

Informe final publicable de proyecto

Anfibios como bioindicadores de calidad ambiental en agroecosistemas frutícolas del Uruguay.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172249

Fecha de cierre de proyecto: 01/05/2026

PEREIRA SILVEIRA, Gisela María (Responsable Técnico - Científico)

LAJMANOVICH, Rafael Carlos (Investigador)

LAVAGGI DESTRO, María Laura (Investigador)

MANEYRO LANDÓ, Raúl Eduardo (Investigador)

RIERO, Mariabelen (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\\

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL/FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS/LABORATORIO DE ECOTOXICOLOGÍA. \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE RIVERA \\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La fruticultura de hoja (FHC) caduca es una actividad productiva relevante en Uruguay que implica un uso intensivo de agroquímicos, cuyos efectos sobre la fauna nativa aún son poco conocidos. Este proyecto evaluó la toxicidad de agroquímicos utilizados en FHC sobre anfibios autóctonos. El estudio se realizó en la Cañada del Dragón (Melilla, Montevideo), que atraviesa zonas de intensa actividad frutícola. Se seleccionaron tres sitios de muestreo a lo largo de la cañada (inicio, medio y final), así como dos charcos control en los Humedales del Santa Lucía. Se utilizó a *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) y *Odontophrynus asper* (Anura: Odontophrynidae) como especies bioindicadoras. Para evaluar la toxicidad de los sedimentos del sitio frutícola se realizaron experimentos de mesocosmos al aire libre, donde larvas de *B. pulchella* fueron expuestas a estos sedimentos y a los del control. En los sedimentos del sitio frutícola se confirmó la presencia de los insecticidas clorantianiliprol (9–11 µg/kg) y metoxifenocida (6–10 µg/kg). Los renacuajos expuestos a estos sedimentos mostraron mayor daño genotóxico, alteraciones enzimáticas, cambios en el comportamiento, y mayor frecuencia de malformaciones en relación con las larvas del control. Complementariamente, se realizaron bioensayos de exposición agudos y crónicos de larvas de *O. asper* al insecticida metoxifenocida (REPIDEX 240 SC). En la exposición aguda se detectaron efectos genotóxicos, mientras que en el bioensayo crónico no se observaron cambios en el crecimiento o desarrollo, pero sí un aumento significativo en el enrollamiento anormal del intestino y una disminución en la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) y catalasa (CAT), en comparación con el control. En conjunto, los resultados evidencian efectos subletales de los agroquímicos sobre anfibios nativos, refuerzan su valor como bioindicadores y aportan información clave para la evaluación del riesgo ambiental y el diseño de prácticas agrícolas más sostenibles que favorezcan su conservación.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Zoología, Ornitología, Entomología, Etología / Herpetología

Palabras clave: biomonitorio / Producción de cultivos frutales / anuros /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

En Uruguay, en las últimas décadas, se ha incrementado la superficie de tierras destinadas a agricultura y forestación (Baeza & Paruelo, 2020). Este incremento ha ido acompañado de un crecimiento en el consumo de plaguicidas (Cárcamo, 2020). En particular, la fruticultura de hoja caduca (FCH) implica un uso intensivo de pesticidas (Ferrer et al., 2013; Nuñez et al., 2007), cuya aplicación tiene como principales objetivos la protección de los cultivos y el control de enfermedades y plagas (Lema et al., 2014). Los pesticidas utilizados en los cultivos pueden impactar negativamente en el ambiente, ya que solo un 0,1% de la cantidad de plaguicida aplicado llega a la plaga, el resto circula como fuente de contaminación emergente para los sistemas bióticos y abióticos (Martino et al., 2008). En Uruguay, se ha reportado la presencia de agroquímicos tanto en agua como en sedimentos (Nardo et al., 2015; Soutullo et al., 2020).

Los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazados a nivel mundial (IUCN, 2026). En Uruguay, de las 49 especies evaluadas, doce están en alguna categoría de amenaza (Carreira & Maneyro, 2015). Dentro de las principales amenazas, a nivel global y local, se destaca la destrucción del hábitat por los cambios en el uso del suelo, así como la contaminación ambiental, asociada en parte al uso de agroquímicos (Carreira & Maneyro, 2019; IUCN, 2026). Los anfibios son particularmente sensibles a la degradación ambiental por sus características biológicas y fisiológicas (Wells, 2007), entre las cuales se destacan: ciclo de vida doble con larvas acuáticas y adultos terrestres (los expone a alteraciones en ambos medios); piel delgada y permeable (propicia la entrada de tóxicos); alta tasa de bioacumulación (Unrine et al., 2007); baja capacidad de dispersión y alta fidelidad de sitio (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007). Además, al habitar charcos asociados o inmersos en sistemas agrícolas, tienen alta probabilidad de entrar en contacto con agroquímicos (García-Muñoz et al., 2010). En particular, las larvas son más sensibles frente a cambios ambientales (Hopkins, 2007). Por esto, son utilizados como bioindicadores de calidad ambiental, dando información sobre su ambiente o sobre el impacto de determinadas prácticas antropogénicas sobre el mismo (ej. Attademo et al., 2005; Peltzer et al., 2013; Bionda et al., 2018).

