

EFFECTOS DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO Y LA METAMORFOSIS DE *SMILISCA PHAEOTA* (COPE, 1862) (ANURA: HYLIDAE)

EFFECTS OF INSECTICIDE CHLORPYRIFOS ON GROWTH RATE AND METAMORPHOSIS OF *SMILISCA PHAEOTA* (COPE, 1862) (ANURA: HYLIDAE)

Sandra M. Gallo-Delgado^{1,4}, Jaime A. Palacio-Baena^{1,2,5}, Paul David A. Gutiérrez-C.^{3,6}

Resumen

Renacuajos de *Smilisca phaeota* fueron expuestos a cuatro concentraciones (0,1, 1,0, 10 y 100 µg/l) subletales de clorpirifos, con el fin de examinar los efectos sobre la tasa de crecimiento de los renacuajos y el tiempo necesario para alcanzar la metamorfosis. Se utilizaron 36 renacuajos entre los estadios 25-26 (seis replicas por tratamiento), situados individualmente en vasos de precipitados de vidrio de 100 ml con 80 ± 3 ml de solución. La longitud total (LT) de cada individuo se midió a los días 3 y 18, y en el clímax de la metamorfosis (estadio 42). La mayor inhibición del crecimiento se observó en el momento clímax de la metamorfosis, con una reducción de la LT promedio de 14 y 17% en las mayores concentraciones del insecticida, frente al tratamiento control. A los tres días de exposición se observó también una reducción del 13,3% en el tamaño de los renacuajos expuestos a 100 µg/l de clorpirifos, en relación con el tratamiento control. En contraste, a los 18 días de exposición no se presentó un efecto significativo en el crecimiento de los renacuajos bajo algún tratamiento. Al parecer, las etapas iniciales y finales del desarrollo larval son las más afectadas por el insecticida y el tiempo para alcanzar el clímax de la metamorfosis también fue afectado por la exposición al clorpirifos. Los renacuajos expuestos a las dos concentraciones mayores del insecticida tomaron más tiempo (43 días en promedio) para alcanzar la metamorfosis.

Palabras clave: clorpirifos, crecimiento, metamorfosis, renacuajos, *Smilisca phaeota*

Abstract

Smilisca phaeota tadpoles were exposed to four sublethal concentrations (0.1, 1.0, 10 y 100 µg/l) of chlorpyrifos insecticide, in order to test the effects on growth rate and the time spend to reach the metamorphosis. Were used 36 tadpoles (six replicates for each treatment), between the Gosner stages 25-26, which were individually placed into 100 ml glass beackers with 80 ± 3 ml of solution. For the each individual, the total length (TL) was measured at the third and eighteenth days, and at the climax of metamorphosis (stage 42). The main growth inhibition was observed at metamorphosis, with a reduction in the mean TL of 14 and 17% in the treatments with the higher insecticide concentrations, compared to the control treatment. At the third day of exposure, there was a 13.3% reduction in the size of the tadpoles exposed to the highest concentration (100 µg/l), compared to the control treatment. In contrast, at the eighteenth day of exposure, there was no significant effect on tadpole growth, for any of the treatments. Therefore, is possible that the both initial and final stages of larval development are more affected by insecticide exposure and the time to complete metamorphosis was also affected by chlorpyrifos exposure. The tadpoles exposed to the two highest concentrations of insecticide took more days (mean 43 days) to reach metamorphosis.

Key words: chlorpyrifos, growth, metamorphosis, tadpoles, *Smilisca phaeota*.

Recibido: junio de 2005; aceptado: junio de 2006.

¹ Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA), Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

² Departamento de Ingeniería Sanitaria. Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia.

³ Grupo Herpetológico de Antioquia. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: ⁴ <smgallo@matematicas.udea.edu.co>, ⁵ <japalaci@udea.edu.co>, ⁶ <pdgutierrez2@yahoo.com>.

