	32,88±1,01 ^b	0,061±0,008	79,37±2,60 ^b
Imidacloprid	31,21±0,77 ^{bc}	0,07±0,008	86,19±2,07 ^{bc}
Mezcla	28,37±0,60 ^{ac}	0,06±0,006	94,56±1,62 ^{ac}

c)

	T50- MET (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	29,96±0,57 ^a	0,06±0,005	95,62±1,64 ^a
Tiametoxam	37,04±0,94 ^b	0,06±0,008	79,10±2,82 ^b
Imidacloprid	35,57±0,79 ^{bc}	0,06±0,007	87,10±2,52 ^{bc}
Mezcla	33,01±0,60 ^{ac}	0,06±0,006	94,35±1,90 ^{ac}

6.3.2.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.

El peso y el largo (LHC) promedio de los metamorfos que lograron completar su desarrollo se encuentra ilustrado en la Figura 6.3. Se encontró que en general las exposiciones individuales a los NEO no alteraron los rasgos evaluados, a diferencia de la exposición a la mezcla de TIA-IMI que disminuyó significativamente el peso promedio de los metamorfos.

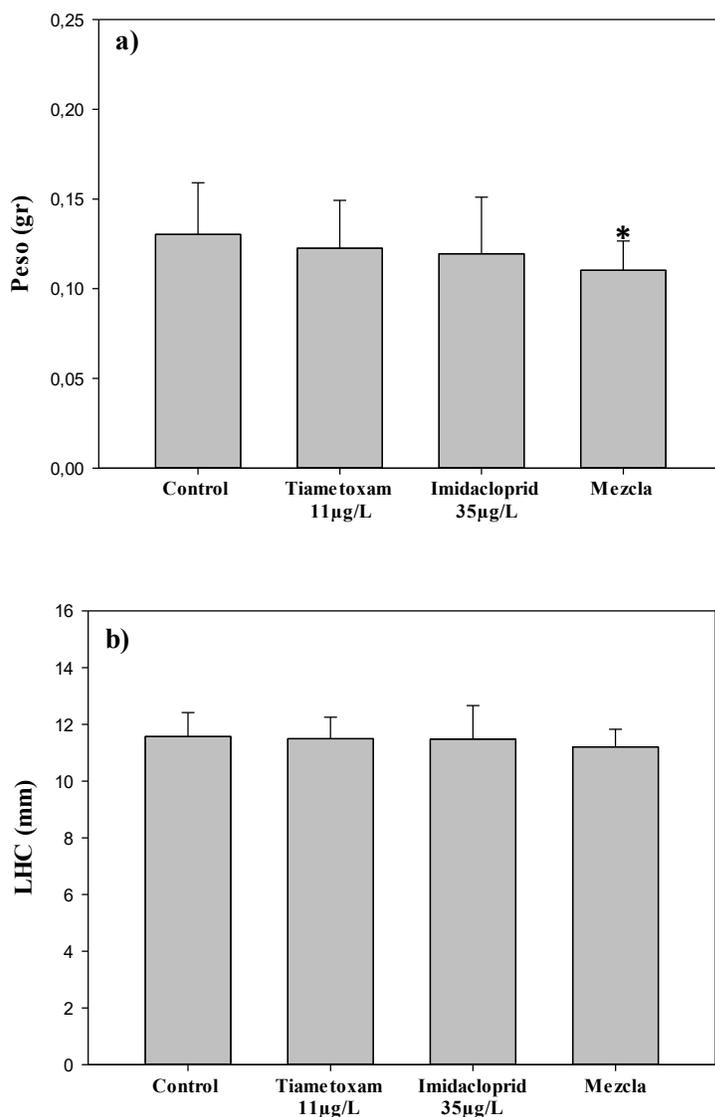


Figura 6.3. a) Peso y b) Longitud hocico-cloaca (promedio \pm E.S.) de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a 11 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam, 35 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid y la correspondiente mezcla de estos dos insecticidas a 5,5 y 17,5 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, durante su desarrollo.

6.3.3 Efecto de la exposición individual y mezcla de clorantraniliprol y tiametoxam en la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

6.3.3.1 Tiempos de metamorfosis.

A lo largo del desarrollo metamórfico se registró una supervivencia superior al 80%, en el grupo control y en los grupos de exposición a los insecticidas de forma individual y en mezcla, sin que se encontraran diferencias significativas entre los grupos de exposición incluido el control (Figura 6.4). El número acumulado de individuos que lograron alcanzar el E39, el E42 y que completaron la metamorfosis (MET) se encuentra ilustrado en la Figura 6.5. En general, entre los días 21 y 38 de exposición, el 50% de los individuos del grupo control y los expuestos a los tratamientos individuales a 43 y 11 $\mu\text{g/L}$ de CLO y TIA respectivamente, y su correspondiente mezcla a 21,5 $\mu\text{g/L}$ de CLO y 5,5 $\mu\text{g/L}$ de TIA, alcanzaron los estadios evaluados (Figura 6.5 y Tabla 6.3). Se observó que para la llegada a E39, un porcentaje significativamente menor de individuos lo lograron en los tratamientos individuales, mientras que en el avance hacia E42 y MET, tanto los tratamientos individuales como la mezcla, registraron un porcentaje significativamente menor de individuos (Tabla 6.3). En cuanto al tiempo que requirieron los individuos para alcanzar los estadios evaluados (E39, E42 y MET), se encontró que, los organismos expuestos a los tratamientos individuales requirieron significativamente más días para alcanzar E39, E42 y MET, en el caso de los organismos expuestos a la mezcla, el requerimiento significativo de más días para alcanzar los estadios evaluados se registró a partir de la llegada al E42 y MET (Tabla 6.3). En general, los valores registrados en las variables expuestas anteriormente (porcentaje de individuos y tiempo de alcance a los E39, E42 y MET) en los tratamientos de exposición y el grupo control, presentaron diferencias significativas (Tabla 6.3). Por ejemplo, desde el E42 todos los tratamientos de exposición individuales y en mezcla, presentaron diferencias significativas con el grupo control (Tabla 6.3 b y c). Asimismo, durante el alcance a MET, los valores correspondientes al tiempo (T50-MET), presentaron diferencias significativas entre los grupos de exposición individual y la mezcla, mientras que los valores correspondientes al porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis (MET), presentaron diferencias significativas solo entre los tratamientos individuales y no respecto al tratamiento con la mezcla (Tabla 6.3c).

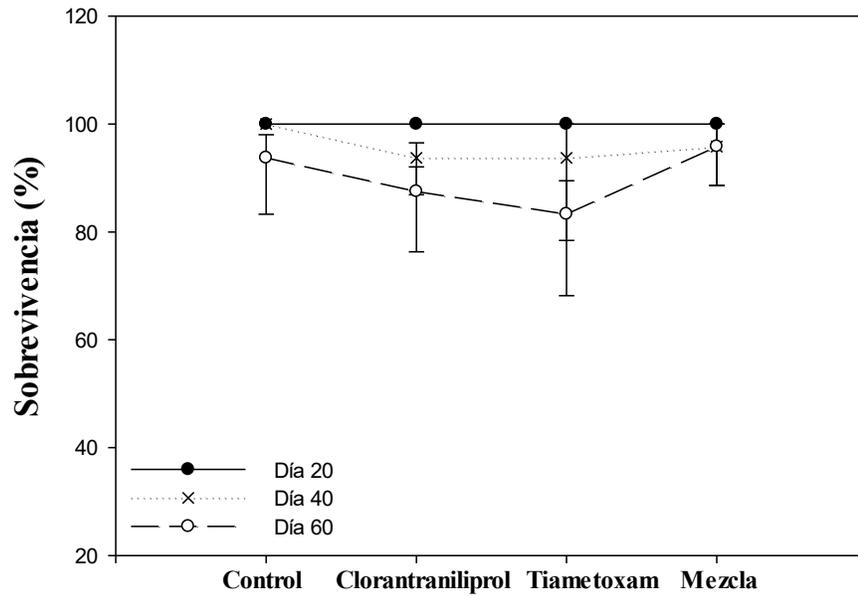


Figura 6.4: Supervivencia registrada durante los días 20, 40 y 60 de exposición de los insecticidas clorantraniliprol y tiametoxam de manera individual a 43 y 11 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, y su correspondiente mezcla con 21,5 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y 5,5 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam, sobre renacuajos de *Rhinella arenarum*.

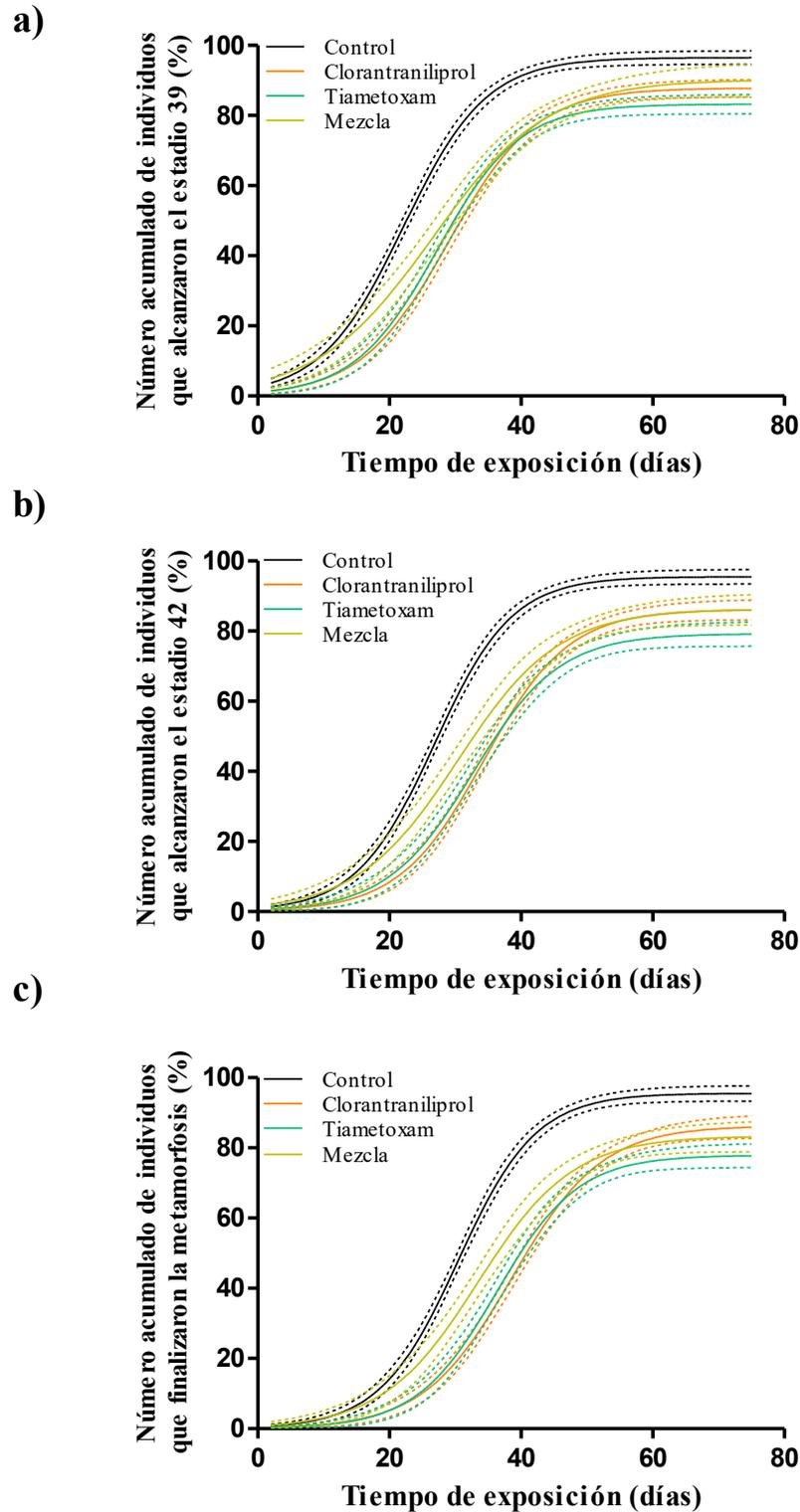


Figura 6.5 Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron: a) Estadio 39 b) Estadio 42 y que c) Finalizaron la metamorfosis, en el grupo control y los grupos expuestos a concentraciones individuales de 43 y 11 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y tiametoxam respectivamente, y su correspondiente mezcla con 21,5 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y 5,5 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 6.3. Tiempo requerido para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum*, alcancen a) Estadio 39 (T50-E39), b) Estadio 42 (T50-E42) y c) Completan la metamorfosis (T50-MET). Tasa de transformación y proporción de individuos que alcanzan cada estadio, en renacuajos expuestos a 43 µg/L de clorantraniliprol, 11 µg/L de tiametoxam y una mezcla binaria conteniendo 21,5 µg/L clorantraniliprol y 5,5 µg/L tiametoxam. Los datos de las columnas que no contienen la misma letra presentaron diferencias significativas (P<0,05).

a)

	T50- E39 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	21,44±0,74 ^a	0,06±0,005 ^a	96,82±1,05 ^a
Clorantraniliprol	29,23±0,66 ^b	0,06±0,006 ^a	87,58±1,33 ^{bc}
Tiametoxam	27,26±0,81 ^{bc}	0,06±0,008 ^a	83,20±1,46 ^c
Mezcla	22,55±3,57 ^{ac}	0,03±0,007 ^b	93,36±3,70 ^{ab}

b)

	T50- E42 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	26,38±0,55 ^a	0,06±0,005 ^a	95,83±1,11 ^a
Clorantraniliprol	34,68±0,61 ^b	0,07±0,006 ^a	85,69±1,48 ^b
Tiametoxam	32,75±0,90 ^{bc}	0,06±0,008 ^a	79,17±1,87 ^c
Mezcla	29,99±1,37 ^c	0,05±0,008 ^b	86,83±2,57 ^b

c)

	T50- MET (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	30,02±0,49 ^a	0,06±0,005	95,91±1,18 ^a
Clorantraniliprol	38,87±0,66 ^b	0,06±0,006	85,90±1,75 ^b
Tiametoxam	36,31±0,79 ^c	0,07±0,008	77,86±1,83 ^c
Mezcla	33,26±1,13 ^d	0,05±0,008	83,65±2,44 ^{bc}

6.3.3.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.

El peso y el largo (LHC) promedio de los metamorfos que lograron completar su desarrollo se encuentra ilustrado en la Figura 6.6. Se encontró que en general la exposición individual a CLO y TIA y su respectiva mezcla CLO-TIA, no alteraron los rasgos evaluados.

