

## TOXICIDAD AGUDA Y EFECTOS SUBLETALES DEL COSMO-FLUX®411F EN EMBRIONES DE CUATRO ESPECIES DE ANUROS COLOMBIANOS

### ACUTE TOXICITY AND SUBLETHAL EFFECTS OF COSMO-FLUX®411F TO EMBRYOS OF FOUR COLOMBIAN ANURAN SPECIES

Liliana M. Henao-Muñoz<sup>1,2</sup>, Verónica A. Arango-Cubillos<sup>1,3</sup>, Manuel H. Bernal-Bautista<sup>1,4</sup>

#### Resumen

El Cosmo-Flux®411F es el coadyuvante principalmente mezclado con el herbicida glifosato para su aplicación en el control de cultivos ilícitos en Colombia y malezas en la agricultura. Sin embargo, no hay estudios que evalúen la toxicidad de este coadyuvante sobre los anuros, los cuales son altamente sensibles a los cambios ambientales. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y los efectos subletales (en el tamaño corporal y la tasa de desarrollo) que causa el Cosmo-Flux®411F en embriones de cuatro especies de anuros colombianos, expuestos bajo condiciones de laboratorio y microcosmos. *Engystomops pustulosus* fue la especie más tolerante al Cosmo-Flux®411F (CL<sub>50</sub> laboratorio: 2.234,86 mg/l; CL<sub>50</sub> microcosmos: 2.535,3 l/ha = 655,13 mg/l), seguida de *Hypsiboas crepitans* (CL<sub>50</sub> laboratorio: 849,21 mg/l; CL<sub>50</sub> microcosmos: 1.169,93 l/ha = 302,31 mg/l), mientras que las más sensibles fueron *Rhinella marina* en laboratorio (CL<sub>50</sub>: 495,18 mg/l) y *R. humboldti* en microcosmos (CL<sub>50</sub>: 478,2 l/ha = 123,59 mg/l). Comparando las concentraciones sugeridas de aplicación de 0,5 a 1 l/ha, con los resultados de los microcosmos, los cuales tuvieron un CL<sub>50</sub> menor que los de laboratorio, el Cosmo-Flux®411F no mostró ningún efecto letal. Tampoco hubo efectos subletales en los individuos expuestos a concentraciones menores a los de CL<sub>50</sub>. Sólo en *R. humboldti* se apreció un retraso en el desarrollo a partir de una concentración 205 veces superior a la utilizada en campo. Por lo tanto, el Cosmo-Flux®411F, a la concentración sugerida de aplicación en campo, no produjo efectos letales ni cambios en el tamaño corporal y la tasa de desarrollo en los embriones de las especies de estudio.

*Palabras clave:* anuros, Colombia, Cosmo-Flux®411F, desarrollo, embriones, tamaño corporal.

#### Abstract

Cosmo-Flux®411F is the main adjuvant mixed with the glyphosate herbicide used for controlling illicit drugs in Colombia and weeds in agriculture. However, there are no studies that test the toxicity of its application to frogs, which are highly sensitive to environmental changes. The aim of this study was to determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and the sublethal effects (on body size and developmental rate) of Cosmo-Flux®411F to anuran embryos of four Colombian species, exposed under controlled laboratory conditions and in microcosms. *Engystomops pustulosus* was the most tolerant species to Cosmo-Flux®411F (laboratory LC<sub>50</sub>: 2,234.86 mg/l; microcosms LC<sub>50</sub>: 2,535.3 l/ha = 655.13 mg/l), followed by *Hypsiboas crepitans* (laboratory LC<sub>50</sub>: 849.21 mg/l; microcosms LC<sub>50</sub>: 1,169.9 l/ha = 302.31 mg/l), while *Rhinella marina* in laboratory (LC<sub>50</sub>: 495.18 mg/l) and *R. humboldti* in microcosms (LC<sub>50</sub>: 478.2 l/ha = 123.59 mg/l) were the most sensitive species. Comparing the recommended application concentrations, 0.5 to 1 l/ha, with the microcosm results, which had a LC<sub>50</sub> lower than those from the laboratory, the Cosmo-Flux®411F showed no lethal effects. There were also no significant sublethal effects on the individuals with concentrations below the LC<sub>50</sub>. Only *R. humboldti* showed a developmental delay in a concentration 205 times higher than normal field applications. Therefore, Cosmo-Flux®411F, at a concentration used in the field neither produced lethal effects nor significant changes in the body size and developmental rate to embryos of the four study species.

*Key words:* anurans, body size, Colombia, Cosmo-Flux®411F, development, embryos

Recibido: enero 2013; aceptado: septiembre 2013.