INTRODUCCIÓN

El declive de las poblaciones de anfibios alrededor del mundo en la última década, ha llevado a los investigadores a conocer cuales son sus factores causales (Lips et al., 2003). Esta situación parece estar relacionada con la acción individual o sinérgica de diversos factores, como la lluvia ácida (Pahkala et al., 2001), la radiación ultravioleta (Blaustein et al., 2003), los patógenos (Daszak et al., 2003), la introducción de especies exóticas (Kats y Ferrer, 2003), el incremento de la vulnerabilidad a la depredación (Relyea y Mills, 2001) y los efectos de sustancias tóxicas (Sparling et al., 2001). Los plaguicidas comúnmente utilizados en las regiones agrícolas son, en particular, una de las causas de contaminación de los ambientes acuáticos que están afectando el desarrollo normal de los anfibios en sus fases larvales acuáticas (Greulich y Pflugmacher, 2003). Dichos agroquímicos llegan a los hábitats acuáticos a través de la escorrentía o la deriva por acción del viento cuando son esparcidos en los cultivos.

Los efectos de la contaminación acuática sobre anfibios se manifiestan en anomalías y bajas tasas de desarrollo de embriones y de renacuajos, que pueden traducirse en una alta mortalidad de los individuos (Carr et al., 2003). Comúnmente, los xenobióticos se encuentran en bajas concentraciones en la naturaleza, y debido a esto, los efectos ecológicos de las exposiciones crónicas subletales son más relevantes que los efectos agudos letales (Boone et al., 2001). En general, los huevos y las larvas de anfibios son más sensibles que los adultos a la contaminación acuática (Greulich y Pflugmacher, 2003).

Los anfibios son considerados entre los tetrápodos como el grupo más susceptible a la contaminación química, especialmente en los estadios tempranos de desarrollo debido a sus características morfológicas y fisiológicas (Sima-A. et al., 2001). La reducida protección de los huevos y la alta permeabilidad de la piel de los anfibios los hace altamente vulnerables a la acción de los xenobióticos (Blaustein et al., 2003). Además, cambios en las comunidades

y la abundancia de las poblaciones de anfibios pueden indicar la presencia de xenobióticos en el ambiente (Rueda-A. et al., 2004).

La baja persistencia ambiental de los insecticidas organofosforados, ha conducido a que estos sean los más utilizados en los últimos años en las prácticas agrícolas. Sin embargo, estos agroquímicos son generalmente más tóxicos que los organoclorados y algunos estudios indican la bioacumulación en plantas acuáticas (Asselborn et al., 2000). Los organofosforados tienen efectos adversos sobre la supervivencia y la tasa de crecimiento de los anfibios, ya que pueden producir malformaciones y problemas en el comportamiento (Bonfanti et al., 2004). El organofosforado clorpirifos es el plaguicida más aplicado en Colombia, con un volumen de producción de 776.824,76 kg, reemplazando al monocrótofos (Arboleda et al., 2000). Aunque la vida media del clorpirifos en el agua es de días o semanas (US EPA, 2002), éste puede afectar en forma crónica a las especies de ciclos de vida cortos (Giraldo y Palacio, 1999).

Colombia es uno de los países más ricos en anfibios (Acosta-G., 2000). Las amplias zonas agrícolas de Colombia, más el uso indiscriminado y sin control de agroquímicos, pueden conducir gradualmente al declive o la extinción de las poblaciones de anfibios. A pesar de lo anterior, aún no se dispone de estudios ecotoxicológicos que evalúen los efectos de los plaguicidas sobre las poblaciones de los anfibios. Con este estudio se buscó establecer si la exposición a concentraciones subletales de clorpirifos produce efectos sobre el crecimiento y tiempo de la metamorfosis en renacuajos de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862).

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de prueba. La especie *S. phaeota* se distribuye en Centroamérica y Norte de Sudamérica, por debajo de 1.560 m de altitud. Se reproduce en charcas temporales de zonas intervenidas

(Mosquera et al., 2002; Páez et al., 2002). El periodo larval oscila entre 30 y 40 días (Gutiérrez-C., 1999). El rápido desarrollo larval posibilita la realización de ensayos de toxicidad crónica con renacuajos de esta especie. Se utilizaron renacuajos de una sola nidada de *S. phaeota*, colectadas en una charca permanente en la vereda Vegas de La Clara (municipio de Gómez Plata, departamento de Antioquia) a 1.100 msnm, y trasladada al Laboratorio de Bioensayos en la Universidad de Antioquia (Medellín, Antioquia).

