

Toxicidad del herbicida oxadiazon en larvas de *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864) Toxicity of the herbicide oxadiazon on *Engystomops pustulosus* larvae (Cope, 1864)

Natalia Mercedes Molina-Guerrero,¹* Hugo Armando Llanos-Ramos y Germán Blanco-Cervantes

Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia

*Autor de correspondencia: nataly.151992@gmail.com

Recibido: 09 de noviembre de 2020

Aceptado: 02 de febrero de 2021

Publicación en línea: 20 de abril de 2021

Resumen

Palabras clave:
oxadiazon; ecotoxicología;
herbicidas; efectos subletales

El herbicida oxadiazon es usado como control de malezas en Colombia; sin embargo, la aplicación de esta sustancia, al igual que la de otros herbicidas, puede afectar la fauna asociada a cuerpos de agua. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos letales, subletales, morfométricos y teratológicos en larvas de *Engystomops pustulosus* expuestas a este herbicida en tres volúmenes de hábitat. Se utilizaron larvas en estado 25 de Gosner y se expusieron durante 96 horas a tres volúmenes de hábitat (40, 200 y 1000 mL) y tres concentraciones del herbicida, con tres réplicas para cada uno. La CL_{50} hallada para los renacuajos en un volumen de 40 mL fue 1,46 mg/L, y en 1000 mL fue de 1,5 mg/L. En cuanto a los efectos subletales, las anomalías quietud prolongada y cola curvada fueron frecuentes en todos los volúmenes (de 27 % a 70 % y de 37 % a 43 %, respectivamente). Aun así, el análisis de regresión no mostró relación entre la variación del volumen y la aparición de anomalías ($p > 0,05$). En cambio, el desarrollo corporal de los renacuajos está relacionado con el volumen ($p < 0,05$), debido a que en volúmenes mayores se observan renacuajos con tallas superiores (3,10-3,25 mm, aproximadamente) en comparación con los depositados en un menor volumen (2,92-2,97 mm, aproximadamente), indistintamente de la concentración aplicada. Se concluye que el herbicida oxadiazon es tóxico para los volúmenes de 40 mL y 1000 mL (CL_{50} 1,46 mg/L y 1,5 mg/L) y que no existe una relación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre el volumen y la aparición de las anomalías en los organismos expuestos, pero sí hay una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el volumen y el desarrollo morfométrico.

Abstract

Key words:
oxadiazon; ecotoxicology;
herbicide; sublethal effects

The herbicide oxadiazon is used as weed control in Colombia; however, the application of this substance, like other herbicides, can affect the fauna associated with bodies of water. The objective was to evaluate the lethal, sublethal, morphometric and teratological effects in *Engystomops pustulosus* larvae exposed to this herbicide in three habitat volumes. Gosner stage 25 larvae were used and exposed for 96 hours to three volumes of habitat (40, 200 and 1000 mL) and three concentrations of the herbicide, with three replicates for each one. The LC_{50} found for the tadpoles in a volume of 40 ml was 1.46 mg / L and in 1000 ml it was 1.5 mg / L. Regarding the sublethal effects, the abnormalities of prolonged quiet and curved tail were frequent in all volumes (from 27 % to 70 % and from 37 % to 43 %, respectively), even so, the regression analysis did not show a relationship between the volume variation and the appearance of abnormalities ($p > 0.05$). On the other hand, the body development of the tadpoles is related to the volume ($p < 0.05$), because in larger volumes tadpoles with larger sizes (3.10-3.25 mm, approximately) are observed compared to the deposited in a smaller volume (2.92-2.97 mm, approximately), regardless of the applied concentration. It is concluded that the herbicide Oxadiazon is toxic for volumes of 40 mL and 1000 mL (LC_{50} 1.46 mg / L and 1.5 mg / L) and that there is no statistically significant relationship ($p > 0.05$) between the volume and the appearance of abnormalities in exposed organisms, but there is a statistically significant relationship ($p < 0.05$) between volume and morphometric development.

Introducción

La transformación del sector agrícola ha sido notable en los últimos años debido al crecimiento en la demanda de alimentos y a las estrategias para incrementar la producción (Diez de Ulzurrun, 2013). Considerando que las malezas compiten con el cultivo por los nutrientes y afectan su crecimiento (Menalled, 2010), se han adoptado distintos métodos de control, entre ellos el control químico a través de herbicidas en gran número de cultivos (Diez de Ulzurrun, 2013) por ser económicos (Menalled, 2010), aumentar el rendimiento y la producción (Aktar *et al.*, 2009), reducir el trabajo manual y adaptarse al tiempo y a las necesidades del cultivo (Diez de Ulzurrun, 2013).

Sin embargo, el control químico genera impactos en el ambiente (Menalled, 2010) porque las malezas generan resistencia, lo que conlleva a un aumento en las dosis y aplicaciones por cultivo (Fischer y Valverde, 2010). Además, el uso de agroquímicos en cultivos provoca daños en el suelo, disminuye la cantidad de organismos benéficos presentes en este, contamina las fuentes hídricas y afecta no solo al organismo que se quiere controlar, sino también a aquellos que no eran objetivo como aves, peces, mamíferos y anfibios, causándoles la muerte o disminuyendo sus capacidades supervivencia (Aktar *et al.*, 2009; Boudh y Singh, 2019; Agostini *et al.*, 2020).

En Colombia el sector agropecuario ha incrementado su producción, lo que supone una mayor cantidad de hectáreas cultivadas y, por ende, una mayor cantidad de agroquímicos para su mantenimiento. Particularmente, el cultivo de arroz pasó de 117708,8 a 126221,2 hectáreas a nivel nacional en el segundo semestre del año 2018 y de 951,8 a 1336,3 hectáreas en el departamento del Magdalena durante el segundo semestre del 2019, lo que representa un incremento de aproximadamente el 7,2 % y el 40,4 % respectivamente (Ministerio de Agricultura, 2020).

De acuerdo al registro nacional de plaguicidas químicos de uso agrícola publicado por el Instituto Nacional Agropecuario (ICA), de los aproximadamente 2558 plaguicidas registrados, 1336 pueden ser usados en arroz; de estos, 117 corresponden a herbicidas, de los cuales 44 tienen como ingrediente activo el oxadiazon (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019).

El oxadiazon fue reglamentado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) mediante Resolución 00913 del 2018 (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, 2018). Este

elemento, cuyo nombre químico según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) es 5-tert-butil-3-(2,4-dicloro-5-isopropoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona, pertenece al grupo de los oxadiazoles, tiene poca solubilidad en agua, es persistente en suelos y agua, y está catalogado como extremadamente tóxico para organismos acuáticos (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, 2018).