<sup>1</sup> Grupo de Herpetología, Eco-fisiología & Etología, Departamento de Biología, Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia. Correos electrónicos: <sup>2</sup> <lmhenaom@ut.edu.co>; <sup>3</sup> <veroca61@hotmail.com>; <sup>4</sup> <mhbernal@ut.edu.co>.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, se ha demostrado que los herbicidas, plaguicidas y numerosos agroquímicos tienen un impacto negativo para muchas especies de anfibios (Mann et al. 2009, Plötner y Matschke 2012, Relyea 2004). Uno de los herbicidas de mayor uso comercial es el glifosato, empleado en Colombia con fines agrícolas y para el programa de erradicación de cultivos ilícitos de coca (*Erythroxylum coca*) y amapola (*Papaver rhoeas*) (Solomon et al. 2007). Sin embargo, para que el glifosato pueda tener mayor eficacia como herbicida, requiere ser mezclado y aplicado con un coadyuvante que facilite su fijación y penetración en las hojas. El Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F es uno de estos coadyuvantes utilizado ampliamente con el glifosato. De acuerdo con la ficha técnica de Cosmoagro (Cosmoagro 2012), empresa que elabora el producto en Colombia, el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F se describe químicamente como una mezcla de aceite mineral y surfactantes especializados no-iónicos con agentes de acoplamiento. El ingrediente activo (17%) es descrito como una mezcla de ésteres de hexitan, alcoholes lineales más aril etoxilado, mezclas de tensoactivos estereoespecíficos no-iónicos, alcoholes lineales etoxilados propoxilados con pequeñas cantidades de compuesto aryl etoxilado. Los ingredientes aditivos (83%) están formados por isoparafinas líquidas, aceite isoparafínico de alta pureza, de fitotoxicidad muy baja y tensión superficial baja que mejora la humectabilidad, promoviendo así la eficacia de los ingredientes activos.

El Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F es soluble en aceites minerales, aceites vegetales y solventes orgánicos usados en la formulación de agroquímicos, dispersable en el agua formando una rápida emulsión. Está clasificado por el Ministerio de Salud de Colombia como un producto ligeramente tóxico para la salud humana (Categoría Toxicológica IV), con

licencia de venta número 2186 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Cosmoagro 2012). Respecto a su ecotoxicidad, es considerado tóxico para peces, algas y dafnias, pero la ficha técnica indica que manteniendo las concentraciones adecuadas no debe ocasionar problemas ecológicos, aunque no especifica cuáles deberían ser las concentraciones adecuadas. En forma general, la dosis recomendada de aplicación está entre 1,5 y 10 ml/l de agua o entre 0,5 y 1 litro/hectárea (l/ha) (Cosmoagro 2012). La importancia del Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F radica en que mejora la adherencia y uniformidad de la mezcla emulsionada, controlando la evaporación e hidrólisis del ingrediente activo con cubrimiento total, garantizando su concentración homogénea por unidad de área. Así, el incremento de la acción tóxica de los herbicidas o pesticidas no obedece a reacciones químicas con el coadyuvante sino a acciones físicas que hacen más eficiente el contacto entre el objetivo y los agroquímicos.

Pocos estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto tóxico de coadyuvantes como el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F en la fauna nativa colombiana. En un trabajo realizado por Rondon-Barragan et al. (2007) en el pez cachama blanca (Characidae: *Piaractus brachypomus*), encontraron que el CL<sub>50</sub> (4.417,99 mg/l) del Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F era alto y poco probable en el ambiente, pero que causaba disminución en la actividad de nado, palidez del hígado, acumulación de material mucoso en las branquias, daños histológicos y degeneración neuronal. Este tipo de trabajos no se han realizado aún con anfibios, aunque Solomon et al. (2007) alertaron que la aspersión de la mezcla glifosato y Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F, aplicada para el control de cultivos ilícitos en Colombia, podría representar riesgos para los anuros presentes en aguas superficiales. Bernal et al. (2009a, b) desarrollaron un estudio para establecer la toxicidad de la mezcla glifosato y Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F en renacuajos, juveniles

y adultos de anuros colombianos, obteniendo datos que esta mezcla no producía un efecto ecológicamente letal, pero no evaluaron la toxicidad en embriones, un estadio sensible a los cambios ambientales, ni la toxicidad de la aplicación individual del herbicida glifosato ni la del coadyuvante Cosmo-Flux®411F. Por tal motivo, el objetivo para este trabajo fue determinar la toxicidad aguda y los efectos subletales (en el tamaño corporal y la tasa de desarrollo) que podría generar el coadyuvante Cosmo-Flux®411F sobre embriones de cuatro especies de anuros colombianos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Organismos de prueba.** Se utilizaron embriones en estadio 10 (Gosner 1960) de cuatro especies de anuros, las cuales se seleccionaron por estar comúnmente asociadas a áreas de cultivo agrícolas y no encontrarse en ninguna categoría de amenaza: *Engystomops pustulosus* (Cope 1864), *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied 1824), *Rhinella marina* (Linnaeus 1758) y *R. humboldti* (Gallardo 1965). Los embriones fueron obtenidos de posturas de huevos recolectadas en diferentes localidades del departamento del Tolima, Colombia, como la vereda Potrerillo (04° 15' 02" N, 74° 58' 55" O), en el municipio de Coello; el corregimiento de Payandé (04° 17' 51" N, 75° 05' 48" O), en el municipio de San Luis; y en los alrededores de la ciudad de Ibagué (04° 25' 39" N, 75° 12' 48" O). Estas posturas fueron transportadas al laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima, y allí se dejaron en recipientes con agua previamente dechlorada por aireación hasta que los embriones alcanzaron el estadio 10 (Gosner 1960).