Sustancia de prueba. El clorpirifos (0,0- dietil 0-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) es una sustancia sólida blanca, de apariencia cristalina y olor fuerte, conocida comercialmente como Lorsban[®], Dursban[®], Empire 20[®], Equaty[®] y Biothrina[®]. En agua es poco soluble, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de su aplicación (ATSDR, 1997). Toxicológicamente, el clorpirifos es de categoría II, produciendo como todos los insecticidas organofosforados, trastornos leves a intermedios en la actividad nerviosa, principalmente por una mayor inhibición de la acetilcolinesterasa, en comparación con otros organofosforados (Domitrovic, 2000). Este insecticida es utilizado en los cultivos de banano, papa, tabaco, cítricos, maíz y flores, entre otros, para el control de insectos y plagas de suelos y hojas (Lopera, 2004).

Aclimatación. Luego de la eclosión de los huevos, los renacuajos fueron mantenidos durante cuatro días en un acuario de vidrio con 3 l de agua filtrada, declorada y aireada. Durante la aclimatación y la exposición de los renacuajos a clorpirifos, la temperatura permaneció constante 22 ± 1 °C y se mantuvo un fotoperíodo de 16:8 horas luz:oscuridad. Los promedios de las condiciones fisicoquímicas del agua fueron: pH 7,27, dureza 60 mg/l de CaCO₃, alcalinidad 116 mg/l y la concentración media de oxígeno disuelto fue 6,4 mg/l. Los renacuajos fueron alimentados con TetraMin *ad libitum*.

Experimentación. Treinta y seis renacuajos en estadios 25-26 (Gosner, 1960) fueron expuestos a

cuatro concentraciones (0,1, 1,0, 10 y 100 µg/l) de clorpirifos (definidas de acuerdo a información secundaria del producto comercial con un 99% de pureza de clorpirifos). Adicionalmente, se establecieron dos controles, uno con agua de dilución y otro con solución acuosa de acetona. Cada uno de los tratamientos contuvo seis renacuajos (replicas), ubicados individualmente en vaso de precipitado de vidrio de 100 ml con 80 ± 3 ml de la solución de prueba. Dado que la vida media del clorpirifos fluctúa en el agua entre pocos días y semanas (US EPA, 2002), los periodos de renovación entre 48 y 72 horas son adecuados para pruebas crónicas. En este caso se hizo renovación de la solución cada 72 horas hasta concluir la prueba. A cada renacuajo vivo, se le midió la longitud total del cuerpo ($LT \pm 0,1$ mm de precisión) a los tres, 18 días y en el clímax de la metamorfosis. Finalmente, se registró el tiempo que cada renacuajo tardó en alcanzar el clímax de la metamorfosis, definido éste como el momento de la emergencia de los extremidades anteriores (estadio 42).

Análisis estadístico. Los resultados fueron evaluados previamente para determinar si cumplían los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza mediante las pruebas chi cuadrado y de Bartlett, con un $\delta = 0,01$ (Zar, 1984). Posteriormente, se aplicó una ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett (ambas con un $\delta = 0,05$) para establecer si existían diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y los controles e identificar que tratamientos presentan diferencias, tanto en la longitud corporal como en el tiempo de metamorfosis (Zar, 1984). Los resultados de la longitud total del cuerpo y el tiempo, fueron transformados a logaritmo para lograr una distribución normal de éstos (US EPA, 1990).

RESULTADOS

Durante los experimentos no se observó ningún efecto letal en los renacuajos de *S. phaeota* expuestos a las diferentes concentraciones y todos los renacuajos sobrevivieron hasta terminar la

metamorfosis. Sin embargo, la exposición a clorpirifos afectó negativamente la tasa de crecimiento y el tiempo para alcanzar la metamorfosis. Los renacuajos expuestos a las concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/l}$ del insecticida presentaron una reducción en la longitud corporal promedio, respecto a los tratamientos control (tabla 1). La reducción fue mayor a los tres días de exposición y en el momento clímax de la metamorfosis. La longitud

corporal de los renacuajos en los diferentes tratamientos varió significativamente entre las tres concentraciones más altas, tanto a los tres días ($F_{5,30} = 2,83$; $P = 0,03$), como en el clímax de la metamorfosis ($F_{5,30} = 6,18$; $P < 0,001$). Aunque a los 18 días de exposición se observó también una variación en la longitud corporal por efecto del plaguicida, no se presentó diferencias significativas ($F_{5,30} = 2,11$; $P = 0,09$) entre los tratamientos.