Se utiliza para el control de malezas gramíneas y de hoja ancha, es sistémico y bloquea el proceso de fotosíntesis al inhibir la enzima cloroplástica protoporfirinógeno oxidasa (PPO). Así pues, las malezas tratadas con oxadiazon presentan clorosis en hojas y tallos y, posteriormente, necrosis (Diez de Ulzurrun, 2013). Asimismo, estudios han demostrado que el oxadiazon reduce el número de esporas de hongos micorrizales, afecta el crecimiento de algas y es tóxico para las abejas (Aktar *et al.*, 2009). Mesléard *et al.* (2016), por su parte, compararon su efecto solo y combinado con el insecticida alfacipermetrina en huevos, larvas y renacuajos premetamórficos de la especie *Pelophylax perezii*, confirmando su efecto letal en renacuajos al aplicar estos agroquímicos, solos o combinados.

Una de las especies que podrían estar expuestas al efecto del oxadiazon es *Engystomops pustulosus* o rana túngara (figura 1), un anfibio de amplia distribución que ha sido reportado en cultivos de arroz (Acuña-Vargas, 2016; Triana-Velásquez *et al.*, 2017). En Colombia, concretamente, se reporta en los departamentos de Antioquia, Caldas, Caquetá, Cesar, Córdoba, Chocó, La Guajira, Magdalena, Santander y Tolima, en un rango altitudinal que va desde los 0 hasta 1540 m.s.n.m. (Ospina y Bedoya-Cañón, 2018).



Figura 1. Ejemplar de *Engystomops pustulosus*

La aplicación de herbicidas como el oxadiazon es una práctica generalizada en los cultivos de arroz, principalmente para el control de malezas. Sin embargo, los estudios sobre su

impacto en los anfibios en estados premetamórficos parecen estar restringidos a otras moléculas como el glifosato (Hena-Muñoz, 2014), el propanil (Triana-Velásquez *et al.*, 2016) y la cipermetrina (Triana-Velásquez *et al.*, 2017), en donde además no se considera la densidad poblacional como factor.

La exposición de renacuajos a agroquímicos puede generar efectos letales, subletales y teratológicos en los individuos. Algunos de los efectos subletales y teratológicos más comunes incluyen natación irregular, quietud prolongada e inmovilidad, y además los renacuajos pueden presentar edemas en distintas partes del cuerpo, cola curvada o anomalías axiales, anomalías intestinales y disminución en el número de queratodotes (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019). En este trabajo se evaluó el efecto tóxico del oxadiazon en larvas de *E. pustulosus* en estados premetamórficos, en condiciones de laboratorio, teniendo en cuenta la densidad poblacional y considerando los efectos teratológicos y los cambios comportamentales y morfométricos producidos por el herbicida.

Materiales y métodos

Especie de estudio

La evaluación de toxicidad del herbicida oxadiazon se realizó con organismos premetamórficos de *E. pustulosus* en el Laboratorio de Fisiología Animal y Vegetal de la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. Se siguieron los protocolos establecidos por el comité de ética de dicha institución educativa para el uso de animales.

Los ejemplares de *E. pustulosus* utilizados para los ensayos de toxicidad se obtuvieron recolectando la masa de huevos (cuatro masas de huevos aproximadamente) en el sector de Puerto Mosquito (11°10'26" N, 74°10'37" W a 80 m de altitud), en la cuenca baja del río Gaira. La vegetación predominante en la zona es la de monte espinoso tropical (Me-T), el promedio multianual de temperatura es de 28,2 °C, y el de precipitación es 448 mm (Noriega *et al.*, 2011; Tamaris-Turizo, 2018). El muestreo se realizó durante los meses de enero y febrero del año 2020.

Las puestas fueron recolectadas en horas de la mañana, y en el sitio de recolección se tomaron los valores de temperatura, pH y dureza. Las puestas fueron introducidas en bolsas plásticas Ziploc® y transportadas al Laboratorio de Biología y Fisiología Animal de la Universidad del Magdalena, donde se mantuvieron en agua en tanques plásticos de 10 L hasta que los individuos alcanzaron el estadio 25 según la escala Gosner (1960). Posteriormente, se seleccionaron individuos al azar para ser utilizados en el ensayo.

Montaje del ensayo

El ensayo de toxicidad se realizó en condiciones de laboratorio, aplicando un diseño completamente al azar con combinación factorial para las concentraciones del herbicida y los volúmenes del recipiente. Los individuos fueron depositados en recipientes plásticos de 40 mL, 200 mL y 1000 mL y expuestos durante 96 horas a tres concentraciones del herbicida oxadiazon (Moiss 250 EC) (1 mg/L, 1,5 mg/L y 2 mg/L) y a una de control (0 mg/L), con tres repeticiones para cada una, para un total de 36 unidades experimentales. No hubo recambio de agua, y los recipientes se llenaron con diluciones del herbicida en agua destilada según la concentración evaluada.

En cada recipiente se colocaron 10 larvas, de manera que se usaron 30 por cada concentración (0 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 2 mg/L) en cada volumen (40 mL, 200 mL y 1000 mL), para un total de 360 larvas en todo el experimento. La densidad de renacuajos fue de 250 renacuajos/L en los recipientes de 40 mL, 50 renacuajos/L en los de 200 mL y 10 renacuajos /L en los de 1000 mL. Se evaluaron distintos volúmenes teniendo en cuenta que la densidad poblacional, junto con otros factores, puede influir en la respuesta del organismo (Díaz *et al.*, 2004).

Evaluación de efectos letales

Tan pronto se realizó la dilución del herbicida por concentraciones, se depositaron las larvas de *E. pustulosus* en los recipientes plásticos y se observaron durante 96 horas. Todas ellas fueron revisadas a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, y en cada revisión se midieron el pH y la temperatura de todos los recipientes con un tester de pH/temperatura pHep®4, marca Hanna HI 98127. Para observar a los individuos se empleó un estereoscopio marca Nikon modelo SMZ 745, y se contabilizó el número de individuos muertos para determinar los efectos letales del herbicida (Murialdo, 2016). Posteriormente, estos fueron retirados de los recipientes.

Evaluación de efectos subletales y teratológicos

Para determinar los efectos subletales se tuvieron en cuenta los cambios morfológicos y el desempeño locomotor en cada individuo (Arenas-Rodríguez, 2014). Las larvas observadas al estereoscopio se revisaron buscando anomalías (despigmentación, edema, cola curvada), hemorragias (caudal, cefálica, abdominal) y cambios comportamentales (natación irregular y quietud prolongada). Se contabilizaron los casos en que se presentaron cambios subletales y se mantuvieron en los recipientes.