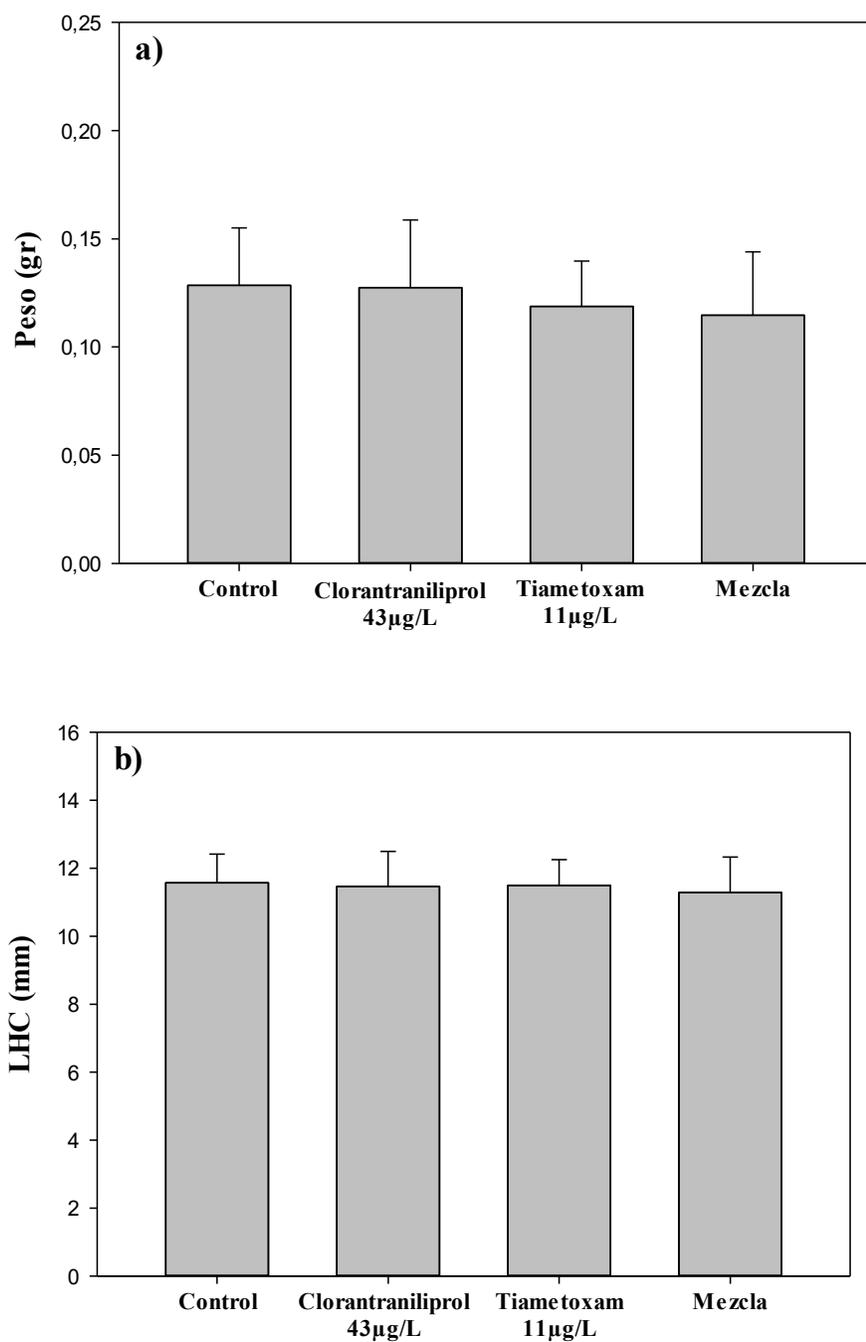


Figura 6.6. a) Peso y b) Longitud hocico-cloaca (promedio \pm E.S.) de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a 43 µg/L de clorantraniliprol, 11 µg/L de tiametoxam y la correspondiente mezcla de estos dos insecticidas a 21,5 µg/L y 5,5 µg/L respectivamente, durante su desarrollo.

6.3.4 Efecto de la exposición individual y mezcla de clorantraniliprol e imidacloprid en la metamorfosis de *Rhinella arenarum*.

6.3.4.1 Tiempos de metamorfosis.

Durante el desarrollo metamórfico se registró una supervivencia superior al 80%, en el grupo control y en los grupos de exposición a los insecticidas de forma individual y en mezcla, sin que se encontraran diferencias significativas entre los grupos de exposición incluido el control (Figura 6.7). El número acumulado de individuos que lograron alcanzar el E39, el E42 y que completaron la metamorfosis (MET) se encuentra ilustrado en la Figura 6.8. En general, entre los días 20 y 38 de exposición, el 50% de los individuos del grupo control y los expuestos a los tratamientos individuales a 43 y 35 $\mu\text{g/L}$ de CLO e IMI respectivamente, y su correspondiente mezcla a 21,5 $\mu\text{g/L}$ de CLO y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de IMI, alcanzaron los estadios evaluados (Figura 6.8 y Tabla 6.4). Se observó que, en los tratamientos individuales y en la mezcla, un porcentaje significativamente menor de individuos lograron alcanzar E39, E42 y MET, y además, requirieron significativamente de un mayor tiempo para alcanzar los tres estadios evaluados (E39, E42 y MET) (Tabla 6.4). En general, los valores registrados en las variables expuestas anteriormente (porcentaje de individuos y tiempo de alcance a los E39, E42 y MET) en los tratamientos de exposición y el grupo control, presentaron diferencias significativas (Tabla 6.4). Por ejemplo, todos los valores registrados en los tratamientos de exposición individual y en mezcla, registraron diferencias significativas con el grupo control desde la llegada al E39, sin que se registraran diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del tratamiento individual correspondiente a CLO y la mezcla (CLO-IMI) que se diferenciaron a partir del E42 en la variable correspondiente al tiempo (T50-E42 y T50-MET) (Tabla 6.4 b y c)

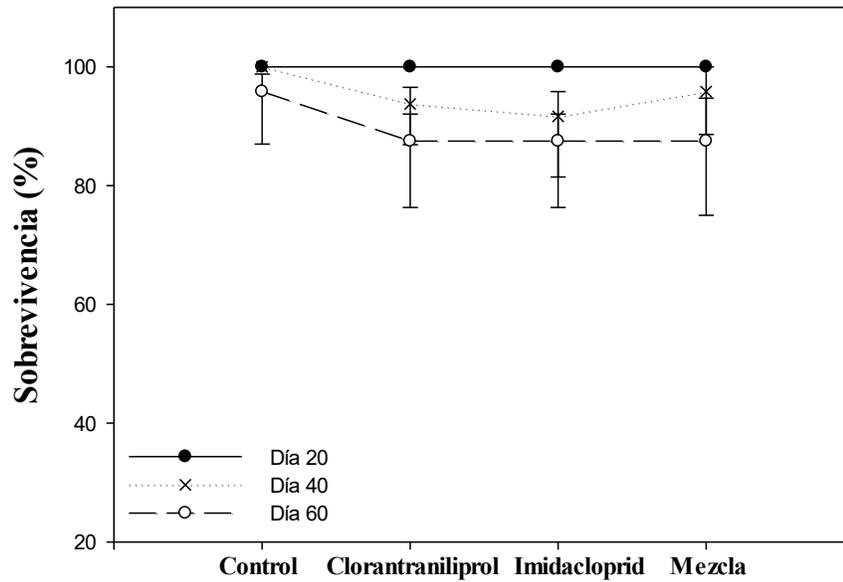


Figura 6.7: Supervivencia registrada durante los días 20, 40 y 60 de exposición de los insecticidas clorantraniliprol e imidacloprid de manera individual a 43 y 35 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, y su correspondiente mezcla a 21,5 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid, sobre renacuajos de *Rhinella arenarum*.

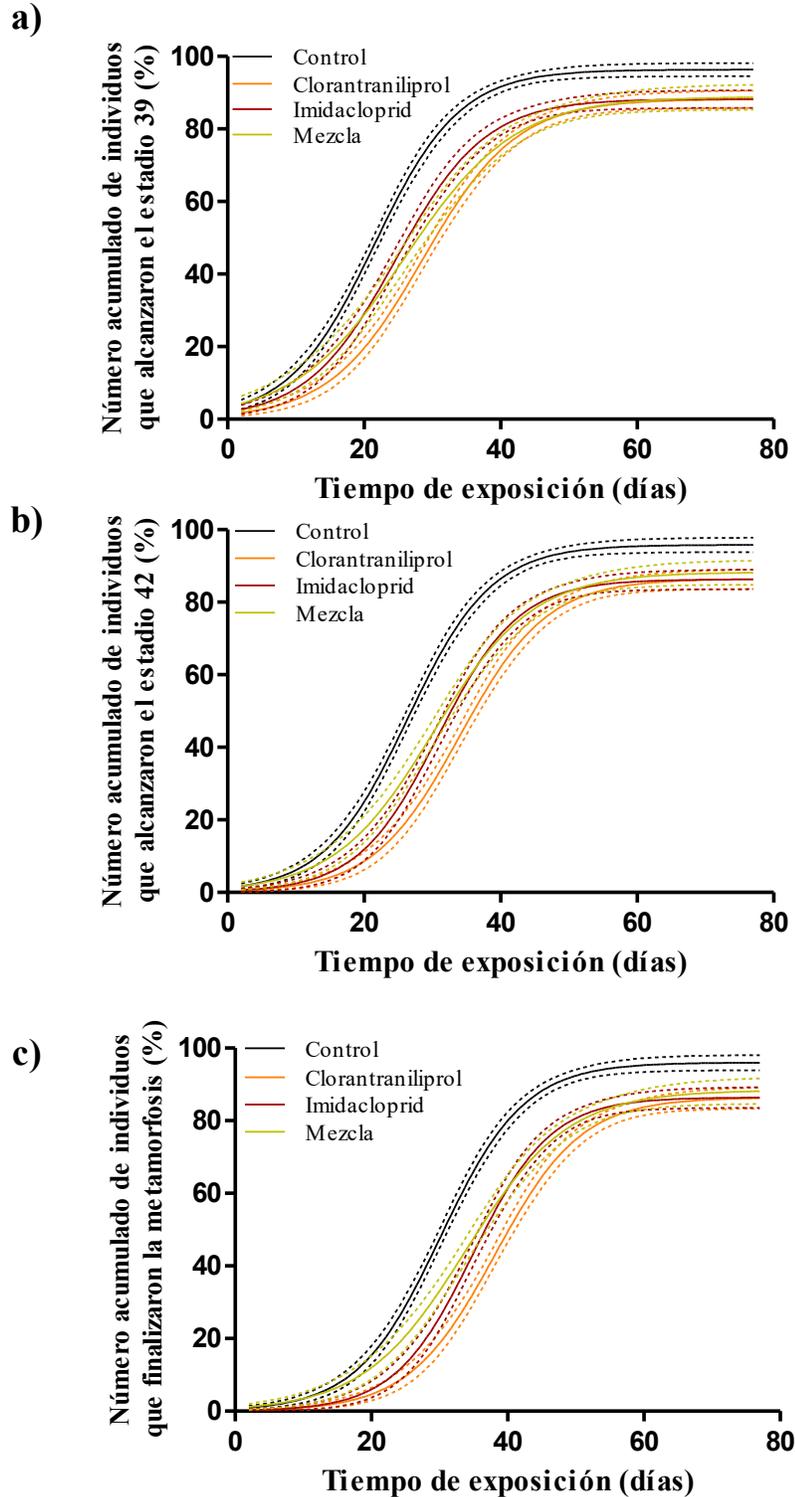


Figura 6.8. Número acumulado de renacuajos de *Rhinella arenarum* que alcanzaron: a) Estadio 39 b) Estadio 42 y que c) Finalizaron la metamorfosis, en el grupo control y los grupos expuestos a concentraciones individuales de 43 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y 35 $\mu\text{g/L}$ imidacloprid y su correspondiente mezcla a 21,5 $\mu\text{g/L}$ de clorantraniliprol y 17,5 $\mu\text{g/L}$ de imidacloprid. Las líneas representan la modelización de la curva sigmoidea calculada para cada tratamiento.

Tabla 6.4. Tiempo requerido para que el 50% de los renacuajos de *R. arenarum*, alcancen a) Estadio 39 (T50-E39), b) Estadio 42 (T50-E42) y c) Completan la metamorfosis (T50-MET). Tasa de transformación y proporción de individuos que alcanzan cada estadio, en renacuajos expuestos a 43 µg/L de clorantraniliprol, 34 µg/L de imidacloprid y una mezcla binaria conteniendo 21,5 µg/L clorantraniliprol y 17,5 µg/L imidacloprid. Los datos de las columnas que no contienen la misma letra presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

a)

	T50- E39 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 39 (%)
Control	20,42±0,79 ^a	0,06±0,005	96,79±1,00 ^a
Clorantraniliprol	28,78±0,71 ^b	0,06±0,006	88,10±1,28 ^b
imidacloprid	24,51±0,88 ^c	0,06±0,006	88,35±1,31 ^b
Mezcla	25,79±1,45 ^{bc}	0,05±0,007	88,93±1,95 ^b

b)

	T50- E42 (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que alcanzaron el estadio 42 (%)
Control	25,66±0,60 ^a	0,06±0,004 ^a	96,25±1,08 ^a
Clorantraniliprol	34,56±0,59 ^b	0,07±0,006 ^b	85,88±1,37 ^b
imidacloprid	30,94±0,67 ^c	0,07±0,007 ^b	86,23±1,41 ^b
Mezcla	29,42±1,07 ^c	0,05±0,006 ^b	88,83±1,89 ^b

c)

	T50- MET (Días)	Tasa de transformación (%/día)	Individuos que finalizaron la metamorfosis (%)
Control	29,65±0,52 ^a	0,06±0,004 ^a	96,40±1,13 ^a
Clorantraniliprol	38,55±0,57 ^b	0,07±0,006 ^b	85,84±1,50 ^b
Imidacloprid	34,94±0,60 ^c	0,07±0,007 ^b	86,37±1,48 ^b
Mezcla	33,20±0,98 ^c	0,05±0,006 ^b	89,10±2,08 ^b

6.3.4.2 Peso y longitud hocico cloaca (LHC) promedio de los individuos metamorfoseados.

El peso y el largo (LHC) promedio de los metamorfos que lograron completar su desarrollo se encuentra ilustrado en la Figura 9. Se encontró que en general la exposición individual a CLO e IMI y su respectiva mezcla CLO-IMI, no alteraron los rasgos evaluados.