**Procedimiento experimental.** Experimentos en condiciones controladas de laboratorio. 25 embriones por cada una de las cuatro especies a utilizar con su respectiva réplica (n = 50 por concentración), se sometieron

a cinco concentraciones experimentales del Cosmo-Flux®411F: 106,25, 212,5, 425, 850 y 1.700 mg/l, más un control negativo: agua previamente dechlorada, por un periodo de 96 horas. Para esto, los embriones fueron puestos en un litro de solución (25 embriones/l), preparada con agua previamente dechlorada, dentro de peceras de vidrio con capacidad para 2 litros. Las peceras se ubicaron en un sector del laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima con aire acondicionado (temperatura promedio de  $23 \pm 2$  °C), y un ciclo de 12 h luz:12 h oscuridad, generado con lámparas de luz blanca (Phillips TLT 20W/54RS) conectadas a un temporizador digital (General Electric PM621). El experimento consistió en un sistema semiestático en donde las soluciones fueron renovadas totalmente cada 24 horas; sin embargo, *antes* y *después* de los recambios se registraron a una profundidad media los parámetros físicoquímicos de conductividad, oxígeno disuelto, temperatura y pH, medidos con un conductímetro (Hanna HI 8033), un oxímetro portátil (Hanna HI 9146) y un pHmetro (Hanna HI 9126), respectivamente.

*Microcosmos.* Para el establecimiento de los microcosmos se siguió lo propuesto por Van Leeuwen y Vermeire (2007, pág. 311), quienes establecen que son experimentos que pueden realizarse dentro del laboratorio simulando algunos aspectos de los sistemas naturales para estudiar los efectos de contaminantes. En este trabajo, los microcosmos se diseñaron con recipientes plásticos de 70 cm de diámetro y 13 cm de profundidad, a los que se les agregó 450 g de tierra y 647 g de arena, recolectadas en el jardín botánico de la Universidad del Tolima a una profundidad aproximada de 50 cm, donde el suelo es franco arcilloso con una humedad relativa entre 72 al 75% y un pH de 5,6. Luego, los recipientes fueron cubiertos con una tela blanca (muselina), para facilitar la posterior observación y el conteo de los organismos, y se les adicionó un volumen de 10 litros de la solución

experimental, preparada con agua previamente dechlorada por aireación, más 2 hojas secas, 4 a 5 piedras de tamaño pequeño y una macrófita. Estos microcosmos se ubicaron aleatoriamente en un área ventilada del laboratorio con una temperatura ambiental promedio de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad, aproximadamente. Las pruebas de toxicidad fueron evaluadas a concentraciones previamente establecidas del Cosmo-Flux®411F de: 0 l/ha (control: agua previamente dechlorada), 205,6 l/ha (53,1 mg/l), 411,2 l/ha (106,25 mg/l), 822,4 l/ha (212,4 mg/l), 1.644,8 l/ha (424,8 mg/l) y 3.289,6 l/ha (849,6 mg/l). A estas concentraciones se sometieron 50 embriones y su réplica ( $n = 100$  por concentración) por cada especie (5 embriones/l), por un periodo de 96 horas bajo condiciones estáticas sin recambio de las soluciones experimentales ni del control. Los parámetros fisicoquímicos de conductividad, oxígeno disuelto, temperatura y pH se registraron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas, a una profundidad media, con los mismos equipos utilizados para las pruebas de laboratorio.

#### Mediciones de toxicidad y efectos subletales.

Al finalizar las 96 horas de experimentación, la toxicidad se determinó a través de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), que representa la concentración de Cosmo-Flux®411F en la que el 50% de los organismos mueren. Para los efectos subletales, los animales sobrevivientes de cada tratamiento, ya en estadio de renacuajos, fueron fotografiados en el estereoscopio para la medición morfométrica de la longitud corporal (LC), longitud de la cola (LCo) y longitud total (LT), con la ayuda del programa ImageJ. También, se registró el estadio de desarrollo en el que se encontraban los individuos en los diferentes tratamientos, de acuerdo con la tabla propuesta por Gosner (1960).