Tabla 1. Longitud total (LT, mm) de los renacuajos de *S. phaeota* expuestos durante los días 3, 18 y en el clímax de la metamorfosis, a cuatro concentraciones subletales de clorpirifos [para cada periodo de tiempo, $n = 36$; d. e. = desviación estándar; tratamiento control de agua con (C+) o sin (C-) acetona]

Tratamiento (concentración, $\mu\text{g/l}$)	Longitud total (LT, mm; promedio \pm d. e.)		
	día 3	día 18	clímax
0 (C-)	20,6 \pm 1,6	34,3 \pm 1,0	34,5 \pm 1,0
0 (C+)	20,9 \pm 1,5	34,4 \pm 2,9	35,7 \pm 1,5
0,1	21,1 \pm 0,9	34,2 \pm 1,7	31,7 \pm 3,8
1,0	20,3 \pm 0,8	32,8 \pm 2,9	31,2 \pm 1,8
10	19,9 \pm 2,0	31,8 \pm 2,2	30,2 \pm 1,2
100	18,0 \pm 2,6	31,5 \pm 2,1	29,2 \pm 3,8

La prueba de Dunnett muestra que los efectos más significativos sobre la longitud total de los renacuajos de *S. phaeota* se registraron en las concentraciones más altas de clorpirifos (10 y 100 $\mu\text{g/l}$) (tabla 2). En la tabla 1 se puede observar, que la mayor inhibición en el crecimiento se presentó en el clímax de la metamorfosis, donde la longitud media total se redujo de 34,5 \pm 1,0 mm en el control negativo a 30,2 \pm 1,2 mm en los individuos expuestos a 10 $\mu\text{g/l}$ y a 29,2 \pm 3,8

mm en los individuos en el tratamiento con 100 $\mu\text{g/l}$ de clorpirifos. Igualmente, se observó una disminución de la longitud total promedio a los tres días, con un valor medio de 18 \pm 2,6 mm en los ejemplares tratados con 100 $\mu\text{g/l}$. Aunque a los 18 días de exposición no se observaron diferencias significativas en la longitud de los renacuajos entre los tratamientos y los controles, a medida que se incrementó la concentración del clorpirifos disminuyó la longitud de las larvas.

Tabla 2. Valores de "d" de Dunnett para longitud corporal total (LT) y el tiempo de desarrollo para alcanzar el clímax de la metamorfosis [tratamiento control de agua con acetona (C+)]

Tratamiento (concentración, $\mu\text{g/l}$)	Valor d para LT			Tiempo de metamorfosis (días)
	día 3	día 18	clímax	
0 (C+)	-0,3	0,0	-0,7	0,3
0,1	-0,5	0,1	2,0	0,7
1,0	0,3	1,2	2,3	1,6
10	0,7	2,0	3,0	2,8
100	2,7	2,2	3,8	3,2

El efecto del plaguicida también se observó en el tiempo promedio que los renacuajos tomaron para alcanzar el momento clímax de la metamorfosis, en las concentraciones superiores a 1 µg/l de clorpirifos, y vario significativamente ($F_{5,30} = 3,60; P = 0,0114$) con el incremento de la concentración de clorpirifos. El tiempo promedio para alcanzar la metamorfosis también varió significativamente en las dos concentraciones más altas con relación al control negativo (tabla 3). Mientras los individuos del tratamiento control alcanzaron en promedio el clímax de la metamorfosis a los 37,3 días, los renacuajos sometidos a concentraciones de 10 y de 100 µg/l de clorpirifos se tardaron en promedio 42,5 y 43,3 días, respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Tiempo necesario para alcanzar el clímax de la metamorfosis en renacuajos de *S. phaeota* sometidos a cuatro tratamientos de clorpirifos [para cada periodo de tiempo, n = 36; d. e. = desviación estándar; tratamiento control de agua con (C+) o sin (C-) acetona]

Tratamiento (concentración, µg/l)	Tiempo de clímax de metamorfosis (días ± d. e.)
0 (C-)	37,33 ± 2,9
0 (C+)	37,83 ± 2,2
0,1	38,50 ± 3,1
1,0	40,33 ± 4,8
10	42,50 ± 3,0
100	43,33 ± 2,1