En altas dosis los agroquímicos pueden causar la muerte de individuos expuestos, pero generalmente producen efectos subletales crónicos que afectan indirectamente la supervivencia, como pueden ser la aparición de malformaciones morfológicas (Pollo et al., 2019); alteraciones comportamentales (Marco et al., 1999); y un enlentecimiento en la metamorfosis (de Wijer et al., 2003). A nivel regional, diversos estudios evaluaron los efectos de agroquímicos sobre anuros (Bosch et al., 2011; de Wijer et al., 2003; Lajmanovich et al., 2005; 2009, entre otros). Sin embargo, estudios que involucren el uso de sedimentos contaminados para evaluar estos efectos, son escasos (Peltzer et al., 2013). En sitios de FHC, los agroquímicos pueden llegar a los cuerpos de agua utilizados por los anfibios principalmente por escorrentía o lixiviación. Estos compuestos tienden a ser absorbidos por los sedimentos y terminan acumulándose en ellos (Hoffman et al., 2003). Las pruebas de toxicidad de sedimentos resultan claves para explorar si los contaminantes químicos en los sedimentos son riesgosos para organismos acuáticos (USEPA, 1996).

La intensificación de la FHC en Uruguay implica un uso creciente de agroquímicos. No obstante, poco se conoce acerca del impacto ambiental que esta actividad puede generar, particularmente sobre la biota. Pese al gran potencial de los anfibios como bioindicadores ambientales, los estudios que los involucran como herramientas para el biomonitorio en Uruguay son escasos. El objetivo de este proyecto es evaluar la potencial toxicidad de los sedimentos en un sitio bajo actividad frutícola, utilizando larvas de anfibios como bioindicadoras. Esto requiere la implementación de herramientas específicas, como los bioensayos ecotoxicológicos con sedimentos. Los experimentos de mesocosmos consisten en peceras que contienen sedimentos y agua donde se desarrollarán las larvas. La potencial toxicidad asociada a los sedimentos se evalúa mediante biomarcadores de efecto (ej. parámetros en las células sanguíneas, actividad enzimática). No obstante, en sistemas complejos (como lo son los mesocosmos), es difícil establecer una relación directa de causa-efecto con elementos específicos (Gauthier et al., 2004). En este sentido, los bioensayos de exposición (a un agroquímico específico) permiten establecer relaciones causa-efecto y obtener parámetros toxicológicos relevantes (Peluso, 2021), por lo que el uso de estos dos abordajes de forma complementaria permitirá un enfoque integral para comprender el efecto de los agroquímicos utilizados en FHC sobre anfibios nativos.

El objetivo general de este proyecto fue conocer el efecto de alguno de los agroquímicos utilizados en la fruticultura de hoja caduca (FHC) en Uruguay, sobre anfibios autóctonos. En particular, se buscó evaluar la potencial toxicidad de los sedimentos asociada al uso intensivo de agroquímicos que implica la FHC, utilizando larvas de anuros como bioindicadoras.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar la presencia y concentración de alguno de los agroquímicos más utilizados en el manejo de los cultivos frutícolas en sedimentos.
2. Analizar la incidencia de los agroquímicos acumulados en sedimentos afectados por la FHC sobre el desarrollo, crecimiento, supervivencia, comportamiento y presencia de malformaciones externas en larvas de anuros.
3. Estudiar el potencial genotóxico de los agroquímicos acumulados en sedimentos afectados por la FHC.
4. Evaluar la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión S-transferasa (GST) en las larvas de anuros expuestas a sedimentos provenientes del sitio afectado por la FHC y a sedimentos del sitio control.
5. Analizar el efecto de alguno de los agroquímicos más utilizados en el área de estudio sobre la supervivencia y desarrollo de las larvas de anfibios anuros.

Metodología/Diseño del estudio

Sitio de estudio

El estudio se realizó en La Cañada del Dragón (Melilla, Montevideo). Esta cañada se sitúa en una zona de intensa producción hortifrutícola. El plan de manejo de los cultivos frutícolas incluyó el uso de acetamiprid, abamectina, matrine, metoxifenoide, mirex y clorantianiliprol. A lo largo de la cañada, se seleccionaron tres sitios de muestreo: 1 (inicio), 2 (medio), y 3 (final). Además, se seleccionaron dos charcos en Humedales del Santa Lucía, como sitios control (C1/C2).