Análisis morfométrico

Se realizó un registro fotográfico para una evaluación morfométrica mediante el programa *ImageJ* (Cortés y De Dulce, 1996; Triana-Velásquez *et al.*, 2016). Para el análisis morfométrico se tuvieron en cuenta la longitud corporal total (LT), la longitud de la cola (LC), la longitud del cuerpo (C) y el ancho del cuerpo (AC) de los organismos experimentales. Estas mediciones se tomaron al iniciar el experimento (0 horas) y al concluirlo (96 horas), y se compararon entre tratamientos y volúmenes (Henao-Muñoz, 2014).

Análisis estadístico

A la temperatura y al pH se les aplicó una prueba de correlación de Spearman mediante el programa Statgraphics Centurion XVII.II (Díaz-Báez *et al.*, 2004). Por su parte, la toxicidad del herbicida oxadiazon se determinó calculando los valores de concentración letal media CL₅₀ mediante el método probit, con intervalos de confianza al 95 % para cada volumen mediante el análisis gráfico (Peraza y Delgado-Blas, 2012) en el programa Statgraphics. Además, se calcularon los valores de NOEC y LOEC (Díaz-Báez *et al.*, 2004; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

Para la evaluación de efectos subletales se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con el tratamiento y el volumen como factores (Arenas-Rodríguez, 2014), y al análisis morfométrico se le aplicó una prueba de análisis multivariado de varianza (MANOVA), tomando como factores la concentración y el volumen. Además, se hicieron análisis ANOVA factoriales (Henao-Muñoz, 2014). Para estos propósitos se utilizó el software Rstudio, versión 1.3.959 (R Core Team, 2020).

Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores de temperatura y pH a las 24 y 96 horas en los tres volúmenes evaluados. Estos parámetros se encuentran relacionados con el paso de las horas (Spearman, $p < 0,05$). En relación con la toxicidad del herbicida oxadiazon en larvas de *E. pustulosus*, la tabla 2 muestra el porcentaje de mortalidad, los valores de CL₅₀ y los intervalos de confianza al 95 %. Como se puede apreciar, el valor de CL₅₀ para el volumen de 40 mL fue ligeramente menor (1,46 mg/L) con respecto al registrado para los 1000 mL (1,5 mg/L). Entretanto, la mortalidad en los 200 mL fue baja en comparación con los otros dos volúmenes, por lo que no se pudo calcular la CL₅₀.

Tabla 1. Media y la desviación estándar de la temperatura y el pH a las 24 y 96 horas. (*): Diferencias significativas ($p < 0,05$); (**): Diferencias altamente ($p < 0,005$).

P. físico-químicos	40 mL		200 mL		1000 mL	
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
pH	8,88*	9,65*	8,75**	9,60**	8,88**	9,98**
	(0,07)	(0,15)	(0,09)	(0,04)	(0,05)	(0,11)
T (°C)	22,73**	19,3**	23,68**	22,60**	24,36*	23,92*
	(0,90)	(0,61)	(0,47)	(0,51)	(0,47)	(0,35)

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad, los valores de CL₅₀ e intervalos de confianza al 95 % por volumen. El valor de CL₅₀ para los 200 mL no fue calculado por el programa debido a la baja mortalidad. IC: intervalo de confianza. NOEC: Concentración más alta a la cual no se observa efecto. LOEC: Concentración más baja a la que se observa efecto. (*): Diferencias significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$). T1: tratamiento 1 (1 mg/L); T2: tratamiento 2 (1,5 mg/L); T3: tratamiento 3 (2 mg/L).

Volumen (mL)	Porcentaje (%) de mortalidad por concentración			CL ₅₀	IC al 95 %	NOEC mg/L	LOEC mg/L
	T1	T2	T3				
40	0,00*	66,67*	100,00*	1,46	1,20 - 1,71	1	1,5
200	23,33	33,33	30,00	-	-	-	-
1000	23,33*	50,00*	76,67*	1,5	1,28 - 1,71	1	1,5

Efectos letales

En términos de efectos subletales, en el volumen de 40 mL se

registraron todas las anomalías evaluadas, además del cuerpo en forma de diamante en algunos individuos (figura 2 a, b, c). La mayor cantidad de anomalías en este volumen

se presentó en las concentraciones de 1,5 mg/L (T2) y 2 mg/L (T3), en donde la cola curvada (figura 2c) y la quietud prolongada fueron las más comunes respectivamente (tabla 3). Estas anomalías, junto con la despigmentación (figura 2a), presentaron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $p < 0,05$). Asimismo, el análisis de regresión dio como resultado que la concentración del herbicida incide en la despigmentación ($r = -0,78$, $p < 0,05$) y en la deformación de la cola ($r = 0,87$, $p < 0,05$). En el grupo control no se registraron anomalías.

Efectos subletales y teratológicos

En el volumen de 200 mL se presentaron todas las anomalías, excepto la hemorragia cefálica (figura 3 a,b,c) en la mayoría de las concentraciones (tabla 4). Además, no se observaron anomalías en el grupo control. Las

anomalías de mayor frecuencia de aparición fueron la cola curvada (figura 3a) y la quietud prolongada (tabla 4), como en el caso del volumen de 40 mL. No obstante, al aplicar la prueba ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$), y el análisis de regresión no mostró un efecto significativo de las concentraciones en la aparición de anomalías. Para el ensayo en 1000 mL, las anomalías más frecuentes fueron también la cola curvada y la quietud prolongada (tabla 5). De estas, solo la cola curvada presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, aunque el análisis de regresión indicó que no existe un efecto de la concentración en la aparición de esta anomalía ($p > 0,05$). Además, se observaron anomalías como despigmentación, hemorragia abdominal y cuerpo en forma de diamante (figura 4). En cuanto al grupo control, no se presentaron anomalías.

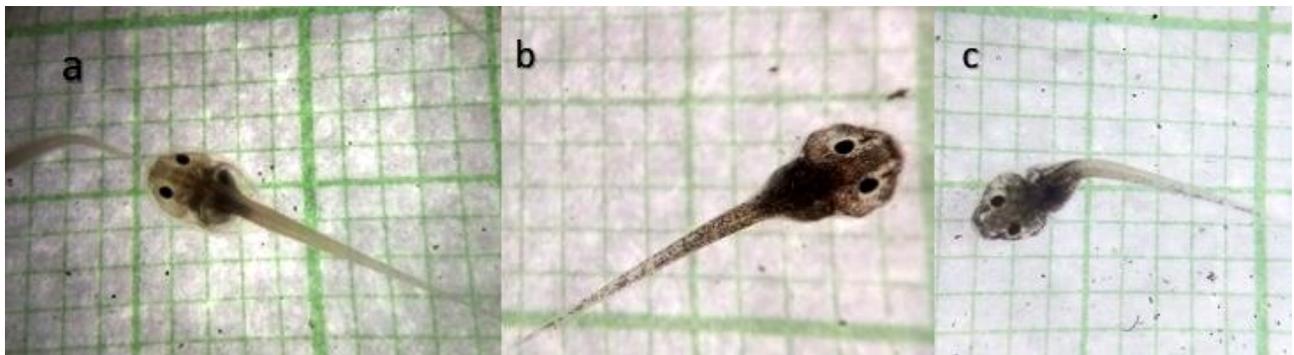


Figura 2. Anomalías observadas en renacuajos en el volumen de 40 mL. (a). Despigmentación. (b). Cuerpo en forma de diamante. (c). Cola curvada.