DISCUSIÓN

Ampliamente se ha demostrado que las sustancias xenobióticas afectan de manera negativa, aún en concentraciones muy bajas, a los renacuajos de los anuros en aspectos relacionados con el crecimiento, tiempo de desarrollo, morfología y comportamiento (Bridges, 1997; Fleeger et al., 2003; Richards y Kendall, 2003; Smith et al., 2006; Sparling et al., 2000). En este estudio se evidenció que renacuajos de *S. phaeota* expuestos a concentraciones subletales del insecticida clorpirifos, fueron afectados en su desarrollo, experimentando una reducción en

el tamaño corporal y un incremento en el tiempo para el clímax de la metamorfosis.

La información sobre los efectos de los productos organofosforados en el crecimiento y tiempo de desarrollo de los renacuajos de anfibios tropicales es aún limitada. La mayoría de las investigaciones realizadas con especies no neotropicales (i.e., *Bufo americanus*, *Hyla chrysoscelis*, *Hoplobatrachus tigrinus*), han demostrado que el clorpirifos es altamente tóxico (El-Merhibi et al., 2004; Mazanti et al., 2003). Además, reduce la longitud y la masa corporal de los renacuajos (Richards y Kendall, 2003), incrementa el tiempo de desarrollo y produce malformaciones (Mazanti et al., 2003).

Durante el crecimiento de los renacuajos se presenta un periodo inicial rápido, seguido de una fase más estable y una disminución en la tasa de crecimiento en el clímax de la metamorfosis (Duellman y Trueb, 1994). Los resultados de este estudio parecen reflejar este patrón, observándose que en la etapa media del desarrollo (18 días) de *S. phaeota* no se presentaron diferencias tan significativas entre los diferentes tratamientos, como ocurrió durante los tres primeros días del desarrollo y en el momento clímax de la metamorfosis. Esto también indica que tanto las primeras etapas, como las finales son las más críticas en el desarrollo larval (Duellman y Trueb, 1994).

La reducción en la longitud corporal y el retraso en el desarrollo de los renacuajos, tanto al inicio como al final del desarrollo larval a 100 µg/l de clorpirifos, puede estar relacionada con la interferencia de esta sustancia sobre el sistema colinérgico (El-Merhibi et al., 2004). Los plaguicidas organofosforados inhiben la acción de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), llevando a que en los organismos se presente un aumento de acetilcolina en el sistema nervioso, causando alteraciones sensoriales y de comportamiento. Como resultado de este trastorno, los organismos se vuelven más lentos y reducen los niveles de actividad, las tasas de forrajeo y en consecuencia la tasa de crecimiento (Sandoval et al., 2003).

Según Marian et al. (1983), los individuos generalmente son más susceptibles a los contaminantes cuando pasan de una fase acuática a una terrestre y los efectos subletales pueden ser mayores durante esta fase crítica. Un retraso en la metamorfosis puede estar relacionado con el hecho de que los individuos expuestos a la sustancia no han alcanzado el tamaño umbral de la metamorfosis (Duellman y Trueb, 1994), el cual puede deberse a la reducción en la tasa de forrajeo.

Estudios previos han demostrado que el crecimiento y la velocidad de metamorfosis en renacuajos dependen de factores ambientales como la temperatura, la cantidad y la calidad de los alimentos (Larson et al., 1998). Sin embargo, factores como la desecación de los charcos, la falta de alimento, pueden conducir a una metamorfosis prematura, y esto también puede estar sucediendo con la presencia de contaminantes ambientales (Räsänen et al., 2002).

El hecho que los renacuajos experimenten una metamorfosis temprana antes de alcanzar el tamaño umbral para ésta, da como resultado individuos terrestres con reducidos tamaños corporales y/o deformidades (Harris et al., 2000). Por lo tanto, son individuos que experimentan una reducida

eficacia biológica (Smith, 1987). De esta forma, la población se afecta negativamente por un bajo reclutamiento de individuos juveniles y/o la presencia de adultos afectados en su desempeño, que a largo plazo puede llevarla a la extinción (Werner 1986; McAlpine et al., 1998; Bridges, 2000).