**Análisis estadístico.** La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y los intervalos de confianza al 95% para la mortalidad acumulada a las 96 horas de exposición, se obtuvieron a través del método

Trimmed Spearman-Kärber (TSK) (versión 1.5) y el análisis Probit (US EPA versión 1.5). También, se estimaron las medias e intervalos de confianza de los parámetros fisicoquímicos en laboratorio, para su comparación *antes* y *después* de los recambios, con la ayuda del programa InfoStat (versión 2011). Para el caso de los microcosmos se utilizó la prueba de correlación de Spearman, con el propósito de establecer si había un cambio significativo en los parámetros fisicoquímicos a lo largo de las 96 horas de los experimentos.

El efecto de las concentraciones del Cosmo-Flux®411F sobre las variables morfométricas medidas (longitud corporal, longitud de la cola y longitud total) a las 96 horas de exposición, se comparó con un análisis multivariado de varianza (MANOVA) a través del paquete estadístico SPSS (versión 19). Sin embargo, este análisis sólo se realizó con los animales sobrevivientes en las dos primeras concentraciones experimentales y el control, ya que los  $CL_{50}$  estuvieron por encima de estas concentraciones en todas las especies. También, estos organismos se utilizaron para comparar los efectos de estas concentraciones sobre la tasa de desarrollo a las 96 horas de experimentación, a través de un análisis de varianza (ANOVA).

## RESULTADOS

*Engystomops pustulosus* fue la especie más tolerante al Cosmo-Flux®411F, tanto en condiciones de laboratorio ( $CL_{50} = 2.234,86$  mg/l) como en microcosmos ( $CL_{50} = 2.535,3$  l/ha = 655,13 mg/l), seguida de *H. crepitans* (laboratorio:  $CL_{50} = 849,21$  mg/l; microcosmos:  $CL_{50} = 1.169,9$  l/ha = 302,31 mg/l). *Rhinella marina* fue la especie más sensible en laboratorio ( $CL_{50} = 495,18$  mg/l; microcosmos:  $CL_{50} = 619,38$  l/ha = 160,05 mg/l), y *R. humboldti* en microcosmos ( $CL_{50} = 478,2$  l/ha = 123,59 mg/l; laboratorio:  $CL_{50} = 123,59$  mg/l). Al comparar

los intervalos de confianza al 95% entre los embriones expuestos al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos,

en todos los casos se observó una tolerancia significativamente mayor en las condiciones de laboratorio que en los microcosmos (tabla 1).

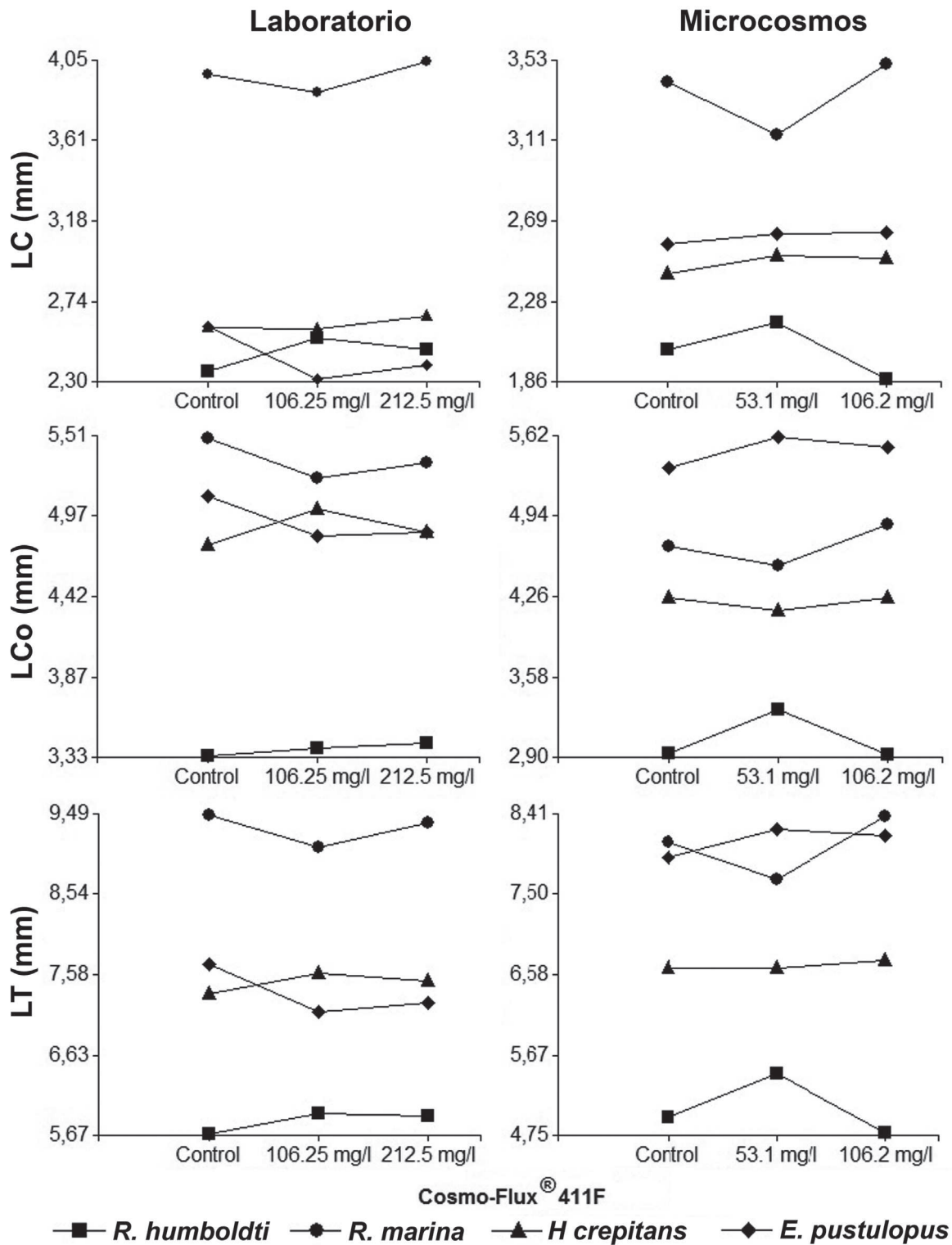
**Tabla 1.** Valores  $CL_{50}$  e intervalos de confianza al 95% para los embriones de las especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos (\* = intervalos de confianza no calculados por el programa)