Experimentos de mesocosmos

En cada uno de los sitios seleccionados se extrajeron sedimentos una única vez, de forma estandarizada (Gristo et al., 2002), utilizando un corer. La extracción se realizó hasta una profundidad de 10 cm, ya que los mayores niveles de contaminantes se concentran en las capas superficiales (Hoffman et al., 2003). Se tomaron seis muestras por cada sitio que fueron almacenadas a -30°C hasta el comienzo del experimento. Una submuestra de cada sitio fue enviada al Laboratorio Analítico Agroindustrial (LAAI) para analizar la presencia y concentración de los pesticidas utilizados en el manejo del cultivo, mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS). En el control, se colectaron renacuajos de *Boana pulchella* en un estadio de desarrollo temprano. Los renacuajos fueron colectados bajo la autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos, Ministerio de Ambiente (Permiso de colecta - código EM2023/360001/012957). Se mantuvieron en acuarios de vidrio (15L de capacidad) con agua filtrada y declorada (filtro PSA, modelo senior 3), hasta que alcanzaron el estadio GS25 (Gosner, 1960), bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12:12 horas luz/oscuridad, oxigenadores con burbujeo constante a ± 90 burbujas/min. Además, fueron alimentadas ad libitum con lechuga hervida hasta el comienzo del experimento (Junges et al., 2012; Lajmanovich et al., 2014). Todos los procedimientos descritos a continuación fueron realizados siguiendo el protocolo de experimentación ID1503, aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias, Udelar. Los experimentos de mesocosmos al aire libre se realizaron siguiendo las metodologías de Peltzer et al. (2013) y USEPA (1996), con algunas modificaciones. Los sedimentos extraídos de cada sitio (C, T1, T2, T3) se colocaron en la base de acuarios de vidrio junto con agua filtrada y declorada, en una proporción sedimento/agua de 1:4. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Luego de un reposo de 48hs, se colocaron 42 larvas de *B. pulchella* en estadio GS25 (Gosner, 1960) por cada réplica. Las larvas se alimentaron ad libitum cada dos días con lechuga hervida y la mortalidad se controló diariamente (Peltzer et al., 2013). Semanalmente, se registró para cada mesocosmo la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, turbidez (NTU) y concentración de oxígeno disuelto (mg/L) en agua utilizando un equipo multiparámetro. Al inicio y al final del experimento, se registró la concentración de nitratos y fosfatos disueltos en el agua siguiendo a Monteiro et al. (2003) y APHA (1995), respectivamente. Una única vez, se extrajeron seis renacuajos por tratamiento para análisis de genotoxicidad y seis más para el análisis de actividad enzimática. Una vez a la semana, se extrajeron seis individuos por tratamiento para evaluar puntos biológicos morfológicos y comportamentales. Este análisis abarcó hasta el día 69 (semana 10), cuando uno de los tratamientos no alcanzó el número mínimo de individuos para los análisis.

Análisis de genotoxicidad

Las larvas fueron sacrificadas mediante inmersión en eugenol al 10% y se les extrajo sangre utilizando capilares heparinizados. Se prepararon frotis de sangre periférica por duplicado, los cuales fueron fijados con alcohol absoluto durante 15 minutos, y luego se dejaron secar a oscuras y a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, fueron teñidos mediante la técnica May Grünwald-Giemsa (Lajmanovich et al., 2014). Para la observación de los preparados se utilizó un microscopio óptico de campo claro ZEISS PRIMOSTAR 3, con una magnificación de 1000x. Se registró la presencia de micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares (ANE) en 1000 eritrocitos por larva (Cabagna et al., 2006; Lajmanovich et al., 2014). Los frotis de sangre fueron fotografiados usando una cámara ZEISS de 8 Megapíxeles. Para identificar a los MN se siguieron los criterios de Fenech (2000), Meintjers et al., (2001) y Schmid (1975), mientras que las ANE fueron identificadas y clasificadas siguiendo los criterios de Josende et al. (2015), Lajmanovich et al., (2014) y Pereira et al., (2024).

Análisis enzimáticos

Se evaluó la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa (GST), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y acetilcolinesterasa (AChE). La actividad de GST se determinó mediante una técnica basada en la conjugación de glutatión reducido (GSH) con el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), formando un producto que se detecta por aumento de absorbancia a 340nm (Habig et al. 1974). La actividad de CAT se determinó mediante el método de Aebi (1984), midiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, permitiendo monitorear la reacción mediante la disminución de la absorbancia a 240 nm. La actividad de SOD se determinó según el método de Kostyuk & Potapovich (1989), que evalúa la capacidad de la enzima para inhibir la autooxidación de la quercetina en condiciones alcalinas. Se midió la disminución de la tasa de oxidación de quercetina a 460nm. La actividad de AChE se determinó según el método de Ellman et al. (1961), que se basa en medir la hidrólisis de acetilcolina ante la presencia de DTNB (5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)), dando lugar a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que genera un producto amarillo que puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 412 nm.