Nuestros resultados demuestran que una exposición crónica de renacuajos a concentraciones altas ($> 10 \mu\text{g/l}$) de clorpirifos tiene efectos negativos significativos sobre el crecimiento y el tiempo de la metamorfosis, con posibles consecuencias sobre las poblaciones. Aunque *S. phaeota* es una especie asociada a zonas intervenidas, es altamente susceptible a la acción los contaminantes que están siendo usados sin control en las áreas agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA). Agradecemos a Vivian Páez, Brian Bock y al Grupo Herpetológico de Antioquia (GHA) y a todos los integrantes del grupo GAIA por su apoyo y colaboración con el estudio. A Carlos A. Serna por su colaboración en campo.

REFERENCIAS

Acosta-Galvis AR. 2000. Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana*, 1:289-319.

ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry = *Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades*). 1997. *ToxFAQs™ Clorpirifos (Chlorpyrifos)*. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E. U. A. Servicio de Salud Pública. Atlanta (GA), E. U. A. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts84.html>. Fecha de consulta: 3 agosto 2006.

Arboleda JP, Peinado JE, Urdaneta MA, Carrascal E. 2000. *Informe nacional sobre el uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar*

y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe. Ministerio del Medio Ambiente, Proyecto PNUMA//UCR/CAR. <<http://www.ine.gob.mx/cenica/cydif/seminarios/c/>>. Fecha de consulta: 23 marzo 2006.

Asselborn VM, Zalocar Y, Parodi E. 2000. *Efectos del insecticida organofosforado clorpirifos sobre el crecimiento y morfología de *Selenastrum capricornutum* Printz (Chlorophyta)*. Universidad Nacional del Nordeste (U. N. N. E.), Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Chaco-Corrientes, Argentina. <http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/6_biologicas/b_pdf/b_020.pdf>. Fecha de consulta: 23 marzo 2006.

- Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC.** 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9:123-140.
- Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Adrioletti M, Bacchetta R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara C.** 2004. Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 70:189-200.
- Boone MD, Bridges CM, Rothermel BB.** 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia*, 129:518-524.
- Bridges CM.** 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1935-1939.
- Bridges CM.** 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of Southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Environmental Contamination and Toxicology*, 39:91-96.
- Carr JA, Gentles A, Smith EE, Goleman WL, Urquidi LJ, Thuett K, Kendall RJ, Giesy JP, Gross TS, Solomon KR, Kraak GV.** 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:396-405.
- Daszak P, Conningham AA, Hyatt AD.** 2003. Infectious disease and amphibian population decline. *Diversity and Distributions*, 9:141-150.
- Domitrovic HA.** 2000. *Toxicidad y respuesta histopatológica en Cichlasoma dimerus (Pisces, Cichlidae) expuestos a carbofuran en ensayos de toxicidad aguda y en ensayos subletales.* Universidad Nacional del Nordeste (U. N. N. E.), Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Chaco-Corrientes, Argentina. <http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/4_veterinarias/v_pdf/v_046.pdf>. Fecha de consulta: 23 marzo 2006.
- Duellman WE, Trueb L.** 1994. *Biology of amphibians.* The Johns Hopkins University Press. Baltimore (MD), E. U. A.
- El-Merhibi A, Kumar A, Smeaton T.** 2004. Role of piperonyl butoxide in the toxicity of chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia* and *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(2):202-212.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM.** 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 317:207-233.
- Giraldo DL, Palacio JA.** 1999. Efectos del clorpirifos sobre la supervivencia y reproducción de *Daphnia pulex*. *Actualidades Biológicas*, 21(71):123-130.
- Gosner KL.** 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.
- Greulich K, Pflugmacher S.** 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology*, 65(3):329-336.
- Gutiérrez-C PDA.** 1999. *Aprendizaje olfatorio en el desarrollo embrionario y reconocimiento de parientes en larvas de Smilisca phaeota (Anura: Hylidae).* Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Harris ML, Chora L, Bishop CA, Bogart JP.** 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2):263-270.
- Kats LB, Ferrer RP.** 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions*, 9(2):99-110.
- Larson DL, McDonald S, Fivizzani AJ, Hamilton SJ.** 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiological Zoology*, 71:671-679.
- Lips KR, Reeve JB, Witters LR.** 2003. Ecological traits predicting amphibian population decline in Central America. *Conservation Biology*, 17:1078-1088.
- Lopera MM.** 2004. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Trabajo de Maestría. Ingeniería Ambiental, Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.
- Marian PM, Arul V, Pandian TJ.** 1983. Acute and chronic effects of carbaryl on survival, growth, and metamorphosis in the bullfrog (*Rana tigrina*). *Environmental Contamination and Toxicology*, 12(3):271-275.