<i>Especies</i>	Laboratorio	Microcosmos	
	(mg/l)	(mg/l)	(l/ha)
<i>R. humboldti</i>	858,26 (678,89-1.085,02)	123,59 (107,54-142,03)	478,28 (416,17-549,65)
<i>R. marina</i>	495,18 (436,00-562,39)	160,05 (135,28-189,35)	619,38 (523,52-732,77)
<i>H. crepitans</i>	849,21 (732,09-985,07)	302,31 (265,26-344,54)	1.169,93 (1.026,54-1.333,35)
<i>E. pustulosus</i>	*2.234,86	655,13 (606,19-708,02)	2.535,33 (2.345,93-2.740,01)

Con respecto a los efectos subletales, no se encontraron diferencias significativas en la longitud corporal, longitud de la cola y longitud total de los organismos comparados entre el control y las dos primeras concentraciones experimentales, en condiciones de laboratorio (MANOVA, Hotelling  $T^2 = 0,028$ ;  $F = 1,347$ ;  $p = 0,252$ ), y en los microcosmos (MANOVA, Hotelling  $T^2 = 0,012$ ;  $F = 0,625$ ;  $p = 0,625$ ) (figura 1). Tampoco hubo una diferencia significativa en las tasas de desarrollo de los individuos expuestos a estas concentraciones en condiciones de laboratorio ni en los microcosmos (ANOVA,  $p > 0,05$ ), con la excepción de *R. humboldti* en los microcosmos, donde los organismos del control se encontraron principalmente en estadio 24 (65%), mientras que en las concentraciones de 205,6 l/ha (53,1 mg/l) y 411,2 l/ha (106,25 mg/l) se encontraron en estadio 23 (100%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (ANOVA,  $F = 18,10$ ;  $p < 0,0001$ ). En general, los embriones en estadio 10 expuestos durante 96 horas de experimentación

a estas concentraciones del Cosmo-Flux®411F y el control llegaron hasta el estadio 25 en *E. pustulosus*, al estadio 23 y 24 en *R. marina*, y hasta el estadio 23 en *H. crepitans*.