Análisis comportamentales

La actividad natatoria se evaluó individualmente siguiendo la metodología descrita en do Amaral et al., (2018). Se colocó a cada larva en un recipiente con 1L de agua filtrada y declorada. Cada renacuajo se aclimató durante 5 minutos y luego se agitó suavemente el agua durante 5 segundos con una varilla de vidrio y se observó su actividad durante 60 segundos. Los comportamientos observados se clasificaron en tres categorías: Natación normal (NS): nado activo contracorriente, con patrón de natación normal; Natación anormal (NA): nado con poco esfuerzo contracorriente o con patrón de nado anormal; Inmovilidad (IN): ausencia total de movimiento. Posteriormente, se evaluó la velocidad de natación individual de acuerdo a Egea-Serrano & Tejedo (2014) y Silva et al. (2020; 2021). Se colocó a cada larva en un recinto de poca altura con agua filtrada y declorada, de modo que la natación se vio limitada al plano horizontal. Cada renacuajo se aclimató durante 5 minutos y luego se indujo una respuesta natatoria al tocar suavemente la cola con una pipeta. Este procedimiento se realizó unas cinco veces por larva, dejando un minuto de aclimatación entre ensayos (Britson & Threlkeld, 1998). La distancia recorrida y el tiempo empleado en el evento natatorio se midieron utilizando un cronómetro y una regla graduada, respectivamente. Se calculó la velocidad total de natación (cm/s) como la distancia total recorrida (cm) sobre el tiempo que le llevó recorrer dicha distancia (s).

Tasas de desarrollo y crecimiento y medidas morfológicas

El primer día del experimento, antes de colocar a las larvas en sus respectivos tratamientos, se determinó la masa húmeda, de doce renacuajos por tratamiento y su estadio de desarrollo de acuerdo a Gosner (1960), observándolas bajo una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800. Al final del experimento, las larvas sobrevivientes fueron pesadas vivas, fotografiadas dorsal y lateralmente, y luego anestesiadas con benzocaína tópica y fijadas en formol al 10%. Utilizando el software Micrometrics® SE Premium, se determinaron las siguientes variables morfológicas en base a las fotografías tomadas: longitud del cuerpo (BL); longitud de la aleta caudal (TFL); alto del cuerpo (BD); altura del músculo de la cola (TMD); altura máxima de la aleta caudal (TFD); ancho máximo del músculo de la cola (TW) y ancho máximo del cuerpo (BW) (Relyea & Werner, 2000). Las tasas de crecimiento (GR) y de desarrollo (DR) de las larvas, se calcularon en base a Teplitsky et al., (2003).

Análisis morfológicos

Las larvas fijadas se analizaron en búsqueda de anomalías morfológicas, utilizando una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800. Las anomalías morfológicas se identificaron según Krishnamurthy & Smith, (2011), Peltzer et al., (2013; 2021); Curi et al., (2017); Sansiñena et al., (2018); Cuzziol Boccioni et al., (2022) y se clasificaron en: 1. anomalías corporales; 2. anomalías en el disco oral; 3. anomalías en la cola; y 4. anomalías intestinales.

Análisis de datos

La normalidad de los datos se probó mediante el test de Shapiro-Wilk, mientras que la homogeneidad de varianzas se probó utilizando el test de Levene (Zar, 2010). El nivel de significancia estadística para todos los análisis se estableció en $\alpha=0.05$. Las diferencias entre tratamientos se testaron mediante un Análisis de varianza paramétrico (ANOVA), cuando los datos fueron normales y homogéneos, y el análisis de varianza no-paramétrico de Kruskal Wallis, cuando no lo fueron. Al detectarse diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó la prueba de Tukey o el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010), respectivamente, o el test de Dunn, utilizando del software Past 4.13 (Hammer et al., 2001). Las diferencias en las frecuencias de MN y de ANE entre tratamientos se analizaron mediante el test de proporción binomial (Margolin et al., 1983), utilizando el software BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007). Los datos de velocidad de nado se normalizaron dividiendo por el largo total de las larvas (cm).

Bioensayos de exposición:

Mediante pruebas exploratorias de 48 hs se determinó la concentración letal media (CL50), la concentración sin efecto observado (NOEC), y la concentración con efecto observado más baja (LOEC), para renacuajos de *Odotophrynus asper* expuestos al formulado comercial RAPIDEX 240 SC, cuyo principio activo es el metoxifenocida (valoración: 220 g/L). Cada tratamiento se realizó por triplicado, y se colocaron 6 renacuajos por réplica. Cada 24hs se monitoreó el pH, DO (mg/L), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y el número de organismos muertos. Se determinaron los valores de CL50, NOEC y LOEC utilizando el paquete "mixtox" del Software R (Zhu & Cheen, 2016).