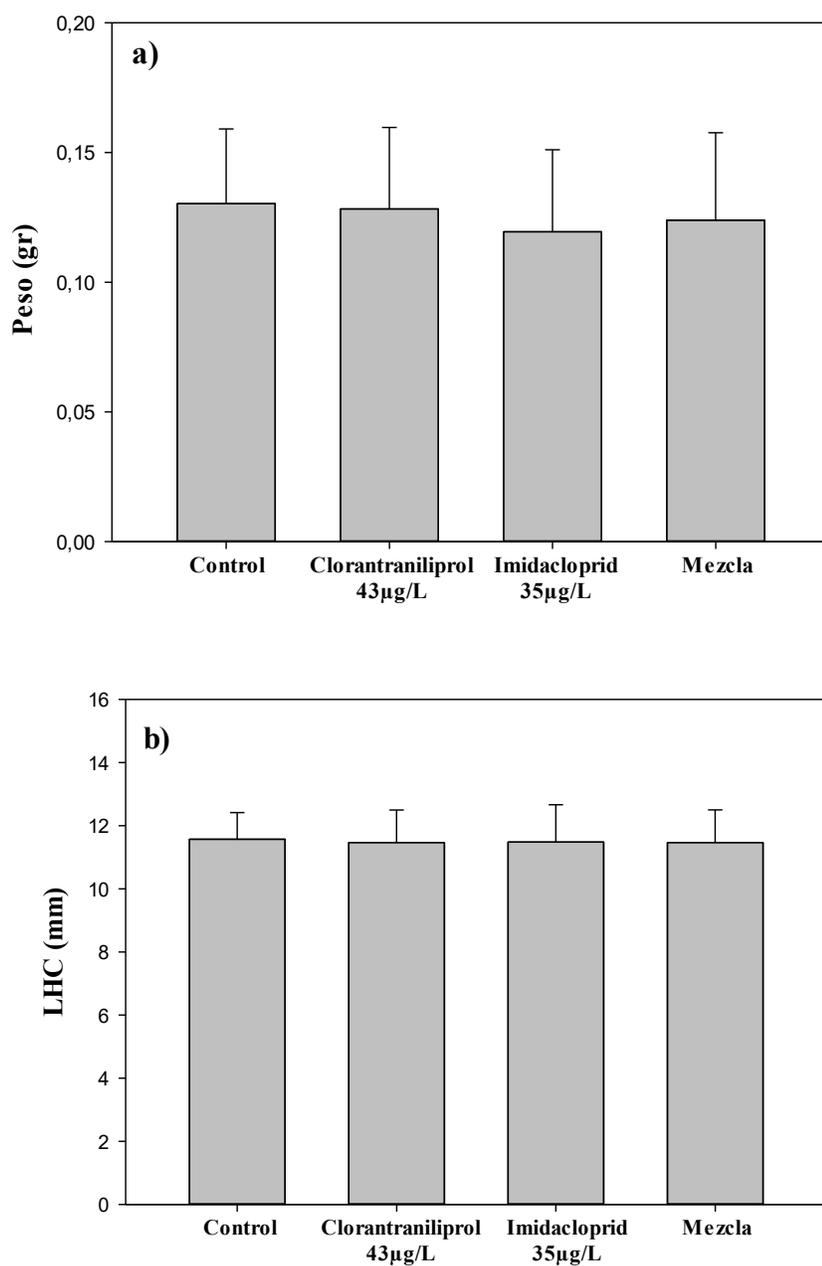


Figura 6.9. a) Peso y b) Longitud hocico-cloaca (promedio \pm E.S.) de *Rhinella arenarum* al finalizar la metamorfosis en el grupo control y grupos expuestos a 43 µg/L de clorantraniliprol, 35 µg/L de imidacloprid y la correspondiente mezcla de estos dos insecticidas a 21,5 y 17,5 µg/L, respectivamente, durante su desarrollo.

6.3.5 Evaluación de la capacidad de salto de los individuos recién metamorfoseados

La prueba realizada con los individuos recién metamorfoseados arrojó que en promedio los metamorfos expuestos individualmente a TIA y a CLO, así como los expuestos a las mezclas binarias de TIA-IMI y CLO-TIA presentan significativamente una menor capacidad de salto en comparación con el grupo control (Figura 6.10), mientras que la capacidad de salto de los metamorfos expuestos a IMI y a su mezcla con CLO (CLO-IMI) no registraron diferencias significativas con el grupo control (Figura 6.10). Las comparaciones entre los grupos de exposición, permitieron observar que la capacidad de salto de los metamorfos expuestos a la mezcla de NEO (TIA-IMI) no presentaron diferencias significativas con los metamorfos expuestos a los insecticidas individualmente (Figura 6.10a), a diferencia de lo ocurrido con la mezcla (CLO-TIA), en la que la capacidad de salto de los metamorfos fue significativamente menor a la de los metamorfos expuestos individualmente (Figura 6.10b), y, finalmente, en el caso de la mezcla (CLO-IMI), la capacidad de salto de los metamorfos solo se diferenció significativamente con los metamorfos expuestos al insecticida CLO (Figura 6.10c).

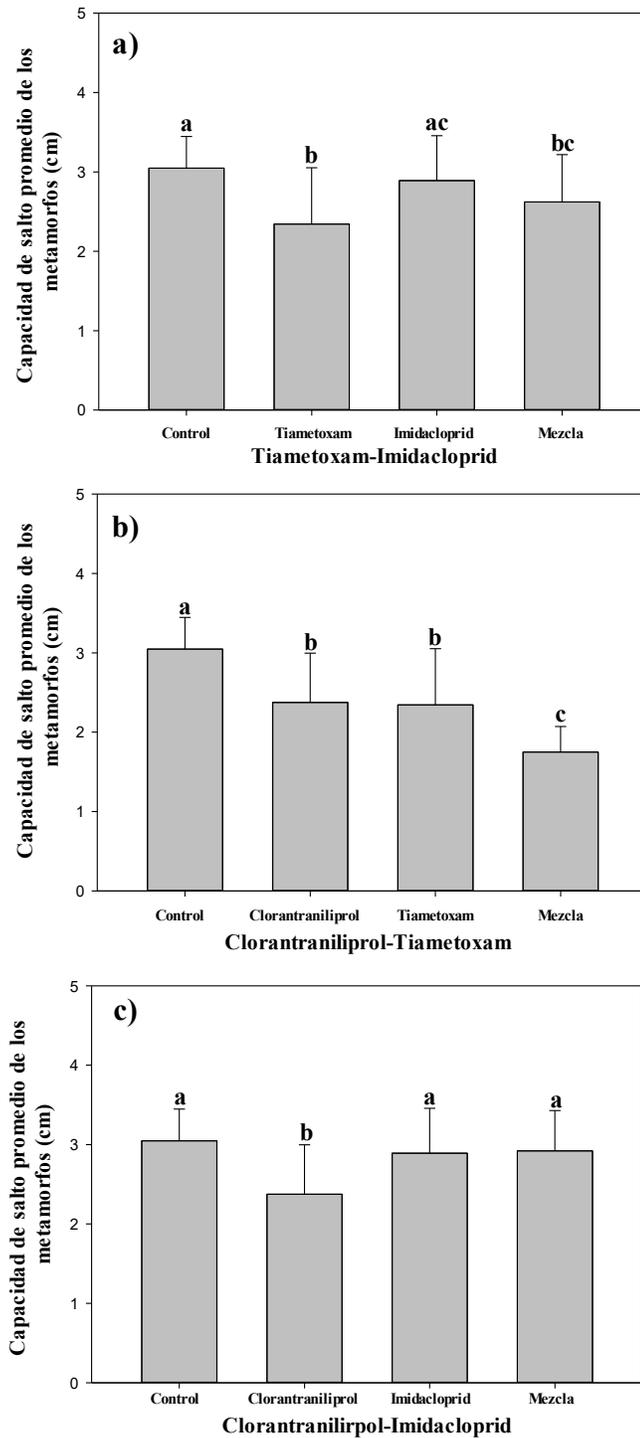


Figura 6.10 Capacidad de salto promedio de los individuos recién metamorfoseados de *Rhinella arenarum*, expuestos a la concentración individual de 11, 35 y 43 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam, imidacloprid y clorantraniliprol respectivamente, y su correspondiente mezcla binaria con 5,5, 17,5 y 21,5 $\mu\text{g/L}$ de tiametoxam, imidacloprid y clorantraniliprol, según el caso. a) Tiametoxam,-Imidacloprid b) Clorantraniliprol-Tiametoxam c) Clorantraniliprol-Imidacloprid.

6.4. DISCUSIÓN

La exposición individual de TIA, IMI y CLO a las concentraciones ambientales de 11, 35, y 43 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, en renacuajos de *Rhinella arenarum*, ocasionó un retraso y una disminución significativa en la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis. Mientras que la exposición a las mezclas binarias (TIA-IMI; CLO-TIA y CLO-IMI) ocasionó una disminución del efecto individual de los insecticidas. De esta forma, el retraso de la metamorfosis fue menor en el número de días y la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis llegó a ser equivalente a las exposiciones individuales en el caso de las mezclas de CLO-TIA y CLO-IMI, y significativamente mayor en la mezcla de TIA-IMI (Tablas 6.2; 6.3; 6.4). En general, los rasgos correspondientes a peso y largo de los individuos juveniles no fueron alterados por la exposición individual y mezclas binarias de los insecticidas, a excepción de la mezcla de los NEO, TIA-IMI en la que los individuos resultaron con un peso significativamente menor. Por otra parte, la prueba correspondiente a la capacidad de salto de los metamorfos, demostró que la exposición individual de TIA y CLO y las mezclas binarias de TIA-IMI y CLO-TIA disminuyeron significativamente la distancia de salto de los individuos.

A diferencia de las DIA, los NEO cuentan con un mayor número de registros de exposiciones individuales, en la evaluación de efectos sobre la metamorfosis de anuros. Exposiciones ambientales de IMI han descrito retrasos y aceleraciones en el desarrollo (Robinson et al., 2017; Danis y Marlatt., 2021; Thompson et al., 2022), e incluso, la exposición de NEO durante el desarrollo metamórfico en anuros ha denotado efectos comportamentales y alteraciones inmunológicas en organismos juveniles (Lee-Jenkins and Robinson., 2018; Gavel et al., 2019; 2021; Robinson et al., 2021). Lo informado por Brodeur y Fonseca., (2023) y el presente capítulo, reportan que la exposición ambiental de TIA e IMI, puede causar un retraso en el tiempo de metamorfosis y una disminución significativa en la proporción de individuos que completan el desarrollo en anuros y que, además, TIA puede causar una disminución en la capacidad de salto en los organismos juveniles. Asimismo, lo descrito en el capítulo 5 y el presente capítulo, son los primeros y únicos reportes hasta la fecha, que evidencian que la exposición ambiental de CLO y ciantraniliprol (CIAN), puede causar un retraso en el tiempo de metamorfosis y una disminución significativa en la

proporción de individuos que completan el desarrollo en anuros, y que, en el caso de CLO, puede causar también una disminución de la capacidad de salto de los organismos juveniles.

Los plaguicidas de acuerdo con su modo de acción son metabolizados por una serie de enzimas, el proceso puede verse afectado por la acción de otras sustancias químicas, que en conjunto pueden inducir o inhibir las vías de detoxificación, provocando cambios en la toxicidad o lo que se conoce como interacciones antagónicas o sinérgicas, respectivamente (Thompson., 1996). Estas interacciones pueden producirse a nivel toxicocinético (TC) ó toxicodinámico (TD) (Hernández et al; 2017). En organismos acuáticos, existe un mayor registro de exposiciones en mezcla de plaguicidas con NEO que con DIA. En la mayoría de los casos, la mezcla de NEO ha denotado interacciones tanto aditivas, como antagónicas y sinérgicas, que varían de acuerdo con la concentración, tiempo de exposición y parámetro evaluado (Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011; Maloney et al., 2017; Rico et al., 2018; Maloney et al., 2018; Schmidt et al., 2022; Veedu et al 2022). En el caso de las DIA, se han descrito interacciones sinérgicas en exposiciones binarias que incluyeron a CLO (Wei et al., 2021; Stinson et al., 2022; Egan et al., 2023; Odetti et al., 2023). La determinación de interacciones entre plaguicidas se suele realizar a través de modelos específicos (Rodney et al., 2013). Teóricamente, los plaguicidas con modo de acción similar suelen presentar aditividad, lo que significa, la no interacción entre ellos (Hernández et al; 2017), mientras que los plaguicidas con diferente modo de acción pueden presentar tanto aditividad, como antagonismo o sinergismo (Hernández et al; 2017). Aunque en este trabajo no se realizaron modelos de interacción, la exposición de la mezcla binaria de los insecticidas TIA, IMI y CLO permitieron identificar que las respuestas variaron de acuerdo con el parámetro evaluado. Por ejemplo, contrario a lo descrito en las exposiciones individuales, la mezcla de los NEO, TIA e IMI causó que una mayor proporción de individuos lograran finalizar la metamorfosis, en un menor tiempo. También, ocasionó que los organismos juveniles obtuvieran un peso significativamente menor, y que al igual que TIA, registraran una menor capacidad de salto. En el caso de las mezclas de CLO-TIA y CLO-IMI, se observó un menor retraso del proceso metamórfico y un porcentaje de individuos que finalizaron la metamorfosis semejante con la exposición individual de los insecticidas. Asimismo, se evidenció que la mezcla de CLO-TIA potenció los efectos individuales de las moléculas, disminuyendo significativamente la capacidad de salto de los organismos juveniles.

Entre las reacciones enzimáticas involucradas en la metabolización de plaguicidas, se encuentran las monooxigenasas microsomales (P450s), glutatión-S-transferasas y esterasas (Thompson., 1996). En anuros al igual que en peces, los plaguicidas se metabolizan a través de las monooxigenasas microsomales (P450s) (Venturino et al., 2003), siendo esta una posible vía de interacción y alteración en la exposición a mezclas de plaguicidas (Stinson et al., 2022). Los NEO, al ser insecticidas de la misma familia y con igual modo de acción - agonistas del receptor AChE-, se cree que actúan en el organismo sobre la misma diana molecular (Loureiro et al., 2010). En este caso, las respuestas diferenciales de la mezcla de los NEO, TIA-IMI con las exposiciones individuales de los insecticidas, pudo haber estado relacionado a una interacción al nivel TD, en la que la presencia de los dos compuestos modifica la respuesta individual de los insecticidas, interacción que puede ocurrir en el mismo receptor o diana molecular (Reffstrup et al., 2010). Incluso, es posible que existiera diferencias entre los mecanismos de toxicidad de acuerdo con los puntos finales evaluados (Loureiro et al., 2010), lo que suele estar relacionado también, con las diferentes propiedades TC-TD de los insecticidas y sus respectivos metabolitos (Rico et al., 2018). En este sentido, aunque no sabemos la acción e incidencia de cada insecticida en la mezcla, los efectos individuales determinaron que, IMI (17,5 µg/L) fue el insecticida con menor efecto en *Rhinella arenarum*, a diferencia de CLO (21,5 µg/L) y TIA (5,5 µg/L) que tuvieron un mayor efecto. Teniendo en cuenta que las concentraciones de exposición de los insecticidas en la mezcla fueron diferentes, se hace relevante poder determinar la acción de cada insecticida en la mezcla y su incidencia en las respuestas obtenidas.