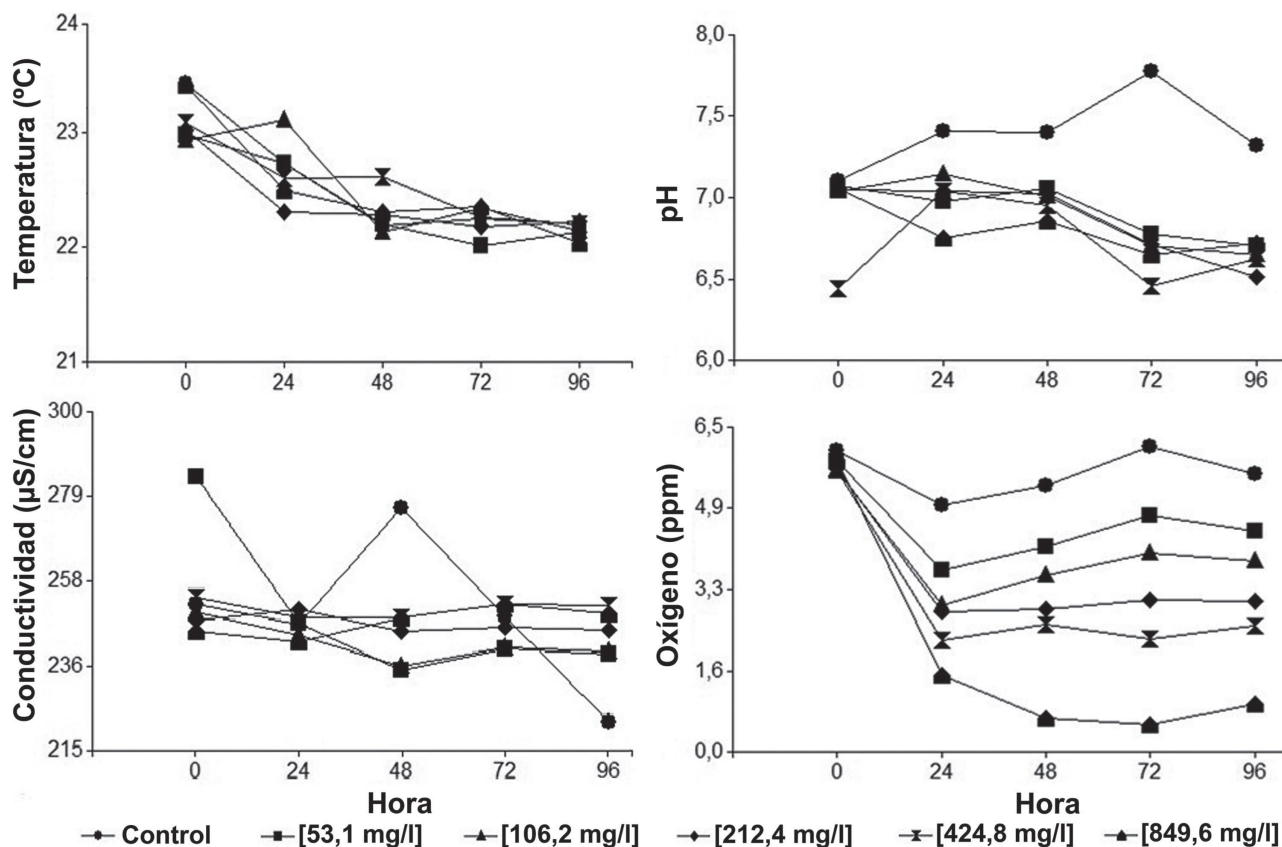
Los registros de los parámetros físicoquímicos, tanto para las condiciones de los microcosmos como de laboratorio, se presentan en la figura 2 y tabla 2, respectivamente. De acuerdo con los intervalos de confianza del 95%, en condiciones de laboratorio hubo diferencias significativas en la conductividad, oxígeno disuelto y la temperatura de las soluciones *antes y después* de los recambios diarios, a pesar que los valores promedios de estos parámetros físicoquímicos fueron cercanos, pero no hubo una diferencia significativa en el pH. En los microcosmos (figura 2), en donde no hubo un recambio diario de las soluciones en el transcurso de las 96 horas, no se encontró un cambio significativo en el pH ni la conductividad (Spearman,  $p > 0,05$  para todos los casos), pero sí un ligero descenso en



**Figura 1.** Promedio de las medidas morfométricas larvales (mm) de acuerdo a diferentes concentraciones de exposición al Cosmo-Flux®411F durante 96 horas en embriones de cuatro especies de anuros colombianos (LC = longitud corporal; LCo = longitud de la cola; LT = longitud total)

la temperatura de los tratamientos (Spearman,  $p < 0,05$ ), y particularmente en el oxígeno disuelto a las dos concentraciones mayores de exposición (concentración 1.644,8 l/ha,

Spearman,  $r = -0,49$ ;  $p = 0,003$ ; concentración 3.289,6 l/ha, Spearman,  $r = -0,67$ ;  $p = 0,00001$ ), donde disminuyó drásticamente después de las 24 horas hasta niveles casi anóxicos.



**Figura 2.** Tendencia general de los parámetros fisicoquímicos en los experimentos realizados en los microcosmos a diferentes concentraciones de exposición al Cosmo-Flux®411F en embriones de cuatro especies de anuros colombianos

**Tabla 2.** Media e intervalos de confianza al 95% de los parámetros fisicoquímicos registrados *antes* y *después* del recambio de las soluciones en las pruebas de laboratorio

Parámetros	Antes del recambio	Después del recambio
Conductividad (µS/cm)	244,01 (239,84-248,18)	227,91 (222,22-233,59)
Oxígeno (ppm)	6,46 (6,19-6,73)	7,36 (7,18-7,53)
pH	7,75 (7,49-8,01)	7,91 (7,67-8,16)
Temperatura (°C)	24,46 (24,25-24,68)	22,47 (22,28-22,66)