En el bioensayo para evaluar genotoxicidad aguda (48 hs), las larvas fueron expuestas a los siguientes tratamientos con metoxifenocida: T1=4.4 mg/L (NOEC); T2=0.88 mg/L (NOEC/5); a un control positivo (40 mg/L de Ciclofosfamida) (Lajmanovich et al., 2005; Pérez-Iglesias et al., 2015), y a un control negativo con agua de filtro declorada. Se utilizaron frascos de vidrio de cinco litros de capacidad que contenían 2 L de solución de prueba, y se realizaron tres réplicas por tratamiento, con diez larvas por réplica

(n=120). La mortalidad se registró cada 24 horas y los individuos muertos fueron retirados y fijados en formol al 10%. Durante los bioensayos de CL50 y los experimentos de genotoxicidad, las larvas no fueron alimentadas, y se monitorearon el pH, el oxígeno disuelto (mg/L), la conductividad y la temperatura del agua de acuerdo con las recomendaciones de la USEPA (1975). Se extrajo sangre de doce renacuajos por tratamiento para los análisis de genotoxicidad, tal como se describió anteriormente. Se realizó un ensayo crónico (1800 hs de duración) para evaluar los efectos subletales del formulado comercial REPIDEX 240 SC en renacuajos de *Odontophrynus asper*. Se testaron tres concentraciones subletales, correspondientes a la NOEC/20 (0.22 mg/L), NOEC/10 (0.44 mg/L), y NOEC/5 (0.88 mg/L). Además, se utilizó un control negativo (C) con agua filtrada y dechlorada. Se utilizaron frascos de vidrio de 5 L de capacidad, con 2 L de solución de prueba. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se colocaron 30 renacuajos por réplica (n=360), que fueron alimentadas con lechuga hervida cada 48 hs. Se realizó un recambio de las soluciones de ensayo cada 48 hs, preparando las soluciones de prueba inmediatamente antes de cada recambio. Se controlaron los parámetros anteriormente mencionados, siguiendo las recomendaciones de USEPA (1975). La mortalidad se registró diariamente, y los individuos muertos fueron removidos inmediatamente y fijados en formol al 10%. El análisis de biomarcadores morfológicos y enzimáticos y el cálculo de las tasas de desarrollo y crecimiento se realizaron tal como se describió anteriormente.

Resultados, análisis y discusión

Experimentos de mesocosmos

Se constató la presencia de los insecticidas clorantraniliprol (9-11 µg/kg) y metoxifenocida (6-10 µg/kg) en los sedimentos provenientes del sitio frutícola. Los renacuajos de *Boana pulchella* que se desarrollaron expuestos a dichos sedimentos presentaron alteraciones a nivel celular, enzimático, morfológico y comportamental. La frecuencia de micronúcleos (MN) y otras aberraciones nucleares (ANE) en los eritrocitos de renacuajos que se desarrollaron expuestos a sedimentos frutícolas fue mayor en comparación al control, indicando daño genotóxico y citotóxico (C/T1: $Z=-9.41$, $p<0.0001$; C/T2: $Z=-7.87$, $p<0.0001$; C/T3: $Z=-11.54$, $p<0.0001$, Test de Proporción Binomial). Estos efectos adversos a nivel celular no pueden tener repercusiones a niveles superiores de organización biológica, especialmente cuando el daño tiene lugar durante el proceso metamórfico, donde están ocurriendo intensos procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación celular, y cualquier daño en el ADN puede resultar en malformaciones que posteriormente afectan la capacidad de los renacuajos de reproducirse y sobrevivir (de Melo e Silva et al., 2024). En cuanto a la actividad enzimática, la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y acetilcolinesterasa (AChE) se vio afectada en algunos tratamientos en comparación al control. La actividad de SOD disminuyó en los T1 y T3 en comparación al control ($F=21.06$, $p=0.0003$, ANOVA; C/T1: $p=0.001$; C/T3: $p=0.003$, Test de Tukey), lo que se relaciona con un aumento excesivo de la concentración de radicales libres inducida por la presencia de contaminantes, provocando una condición de estrés oxidativo que excede la capacidad del organismo para responder al daño oxidativo e inactivando, en consecuencia, enzimas antioxidantes como la SOD (Li et al., 2025; Hu et al. 2025). Por otra parte, la actividad de AChE se incrementó en los tratamientos T1 y T2 en comparación al control ($F=14.98$, $p=0.001$, ANOVA; C/T1: $p=0.002$; C/T2: $p=0.005$, Test de Tukey). Un aumento en la actividad de esta enzima se ha relacionado con una respuesta del organismo a la exposición a contaminantes, que aumenta su síntesis, ya que probablemente asume una función metabolizadora de xenobióticos (Ndlovu & Basopo, 2022). Se identificaron 11 tipos de malformaciones morfológicas, las cuales fueron más frecuentes en renacuajos expuestos a sedimentos frutícolas en comparación al control (C/T1: $Z=-2.10$, $p=0.02$; C/T2: $Z=-3.62$, $p<0.0001$; C/T3: $Z=-6.05$, $p<0.0001$, Test de Proporción Binomial). Las malformaciones más frecuentes fueron las del disco oral (Frec. relativa de anomalías: disco oral = 31.02 %; intestinales = 10.84%; cola = 6.93; corporales = 5.72%), que incluyen la pérdida de queratodotes y alteraciones en el pico córneo, las cuales reducen la eficiencia en la alimentación de los renacuajos (Venesky et al., 2010). En cuanto a la mortalidad, las tasas de desarrollo y crecimiento, las variables morfológicas y la velocidad de nado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Finalmente, los renacuajos que se desarrollaron en el T3 presentaron una mayor frecuencia de natación anormal ($H=9.44$, $p=0.02$, Test de Kruskal Wallis; C/T3: $p=0.007$, Test de Mann-Whitney). Esta alteración puede resultar en una mayor vulnerabilidad ante depredadores (do Amaral et al., 2018) y en una disminución en la alimentación, lo que a su vez puede afectar la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de los individuos (Bach et al., 2016). Estos resultados dan cuenta de la capacidad de los sedimentos de sitios frutícolas de acumular pesticidas utilizados en el manejo de los cultivos, específicamente metoxifenocida y clorantraniliprol. Asimismo, la toxicidad asociada a los sedimentos generó efectos adversos en renacuajos de *Boana pulchella* que se desarrollaron expuestos a los mismos, a nivel celular (mayor frecuencia de MN y ANE), nivel enzimático (alteraciones en la actividad de SOD y AChE), nivel morfológico (mayor frecuencia de malformaciones morfológicas) y nivel comportamental (mayor frecuencia de natación anormal). No obstante, no es posible atribuir los efectos observados exclusivamente a los pesticidas detectados, ya que no podría descartarse la presencia de otros contaminantes que no fueron analizados en este trabajo (por ejemplo: pesticidas no utilizados actualmente, pero de alta persistencia, metales, excipientes de formulados comerciales, etc.), y al posible efecto sinérgico o antagónico que puedan estar generando su interacción con los insecticidas detectados. En sistemas complejos, es difícil establecer una relación directa de causa-efecto con elementos específicos (Gauthier et al., 2004).