Tabla 3. Proporción de anomalías a los 40 mL. T1: tratamiento 1 (1 mg/L); T2: tratamiento 2 (1,5 mg/L); T3: tratamiento 3 (2 mg/L).

Anomalías	Características	T1	T2	T3
Malformación	Despigmentación	0,63	0	0
	Edema	0	0	0,03
	Cola curvada	0	0,2	0,43
Hemorragia	Caudal	0	0	0,07
	Cefálica	0	0	0,1
	Abdominal	0	0,07	0,07
Comportamiento	Natación irregular	0	0,07	0
	Quietud prolongada	0	0,7	0,27

Además del análisis anterior, se comparó cada anomalía entre volúmenes y concentraciones ensayadas mediante análisis de varianza (ANOVA) y análisis de regresión. Al realizar estos análisis no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre volúmenes y tratamientos para la despigmentación.

El análisis de regresión tampoco mostró relación entre datos (volumen: $r^2 = 0,0518$; concentración: $r^2 = 0,4253$), al igual que

para las anomalías de edemas (volumen: $r^2 = 0,125$; concentración: $r^2 = 0,05284$), cola curvada (volumen: $r^2 = 0,0006805$; concentración: $r^2 = 0,5323$), hemorragia caudal (volumen: $r^2 = 0,1332$; concentración: $r^2 = 0,3857$), hemorragia abdominal (volumen: $r^2 = 0,02292$; concentración: $r^2 = 0,378$), natación irregular (volumen: $r^2 = 0,28$; concentración: $r^2 = 0,06349$) y hemorragia cefálica (volumen: $r^2 = 0,03226$; concentración: $r^2 = 0,1875$).

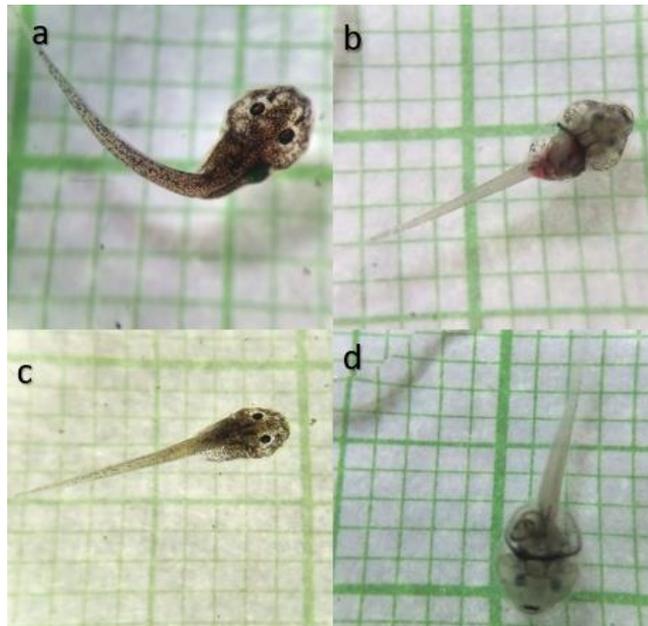


Figura 3. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 200 mL. (a). Cola curvada. (b). Hemorragia abdominal. (c). Cuerpo en forma de diamante. (d). Despigmentación.

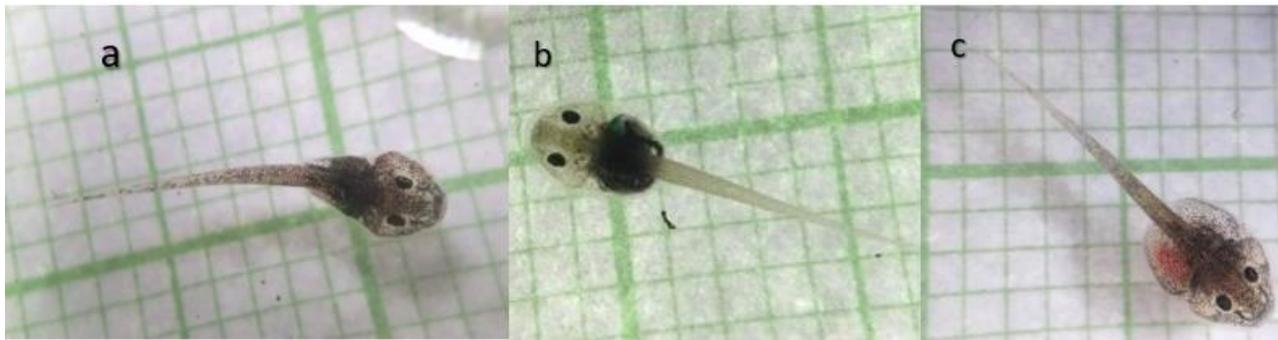


Figura 4. Anormalidades observadas en renacuajos en el volumen de 1000 mL. A. Cuerpo en forma de diamante. B. Despigmentación. C. Hemorragia abdominal.

Tabla 4. Proporción de anormalidades a los 200 mL. T1: tratamiento 1 (1 mg/L); T2: tratamiento 2 (1,5 mg/L); T3: tratamiento 3 (2 mg/L).

Anormalidades	Características	T1	T2	T3
Malformación	Despigmentación	0,07	0,23	0,13
	Edema	0,03	0,10	0,23
	Cola curvada	0,3	0	0,4
Hemorragia	Caudal	0,03	0	0,03
	Cefálica	0	0	0,13
	Abdominal	0	0	0
Comportamiento	Natación irregular	0	0	0
	Quietud prolongada	0	0	0,2

Tabla 5. Proporción de anomalías a los 1000 mL. T1: tratamiento 1 (1 mg/L); T2: tratamiento 2 (1,5 mg/L); T3: tratamiento 3 (2 mg/L).