El rendimiento locomotor es un factor importante en la sobrevivencia de los vertebrados y comúnmente está relacionado con la aptitud o fitness de los organismos. En anuros, este factor está directamente relacionado con el tamaño corporal de los individuos, siendo el largo y el peso, los rasgos más importantes (James et al., 2005; Bi et al., 2023). Interesantemente, la capacidad de salto de los metamorfos de *R. arenarum* se vio disminuida en las exposiciones individuales de TIA y CLO, y en las mezclas binarias de TIA-IMI y CLO-TIA. Aunque en ningún caso se vio alterado el largo de los individuos, es posible que el bajo peso de los metamorfos haya influido en el resultado en la mezcla de los NEO. Reportes previos indican que la exposición individual a un NEO durante el desarrollo metamórfico en anuros puede afectar la respuesta de ataque en los metamorfos (Lee-Jenkins

y Robinson, 2018), aunque en este caso no medimos la respuesta al estímulo, contribuimos a la evidencia de que la exposición a los NEO durante el desarrollo larval en anuros puede afectar la aptitud de los metamorfos o juveniles. Por otra parte, lo ocurrido en la mezcla CLO-TIA evidenció un efecto sinérgico que potenció la respuesta individual de los insecticidas. Reportes han indicado que exposiciones con NEO y DIA ocasionan alteraciones en el desplazamiento de organismos acuáticos (Rodrigues et al., 2016; Hussain et al., 2020; Egan et al., 2023). Aunque en este caso la mezcla con CLO y el NEO, IMI, no arrojó un efecto significativo, la exposición de la mezcla en individuos del pez *Pimephales promelas*, sobre-activó la expresión génica de los receptores de rianodina (RyR) (Stinson et al., 2022), involucrados en la función neuromuscular de organismos invertebrados y vertebrados, incluido los renacuajos (Cordova et al., 2006; Haremaki y Weinstein., 2012). Teniendo en cuenta que CLO actúa sobre los (RyR) en organismos blancos (Lahm et al 2005), sería conveniente poder evaluar si CLO y TIA intervinieron en la función de los RyR en *R. arenarum* y su posible relación con la disminución de la capacidad de salto en los organismos juveniles.

El conocimiento sobre la función reguladora de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), en la metamorfosis de anuros (Tata, 2006), nos ha permitido discutir en trabajos anteriores, la hipótesis de que exposiciones ambientales e individuales de los NEO, TIA e IMI y las DIA, CLO y CYAN, pueden estar interviniendo en la acción tiroidea de *R. arenarum*, en relación con las alteraciones encontradas durante la metamorfosis (Brodeur et al., 2023 y Capítulo 5). En este caso, el retraso en el desarrollo y la disminución en la proporción de individuos que lograron finalizar la metamorfosis, por parte de los individuos expuestos, nos permite reportar evidencia de que la alteración tiroidea puede suceder tanto en exposiciones individuales como en mezclas binarias de insecticidas que incluyeron un NEO y una DIA. Contrario a lo que venimos documentando en trabajos anteriores, los efectos aquí descritos ocurrieron desde la llegada al E39, esto, pudo deberse a que los renacuajos fueron expuestos en un estadio más avanzado (E35) y en el que normalmente los niveles de las HT están en ascenso (Thambirajah et al., 2019). Es importante, que posteriores trabajos puedan determinar el accionar intrínseco de los insecticidas NEO y DIA sobre la acción tiroidea en el desarrollo metamórfico en anuros y el

alcance que pueden llegar a representar cuando son expuestos de forma individual y en mezcla.

En ambientes acuáticos naturales, se ha identificado que las mezclas de NEO pueden representar efectos sinérgicos que ponen en riesgo a la biodiversidad y a sus dinámicas ecológicas (Schmidt et al., 2022), esto, y su frecuente detección en zonas agrícolas ha impulsado el uso de las DIA (Raby et al., 2022). Es así, como las detecciones de esta clase de insecticidas en aguas superficiales han aumentado en diversas partes del mundo incluida la Argentina (CDPR 2019; Jayasiri et al., 2022; Stinson et al., 2022; Brodeur et al., comunicación personal). Con el fin de seguir conociendo el riesgo que representan los NEO y DIA en especies de anuros autóctonos de la región pampeana, hemos identificado que la exposición individual y en mezcla a una concentración ambiental, altera el desarrollo metamórfico de *R. arenarum*, y que, además, rasgos como el peso y la capacidad de salto de los juveniles se ven significativamente afectados por la mezcla. Lo reportado tras la exposición a las mezclas binarias de esta clase de insecticidas representan los primeros reportes en anuros. Es importante seguir investigando el alcance que pueden tener estos efectos en las poblaciones naturales y el mecanismo por el que puede verse alterado la acción tiroidea, debido a que seguimos aumentando la evidencia de que la exposición de los insecticidas NEO y DIA de forma individual y en mezcla altera su función. Asimismo, el estudio del desarrollo metamórfico en anuros tras la exposición a plaguicidas es un aspecto esencial en la evaluación de riesgo, por lo que es esencial conocer el alcance que pueden tener en otras especies.

7. CONCLUSIONES

Argentina es conocida a nivel mundial, como uno de los países líderes en la producción y exportación de productos agrícolas (Maydana et al., 2020). Entre las áreas más productivas se encuentra la región pampeana, quien soporta el 60% del total de la producción agropecuaria nacional (Pórfido., 2014). La alta productividad ha sido posible con la implementación de semillas transgénicas y el alto uso de plaguicidas (Oerke., 2005; Kahl y Kleisinger., 2016).

Entre los tipos de plaguicidas más utilizados se encuentran los insecticidas, quienes son los segundos con mayor aplicación en el país (Pórfido., 2014). En ese sentido, los neonicotinoides (NEO) y las diamidas antranilicas (DIA) representan unas de las principales familias de insecticidas con mayor uso (Anguiano y Ferrari., 2019), siendo el tiametoxam (TIA) e imidacloprid (IMI) en el caso de los NEO y el clorantraniliprol (CLO) y ciantraniliprol (CIAN) en el caso de las DIA, las sustancias más comercializadas (Anguiano y Ferrari., 2019). El ingreso de estas moléculas en cuerpos de aguas superficiales es uno de los riesgos más importantes, debido a la contaminación y a los efectos que pueden tener sobre la fauna acuática (Gaona et al., 2019; Stadlinger et al., 2018).

Entre los organismos acuáticos más sensibles a la exposición de plaguicidas se encuentran los anfibios, en especial en aquellas especies con estadios larvales (Bishop et al., 2012; Wagner y Viertel., 2017). De acuerdo con esto y debido a la falta de información sobre el efecto de los insecticidas en especies de anfibios autóctonos, se desarrolló el presente trabajo de tesis, con el fin de contribuir al conocimiento sobre el impacto de las familias de insecticidas de los NEO y de las DIA, en especies de renacuajos de anuros autóctonos de la región pampeana argentina, mediante una evaluación ecotoxicológica que incluyó, la exposición aguda (96 horas) y subcrónica de las especies con los insecticidas TIA, IMI, CLO y CIAN.

En particular, las exposiciones subcrónicas se realizaron hasta la culminación de la metamorfosis del sapo común *Rhinella arenarum*, con concentraciones ambientales de los insecticidas de manera individual y en sus mezclas binarias, con el fin de simular un escenario natural de exposición y poder determinar los efectos que ocurren en etapas críticas del

desarrollo como lo es la metamorfosis (Stoks et al., 2022). Además de poder generar y aportar valores de ecotoxicidad de los compuestos, para que puedan ser utilizados en las evaluaciones de riesgos reglamentarias requeridas en el registro de plaguicidas (Boivin y Poulsen., 2017), que, en este caso, correspondería al eventual re-registro de los insecticidas NEO y DIA aprobados en argentina.

Se conoce que una evaluación de riesgo se realiza mediante la relación entre la concentración ambiental prevista del compuesto (**PEC**-Predicted Environmental Concentration) y la concentración prevista sin efecto del compuesto (**PNEC**-Predicted No Effect Concentration) (Martins et al., 2012; Iturburu et al., 2019). De esta forma, los valores de ecotoxicidad correspondientes a la: concentración letal 50 (**CL50**), concentración sin efecto observado (**NOEC**-No Observed Effect Concentration) y la concentración más baja con efecto observado (**LOEC**-lowest observed effect concentration), obtenidos en este trabajo podrán ser utilizados para el cálculo de **PNEC** (Amiard y Amiard-Triquet., 2015; Iturburu et al., 2019; Carriquiriborde et al., 2021).

En ese sentido, los primeros valores de ecotoxicidad que se obtuvieron fueron los correspondientes a la toxicidad aguda (CL50) de los NEO, TIA e IMI y las DIA, CLO y CIAN en tres especies de anfibios autóctonos de argentina (Tabla 2.2 y Tabla 3.2). Las CL50 no representaron un peligro de letalidad directa en estadios larvales de *Rhinella arenarum*, *Rhinella fernandezea* y *Scinax granulatus* y los valores fueron consecuentes con los reportes ya existentes (Tabla 2.1 y Tabla 3.1). En el caso de IMI de acuerdo con la relación especie/estadio/formulado comercial ó /ingrediente activo, los valores de toxicidad aguda obtenidos en este trabajo con *R. arenarum* en estadio (E) 25 y E27 y *S. granulatus* en E25 resultaron ser los más altos registrados hasta la fecha (Tabla 2.2 vs Tabla 2.1). Por otra parte, las CL50 reportadas en este trabajo con los insecticidas TIA, CLO y CIAN son los primeros en obtenerse en especies de anfibios autóctonos de argentina.

La exposición subcronica de *R. arenarum* con los insecticidas NEO y DIA durante la metamorfosis (MET), permitió conocer el impacto que tienen sobre el tiempo que requirieron los individuos para finalizar la MET y la proporción de individuos que lograron completarlo. Además de evaluar el impacto que la exposición causó sobre rasgos aptitudinales en los

juveniles, como el peso, largo y la capacidad de salto. Determinando así, las variables más sensibles o afectadas por la exposición específica de los insecticidas.

La determinación de los efectos de los NEO en concentraciones ambientales sobre la metamorfosis de *R. arenarum*, permitió analizar que los individuos fueron más sensibles a la exposición con TIA (capítulo 4 y capítulo 6). De esta forma, con TIA, obtuvimos el LOEC más bajo registrado hasta la fecha para anfibios autóctonos (1,01 µg/L), correspondiente al retraso significativo que tuvieron los individuos durante la finalización de la metamorfosis (MET) (capítulo 4). Previo a este trabajo, registros detallaron que la exposición con TIA no impactaba negativamente la MET de *Lithobates sylvaticus* y *Lithobates pipiens* especies de anfibios autóctonos de Canadá (Robinson et al, 2017; 2019). Entre los rasgos aptitudinales evaluados, fue la capacidad de salto el parámetro más sensible en los individuos juveniles de *R. arenarum* (LOEC de 11 µg/L) (Capítulo 6). Lee-Jenkins y Robinson (2018), reportó que la exposición con 1, 10 y 100 µg/L de TIA no impactaba en el rendimiento locomotor en juveniles de *Lithobates sylvaticus*. Este trabajo, representa el primer registro de efectos del TIA en parámetros comportamentales en juveniles de anfibios autóctonos.

El impacto de IMI sobre la MET de anfibios autóctonos ha tenido un mayor reporte (Robinson et al., 2017; Danis y Marlatt, 2021; Thompson et al., 2022). En este trabajo, encontramos que la exposición de IMI en *R. arenarum* afectó tanto el tiempo de MET como la proporción de individuos que completaron el desarrollo (capítulo 6). Sin embargo, frente a los datos existentes, reportamos el LOEC más bajo hasta la fecha (i.e. 35 µg IMI/L), que correspondió a la disminución de individuos que completan la MET.

El desarrollo de los capítulos 5 y 6 son los primeros reportes acerca del impacto de las DIA en concentraciones ambientales sobre la MET y rasgos aptitudinales de anfibios autóctonos. Entre los resultados más interesantes se destaca que CLO y CIAN afectaron de manera similar la MET de *R. arenarum*, aunque los individuos resultaron ser más sensibles a la exposición con CLO. De esta forma, CLO causó un retraso en la finalización de la MET y una disminución de los individuos que lograron completar el desarrollo (LOEC de 5 µg/L y NOEC de 50 µg/L, respectivamente). Además, los juveniles tuvieron una menor capacidad de salto (45 µg/L). En el caso de CIAN, los individuos se encontraron acelerados, es decir, requirieron de un menor tiempo para finalizar la MET y, además, ocurrió una disminución

de los individuos que completaron el desarrollo (NOEC de 500 $\mu\text{g/L}$ y 50 $\mu\text{g/L}$, respectivamente)

El desarrollo del capítulo 6, representó un primer acercamiento a la exposición realista (en campo) de los insecticidas en poblaciones naturales de anfibios autóctonos. Se obtuvieron los primeros reportes de efectos tras la exposición de mezclas binarias con TIA (5,5 $\mu\text{g/L}$), IMI (17,5 $\mu\text{g/L}$) y CLO (22,5 $\mu\text{g/L}$) en concentraciones ambientales sobre la MET y rasgos aptitudinales del sapo común *R. arenarum*. Hasta el momento se conocía un único registro previo que evaluó el efecto de la mezcla binaria CLO-IMI en un organismo acuático, correspondiente a individuos del pez *Pimephales promelas* (Stinson et al., 2022). Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos son los primeros en reportarse, detallamos que las mezclas binarias (TIA-IMI) (CLO-TIA) (CLO-IMI) retrasaron la MET y disminuyeron la proporción de individuos que completaron el desarrollo en *R. arenarum*, al igual que ocurrió con la exposición individual de los insecticidas. Asimismo, rasgos aptitudinales como el peso y capacidad de salto de los juveniles se vieron significativamente afectados en las mezclas binarias con TIA-IMI y CLO-TIA.