Bioensayos de exposición

Se determinó la concentración que produce una mortalidad de 50% de los individuos expuestos (CL50), la concentración más baja con efecto observado (LOEC) y la concentración más alta que no produce efecto en la mortalidad (NOEC), para renacuajos de *Odontophrynus asper* expuestos al formulado comercial REPIDEX 240 SC (a base de metoxifenocida): CL50 = 11.59 mg/L; LOEC = 8.6 mg/L; NOEC = 4.4 mg/L. Como resultado del bioensayo de genotoxicidad aguda (48 hs de exposición) se identificaron MN y 11 tipos de ANE, siendo más frecuentes en todas las concentraciones del agroquímico al que se expusieron los renacuajos (0.88 mg/L, 4.4 mg/L) en comparación al control (C/T14.4mg/L: $Z=-10.06$, $p<0.0001$; C/T20.88mg/L: $Z=-9.73$, $p<0.0001$, Test de Proporción Binomial), indicando daño genotóxico y citotóxico. Estos resultados dan cuenta del valor de este bioindicador como una señal de alerta temprana. Asimismo, la simpleza y facilidad de la técnica para ser llevada a cabo tanto en campo como en laboratorio y su bajo costo (Peltzer et al., 2024), la convierte en una potente herramienta para el biomonitoreo en agroecosistemas. En cuanto a los resultados del bioensayo de exposición crónica (1800 horas de exposición), no se observaron diferencias significativas en las tasas de desarrollo y crecimiento, ni en las variables morfológicas analizadas. En lo referente a la actividad enzimática, los renacuajos de *Odontophrynus asper* expuestos a 0.88 mg/L de metoxifenocida (mayor concentración testada) presentaron una disminución significativa en la actividad de la glutatión S-Transferasa (GST) en comparación al control ($H=9.46$, $p=0.002$, Test de Kruskal Wallis; C/T20.88mg/L: $p=0.02$, Test de Dunn). Al tratarse de una enzima involucrada en el mecanismo de biotransformación, modificando los contaminantes para volverlos más excretables (de Almeida & Freitas, 2024), su inhibición puede comprometer la capacidad del organismo de defenderse frente a xenobióticos. Por su parte, la actividad de la catalasa (CAT) también se vio disminuida en renacuajos de *O. asper* expuestos a 0.44mg/L y 0.88 mg/L de metoxifenocida ($H=10.38$, $p=0.02$, Test de Kruskal Wallis; C/T10.44mg/L: $p=0.04$; C/T20.88mg/L: $p=0.002$, Test de Dunn). Al igual que la SOD, esta enzima cumple una función antioxidante, por lo que su inhibición también podría estar comprometiendo la capacidad de los renacuajos de responder en condiciones de daño oxidativo (Hu et al., 2025). Finalmente, la frecuencia de malformaciones morfológicas identificadas no mostró diferencias significativas entre tratamientos y el control, excepto para la frecuencia de enrollamiento anormal del intestino (U), que fue significativamente mayor en renacuajos expuestos a 0.88 mg/L de metoxifenocida (C/T20.88mg/L: $Z=-2.84$, $p<0.002$, Test de Proporción Binomial). Estos resultados evidencian los efectos generados por el insecticida metoxifenocida sobre renacuajos de *O. asper*, una especie frecuente en agroecosistemas, a distintos niveles de organización (celular, enzimático, morfológico). Asimismo, se destaca la aparición de efectos a muy bajas concentraciones, ya que a pesar de que la CL50 fue de 11.59 mg/L, efectos nivel celular (mayor frecuencia de MN y ANE) aparecieron en una concentración de 0.88 mg/L y la actividad enzimática de la CAT se vio afectada a una concentración de 0.44 mg/L, ambas concentraciones son 5 y 10 veces menores que la concentración mínima con efecto observado en la mortalidad (NOEC), respectivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que los sedimentos provenientes de sitios frutícolas, así como la exposición al insecticida metoxifenocida, generan efectos adversos en anfibios a nivel celular, enzimático, comportamental y morfológico. La detección de daño genotóxico, alteraciones enzimáticas y cambios en el comportamiento, incluso en ausencia de efectos sobre la supervivencia, el crecimiento o el desarrollo, destaca la importancia de incorporar estos biomarcadores sensibles para la evaluación de la calidad ambiental. En este sentido, la complementariedad de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica permitió una evaluación más integral de los efectos de los contaminantes. No obstante, la complejidad de los sistemas estudiados impide atribuir los efectos observados exclusivamente a los compuestos detectados, ya