## DISCUSIÓN

En condiciones de laboratorio y microcosmos, los organismos de la especie *E. pustulosus* fueron los más tolerantes al Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F, mientras que *R. marina* fue la más sensible en laboratorio y *R. humboldti* en microcosmos. A pesar de que los embriones y renacuajos de estas especies se pueden encontrar simultáneamente en una misma charca y en áreas de cultivo donde se aplica la mezcla glifosato y Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F, una diferencia notable entre estas especies radica en su tipo de posturas, lo que podría explicar algunas diferencias en la sensibilidad ante el coadyuvante Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F. Por ejemplo, *E. pustulosus* presenta una postura con un nido de espuma (Guayara-Barragán y Bernal 2012), que protege a los embriones del contacto directo con los químicos disueltos en el agua y asperjados, mientras que *R. marina* y *R. humboldti* presentan una postura en forma de cadena dentro del agua, la cual tiene sólo una membrana delgada (Guayara-Barragán y Bernal 2012), que podría permitir el flujo continuo de los químicos hacia los embriones. En los experimentos desarrollados tanto en laboratorio como en los microcosmos, los embriones fueron extraídos de la protección otorgada por la masa de huevos; sin embargo, los embriones de *E. pustulosus* siempre contaron con un pequeño revestimiento del nido de espuma, el cual fue difícil de eliminar totalmente, lo que pudo contribuir a su mayor tolerancia al Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F. Contrario al resultado del presente trabajo, los embriones y larvas de *E. pustulosus* son más sensibles a los cambios del pH acuático que los de *R. marina* y *R. humboldti* (Henao y Bernal 2011), factor que no cambió significativamente ni en laboratorio ni en los microcosmos.

Comparando la concentración sugerida de aplicación del Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F de 0,5 a 1 litro por hectárea (Cosmoagro 2012), con los valores CL<sub>50</sub> de los microcosmos ajustados a litros por

hectárea (tabla 1), el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F no resulta tóxico para los embriones de ninguna de las especies de estudio. Incluso, el CL<sub>50</sub> de la especie más sensible, *R. humboldti* (478,2 l/ha), es 478 veces superior a la concentración máxima sugerida de aplicación. De igual manera, si se compara la concentración del Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F utilizada como coadyuvante del glifosato para el control de cultivos ilícitos, en la proporción de 2,3% v/v (Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F/glifosato) (Bernal et al. 2009a), correspondiente a 0,24 l/ha de Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F, los datos de CL<sub>50</sub> muestran toxicidad aún menor, en donde el CL<sub>50</sub> de la especie más sensible, *R. humboldti*, resulta ser 1.992,8 veces superior. Por lo tanto, de acuerdo con estos datos, el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F como se aplica en campo no es letal para los embriones de las especies de estudio.

Los resultados de los CL<sub>50</sub> en laboratorio fueron superiores a los de los microcosmos (tabla 1), indicando sensibilidad menor a este coadyuvante. Una de las principales razones a esta diferencia puede ser atribuida al cambio en las condiciones físicoquímicas del medio durante los experimentos, particularmente a la notable reducción del oxígeno disuelto en los microcosmos a las concentraciones mayores en el transcurso de las 96 horas (figura 2). Estas condiciones hipóxicas muy posiblemente resultaron de la capa de grasa producida por el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F sobre el espejo de agua, la cual no se removió durante las 96 horas de experimentación, contrario a la renovación diaria de las soluciones en las condiciones de laboratorio. Debido a que la mortalidad más alta también se encontró a las concentraciones mayores del Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F (212,4, 424,8 y 849,6 mg/l), se realizó un experimento adicional con aireación continua (promedio del oxígeno disuelto = 5,51 ppm), a través de la instalación de una bomba de aire (Power Life P500), para determinar qué tan tóxico podría ser ahora el Cosmo-Flux<sup>®</sup>411F a estas concentraciones. Los resultados de estos experimentos mostraron



que el Cosmo-Flux®411F no resultó ser letal para ninguno de los organismos de las especies del estudio. De tal manera que la toxicidad del Cosmo-Flux®411F hallada en el primer experimento a las concentraciones mayores pudo ser influida por las condiciones hipóxicas de estos tratamientos, más que por la misma toxicidad del Cosmo-Flux®411F. Lo anterior concuerda con estudios realizados por Bernal et al. (2011) y Seymour et al. (2000), quienes sostienen que la hipoxia acuática es un factor estresante del medio ambiente de los anuros, que puede tener efectos letales y generar retrasos en el desarrollo de los embriones y renacuajos. A pesar que la temperatura de los microcosmos también decayó significativamente en las concentraciones experimentales, los promedios máximos y mínimos de esta variación fueron relativamente cercanos (figura 2), y representan temperaturas frecuentes dentro del hábitat de estas especies en las cuales se ha demostrado una supervivencia embrionaria experimental del 100% (Bernal y Lynch 2013). El descenso en la temperatura de los microcosmos durante las 96 horas se atribuye a una disminución en la temperatura ambiental después de iniciado los experimentos.