Anormalidades	Características	T1	T2	T3
Malformación	Despigmentación	0,2	0	0
	Edema	0	0	0
	Cola curvada	0,03	0,47	0,27
Hemorragia	Caudal	0	0	0
	Cefálica	0,03	0,03	0,03
	Abdominal	0,03	0,03	0,03
Comportamiento	Natación irregular	0,13	0,13	0,17
	Quietud prolongada	0,3	0,43	0,13

Análisis morfométrico

Con respecto al análisis morfométrico, existen diferencias significativas (Hotelling=0,0003491; $p < 0,05$) para la longitud total (LT) y la longitud del cuerpo (C) con el volumen como factor. Para la longitud del cuerpo (C), el volumen de 1000 mL difiere de los volúmenes de 200 mL y 40 mL (Tukey, $p < 0,05$), y para la longitud total (LT) el volumen de 40 mL difiere de los volúmenes de 200 mL y 1000 mL. Al realizar este mismo análisis tomando como factor las concentraciones, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las medidas morfométricas analizadas. La media y la desviación estándar de las variables morfométricas al iniciar el

experimento (0 horas) y al concluirlo (96 horas) se presentan en la figura 5.

Al comparar los valores morfométricos a las 96 horas con los registradas al iniciar el ensayo, se observa que los renacuajos que se encontraban en el volumen de 1000 mL presentaron mayores valores de longitud del cuerpo y longitud total. El análisis estadístico indicó que entre volúmenes estas variables morfométricas difieren, y también se observa que los renacuajos que se encontraban en 40 mL reportaron para todos los casos un tamaño menor con respecto a las condiciones iniciales.

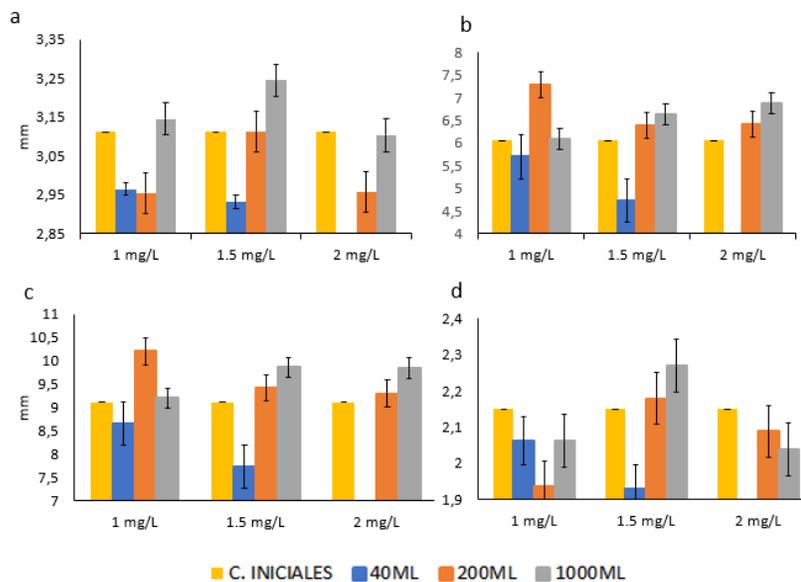


Figura 5. Gráfica de la media de las medidas morfométricas tomadas a las larvas de *E. pustulosus* a las 96 horas comparadas con las condiciones iniciales. (a). Longitud del cuerpo (C). (b). Longitud de la cola (LC). (c). longitud total (LT). (d). Ancho corporal (AC).

Discusión

Engystomops pustulosus es útil como modelo para investigaciones en laboratorio debido a que es una especie

abundante, sencilla de monitorear y de fácil mantenimiento, además de que es ideal para estimar la toxicidad en agua en estado larvario (Díaz-Báez *et al.*, 2004). Por otra parte, al estar presente en ambientes con intervención antrópica, puede

brindar una perspectiva amplia desde el punto de vista ecológico, ya que el efecto que tiene la contaminación química en su hábitat es un aspecto que puede seguir siendo estudiado para estos organismos (Ospina y Bedoya-Cañón, 2018). Por otro lado, identificar el impacto que tiene el herbicida oxadiazon puede contribuir a mejorar las estrategias de conservación y la disminución del impacto en las poblaciones no solo de *E. pustulosus*, sino de otras especies de anfibios (Agostini *et al.*, 2020).

Durante el ensayo de toxicidad la temperatura de todos los recipientes disminuyó, tal y como lo registraron Henao-Muñoz *et al.* (2013) al realizar una prueba de toxicidad con el agroquímico Cosmo-Flux®411F. Aun así, estas variaciones no influyen en el desarrollo y la supervivencia de los individuos en las condiciones ensayada, debido a que los rangos de temperatura hallados son similares a los reportados por Henao-Muñoz (2014). Además, *E. pustulosus* es una especie con un rango de distribución altitudinal amplio que va desde los 0 a los 1540 m s.n.m (Ospina y Bedoya-Cañón, 2018).

Por otro lado, se observaron valores altos de pH en el ensayo con soluciones frescas. Sin embargo, en un estudio para determinar la tolerancia a pH ácidos y básicos en *E. pustulosus* de estadio 25 se encontró que al exponer estos organismos a hidróxido de sodio (NaOH) la CL₅₀ fue de 9,87 (Henao-Muñoz y Bernal-Bautista, 2011). Este valor fue superior al reportado a las 96 horas para los volúmenes de 40 mL y 200 mL en esta investigación, y solo fue inferior al reportado en el volumen de 1000 mL (pH=9,98), aunque los renacuajos sobrevivientes en este último volumen tuvieron un mayor desarrollo corporal en comparación con los otros dos volúmenes, por lo que no se puede considerar como un agente de perturbación.

Al evaluar la toxicidad de agroquímicos, *E. pustulosus* ha sido catalogada como la menos sensible frente a agentes como la cipermetrina (Triana-Velásquez *et al.*, 2017), el glifosato y el Cosmo-Flux®411F (Henao-Muñoz *et al.*, 2013; Henao-Muñoz, 2014) con respecto a otras especies de anfibios colombianos. Sin embargo, *E. pustulosus* se encuentra en zonas de intervención antrópica y podría ser expuesta al oxadiazon por su rango de distribución y hábitat (Ospina y Bedoya-Cañón, 2018).

Ambrosi *et al.* (1977), en su estudio de la persistencia y el metabolismo de oxadiazon en el suelo, señalaron que la concentración de este herbicida en el agua nunca excedió las 0,06 ppm debido a su baja solubilidad. De todos modos, el coeficiente de partición del oxadiazon es de 5,33 (Autoridad

Nacional de Licencias Ambientales, 2018), lo que indica que presenta una alta bioacumulación en tejidos grasos (Murialdo, 2016).