que no puede descartarse la presencia de otros contaminantes ni la ocurrencia de interacciones entre ellos. En este sentido, los resultados deben interpretarse en el marco de exposiciones múltiples y condiciones ambientales variables, propias de los agroecosistemas. Los resultados remarcan la necesidad de implementar la gestión de sedimentos en los cuerpos de agua dentro de sistemas agrícolas. Finalmente, cabe destacar que este estudio aporta evidencia novedosa sobre los efectos del metoxifenocida en vertebrados.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados del presente proyecto permiten concluir que la exposición a sedimentos provenientes de cultivos frutícolas, así como la exposición al insecticida metoxifenocida (Formulado comercial REPIDEX 240 SC), generan efectos adversos en anfibios a múltiples niveles de organización biológica. En particular, se evidenció la presencia de daño genotóxico y citotóxico, alteraciones en biomarcadores enzimáticos asociados a procesos de estrés oxidativo y detoxificación, alteraciones en el comportamiento, y un incremento en la frecuencia de anomalías morfológicas en renacuajos expuestos. Cabe destacar que estos efectos se detectaron incluso en ausencia de cambios significativos en respuestas biológicas comúnmente utilizadas como indicadores de contaminación, como, por ejemplo: la supervivencia, el crecimiento o las tasas de desarrollo. Este resultado resalta la importancia de incorporar biomarcadores sensibles en estudios ecotoxicológicos, ya que permiten identificar respuestas subletales tempranas que podrían tener consecuencias a futuro sobre la aptitud de los individuos y sobre la dinámica de las poblaciones. La evaluación en conjunto de biomarcadores genéticos, bioquímicos, comportamentales y morfológicos demostró ser un enfoque sólido para la detección de efectos de contaminantes en organismos expuestos a condiciones ambientales complejas, y permitió obtener una visión más completa del impacto de los agroquímicos.

Los resultados obtenidos en los experimentos de mesocosmos al aire libre evidencian el rol de los sedimentos como reservorios de contaminantes en agroecosistemas. La detección de insecticidas en sedimentos y los efectos observados en los renacuajos de *Boana pulchella*, sugiere que los sedimentos representan una vía relevante de exposición crónica para los anfibios, particularmente durante sus etapas iniciales de desarrollo. Por este motivo, resulta clave monitorear el estado de las poblaciones de anfibios presentes en los cuerpos de agua inmersos en agroecosistemas frutícolas; y se destaca la necesidad de implementar la gestión de sedimentos en los cuerpos de agua dentro de sistemas agrícolas.

Los bioensayos de exposición con metoxifenocida permitieron el cálculo de parámetros toxicológicos clave, como la Concentración Letal 50 (CL50), que corresponde a la dosis letal para el 50% de los organismos durante el período de exposición; la concentración sin efecto observado (NOEC), entendida como el nivel más alto que no genera efectos adversos significativos frente al control; y la concentración con efecto observado más bajo (LOEC), que marca el umbral más bajo con diferencias significativas respecto al control. Estos parámetros son de gran valor porque permiten comparar el grado de toxicidad de diferentes compuestos, evaluar la sensibilidad relativa entre especies y analizar variaciones bajo distintas condiciones experimentales. Además, estos bioensayos permitieron identificar efectos adversos a concentraciones considerablemente más bajas que las letales. Los efectos observados a nivel celular e individual (particularmente el daño genético, las alteraciones enzimáticas y las malformaciones), podrían tener consecuencias a largo plazo sobre la supervivencia, la reproducción y el desempeño de los individuos en su ambiente natural. Los cambios comportamentales, como la natación anormal, podrían traducirse en una mayor vulnerabilidad frente a depredadores o en una menor eficiencia en la obtención de alimento, afectando indirectamente la condición corporal y la probabilidad de culminar el proceso de metamorfosis. La detección de daño genotóxico y alteraciones en la actividad enzimática a concentraciones subletales destacan la importancia de incorporar estos biomarcadores de alerta temprana en la evaluación de la toxicidad de agroquímicos.