- Mazanti L, Rice C, Bialek K, Spaling D, Stevenson C, Jonson WE, Kangas P, Rheinstein J.** 2003. Aqueous-phase disappearance of atrazine, metochlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. *Environmental Contamination and Toxicology*, 44(1):67-76.
- McAlpine DF, Burgess NM, Busby DG.** 1998. Densities of mink frogs, *Rana septentrionalis*, in New Brunswick forest ponds sprayed with the insecticide fenitrothion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(1):30-36.
- Mosquera H, Maturana HO, Echeverry CL, Jiménez AM, Asprilla J, Rengifo JT.** 2002. Aspectos reproductivos de *Smilisca phaeota* (Anura: Hylidae) en hábitats artificiales urbanos del Chocó, Colombia. *Revista Institucional* (Universidad Tecnológica del Chocó), 17:29-34.
- Páez VP, Bock BC, Estrada JJ, Ortega AM, Daza JM, Gutiérrez-C PD.** 2002. *Guía de campo de algunas especies de anfibios y reptiles de Antioquia*. Editorial Multipresos. Medellín (Antioquia), Colombia.
- Pahkala M, Laurila A, Björn LO, Merilä J.** 2001. Effects of ultraviolet-B radiation and pH on early development of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology*, 38:628-636.
- Räsänen K, Laurila A, Merilä J.** 2002. Carry-over effects of embryonic acid conditions on development and growth of *Rana temporaria* tadpoles. *Freshwater Biology*, 47:19-30.
- Relyea RA, Mills N.** 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* (U. S. A.), 98:2491-2496.
- Richards SM, Kendall RJ.** 2003. Physical effects of chlorpyrifos on two stages of *Xenopus laevis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* (Part A: Current Issues), 66(1):75-91.
- Rueda-Almonacid JV, Lynch JD, Amézquita A (eds.)**. 2004. *Libro rojo de anfibios de Colombia*. Conservación Internacional, Colombia, Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.
- Sandoval MT, Pérez-Coll C, Herkovits J.** 2003. *Efecto del insecticida malathion sobre embriones y larvas de Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). Universidad Nacional del Nordeste (U. N. N. E.), Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Chaco-Corrientes, Argentina. <www.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/06-Biologicas/B-022.pdf>. Fecha de consulta: 23 marzo 2006.
- Sima-Álvarez R, Mejía-Muñoz M, Rodríguez-Serna M, Güemez-Ricalde J.** 2001. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y efecto histopatológico del permanganato de potasio, en renacuajos de rana toro *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Universidad y Ciencia*, 17(34):65-72.
- Smith DC.** 1987. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68:344-350.
- Smith GR, Temple KG, Dingfelder HA, Vaala DA.** 2006. Effects of nitrate on the interactions of the tadpoles of two ranids (*Rana clamitans* and *R. catesbeiana*). *Aquatic Ecology*, 40(1):125-130.
- Sparling DW, Bishop CA, Linder G.** 2000. The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research. Pp. 1-14. *En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.). Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC technical publications series. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola (FL), E. U. A.
- Sparling DW, Fellers GM, McConnell.** 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, U. S. A. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(7):1591-1595.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency).** 1990. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4th ed. EPA 600/4-90/027. United States Environmental Protection Agency. Washington D. C., E. U. A.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency).** 2002. *Interim reregistration eligibility decision for chlorpyrifos*. EPA 738-R-01-007. Case N.º (0100). United States Environmental Protection Agency. Washington D. C., E. U. A.
- Werner EE.** 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *The American Naturalist*, 128(3):319-341.
- Zar JH.** 1984. *Biostatistical analysis*. Segunda edición. Prentice-Hall, Inc, Nueva Jersey (NJ), E. U. A.