En los organismos acuáticos, el factor de bioconcentración está relacionado con las características químicas de la sustancia, por lo que cabe tener en cuenta que el oxadiazon, que es poco soluble en agua y tiene un coeficiente de octanol elevado, tiende a permanecer en el organismo y acumularse (Murialdo, 2016). Por su parte, Imanaka *et al.* (1981) reportaron en su estudio una concentración de 0,017 ppm en individuos de *Carassius cuvieri* nueve meses después de haber sido aplicado el oxadiazon y cuando la concentración en el agua era de 0,024 ppb, lo que demuestra que, aunque el herbicida se degrade en el agua, este puede persistir por largos periodos en un organismo.

El resultado de la CL₅₀ para el ensayo de los 200 mL, la cual no fue calculada por el programa estadístico debido a la baja mortalidad, difiere de los resultados reportados para los ensayos de 40 mL (1,46 mg/L) y 1000 mL (1,5 mg/L). Esta diferencia puede tener varias razones, entre las cuales cabe considerar fuentes de variabilidad como variaciones biológicas propias de los individuos, variaciones en el agente químico, entre otras (Díaz-Báez *et al.*, 2004). Además, la tolerancia al agente tóxico varía entre los individuos de la población; así, aun cuando esta última sea homogénea, habrá organismos más tolerantes que otros, si bien generalmente la proporción de individuos muy tolerantes siempre es baja (Murialdo, 2016).

La CL₅₀ de oxadiazon entre los volúmenes de 40 mL y 1.000 mL fue similar, lo cual concuerda con lo reportado por Montealegre-Delgado *et al.* (2013), quienes no observaron diferencias significativas en la supervivencia de *E. pustulosus* entre los volúmenes evaluados (100 mL, 1000 mL y 2000 mL) a los 20 y 60 días. Además, la CL₅₀ de 1,46 mg/L para los 40 mL y de 1,5 mg/L para los 1000 mL también coincide con lo señalado por Montealegre-Delgado *et al.* (2013), en cuyo estudio la supervivencia de *E. pustulosus* fue menor en el volumen más pequeño. En cuanto a la acción del oxadiazon en las células de *E. pustulosus*, podría suponerse que el mecanismo de acción es similar que en las plantas: este herbicida destruye membranas vegetales e inhibe la acción de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPO) (Clavijo, 2010). Por ejemplo, aunque no se reportan estudios para anfibios, cabe considerar los hallazgos de Matringe *et al.* (1989), quienes demostraron que el oxadiazon es un inhibidor de esta enzima, no solo en células vegetales sino también en las mitocondrias de células hepáticas de ratones. En los mamíferos, la PPO

participa en la biosíntesis del grupo hemo en la mitocondria, oxidando al protoporfirinógeno y obteniendo protoporfirina IX (PPIX), que al final forma el grupo hemo por la ferroquelatasa (FC) al catalizar la inserción de un átomo ferroso en la protoporfirina IX10 (Villavicencio-Queijeiro, 2012).

Al igual que en el estudio realizado por Mesléard *et al.* (2016), el resultado de la presente investigación confirma el efecto letal de oxadiazon en anfibios. Los efectos subletales más frecuentes producidos por la exposición a oxadiazon fueron la cola curvada, la despigmentación y la quietud prolongada, a diferencia de los reportados por Henao-Muñoz (2014), quienes afirman que los organismos de *E. pustulosus* no presentaron alteraciones en la locomoción al ser expuestos a glifosato y a Cosmo-Flux®411F. Por otra parte, Vismara *et al.* (2000), en un análisis histológico realizado a renacuajos de *Xenopus laevis* que presentaban la cola curvada, encontraron en la zona de curvatura anomalías en la disposición de las miofibrillas y en algunos de los miocitos. En todo caso, se trata de anomalías que, en ambientes naturales, disminuyen la capacidad de supervivencia de los organismos ya que, al presentar una movilidad reducida, se les dificulta huir de los depredadores o competir por los recursos (Triana-Velásquez *et al.*, 2016, 2017).

El análisis de regresión mostró una relación entre el aumento del volumen y el nado irregular en las soluciones frescas. En esa misma línea, Henao-Muñoz y Bernal-Bautista (2011) también reportaron natación irregular en individuos de *E. pustulosus* expuestos a valores de pH muy altos o muy bajos, y Triana-Velásquez *et al.* (2017) observaron esta anomalía para la misma especie en presencia de cipermetrina. En cuanto a la relación entre la natación irregular y el volumen del recipiente, esto podría deberse a que los renacuajos en el volumen de 1000 mL tuvieron una longitud total superior con respecto a los demás, lo que conllevaría a un mayor desempeño locomotor, aunque hayan presentado anomalías.

Por otro lado, la despigmentación fue otra de las anomalías frecuentes en todos los volúmenes. Cortés y De Dulce (1996) mencionan que la despigmentación en los renacuajos puede ser ocasionada por un descenso en la alfa MSH (hormona estimulante de melanocitos), que además no puede transportarse correctamente a través de los microtúbulos porque esta estructura es afectada por iones.

Es importante considerar que el oxadiazon ha sido formulado para que sus efectos como herbicida se cumplan en un determinado periodo de tiempo (Autoridad Nacional de

Licencias Ambientales, 2018). En ese orden de ideas, es de esperarse que desarrolle su acción durante los periodos requeridos para no afectar el crecimiento de otros cultivos y el metabolismo de fauna no objetiva. Sin embargo, los residuos de este agente pueden persistir en el suelo por periodos superiores a los descritos en la ficha técnica (Das *et al.*, 2003; Milan *et al.*, 2019) y ser transportados por escorrentía a fuentes de agua temporales que pueden ser utilizadas por anfibios durante su reproducción (Boudh y Singh, 2019; Agostini *et al.*, 2020).

En cuanto a los individuos del control, estos solo fueron más grandes que los contenidos en el volumen de 40 mL, los cuales redujeron su tamaño tal y como reportaron Henao-Muñoz *et al.* (2013) para el Cosmo-Flux®411F, Triana-Velásquez *et al.* (2016) para el propanil, y Triana-Velásquez *et al.* (2017) para cipermetrina, pero contrario a lo que reportaron Triana-Velásquez *et al.* (2013) para glifosato. Con respecto, los individuos contenidos en el volumen de 1000 mL fueron significativamente más grandes con respecto a los otros volúmenes ($p < 0,05$), al igual que lo reportado por Montealegre-Delgado *et al.* (2013), en cuya investigación los hábitats más grandes permitieron que los individuos de *E. pustulosus* tuvieran un desarrollo más avanzado y longitudes totales mayores con respecto al hábitat más pequeño. En cambio, en los renacuajos que estaban en un hábitat más pequeño la longitud total fue menor, y su desarrollo, más lento. Ahora bien, cabe mencionar que en el ensayo realizado por Montealegre-Delgado *et al.* (2013) el hábitat más pequeño fue de 100 mL, mientras que para este estudio el hábitat más pequeño fue de 40 mL, y en ambos casos se depositaron 10 renacuajos por recipiente, siendo la densidad de 100 larvas/L y 250 larvas/L respectivamente.