Relyea (2012) indicó que los contaminantes pueden interferir en el desarrollo morfológico de los organismos causando alteraciones que impiden su adaptación al medio circundante. Por ejemplo, las alteraciones en la cola o la morfología de los renacuajos pueden afectar su capacidad natatoria, la cual es muy importante como respuesta de escape ante depredadores (Belden y Blaustein 2002, Kats et al. 2000), o en la búsqueda de alimento. En este estudio no se encontró que el Cosmo-Flux®411F causará diferencias morfométricas en la longitud de la cola, longitud corporal y longitud total de los renacuajos sobrevivientes hasta una concentración subletal de 212,5 mg/l en condiciones de laboratorio, ni de 411,2 l/ha (106,2 mg/l) en microcosmos (figura 1).

Tampoco causó retrasos en el desarrollo de los embriones expuestos a estas concentraciones, con excepción de *R. humboldti* en microcosmos en donde hubo una tasa de desarrollo menor a partir de 205,6 l/ha, que representa una concentración 205 veces superior a la sugerida para aplicación en campo. El que no se haya detectado ningún cambio significativo en la morfología de los individuos y en su tasa de desarrollo por la exposición al Cosmo-Flux®411F, a concentraciones aún superiores a las asperjadas bajo condiciones reales, parece confirmar la poca toxicidad de este coadyuvante sobre los embriones de los anuros. Sin embargo, queda por conocer si su efecto tóxico puede ser potenciado al aplicarse en interacción con el herbicida glifosato, aunque existen datos en renacuajos de estas especies que indican una toxicidad baja (Bernal et al. 2009a). En conclusión, el coadyuvante Cosmo-Flux®411F, bajo las concentraciones sugeridas de aplicación en campo, no produjo efectos tóxicos en los embriones de estudio, ni afectó su tasa de crecimiento y desarrollo.

## AGRADECIMIENTOS

A María Triana, Claudia Montes y Jorge Turriago, por el apoyo en los montajes y el desarrollo de esta investigación. A la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima por la financiación del trabajo, mediante el proyecto 490110. Este trabajo cuenta con el permiso de investigación científica en diversidad biológica otorgado por la Corporación Autónoma Regional del Tolima, CORTOLIMA (Resolución N.º 2886 de 2011).

## REFERENCIAS

- Belden LK, Blaustein AR. 2002. Exposure of red-legged frog embryos to ambient UV-B radiation in the field negatively affects larval growth and development. *Oecologia*, 130 (4): 551-554.
- Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. 2009a. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs I. Laboratory acute toxicity.

- Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 72: 961-965.
- Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. 2009b. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval and juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 72: 966-973.
- Bernal MH, Alton LA, Cramp RL, Franklin CE. 2011. Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on developing anuran embryos and larvae? Journal of Comparative Physiology Part B, 181 (7): 973-980.
- Bernal MH, Lynch JD. 2013. Thermal tolerance in anuran embryos with different reproductive modes: relationship to altitude. The Scientific World Journal, 2013: 1-7.
- Cosmoagro [Internet]. 2012. Cosmoagro: Cosmo-Flux®411F. Fecha de acceso: 4 de diciembre de 2012. Disponible en: <<http://www.cosmoagro.com/site/blog/cosmo-flux-411f/>>.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16 (3): 183-190.
- Guayara-Barragán MG, Bernal MH. 2012. Fecundidad y fertilidad en once especies de anuros colombianos con diferentes modos reproductivos. Caldasia, 34 (2): 483-496.
- Henao-Muñoz LM, Bernal-Bautista MH. 2011. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 35 (134): 105-110.
- Kats LB, Kiesecker JM, Chivers DP, Blaustein AR. 2000. Effects of UV-B radiation on anti-predator behavior in three species of amphibians. Ethology, 106 (10): 921-931.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risk in a complex environment. Environmental Pollution, 157: 2903-2927.
- Plötner J, Matschke J. 2012. Akut-toxische, subletale und indirekte Wirkungen von Glyphosat und glyphosathaltigen Herbiziden auf Amphibien - eine Übersicht. Zeitschrift für Feldherpetologie, 19: 1-20.
- Relyea RA. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (7): 1737-1742.
- Relyea RA. 2012. New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. Ecological Applications, 22 (2): 634-647.
- Rondon-Barragán IS, Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PR. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux®411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20: 431-446.
- Seymour RG, Roberts JD, Mitchell NJ, Blaylock AJ. 2000. Influence of environmental oxygen on development and hatching of aquatic eggs of the Australian frog, *Crinia georgiana*. Physiological and Biochemical Zoology, 73: 501-507.
- Solomon KR, Anadón A, Carrasquilla G, Cerdeira A, Marshall J, Sanin LH. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. Environmental Contamination and Toxicology, 190: 43-125.
- Van Leeuwen CJ, Vermeire TG. 2007. Risk assessment of chemicals: an introduction. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht (Netherlands): Springer. p. 686.