Teniendo en cuenta los valores de ecotoxicidad obtenidos a lo largo del presente trabajo, al comparar los efectos individuales de los insecticidas en *R. arenarum*, se pudo determinar que nuestra especie modelo fue más sensible a la exposición con TIA durante la metamorfosis y que al estar expuesto en mezcla con IMI o con CLO los efectos sobre los juveniles se ven potenciados. Esto indica que concentraciones ambientales de los insecticidas TIA, IMI y CLO (Wang et al., 2022; Jayasiri et al 2022; Stinson et al., 2022), representan un riesgo para los anfibios autóctonos. En la literatura se encuentra descrito que, en un mayor número de casos la exposición a plaguicidas ocasiona un retraso en la metamorfosis de anfibios (Stoks et al., 2022). De acuerdo con nuestros resultados, es posible que *R. arenarum* sea más sensible a la prolongación de su desarrollo metamórfico en presencia de TIA y CLO. En algunos casos se cree que un retraso en el desarrollo puede ser una estrategia de adaptación para evitar tener metamorfos de menor tamaño (Thompson and Popescu., 2021; Stoks et al., 2022), sin embargo, pueden existir riesgos de depredación o la imposibilidad de completar su desarrollo, en especies que se reproducen en estanques efimeros (Mann et al., 2009), como es el caso de nuestra especie modelo (Natale., 2006). En anfibios, rasgos como la edad y el

tamaño de la metamorfosis intervienen en la aptitud de los adultos (Earl and Whiteman., 2015; Székely et al., 2020). En este caso, la capacidad de salto de los juveniles fue el rasgo aptitudinal más sensible tras la exposición con los insecticidas TIA y CLO. Efecto que se vio potenciado negativamente en las dos mezclas binarias con TIA, (TIA-CLO) y (TIA-IMI). La mezcla TIA-IMI, obtuvo además los metamorfos con menor tamaño. Esto podría tener consecuencias ecológicas en las poblaciones naturales, debido a que el efecto está directamente relacionado a la capacidad de huida y sobrevivencia de los individuos (James et al., 2005; Bi et al., 2023).

Los efectos de los NEO y las DIA sobre la metamorfosis de *R. arenarum* fueron registrados entre el estadio 39 y estadio 42. Se estima que el impacto sobre el desarrollo de los individuos fue ocasionado por la alteración de la función tiroidea por la exposición con los insecticidas. Teniendo en cuenta que en anuros el avance de la metamorfosis sucede bajo el estricto control de las hormonas tiroideas (HT) entre los estadios 34 y 42 (Thambirajah et al., 2019). Se espera que en futuros estudios se pueda evaluar la acción específica de los insecticidas en la alteración de la función tiroidea en *R. arenarum*.

Finalmente, los resultados obtenidos a partir de esta tesis determinan que el estudio sobre la metamorfosis es una etapa del desarrollo de los anfibios sensible y adecuada para la evaluación de los efectos de los plaguicidas en organismos acuáticos. Se pudo contribuir con un nuevo conocimiento científico sobre los efectos de los insecticidas NEO y DIA en el desarrollo de los anfibios autóctonos. Siendo esta, información de base para el grupo taxonómico que cuenta con pocos datos en la literatura científica en comparación con otros grupos. Teniendo en cuenta que los efectos suceden en etapas críticas del desarrollo de los anfibios, es conveniente mitigar la presencia de los insecticidas durante el ciclo reproductivo de las especies. Se espera que los resultados puedan ser considerados y adoptados por los organismos reguladores encargados de realizar las respectivas evaluaciones de riesgo de los plaguicidas autorizados en argentina.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Agostini, M. G., Roesler, C. I. 2011. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax granulatus* (Peters, 1871): distribution extension in central Argentina. *Journal of species lists and distribution*. ISSN 1809-127X (online edition)

Agostini, M. G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A. E., Bilenca, D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation*, 241, 108355.

Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C. 2015. Conventional risk assessment of environmental contaminants. In *Aquatic ecotoxicology* (pp. 25-49). Academic Press.

Anguiano, O. L., & Ferrari, A. (2019). Riesgo ecotoxicológico de plaguicidas utilizados en Argentina. *Universidad Nacional del Comahue*. Buenos Aires, Argentina, 63.

Arias, A. H., Buzzi, N. S., Pereira, M. T., Marcovecchio, J. E. 2011. Pesticides reaching the environment as a consequence of inappropriate agricultural practices in Argentina. *Pesticides-formulations, effects, fate*, 307, 532-537.

Arias-Andrés, M., Rämö, R., Mena Torres, F., Ugalde, R., Grandas, L., Ruepert, C., Castillo, L. E., Van den Brink, P. J., Gunnarsson, J. S. 2018. Lower tier toxicity risk assessment of agriculture pesticides detected on the Río Madre de Dios watershed, Costa Rica. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 13312-13321.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., García-Río, L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, ecosystems & environment*, 123(4), 247-260.

Aronzon, C. M., Svartz, G. V., Perez Coll, C. S. 2016. Joint toxicity of copper and diazinon during embryonic and larval development of the common South American toad, *Rhinella arenarum*. *Chemistry and Ecology*, 32(9), 829-842.

ASTM. 1998. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-xenopus (FETAX). Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing Materials E1439– E1498.

Astor, E., Márquez, T., Huber, A., De Scals, D., Goñi, J. M. 2009. Clorantraniliprole: un insecticida innovador perteneciente a la nueva familia química de las diamidas antranílicas. *Phytohemeroteca*, 212.

Bahl, M. F., Brodeur, J. C., Costa, C. S., D'Andrea, M. F., Sansiñena, J. A., Marino, D. J., Natale, G. S. 2021. Lethal and sublethal effects of the natural and healthy spinosad-based formulation Tracer™ on tadpoles of two neotropical species. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 13524-13535.

Baker, N. J., Bancroft, B. A., Garcia, T. S. 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of the total environment*, 449, 150-156.

Barbee, G. C., McClain, W. R., Lanka, S. K., Stout, M. J. 2010. Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice–crayfish cropping systems. *Pest Management Science*, 66(9), 996-1001.

Barry, J. D., Portillo, H. E., Annan, I. B., Cameron, R. A., Clagg, D. G., Dietrich, R. F., Watson, L. J., Leighty, R. M., Ryan, D. L., McMillan, J. A., Swain, R. S., Kaczmarczyk, R. A. 2014. Movement of cyantraniliprole in plants after foliar applications and its impact on the control of sucking and chewing insects. *Pest Management Science* 71(3): 395-403

Bentley, K. S., Fletcher, J. L., Woodward, M. D. 2010. Chlorantraniliprole: An Insecticide of the Anthranilic Diamide Class. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Chapter 102: 2231-2242

Bernardos, J., Zaccagnini, M. E. 2011. El uso de insecticidas en cultivos agrícolas y su riesgo potencial para las aves en la región pampeana. *El hornero*, 26(1), 55-64.

Bi, B., Tong, J., Lei, S., Chen, D., Jin, Q., Hong, D., Wang, X., Chen, J., Zhao, S. 2023. Using Behavioral Characteristics to Design Amphibian Ladders for Concrete-Lined Irrigation Channels. *Sustainability*, 15(7), 6029.

Biggs, J., Williams, P., Whitfield, M., Nicolet, P., Brown, C., Hollis, J., Arnold, D., Pepper, T. 2007. The freshwater biota of British agricultural landscapes and their sensitivity to pesticides. *Agriculture, ecosystems & environment*, 122(2), 137-148.

Bishop, P. J., Angulo, A., Lewis, J. P., Moore, R. D., Rabb, G. B., Moreno, J. G. 2012. The Amphibian Extinction Crisis-what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? *SAPI EN. S. Surveys and Perspectives Integrating Environment and Society*, (5.2).

Boccioni, A. P. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., & Martinuzzi, C. S. 2021. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 273, 128475.

Boesten, J.J.T.I., Köpp, H., Adriaanse, P.I., Brock, T.C.M., Forbes, V.E. 2007. Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 291-308

Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N., Tapparo, A. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res* 22: 35-67

Bonmatin, J-M., Noome, D. A., Moreno, H., Mitchell, E. A.D., Glauser, G., Soumana, O. S., van Lexmond, M. B., Sanchez-Bayo, F. 2019. A survey and risk assessment of neonicotinoids in water, soil and sediments of belize. *Environmental Pollution* 249: 949-958.

Boone, M. D. 2018. An amphibian with a contracting range is not more vulnerable to pesticides in outdoor experimental communities than common species. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(10), 2699-2704.

Boorse, G. C., Denver, R. J. 2004. Expression and hypophysiotropic actions of corticotropin-releasing factor in *Xenopus laevis*. *General and comparative endocrinology*, 137(3), 272-282.

Borsuah, J. F., Messer, T. L., Snow, D. D., Comfort, S. D., Mittelstet, A. R. 2020. Literature review: Global neonicotinoid insecticide occurrence in aquatic environments. *Water*, 12(12), 3388.

Brannelly, L. A., Ohmer, M. E., Saenz, V., Richards-Zawacki, C. L. 2019. Effects of hydroperiod on growth, development, survival and immune defences in a temperate amphibian. *Functional Ecology*, 33(10), 1952-1961.

Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Rojas, D. E., Cristos, D., Vargas, C., Poliserpi, M. B., Andriulo, A. E. 2022. Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. *Environmental Research*, 204, 112354.

Brodeur, J. C. Fonseca Peña, S. V. D. 2023. Effects of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam and imidacloprid on metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum* at environmentally-relevant concentrations, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: 10.1080/15287394.2023.2213259.

Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., Sánchez, M. 2014. Synergy between glyphosate-and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 112, 70-76.

Brodeur, J. C., Sanchez, M., Castro, L., Rojas, D. E., Cristos, D., Damonte, M. J., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., Andriulo, A. E. 2017. Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere*, 185, 36-46.

Brodeur, J. C., Sassone, A., Hermida, G. N., Codugnello, N. 2013. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 10-17.

Brodeur, J. C., Svartz, G., Perez-Coll, C. S., Marino, D. J., Herkovits, J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum*

and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 161-170.

Brunelli, E., Bernabó, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., Tripepi, S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91: 135-142

Buchholz, D. R., Shi, Y-B. 2018. Dual function model revised by thyroid hormone receptor alpha knockout frogs. *General and Comparative Endocrinology* 265: 214-218

Calabrese, E. J. 2013. Hormetic mechanisms. *Critical reviews in toxicology*, 43(7), 580-606.

Calamari, D., Zhang, L. 2002. Environmental risk assessment of pesticides on aquatic life in Xiamen, China. *Toxicology Letters*, 128(1-3), 45-53.

Calvo, S., Romo, S., Soria, J., Picó, Y. 2021. Pesticide contamination in water and sediment of the aquatic systems of the Natural Park of the Albufera of Valencia (Spain) during the rice cultivation period. *Science of the Total Environment*, 774, 145009.

Caprile, A.C. 2019. Residuos de plaguicidas en la cuenca del arroyo Pergamino. Contribución de los sistemas de producción agrícola. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencia del Suelo. Buenos Aires, Argentina.

Carazo-Rojas, E., Pérez-Rojas, G., Pérez-Villanueva, M., Chinchilla-Soto, C., Chinpampillo, J. S., Aguilar-Mora, P., Alpizar-Marin, M., Masís-Mora, M., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Vryzas, Z. 2018. Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. *Environmental pollution*, 241, 800-809.

Carrasco, A. E., Sánchez, N. E., Tamagno, L. E, 2012. Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. AUGM- Comité de Medio Ambiente, Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva America Latina. ISSN 2314-1743.

CASAFE Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes -Argentina. Guía online de productos fitosanitarios. 2022.

Carriquiriborde, P., Amé, M. V., Anguiano, O. L., Cazenave, J., Demetrio, P. M., Eissa, B. L., Ferrari, A., Gagnetten, A. M., Laborde, M. R R., Larramendy, M. L., Lo Nostro, F. L., Menone, M. L., Miglioranza, K. S. B., Monserrat, J. M., Ossana, N. A., Peluso, M. L., Regaldo, L., Rimodi, F., Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Somoza, G. M. 2021. Principios de ecotoxicología. Libro de catedra 1ra edición, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. EDULP Editorial de la UNLP

Casillas, A., de la Torre, A., Navarro, I., Sanz, P., Martinez, M de los A. 2022. Environmental risk assessment of neonicotinoids in surface water. *Science of the Total Environment* 809: 151161.

Cavallaro, M. C., Main, A. R., Liber, K., Phillips, I. D., Headley, J. V., Peru, K. M., Morrissey, C. A. 2019. Neonicotinoids and other agricultural stressors collectively modify aquatic insect communities. *Chemosphere*, 226, 945-955.

CDPR California Department of Pesticide Regulation. 2019. Surface Water Monitoring for Pesticides in Agricultural Areas in the Central Coast and Southern California. 6 pag

Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monit. Zool. Ital. Monogr.* 2, Nuova Serie, Firenze, Italia.

Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., Jiang, H. 2020. Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 10286-10295.

Chaudhary, V. K., Arya, S., Singh, P. 2021. Effects of pesticides on biodiversity and climate change. 2021. *International Journal on Environmental Sciences*. 11 (2): 95-99

Chen, J., Xue, L., Wei, R., Liu, S., Yin, C. C. 2019. The insecticide chlorantraniliprole is a weak activator of mammalian skeletal ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *Biochemical and biophysical research communications*, 508(2), 633-639.

Cheron, M., Brischoux, F. 2020. Aminomethylphosphonic acid alters amphibian embryonic development at environmental concentrations. *Environmental Research*, 190, 109944.

Choi, J., Ishizuya-Oka, A., Buchholz, D. R. 2017. Growth, Development, and Intestinal Remodeling Occurs in the Absence of Thyroid Hormone Receptor α in Tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology* 158(6): 1623-1633

Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., Zanella, R. 2018. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of the total environment*, 626, 737-743.

Corcoran, S., Metcalfe, C. D., Sultana, T., Amé, M. V., Menone, M. L. 2020. Pesticides in surface water in argentina monitored using polar organic chemical integrative samplers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 104: 21-26

Cordova, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J. S., Lahm, G. P., Selby, T. P., Stevenson, T. M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D. F., Wu, L., Smith, R. M., Tao, Y. 2006. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(3), 196-214.

Costantini, D. 2022. For better or worse: benefits and costs of transgenerational plasticity and the transhormesis hypothesis. In *Development Strategies and Biodiversity: Darwinian Fitness and Evolution in the Anthropocene* (pp. 37-49). Cham: Springer International Publishing.

Craddock, H. A., Huang, D., Turner, P. C., Quiròs-Alcalà, L., Payne-Sturges, D. C. 2019. Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999-2015. *Environmental Health* 18:7

Crespi, E. J., Warne, R. W. 2013. Environmental conditions experienced during the tadpole stage alter post-metamorphic glucocorticoid response to stress in an amphibian. *Integrative and comparative Biology*. Vol 53-6: 989:1001

Cui, F., Chai, T., Qian, L., Wang, C. 2017. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 169, 107-116.

Danis, B.E.G., Marlatt, V.L. 2021. Investigating Acute and Subchronic Effects of Neonicotinoids on Northwestern Salamander Larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 80:691–707.

De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J. L. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107: 423-431

Denver, R. J. 2009. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology* 164: 20-31

Denver, R. J. 2021. Stress hormones mediate developmental plasticity in vertebrates with complex life cycles. *Neurobiology of Stress*, 14, 100301.