Los diferentes mecanismos de acción de los herbicidas permiten actuar de diferentes formas sobre las malezas. Sin embargo, los renacuajos expuestos a estos evidencian efectos similares entre ellos. Es así como Bernal *et al.* (2009) registraron movimientos anormales y quietud prolongada en *Rhinella granulosa*, *R. marina* y *Hyla crepitans*, lo que coincide con Bauer-Dial y Dial (1995), quienes observaron dificultades para nadar en *Lithobates berlandieri* cuando fue sometido a pruebas con glifosato y paraquat respectivamente. Asimismo, se evidencia que el retraso en el crecimiento de renacuajos se relaciona con los herbicidas usados en el cultivo de arroz, ya sea propanil (Triana-Velásquez *et al.*, 2016), paraquat (Osano *et al.*, 2002) y 2,4D (Coady *et al.*, 2013). El clomazone está relacionado con la aceleración de la metamorfosis de

Physalaemus nattereri y *Rhinella schneideri* (Freitas *et al.*, 2017), lo que puede concordar con las alteraciones de la actividad endocrina detectadas en *Xenopus laevis* con 2,4D (Coady *et al.*, 2013). Esta investigación reporta curvatura de la cola y quietud prolongada producidas por el oxadiazon como las de mayor frecuencia, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos con glifosato (Bernal *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2012; Baier *et al.*, 2016). Además, se observa que la quietud prolongada y los movimientos anormales de los renacuajos pueden estar relacionados con compuestos químicos derivados de la glicina (paraquat-glifosato), los cuales pueden actuar como análogos en la síntesis de proteínas y dar como resultado proteínas disfuncionales o agentes quelantes de magnesio (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn), disminuyendo la biodisponibilidad de minerales (Seneff *et al.*, 2016).

Conclusión

El uso generalizado de pesticidas en el sector agrícola se ha convertido en un agente de perturbación para las poblaciones de anfibios debido a que su aplicación se realiza utilizando riego o aspersiones. Aunque aún se desconoce la acción que tienen gran parte de los herbicidas en la fisiología y el desarrollo de los anfibios, este estudio demuestra que, además de la letalidad que produce en individuos premetamórficos de *E. pustulosus*, el oxadiazon también genera anomalías físicas y comportamentales, sin importar la concentración ($p > 0,05$). De igual forma se comprobó la toxicidad de este químico para los volúmenes de 40 mL y 1000 mL (CL_{50} de 1,46 mg/L y 1,5 mg/L respectivamente). Además, se observó que el volumen de agua en el que se desarrolla un organismo de *E. pustulosus* influye en los valores morfométricos que este alcanza, indistintamente de la concentración del herbicida ($p > 0,05$). Por lo tanto, volúmenes mayores permiten que los renacuajos alcancen tallas más cercanas a su nivel de desarrollo, mientras que volúmenes menores producen un retraso en su crecimiento, sin relación con la letalidad o con la aparición de anomalías ($p > 0,05$).

Los resultados descritos podrían sugerir que el tamaño del hábitat y una baja densidad poblacional influyen en la supervivencia del organismo. Así, dentro de un escenario agrícola en el que los hábitats naturales se ven reducidos por la expansión de cultivos o el uso de aguas para riego, se podrían formar pequeños estanques que, al tener contacto con herbicidas, se contaminan y provocan un desarrollo inadecuado de los organismos que los habitan. Por lo tanto, se requerirán estudios en microcosmos y mesocosmos para

simular mejor las condiciones ambientales y tener una mejor comprensión del efecto del herbicida en larvas de anfibios colombianos.

Referencias

- Acuña-Vargas, J.C. 2016. Anfibios y reptiles asociados a cinco coberturas de la tierra, municipio de Dibulla, La Guajira, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana* 32(2): 133-146. Doi:<https://doi.org/10.21829/azm.2016.322940>.
- Agostini, M. G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A. E. y Bilenca, D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation* 241: 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.
- Aktar, W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1-12. Doi: <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- Ambrosi, D., Kearney, P. C. y Macchia, J. A. 1977. Persistence and Metabolism of Oxadiazon in Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25(4): 868-872. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf60212a019>.
- Arenas-Rodríguez, A. 2014. Efectos letales y subletales en embriones y renacuajos de anuros expuestos a pH ácidos y básicos. Tesis de Maestría, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia.
- Autoridad Nacional de Licencias Ambientales. 2018. "Por la cual se emite Dictamen Técnico Ambiental para el producto formulado Oxadiazón CRL 250 EC, a partir del ingrediente activo grado técnico oxadiazón". Resolución 00092, 35.
- Baier, F., Jedinger, M., Grube, E. y Zaller, J.G. 2016. Temperature-dependence of glyphosate-based herbicide's effects on egg and tadpole growth of Common Toads. *Frontiers in Environmental Science* 4(28):51. Doi: <https://10.3389/fenvs.2016.00051>.
- Bauer Dial, C. y Dial, N. 1995. Lethal effects of the consumption of field levels of paraquat- Contaminated plants on frogs tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 870-877. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00209467>.
- Bernal MP, Albuquerque JA, Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. *A review Bioresour Technology* 100: 5444-5453.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>.