De Souza, R. M., Seibert, D., Quesada, H. B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M. R., Bergamasco, R. 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection*, 135, 22-37.

Del Conte, E., Sirlin, J. L. 1952. Pattern series of the first embryonic stages in *Bufo arenarum*. *The Anatomical Record*, 112(1), 125-135.

Desai, B., Parikh, P. 2014. Behavioural responses to acute exposure of Imidacloprid and Curzate on *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *International Journal of Open Scientific Research*, 2(1), 1-12.

Earl, J. E., Whiteman, H. H. 2015. Are commonly used fitness predictors accurate? A meta-analysis of amphibian size and age at metamorphosis. *Copeia*, 103(2), 297-309.

EFSA European Food Safety Authority. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorantraniliprole. EFSA Journal 11(6): 3143

EFSA European Food Safety Authority. 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyantraniliprole. EFSA Journal 12(9): 3814

EFSA European Food Safety Authority., Crivellente, F., Hart, A., Hernandez-Jerez, A. F., Bennekou, S. H., Pedersen, R., Terron, A., Wolterink, G., Mohimont, L. 2019. Establishment of cumulative assessment groups of pesticides for their effects on the thyroid. EFSA Journal, 17(9).

Egan, N., Stinson, S. A., Deng, X., Lawler, S. P., Connon, R. E. 2023. Swimming Behavior of *Daphnia magna* Is Altered by Pesticides of Concern, as Components of Agricultural Surface Water and in Acute Exposures. *Biology*, 12(3), 425.

El Euony, O. I., Elblehi, S. S., Abdel-Latif, H. M., Abdel-Daim, M. M., El-Sayed, Y. S. 2020. Modulatory role of dietary *Thymus vulgaris* essential oil and *Bacillus subtilis* against thiamethoxam-induced hepatorenal damage, oxidative stress, and immunotoxicity in African catfish (*Clarias garipenus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 23108-23128.

El Okle, O. S., Lebda, M. A., Tohamy, H. G. 2016. Thiamethoxam- Induced Biochemical, Hormonal and Histological Alterations in Rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* 8(5): 320-325

Elfikrie, N., Ho, Y. B., Zaidon, S. Z., Juahir, H., Tan, E. S. S. 2020. Occurrence of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers in Tenggi River Basin, Malaysia. *Science of the Total Environment* 712: 136540.

Ensley, S. M. 2018. Neonicotinoids. In *Veterinary toxicology* (pp. 521-524). Academic Press.

Etkin W. 1936. The phenomena of the anuran metamorphosis. III. The development of the thyroid gland. *Journal of Morphology*, 59: 68–89.

Etkin W. 1968. Hormonal control of amphibian metamorphosis. In W Etkin and LJ Gilbert (Ed.), *Metamorphosis: A problem in developmental biology*, 313–348. Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56: 457–463.

Fabrezi, M., Quinzio, S., Goldberg, J., De Sá, R. O. 2012. The development of *dermatonotus muelleri* (anura: microhylidae: gastrophryinae). *Journal of Herpetology*, 46(3), 363-380.

Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56:457–463.

Figueiredo, J., Rodrigues, D de J. 2014. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. *Herpetological Journal* 24: 7-15

Finnegan, M. C., Baxter, L. R., Maul, J. D., Hanson, M. L., Hoekstra, P. F. 2017. Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), 2838-2848.

Fonseca Peña, S. V. D., Brodeur, J. C. 2023. Toxicity and effects on anuran tadpole metamorphosis of the anthranilic diamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-16.

Fonseca Peña, S. V. D., Natale, G. S., Brodeur, J. C. 2022. Toxicity of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam and imidacloprid to tadpoles of three species of South American amphibians and effects of thiamethoxam on the metamorphosis of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. Vol 85:1019-1039. <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2147113>

Freitas, J. S., da Silva Pinto, T. J., Yoshii, M. P. C., da Silva, L. C. M., de Palma Lopes, L. F., Ogura, A. P., Giroto, L., Montagner, C. C., de Oliveira Goncalves Alho, L., Gebara, R. C., Schiesari, L., Espíndola, E. L. G. 2022. Realistic exposure to fipronil, 2, 4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. *Environmental Pollution*, 299, 118894.

Gallardo, J.M. Varela de Olmedo, E. 1992. Anfíbios de la República Argentina: Ecología y comportamiento. *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina*, 41: 1-116

Gaona, L., Bedmar, F., Gianelli, V., Faberi, A. J., Angelini, H. 2019. Estimating the risk of groundwater contamination and environmental impact of pesticides in an agricultural basin in Argentina. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 6657-6670

Gavel, M.J., Richardson, S.D., Dalton, R.L., Soos, C., Ashby, B., McPhee, L., Forbes, M.R., Robinson, S.A. 2019. Effects of 2 Neonicotinoid Insecticides on Blood Cell Proliferation and Corticosterone Concentrations of Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 38 (6): 1273-1284.

Gavel, M.J., Young, S.D., Dalton, R., Soos, C., McPhee, L., Forbes, M.R., Robinson, S.A. 2021. Effects of two pesticides on northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) stress metrics: Blood cell proliferation and corticosterone concentrations. *Aquat. Toxicol.* 235:105820.

Gervasi, S. S., Fougopoulos, J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, 22(1), 100-108.

Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 103-118.

Gomez, M. L., Zaracho, V. H., Sandoval, M. T. 2016. Desarrollo embrionario-larval y metamorfosis de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae). *Revista veterinaria*, 27(1), 21-27.

Gondim, P. M., Rodrigues, J. F. M., Cascon, P. 2020. Fluctuating asymmetry and organosomatic indices in anuran populations in agricultural environments in semi-arid Brazil. *Herpetol. Conserv. Biol.* 15:354–66.

Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.

Greenwood, S. N., Belz, R. G., Weiser, B. P. 2022. A conserved mechanism for hormesis in molecular systems. *Dose-Response*, 20(3), 15593258221109335.

Hadiatullah, H., Zhang, Y., Samurkas, A., Xie, Y., Sundarraj, R., Zuilhof, H., Qiao, J., Yuchi, Z. 2022. Recent progress in the structural study of ion channels as insecticide targets. *Insect Science*, 29(6), 1522-1551.

Hamer, A. J., Makings, J. A., Lane, S. J., Mahony, M. J. 2004. Amphibian decline and fertilizers use don agricultural land in south-eastern Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 102: 299-305

Haremaki, T., Weinstein, D. C. 2012. Eif4a3 is required for accurate splicing of the *Xenopus laevis* ryanodine receptor pre-mRNA. *Developmental biology*, 372(1), 103-110.

Hassan, H. F., Mohammed, H. S., Meligi, N. M. 2021. Potential impact of marjoram on coaragen- induced physiological and histological alterations in male albino rats. *Egyptian Journal of Zoology* 75: 25-38

Hayes, T. B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 921-933.

Hernández, A. F., Gil, F., Lacasaña, M. 2017. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of toxicology*, 91, 3211-3223.

Hill, C. E., Myers, J. P., Vandenberg, L. N. 2018. Nonmonotonic dose–response curves occur in dose ranges that are relevant to regulatory decision-making. *Dose-Response*, 16(3), 1559325818798282.

Hladik, M.L., Main, A.R., Goulson, D. 2018. Environmental risk and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environ. Sci. Tech.* 52:3329-3335.

Holtswarth, J. N., Rowland, F. E., Puglis, H. J., Hladik, M. L., Webb, E. B. 2019. Effects of the neonicotinoid insecticide clothianidin on southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) tadpole behavior. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 103, 717-722.

Hunt, L., Bonetto, C., Marrochi, N., Scalise, A., Fanelli, S., Liess, M., Lydy, M. J., Chiu, M. C., Resh, V. H. 2017. Species at Risk (SPEAR) index indicates effects of insecticides on stream invertebrate communities in soy production regions of the Argentine Pampas. *Science of the Total Environment*, 580, 699-709.

Hussain, A., Audira, G., Malhotra, N., Uapipatanakul, B., Chen, J. R., Lai, Y. H., Huang, J. C., Chen, K. H. C., Lai, H. T., Hsiao, C. D. 2020. Multiple screening of pesticides toxicity in zebrafish and daphnia based on locomotor activity alterations. *Biomolecules*, 10(9), 1224.

Ibrahim, K., El-Desouky, M., Abou-Yousef, H., Gabrownny, K., El-Sayed, A. 2015. Imidacloprid and/or Esfenvalerate Induce Apoptosis and Disrupt Thyroid Hormones in Neonatal Rats. 10. 106-112. 10.5829/idosi.gjbb.2015.10.03.1121.

Islam, M. A., Hossen, M. S., Sumon, K. A., Rahman, M. M. 2019. Acute toxicity of imidacloprid on the developmental stages of common carp *Cyprinus carpio*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 11, 244-251.

Iturburu, F. G., Calderon, G., Amé, M. V., Menone, M. L. 2019. Ecological Risk Assessment (ERA) of pesticides from freshwater ecosystems in the Pampas region of Argentina: Legacy and current use chemicals contribution. *Science of the Total Environment*, 691, 476-482.

IUCN. 2022. The IUCN red list of threatened species. Version 2021-3. <https://www.iucnredlist.org>

James, R. S., Wilson, R. S., de Carvalho, J. E., Kohlsdorf, T., Gomes, F. R., Navas, C. A. 2005. Interindividual differences in leg muscle mass and pyruvate kinase activity correlate with interindividual differences in jumping performance of *Hyla multilineata*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(5), 857-867.

Jayasiri, M.M.J.G.C.N., Yadav, S., Dayawansa, N.D.K., Propper, C. R., Kumar, V., Singleton, G. R. 2022. Spatio-temporal analysis of water quality for pesticides and other agricultural pollutants in *Deduru Oya* river basin of Sri Lanka. *Journal of Cleaner Production* 330: 129897

Jenkins, J.A., Hartop, K.R., Bukhari, G., Howton, D.E., Smalling, K.L., Mize, S.V., Hladik, M.L., Johnson, D., Draugelis-Dale, R.O., Brown, B.L. 2021. Juvenile african clawed frogs (*Xenopus laevis*) express growth, metamorphosis, mortality, gene expression and metabolic changes when exposed to thiamethoxam and clothianidin. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 13291.

Jipsa, J. R., Logaswamy, S. 2013. Effect of an insecticides chlorantraniliprole on some biochemical characteristics of fish *Labeo rohita*. *International Journal for Life Science and Educational Research*, 1(3), 128-130.

Jobbágy, E. G., Aguiar, S., Piñeiro, G., Garibaldi, L. A. 2021. Impronta ambiental de la agricultura de granos en Argentina: revisando desafíos propios y ajenos. *CH Volumen 29 número 173- Pag 55-64*.

Kahl, M., Kleisinger, G. 2016. Compatibilidad de mezclas de tanque de glifosato + 2,4-D sal amina en distintas concentraciones y en escala reducida. *Serie Extensión INTA Paraná 79:19-23*.

Kenko, D. B. N., Tchamadeu, N. N., Ngealekeleoh, F., Nchase, S. 2017. Ecotoxicological effects of imidacloprid and lambda-cyhalothrin (insecticide) on tadpoles of the African common toad, *Amietophrynus regularis* (Reuss, 1833) (Amphibia: Bufonidae). *Emerging Science Journal*, 1(2), 49–53

Kerle E.A., Jenkins J.J., Vogue P.A. 2007. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. *Oregon State Univ Extension Service*, EM8561-E.

Kikuyama, S., Hasunuma, I., Okada, R. 2021. Development of the hypothalamo–hypophyseal system in amphibians with special reference to metamorphosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 524, 111143.

Kikuyama, S., Okada, R., Hasunuma, I., Nakada, T. 2019. Some aspects of the hypothalamic and pituitary development, metamorphosis, and reproductive behavior as studied in amphibians. *General and Comparative Endocrinology*, 284, 113212.

Kocamaz, D., Oruc, E. 2018. Assessment of synergistic toxicity two commercial pesticides, thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, on total antioxidant/oxidant status, oxidative stress index and somatic indices in different tissues of tilapia. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(4), 2312-2319.

Köhler, H. R., Triebkorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *science*, 341(6147), 759-765.

Kohli, A. K., Lindauer, A. L., Brannelly, L. A., Ohmer, M. E., Richards-Zawacki, C., Rollins-Smith, L., Voyles, J. 2019. Disease and the drying pond: examining possible links among drought, immune function, and disease development in amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 92(3), 339-348.

Kolupaeva, V. N., Kokoreva, A. A., Belik, A. A., Pletenev, P. A. 2019. Study of the behavior of the new insecticide cyantraniliprole in large lysimeters of the Moscow State University. *Open Agriculture 4: 599-607*

Kulkarni, S. S., Buchholz, D. R. 2014. Corticosteroid signaling in frog metamorphosis. *General and comparative endocrinology*, 203, 225-231.

Kumar, N., Kushwah, A. S., Gupta, S. 2021. Effect of pH on Persistence and Degradation of Cyantraniliprole in Aqueous Media. *Pesticide Research Journal Vol 33*: 18-24

Kumar, R., Sankhla, M. S., Kumar, R., Sonone, S. S. 2021. Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(3), 10131-10140.

Kundoo, A. A., Dar, S. A., Mushtaq, M., Bashir, Z., Dar, M. S., Gul, S., Ali, M. T., Guizar, S. 2018. Role of neonicotinoids in insect pest management: A review. *J. Entomol. Zool. Studies* 6(1): 333-339.

Lahm, G. P., Selby, T. P., Freudenberger, J. H., Stevenson, T. M., Myers, B. J., Seburyamo, G., Smith, B. K., Flexner, L., Clark, C. E., Cordova, D. 2005. Insecticidal anthranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15: 4898-4906

Lalonde, B., Garron, C. 2020. Temporal and Spatial Analysis of Surface Water Pesticide Occurrences in the Maritime Region of Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 79(1): 12-22

Larson, J. L., Redmond, C. T., Potter, D. A. 2012. Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. *Pest Management Science*, 68(5), 740-748.

Larson, J. L., Redmond, C. T., Potter, D. A. 2013. Assessing insecticide hazard to bumble bees foraging on flowering weeds in treated lawns. *PLoS one*, 8(6), e66375.

Lavtizar, V., van Gestel, C. A.M., Dolenc, D., Trebse, P. 2014. Chemical and photochemical degradation of chlorantraniliprole and characterization of its transformation products. *Chemosphere* 95: 408-414

Lee-Jenkins, S.S., Robinson, S.A. 2018. Effects of Neonicotinoids on Putative Escape Behavior of Juvenile Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) Chronically Exposed as Tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 37(12): 3115-3123.

Liu, Y., Zhang, H., He, F., Li, X., Tan, H., Zeng, D. 2018. Combined toxicity of chlorantraniliprole, lambda-cyhalothrin, and imidacloprid to the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 22598-22605.

Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L., Pinheiro, C., Ribeiro, F., Soares, A. M. 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of

action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1716-1726.

Mac Loughlin, T. M., Peluso, M. L., Marino, D. J.G. 2022. Multiple pesticides occurrence, fate, and environmental risk assessment in a small horticultural stream of Argentina. *Science of the Total Environment* 802: 149893

Macagnan, N., Rutkoski, C. F., Kolcenti, C., Vanzetto, G. V., Macagnan, L. P., Sturza, P. F., Hartmann, P. A., Hartmann, M. T. 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(25), 20699-20704.

Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A., Widmer, H. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science* 57: 906-913

Maloney, E. M., Morrissey, C. A., Headley, J. V., Peru, K. M., Liber, K. 2017. Cumulative toxicity of neonicotinoid insecticide mixtures to *Chironomus dilutus* under acute exposure scenarios. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(11), 3091-3101.

Maloney, E. M., Morrissey, C. A., Headley, J. V., Peru, K. M., Liber, K. 2018. Can chronic exposure to imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam mixtures exert greater than additive toxicity in *Chironomus dilutus*?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 354-365.

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(11), 2903-2927.

Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S., Miaud, C. 2006. Toxicity of PAHs and jelly protection of eggs in the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 472-475.

Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., Marques, C. R. 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 1167-1176.

Martori, R., Aun, L., Birri, A., Rozzi Giménez, C., Heredia, E. 2010. Reproducción comparada de tres especies de anuros sintópicos de una localidad del sudeste de Córdoba. *Cuadernos de Herpetología*, 18.

Maydana, G., Romagnoli, M., Cunha, M., Portapila, M. 2020. Integrated valuation of alternative land use scenarios in the agricultural ecosystem of a watershed with limited available data, in the Pampas region of Argentina. *Science of the Total Environment*, 714, 136430.

McClelland, S. J., Woodley, S. K. 2022. Developmental exposure to trace concentrations of chlorpyrifos results in nonmonotonic changes in brain shape and behavior in amphibians. *Environmental Science & Technology*, 56(13), 9379-9386.

McDiarmid, R. W., Altig, R. (Eds.). 1999. Tadpoles: the biology of anuran larvae. University of Chicago Press. Illinois.

McMahon, T. A., Boughton, R. K., Martin, L. B., Rohr, J. R. 2017. Exposure to the herbicide atrazine nonlinearly affects tadpole corticosterone levels. *Journal of Herpetology*, 51(2), 270-273.

Menon, M., Mohanraj, R. 2018. Toxicity of neonicotinoid pesticide imidacloprid and impediment of ecosystem services. *Russian Agricultural Sciences*, 44, 171-176.

Miles, J. C., Hua, J., Sepulveda, M. S., Krupke, C. H., Hoverman, J. T. 2017. Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. *PloS one*, 12(3), e0174171.

Ministerio de Economía Argentina. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP). Monitor de Estimaciones Agrícolas – series históricas. 2022.

Miranda, L. A., Pisanó, A. 1996. Estudio Morfométrico Sobre el Desarrollo y Evolución de las Glándulas Tiroideas durante la Metamorfosis de *Bufo arenarum*. *Cuadernos de Herpetología* 10(1-2): 4757

Moe T. A. 2017. Sub-lethal and lethal effects of a neonicotinoid pesticide on the development of Northern leopard frog tadpoles. MSc thesis. Northern Michigan University, Marquette, MI, USA

Mohanty, B., Pandey, S. P., Tsutsui, K. 2017. Thyroid disrupting pesticides impair the hypothalamic-pituitary-testicular axis of a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Reproductive Toxicology*, 71, 32-41.

Mojiri, A., Zhou, J. L., Robinson, B., Ohashi, A., Ozaki, N., Kindaichi, T., Farraji, H., Vakili. 2020. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. *Chemosphere* 253: 126646

Mondal, A. K., Goswami, K., Ghosh, S., Pal, S., Mukherjee, A. K., Samanta, P., Kole, D., Ghosh, A. R. 2019. Toxicity Analysis of Ferterra (Chlorantraniliprole 0.4% GR) on Tilapia (*Oreochromis niloticus* (Linn.): Histological and Ultrastructural Observations. In *Proc. Zool. Soc.* (pp. 1-13).

Montaña, C. G., Silva, S. D. G. T. M., Hagyar, D., Wager, J., Tiegs, L., Sadeghian, C., Schriever, T. A., Schalk, C. M. 2019. Revisiting “what do tadpoles really eat?” A 10-year perspective. *Freshwater Biology* 00: 1-14

Montico, S., Di Leo, N. C. 2021. Riesgo de contaminación del acuífero freático con plaguicidas en la cuenca del arroyo Ludeña, Argentina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 8(2): e2688.

Montiel-León, J. M., Muñoz, G., Duy, S. V., Do, D. T., Vaudreuil, M-A., Goery, K., Guillemette, F., Amyot, M., Sauvé, S. 2019. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution* 12397

Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, Matthias., Cavallaro, M.C., Liber, Karsten. 2015. Neonicotinoid contamination of global Surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment international* 74: 291-303

Mullins, J. W. 1993. Imidacloprid A new Nitroguanidine Insecticide. *Pest Control With Enhanced Environmental Safety*. Chapter 13. 183-198

Munaron, D., Mérigot, B., Derolez, V., Tapie, N., Budzinski, H., Fiandrino, A. 2023. Evaluating pesticide mixture risks in French Mediterranean coastal lagoons waters. *Science of The Total Environment*, 867, 161303.

Nagaraju, B., Hagos, Z. 2016. Residue confirmation in vital tissues of the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sublethal concentration of Chlorantraniliprole. *Int. J. Biol. Technology*, 7(1), 7-10.

Nagaraju, B., Hagos, Z., Babu, K. R., Krishnan, G., Chaitanya, K., Teka, Z., Weletnsae, T. 2017. Effect of an insecticide chlorantraniliprole on biochemical characteristics of snakehead fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Scientific Studies & Research. Series Biology/Studii si Cercetari Stiintifice. Seria Biologie*, 26(2).

Nagaraju, B., Rathnamma, V. V. 2013. Acute toxicity of chlorantraniliprole to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Adv. Zool. Bot* 1:78–82. doi:10.13189/azb.2013.010402.

Naiel, M. A., Ismael, N. E., Abd El-hameed, S. A., Amer, M. S. 2020. The antioxidative and immunity roles of chitosan nanoparticle and vitamin C-supplemented diets against imidacloprid toxicity on *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 523, 735219.

Natale, G. S. 2006. Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Nations, U. 2019. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). United Nations: New York, NY, USA.

Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Edge, C., Houlihan, J., Trudeau, V. L. 2012. Expression profiles of metamorphosis-related genes during natural transformations in tadpoles of wild Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Canadian journal of zoology*, 90(9), 1059-1071.

Nieuwkoop P. D., Faber, J. 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2nd ed. North Holland Publ. CO., Amsterdam

Nowell, L. H., Moran, P. W., Schmidt, T. S., Norman, J. E., Nakagaki, N., Shoda, M. E., Mahler, B. J., Van Metre, P. C., Stone, W. W., Sandstrom, M. W. Hladik, M. L. 2018. Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern US streams. *Science of the Total Environment*, 613, 1469-1488.

O'Brien, D., Lewis, S., Davis, A., Gallen, C., Smith, R., Turner, R., Warne, M., Turner, S., Caswell, S., Mueller, J. F., Brodie, J. 2016. Spatial and temporal variability in pesticide exposure downstream of a heavily irrigated cropping area: application of different monitoring techniques. *Journal of agricultural and food chemistry* (64) (20): 3975-3989

Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Gninenko, Y. I., Zaitsev, A. S., Nyadar, P. M., Adeyemi, T. A. 2015. A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55(3).

Odetti, L. M., Chacón, C. F., Siroski, P. A., Simoniello, M. F., Poletta, G. L. 2023. Effects of glyphosate, 2, 4-D, chlorantraniliprole, and imidacloprid formulations, separately and in mixtures in *Caiman latirostris* hatchlings. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 469, 116544.

OECD, 1992. Guideline for Testing of Chemicals, 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD, Paris, France.

Oerke EC. 2005. Crop losses to pests. *The Journal of Agriculture Science* 144:31–43

Pandey, N., Rana, D., Chandrakar, G., Gowda, G. B., Patil, N. B., Pandi G, G. P., Annamalai, M., Pokhare, S. S., Rath, P.C., Adak, T. 2020. Role of climate change variables (standing water and rainfall) on dissipation of chlorantraniliprole from a simulated rice ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 205: 111324

Pandey, S.P., Mohanty, B. 2015. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere* 122:227-234.

Pandey, S. P., Mohanty, B. 2017. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on co-exposures to dithiocarbamate and neonicotinoid pesticides: Study in a wildlife bird, *Amandava amandava*. *NeuroToxicology* 60: 16-22

Panigo, D. H. E., Bellone, M. D. R. F., Roggio, M. A., Carezzano, F. 2022. Análisis morfométrico de poblaciones larvales de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) provenientes de ambientes con distinto nivel de perturbación antropogénica del centro de Argentina. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*, 17(1), 9-18.

Paul, P., Sterner, Z. R., Buchholz, D. R., Shi, Y-B., Sachs, L. M. 2022. Thyroid and Corticosteroid Signaling in Amphibian Metamorphosis. *Cells* 11: 1595

Pauli, B. D., Coulson, D. R., Berrill, M. 1999. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic® 240 LV insecticide following single or double exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(11), 2538-2544.

Pavlaki, M. D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A. M. 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 99-110.

Pawar, P., Bhilave, M. P. 2019. Effect of insecticide Chlorantraniliprole on hematological profile of fingerlings of freshwater fish *Cirrhinus Mrigala*. *Intl J Res Anal Rev*, 6, 982-989.

Pawar, P. V., Bhilave, M. P. 2020. Impact of novel insecticide chlorantraniliprole on alkaline phosphatase activity in freshwater fish *cirrhinus mrigala*, *inter. J. Sci. Technol*, 9, 2992-2995.

Pawar, P. V., Bhilave, M. P. 2021. Effect of chlorantraniliprole exposure on total protein content in freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences*, 18(2), 218-218.

Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernandez, J. C., Cabagna, M. C., Attademo, A. M., Bassó, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 185-197.

Peluso, J., Aronzon, C. M., Chehda, A. M., Boccioni, A. P. C., Peltzer, P. M., De Geronimo, E., Aparicio, V., Gonzalez, F., Valenzuela, L., Lajmanovich, R. C. 2022. Environmental quality and ecotoxicity of sediments from the lower Salado River basin (Santa Fe, Argentina) on amphibian larvae. *Aquatic Toxicology*, 253, 106342.

Pengue, W. A. 2014. Cambios y escenarios en la agricultura argentina del siglo XXI. Panel de Recursos UNEP.

Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., Costa, J. L. 2017. Spatial and temporal trends and ow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (12): 3206-3216.

Pérez, D.J., Iturburu, F.G., Calderon, G., Oyesqui, L.A.E., DeGeronimo, E., Aparicio, V.C. 2021. Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed landuse basin of the Pampas región, Argentina. *Chemosphere* 263:128061.

Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based

insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104: 120–126.

Pochini, K.M., Hoverman, J.T. 2017. Reciprocal effects of pesticides and pathogens on amphibian hosts: The importance of exposure order and timing. *Environ. Poll.* 221: 359-366.

Pórfido, O. D. 2014, *Los plaguicidas en la República Argentina*. Ministerio de Salud de la Nación: Buenos Aires. 1ª ed. 192 p.

Qadir, S., Latif, A., Ali, M., Iqbal, F. 2014. Effects of imidacloprid on the hematological and serum biochemical profile of *Labeo rohita*. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(4).

Raby, M., Lissemore, L., Kaltenecker, G., Beaton, D., Prosser, R. S. 2022. Characterizing the exposure of streams in southern Ontario to agricultural pesticides. *Chemosphere*, 294, 133769.

Rathnamma, V. V., Nagaraju., B. 2013. Median lethal concentrations (LC50) of chlorantraniliprole and its effects on behavioral changes in freshwater fish *Labeo rohita*. *Int. J. Public. Health* 2:137–42. doi:10.11591/ijphs.v2i4.4208.

Rathnamma, V. V., Nagaraju., B. 2014a. Acute toxicity and histopathological changes in freshwater fish *Cirrhinus mrigala* exposed to chlorantraniliprole. *J.Zool. Stud* 1:23–30.

Rathnamma, V. V., Nagaraju., B, 2014b. Oxidative stress induced by chlorantraniliprole in various tissues of freshwater fish *Ctenopharyngodon idella*. *J. Med. Sci. Public Health* 221:27.

Redman, Z. C., Anastasio, C., Tjeerdema, R. S. 2020. Quantum Yield for the Aqueous Photochemical Degradation of Chlorantraniliprole and Simulation of Its Environmental Fate in a Model California Rice Field. *Environmental Toxicology and Chemistry Vol 39*: 19291935.

Reffstrup, T. K., Larsen, J. C., Meyer, O. 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 56(2), 174-192.

Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., Frede, H. G. 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground-and surface water and their effectiveness; a review. *Science of the total environment*, 384(1-3), 1-35.

Relyea, R. A., Diecks, N. 2008. An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological applications*, 18(7), 1728-1742.

Remucal, C. K. 2014. The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides: a review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(4), 628-653.

Rico, A., Arenas-Sánchez, A., Pasqualini, J., García-Astillero, A., Cherta, L., Nozal, L., Vighi, M. 2018. Effects of imidacloprid and a neonicotinoid mixture on aquatic invertebrate communities under Mediterranean conditions. *Aquatic Toxicology*, 204, 130-143.

Robinson, S. A., Richardson, S.D., Dalton, R. L., Maisonneuve, F., Trudeau, V.L., Pauli, B.D., Lee-Jenkins, S.Y. 2017. Sublethal effects on wood frogs chronically exposed to environmentally relevant concentrations of two neonicotinoid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(4): 1101-1109.

Robinson, S.A., Gavel, M.J., Richardson, S.D., Chlebak, R.J., Milotic, D., Koprivnikar, J., Forbes, M.R. 2019. Sub-chronic exposure to a neonicotinoid does not affect susceptibility of larval leopard frogs to infection by trematode parasites, via either depressed cercarial performance or host immunity. *Parasitology Research* 118 (9): 2621-2633.

Robinson, S. A., Chlebak, R. J., Young, S. D., Dalton, R. L., Gavel, M. J., Prosser, R. S., Bartlett, A., de Solla, S. R. 2021. Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. *Environmental pollution*, 284, 117149.

Rodney, S. I., Teed, R. S., Moore, D. R. 2013. Estimating the toxicity of pesticide mixtures to aquatic organisms: a review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 19(6), 1557-1575.

Rodrigues, A. C., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M.V.M., Pestana, J. L. 2015. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 508, 506-513.

Rodrigues, A. C., Henriques, J. F., Domingues, I., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M.V.M., Pestana, J. L. 2016. Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquatic Toxicology*, 170, 371-376.

Roelants, K., Gower, D. J., Wilkinson, M., Loader, S. P., Biju, S. D., Guillaume, K., Moriau, L., Bossuyt, F. 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 887-892.

Rosado-Berrios, C. A. 2018. Water Quality Assessment of the Lower Cache and the Bayou DeVew Rivers, Arkansas: An Assessment of Nutrients, Sediment, Lead, and Acute Toxicity of Acephate and Thiamethoxam. Arkansas State University.

Rousseau, K., Dufour, S., Sachs, L. M. 2021. Interdependence of thyroid and corticosteroid signaling in vertebrate developmental transitions. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 679.

Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45: 632–639.

Saka, M., Tada, N. 2021. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. *Chemosphere* 270: 129418.

Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., Hartmann, P. A., Hartmann, M. 2022. Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific reports*, 12(1), 11926.

Sánchez-Bayo, F. 2014. The trouble with neonicotinoids. Chronic exposure to widely used insecticides kills bees and many other invertebrates. *Science* 346: 806-807

Sánchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D. 2016. Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 71.

Sánchez, L. C., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Manzano, A. S., Junges, C. M. Attademo, A. M. 2013. Reproductive activity of anurans in a dominant agricultural landscape from central-eastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 912-926

Santos, M. F., Krüger, A. P., Turchen, L. M., Cutler, G. C., Oliveira, E. E., Guedes, R. N. C. 2018. Non-targeted insecticidal stress in a pest species: insecticides, sexual fitness and hormesis in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 375-383.

Sattelle, D. B., Cordova, D., Cheek, T. R. 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience*, 8(3), 107-119.

Schmidt, T. S., Miller, J. L., Mahler, B. J., Van Metre, P. C., Nowell, L. H., Sandstrom, M. W., Carlisle, D. M., Moran, P. W., Bradley, P. M. 2022. Ecological consequences of neonicotinoid mixtures in streams. *Science Advances*, 8(15), eabj8182.

Schmidt-Jeffris, R. A., Nault, B. A. 2016. Anthranilic diamide insecticides delivered via multiple approaches to control vegetable pests: a case study in snap bean. *Journal of economic entomology*, tow219.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Selby, T. P., Lahm, G. P., Stevenson, T. M., Hughes, K. A., Cordova, D., Annan, I. B., Barry, J. D., Benner, E. A., Currie, M. J., Pahutski, T. F. 2013. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with

cross-spectrum insecticidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23: 6341-6345

Shi, J., Huber, M., Wang, T., Dali, W., Lin, Z., Chun-Sheng, Y. 2016. Progress in the studies on hormesis of low-dose pollutants. *Environmental Disease*, 1(2), 58-64.

Shuman-Goodier, M. E., Singleton, G. R., Forsman, A. M., Hines, S., Christodoulides, N., Daniels, K. D., Propper, C. R. 2021. Developmental assays using invasive cane toads, *Rhinella marina*, reveal safety concerns of a common formulation of the rice herbicide, butachlor. *Environmental Pollution*, 272, 115955.

Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., Parris, K. M. 2018. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 482-488.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., Mceland, M., Mineau, P., Mitchell, E.A., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van Der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34.

Solis, M., Bonetto, C., Marrochi, N., Paracampo, A., Mugni, H. 2018. Aquatic macroinvertebrate assemblages are affected by insecticide applications on the Argentine Pampas. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 11-16.

Solis, M., Mugni, H., Hunt, L., Marrochi, N., Fanelli, S., Bonetto, C. 2016. Land use effect on invertebrate assemblages in Pampasic streams (Buenos Aires, Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 1-12.

Song, C., Zhang, J., Hu, G., Meng, S., Fan, L., Zheng, Y., Chen, J., Zhang, X. 2019. Risk assessment of chlorantraniliprole pesticide use in rice-crab coculture systems in the basin of the lower reaches of the Yangtze River in China. *Chemosphere* 230: 440-448

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*. Vol 28 (8): 1696-1703.

Stadlinger, N., Berg, H., Van den Brink, P. J., Tam, N. T., Gunnarsson, J. S. 2018. Comparison of predicted aquatic risks of pesticides used under different rice-farming strategies in the Mekong Delta, Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 13322-13334.

Stinson, S. A., Hasenbein, S., Connon, R. E., Deng, X., Alejo, J. S., Lawler, S. P., Holland, E. B. 2022. Agricultural surface water, imidacloprid, and chlorantraniliprole result

in altered gene expression and receptor activation in *Pimephales promelas*. *Science of The Total Environment*, 806, 150920.

Stoks, R., Janssens, L., Delnat, V., Swaegers, J., Tüzün, N., Verheyen, J. 2022. Adaptive and maladaptive consequences of larval stressors for metamorphic and postmetamorphic traits and fitness. *Development Strategies and Biodiversity: Darwinian Fitness and Evolution in the Anthropocene*, 217-265.

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.

Suarez, R., Goijman, A., Cappelletti, S., Solari, L., Cristos, D., Rojas, D.E., Krug, P., Babbitt, K., Gavier-Pizarro, G. 2021. Combined effects of agrochemical contamination and forest loss on anuran diversity in agroecosystems of east-central Argentina. *Sci. Total Environ.* 759:143435.

Svartz, G. V., Wolkowicz, I. R. H., Coll, C. S. P. 2014. Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 875-881.

Sweeney, M. R., Thompson, C. M., Popescu, V. D. 2021. Sublethal, behavioral, and developmental effects of the neonicotinoid pesticide imidacloprid on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(7), 1838-1847.

Székely, D., Cogălniceanu, D., Székely, P., Armijos-Ojeda, D., Espinosa-Mogrovejo, V., Denoël, M. 2020. How to recover from a bad start: size at metamorphosis affects growth and survival in a tropical amphibian. *BMC ecology*, 20(1), 1-8.

Tata, J.R. 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246:10–20.

Temiz, O., Cogun, H. Y., Kargin, F. 2018. Influence of chlorantraniliprole toxicity on ionic regulation of gill and muscle ATPase activity of Nile fish (*Oreochromis niloticus*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(7), 5027-5032.

Thambirajah, A.A., Koide, E.M., Imbery, J.J., Helbing, C.C. 2019. Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology* doi: 10.3389/fendo.2019.00276.

Thompson, C. M., Popescu, V. D. 2021. Complex hydroperiod induced carryover responses for survival, growth, and endurance of a pond-breeding amphibian. *Oecologia*, 195(4), 1071-1081.

Thompson, C. M., Sweeney, M. R., Popescu, V. D. 2022. Carryover effects of pesticide exposure and pond drying on performance, behavior, and sex ratios in a pool breeding amphibian. *Journal of Zoology*, 317(3), 229-240.

Thompson, H. M. (1996). Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology*, 5(2), 59-81.

Thunnissen, N. W., Lautz, L. S., Van Schaik, T. W. G., Hendriks, A. J. 2020. Ecological risks of imidacloprid to aquatic species in the Netherlands: Measured and estimated concentrations compared to species sensitivity distributions. *Chemosphere*, 254, 126604.

Tiryaki, O., Temur, C. 2010. The Fate of Pesticide in the Environment. *J. Biol. Environ. Sci* 4(10): 29-38

Tiwari, S., Stelinski, L. L. 2013. Effects of cyantraniliprole, a novel anthranilic diamide insecticide, against Asian citrus psyllid under laboratory and field conditions. *Pest Management Science*, 69(9), 1066–1072.

Trudeau, V. L., Thomson, P., Zhang, W. S., Reynaud, S., Navarro-Martin, L., Langlois, V. S. 2020. Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Molecular and cellular endocrinology*, 513, 110861.

Truhaut, R. 1969. Intervención oral en la reunión “International Council of Scientific Unions” (ICSU). Estocolmo.

Truong, K. M., Pessah, I. N. 2019. Comparison of chlorantraniliprole and flubendiamide activity toward wild-type and malignant hyperthermia-susceptible ryanodine receptors and heat stress intolerance. *Toxicological Sciences*, 167(2), 509-523.

Tuelher, E. S., da Silva, E. H., Freitas, H. L., Namorato, F. A., Serrão, J. E., Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E. 2017. Chlorantraniliprole-mediated toxicity and changes in sexual fitness of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of pest science*, 90, 397-405.

Uçkun, M., Özmen, M. 2021. Evaluating multiple biochemical markers in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to the pesticides thiacloprid and trifloxystrobin in single and mixed forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40-10: 2846–2860

USEPA., 2008. Pesticide fact sheet, chlorantraniliprole. United States environment protection agency, office of prevention, pesticides and toxic substances. <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/chlorantraniliprole.pdf>. Accessed on 1 July, 2010

USEPA, U.S. Environmental Protection Agency. 2012. Pesticides: reregistration. (<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>).

Utami, R. R., Geerling, G. W., Salami, I. R.S., Notodarmojo, S., Ragas, M.J. 2020. Environmental prioritization of pesticide in the Upper Citarum River Basin, Indonesia, using predicted and measured concentrations. *Science of The Total Environment*. Vol 738: 140130

Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, V. C., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F. R., Ingaramo, M del R., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J. N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, R., Moreno, L., Natale, G. S., Perez Iglesias, J. M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C., Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología*, 26, 131-159.

Van der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bijleveld van Lexmond, M. F., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C. A., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., van Praagh, J., Whitehorn, P. R., Wiemers, M. 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 148-154.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R. Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., Myers, J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 33:378–455

Veedu, S. K., Ayyasamy, G., Tamilselvan, H., Ramesh, M. 2022. Single and joint toxicity assessment of acetamiprid and thiamethoxam neonicotinoids pesticides on biochemical indices and antioxidant enzyme activities of a freshwater fish *Catla catla*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 257, 109336.

Vela, N., Pérez-Lucas, G., Navarro, M. J., Garrido, I., Fenoll, J., Navarro, S. 2017. Evaluation of the Leaching Potential of Anthranilamide Insecticides Through the Soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 99: 465-469

Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., Pechen De D'Angelo, A. M. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4), 167-186.

Vieira, D. C., Noldin, J. A., Deschamps, F. C., Resgalla Jr, C. 2016. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. *Chemosphere*, 162, 48-54.

Villaamil Lepori, E. C., Bovi Mitre, G., Nasseta, M. 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Vol 29, pp. 25-43.

Virto, I., Imaz, M. J., Fernández-Ugalde, O., Gartzia-Bengoetxea, N., Enrique, A., Bescansa, P. 2014. Soil degradation and soil quality in Western Europe: Current situation and future perspectives. *Sustainability*, 7(1), 313-365.

Wang, J., Yin, R., Liu, Y., Wang, B., Wang, N., Xiao, P., Xiao, T., Hirai, H. 2022. Metaanalysis of neonicotinoid insecticides in global surface waters. *Environ. Sci. Poll. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22270-y>.

Wang, Y., Xu, P., Chang, J., Li, W., Yang, Lu, Tian, H. 2020. Unraveling the toxic effects of neonicotinoid insecticides on the thyroid endocrine system of lizards. *Environ. Poll.* 258:113731.

Wang, Y., Yang, G., Dai, D., Xu, Z., Cai, L., Wang, Q., Yu, Y. 2016. Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 4528-4536.

Wagner, N., Lötters, S., Veith, M., Viertel, B. 2015a. Acute toxic effects of the herbicide formulation Focus® Ultra on embryos and larvae of the Moroccan painted frog, *Discoglossus scovazzi*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 69, 535-544.

Wagner, N., Lötters, S., Veith, M., & Viertel, B. 2015b. Acute toxic effects of the herbicide formulation and the active ingredient used in cycloxydim-tolerant maize cultivation on embryos and larvae of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94, 412-418.

Wagner, N., Viertel, B. 2017. The Use of Aquatic Life-stages of European Amphibians in Toxicological Studies. In *Ecotoxicology and Genotoxicology* (pp. 371-406).

Wei, L., Shao, W-W., Ding, G-H., Fan, X-L., Yu, M-L., Lin, Z-H. 2014. Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Zoological Research* 35: 272-279

Wei, L., Shao, W-W., Lin, Z-H. 2021. Effects of Four Individual Pesticides and their Pairwise Combinations on the Survival and Growth of the Tadpoles of Two Anuram Species. *Pakistan J. Zool.* 1-10

Wesner, J., Kraus, J. M., Henry, B., Kerby, J. 2020. Metamorphosis and the impact of contaminants on ecological subsidies. *Contaminants and Ecological Subsidies: The Land-Water Interface*, 111-125.

Wood, T.J., Goulson, D., 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:17285–17325.

Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., Wang, Y. 2018. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* 235: 470481.

Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., Chang, Z. 2016. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 132-139.

Xu, C., Fan, Y., Zhang, X., Kong, W., Miao, W., Li, Q. X. 2020. DNA damage in liver cells of the tilapia fish *Oreochromis mossambicus* larva induced by the insecticide cyantraniliprole at sublethal doses during chronic exposure. *Chemosphere*, 238, 124586.

Yang, G., Lv, L., Di, S., Li, X., Weng, H., Wang, X., Wang, Y. 2020. Combined toxic impacts of thiamethoxam and four pesticides on the rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 5407-5416.

Yi, X., Zhang, C., Liu, H., Wu, R., Tian, D., Ruan, J., Zhang, T., Huang, M., Ying, G. 2019. Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China. *Environmental Pollution* 251: 892900.

Zacharia, J. T. 2011. Identity, physical and chemical properties of pesticides. *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, 1-18.

Zhang, C., Hu, X., Zhao, H., Wu, M., He, H., Zhang, C., Tang, T., Ping, L., Li, Z. 2013. Residues of cyantraniliprole and its metabolite J9Z38 in rice field ecosystem. *Chemosphere*. Vol 93:190-195

Zhang, J-M., Chai, W-G., Wu, Y-L. 2012. Residues of chlorantraniliprole in rice fields ecosystem. *Chemosphere* 87: 132-136

Zhelev, Z., Tsonev, S., Boyadzhiev, P. 2022. Using of fluctuating asymmetry in adult *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Anura: Ranidae) meristic traits as a method for assessing developmental stability of population and environmental quality of their habitat: Industrial area in southern Bulgaria. *Turk. J. Zool* 46 (2):220–27.

Zhou, X., Deng, Y., Wang, R., Wang, F., Cui, H., Hu, D., Lu, P. 2023. Toxic effects of imidacloprid and sulfoxaflor on *Rana nigromaculata* tadpoles: Growth, antioxidant indices and thyroid hormone-related endocrine system. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(6), 104723.