- Boudh, S. y Singh, J. 2019. Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. En: Bharagava, R. N. y Chowdhary, P. Editores. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. Springer Nature Singapore.
- Bucker, D. 1989. Histology. En: Austri, D., Editor. *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. Wiley, Nueva York, Estados Unidos.
- Clavijo, J. 2010. Acción de los herbicidas en un arrozal: Modo y mecanismo. En: Degiovanni, V., Martínez, C. P. y Motta, F., Editores. *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina: Tomo I. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Universidad de Córdoba, Montería.
- Cortés, F. y De Dulce, B. 1996. Descripción de las alteraciones de embriones de *Hyla labialis* expuestos a Hg₂^{*}, Cl⁻ y NO₃⁽⁻¹⁾. *Universitas Scientiarum* 3(1-2): 41-52.
- Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Sosinski, L., Neal, B. y Hammond, L. 2013. An evaluation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in the amphibian metamorphosis assay and the fish short-term reproduction assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90:143-150. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.025>.
- Das, A. C., Debnath, A. y Mukherjee, D. 2003. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. *Chemosphere* 53(3): 217-221. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00440-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00440-5)
- Díaz-Báez, M. C., Bustos-López, M. C. y Espinosa-Ramírez, A. J. 2004. *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Diez de Ulzurrun, P. 2013. *Modos de acción herbicida*. REM - AAPRESID, Rosario.
- Freitas J.S., Felício ,A.A., Teresa, F.B. y E. Alves de Almeida Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere* 185: 58-562. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061>.
- Fischer, A. y Valverde, B. 2010. Resistencia a herbicidas en malezas asociados con arroz. En: Degiovanni, V., Martínez, C. P. y Motta, F., Editores. *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina*. Cali, Colombia.
- Glantz, S.A. 2006. *Bioestadística* (6o Edición). McGraw-Hill Interamericana, California.
- Gosner, K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetológica* 16(3): 183-190.
- Henao-Muñoz, L.M. 2014. Toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada del glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en renacuajos de anuros colombianos. Tesis de Maestría, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia.
- Henao-Muñoz, L.M. y Bernal-Bautista, M.H. 2011. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 35(134): 105-110.
- Henao-Muñoz, L.M., Arango-Cubillos, V. y Bernal-Bautista, M. H. 2013. Toxicidad aguda y efectos subletales del Cosmo-Flux®411F en embriones de cuatro especies de anuros colombianos. *Actualidades Biológicas* 35(99): 209-218.
- Imanaka, M., Matsunaga, K., Shigeta, A. e Ishida, T. 1981. Oxadiazon Residues in Fish and Shellfish. *Journal of Pesticide Science* 6(4): 413-417. Doi: <https://doi.org/10.1584/jpestics.6.413>.
- Instituto Colombiano Agropecuario. 2019. Plaguicidas registrados - diciembre de 2019. Instituto Colombiano Agropecuario_URL: <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>. Consultado: 15 de febrero 2020.
- Matringe, M., Camadro, J., Labbe, P. y Scalla, R. 1989. Protoporphyrinogen oxidase inhibition by three peroxidizing herbicides: oxadiazon LS 82-556 and M&B 39279. *FEBS Letters* 245(1,2): 35-38. Doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80186-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80186-3).
- Menalled, F.D. 2010. Consideraciones ecológicas para el desarrollo de programas de manejo integrado de malezas. *Agroecología* 5:73-78.
- Mesléard, F., Gauthier-Clerc, M. y Lambret, P. 2016. Impact of the insecticide Alphacypermetrine and herbicide Oxadiazon, used singly or in combination, on the most abundant frog in French rice fields, *Pelophylax perezi*. *Aquatic Toxicology* 176: 24-29. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.004>.
- Milan, M., Ferrero, A., Fogliatto, S., Piano, S., Negre, M. y

- Vidotto, F. 2019. Oxadiazon dissipation in water and topsoil in flooded and dry-seeded rice fields. *Agronomy* 9(9): 557. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy9090557>.
- Ministerio de Agricultura. 2020. Base Agrícola EVA 2007-2019 (P). Ministerio de Agricultura de Colombia. URL: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=59>. Consultado: 15 de febrero 2020.
- Montealegre-Delgado, X.K., Avendaño-Casadiago, K. y Hernando Bernal, M. 2013. Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella humboldti* (Anura: Bufonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 53(23): 309-314. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0031-10492013002300001>.
- Moore, L.J., Fuentes, L., Rodgers, J.H., Bowerman, W.W., Yarrow, G. K. y Chao, W.Y. 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology Environmental Safety* 78:28-133. Doi: <https://10.1016/j.ecoenv.2011.11.025>.
- Murialdo, R. 2016. *Ecología, ecosistemas y ecotoxicología: conceptos fundamentales*. Editorial Brujas, Buenos Aires.
- Noriega, J.A., Moreno, J. y Otavo, S. 2011. Quince años del arribo del escarabajo *Digitonthophagus gazella* (Fabricius, 1787) (Coleoptera: Scarabaeidae) a Colombia: proceso de invasión y posibles efectos de su establecimiento. *Biota Colombia* 12 (2): 35-44. Doi: <https://doi.org/10.21829/azm.2010.262724>.
- Osano, O., Admiraal, W. y Otieno, D. 2002. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology Chemical* 21:375-379. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210221>.
- Ospina, A.M y Bedoya-Cañón, M.A. 2018. *Engystomops pustulosus* (Leptodactylidae). En: Ospina, A.M y Bedoya-Cañón. *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*. Asociación Colombiana de Herpetología ACH, Medellín.
- Peraza, R.G. y Delgado-Blas, V.H. 2012. Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (Webster, 1879) (Polychaeta: Annelida). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(2): 137-144.
- Pérez-Iglesias, J.M., Brodeur, J.C. y Larramendy, M.L. 2019. An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research* 27(2): 2131-2143. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06880-7>.
- Seneff, S., Morley, W.A., Hadden, M.J. y Michener, M.C. 2016. Does Glyphosate Acting as a Glycine Analogue Contribute To ALS? *Journal of Bioinformatics and Proteomics Review* 2(2): 140-160. Doi: <https://doi.org/10.15436/2381-0793.16.1173>.
- Tamaris-Turizo, C.E. 2018. Relaciones tróficas de macroinvertebrados acuáticos en un río tropical de la Sierra Nevada de Santa Marta. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Triana-Velásquez, T.M., Montes-Rojas, C.M. y Bernal-Bautista, M.H. 2013. Efectos letales y subletales del glifosato (Roundup® Activo) en embriones de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana* 18(2): 271-278.
- Triana-Velásquez, T.M., Henao-Muñoz, L.M. y Bernal-Bautista, M.H. 2016. Toxicidad del herbicida propanil (Propanil Trust® 500EC) en embriones y renacuajos de tres especies de anuros. *Acta Biológica Colombiana* 21(3): 627-634. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.54845>.
- Triana-Velásquez, T.M., Henao-Muñoz, L.M. y Bernal-Bautista, M. H. 2017. Toxicidad aguda del insecticida cipermetrina (Cypermon® 20 EC) en cuatro especies de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana* 22(3): 340-347. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.62631>.
- Villavicencio-Queijeiro, A. 2012. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas* 15(2): 116-132.
- Vismara, C., Battista, V., Vailati, G. y Bacchetta, R. 2000. Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology* 49(3): 171-179. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00080-6).
- Citar como:** Molina-Guerrero, N.M., Llano-Ramos, H.A. y Blanco-Cervantes, G. 2021. Toxicidad del herbicida oxadiazon en larvas de *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864) *Intropica* 16(1): 8-19. Doi: <https://doi.org/10.21676/23897864.3721>.