En conjunto, los resultados confirman el valor de los anfibios como herramientas sensibles de biomonitoreo en agroecosistemas, destacando el uso de *Boana pulchella* y *Odontophrynus asper* como modelos biológicos apropiados para estudios ecotoxicológicos. Este proyecto evidencia por primera vez en Uruguay que los sedimentos contaminados en zonas frutícolas pueden generar efectos adversos en especies nativas, aportando conocimiento clave para el desarrollo de estrategias de conservación y manejo ambiental. Además, este estudio constituye uno de los primeros antecedentes que evalúa experimentalmente los efectos del insecticida metoxifenocida (un compuesto de uso extendido), en anfibios, brindando información novedosa sobre su impacto en vertebrados no blanco. Desde una perspectiva aplicada, estos resultados contribuyen al diseño de prácticas agrícolas más sostenibles y compatibles con la conservación de la biodiversidad, resaltando la necesidad de incorporar biomarcadores de alerta temprana en la evaluación de la toxicidad de agroquímicos, y de considerar el rol de los sedimentos como compartimento clave en la exposición de los organismos acuáticos.

En este contexto, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Incorporar biomarcadores de alerta temprana, como los utilizados en este estudio, en programas de monitoreo ambiental en agroecosistemas. Esto permitiría detectar efectos adversos antes de que aparezcan a niveles superiores de organización biológica.
2. Ampliar los análisis de contaminantes en matrices ambientales, incluyendo no solo los compuestos que son utilizados actualmente, sino también compuestos de alta persistencia, así como metales y otros contaminantes emergentes. También es importante considerar el posible efecto de las mezclas de contaminantes, ya que en condiciones ambientales reales los organismos están expuestos a múltiples compuestos de forma simultánea.
3. Promover prácticas de manejo agrícola que minimicen el transporte y la acumulación de agroquímicos en cuerpos de agua (ej. el manejo adecuado de escurrimientos).

Finalmente, se destaca la importancia de fortalecer la articulación entre el ámbito científico y el sector productivo. La colaboración establecida en el marco de este proyecto con actores del sector frutícola a través de la Cooperativa JUMECAL constituye un antecedente valioso que puede facilitar la implementación de estrategias de manejo más sostenibles, basadas en evidencia científica.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Tesis de grado/monografías	Lo que no te mata te hace un buen bioindicador: evaluación de los efectos a nivel genético y comportamental en larvas de Boana pulchella (Anura: Hylidae) expuestas a sedimentos contaminados	Paula Ferrari	https://hdl.handle.net/20.500.12008/54193	https://silo.uy/vufind/Record/COLIBRI_4882bf05ce8aa824f1cf0f2117575c9a?sid=16226657	Finalizado

Referencias bibliográficas

Las referencias en extenso se brindan como documento adjunto.

Aebi. 1984. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

APHA. 1995. *PHA/AWWA/WPCF*. Washington.

Attademo et al. 2005. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(4), 389-394.

Ayres et al. 2007. *BioEstat* (5.3). Instituto Mamirauá.

Bach et al. 2016. *Environmental Science And Pollution Research*, 23(23), 23959-23971.

Baeza & Paruelo. 2020. *Remote sensing*, 12(3), 381.

Bionda et al. 2018. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398.

Bosch et al. 2011. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6), 155–163.

Britson & Threlkeld. 1998. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 154–161.

Cabagna et al. 2006. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 88(4), 729 737.

Caldwell & Shepard. 2007. *Journal of Herpetology*, 41(4), 611-621.

Cárcamo. 2020. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) en Uruguay. RAPAL Uruguay.

Carreira & Maneyro. 2015. Dirección Nacional de Medio Ambiente.

Carreira & Maneyro (2019). MVOTMA, DINAMA.

Curi et al. 2017. *Ecotoxicology and environmental safety*, 143, 62-71.

Cuzziol Boccioni et al. 2022. *Chemosphere*, 309(1), 136554.

de Almeida & Freitas. 2024. CRC Press.

de Melo e Silva et al. 2024. En Alves de Almeida & Freitas (Eds.), *Toxicology of Amphibian Tadpoles*, 133–151.

de Wijer et al. 2003. *Applied Herpetology*, 1, 3-12.

do Amaral et al. 2018. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 12932–12946.

Egea-Serrano & Tejedo. 2014. *Aquatic toxicology*, 146, 144-153.

Ejilibe et al. 2018. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 6(2), 270.

Ellman et al. 1961. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

Fenech. 2000. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.

Ferrer et al. 2013. En *Clima de cambios: nuevos desafíos de adaptación en Uruguay*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & FAO, 6.

García-Muñoz et al. 2010. *Iniciación a la Investigación*, (5).

Gauthier et al. 2004. *Science of the total environment*, 323(1–3), 47–61.

Gosner. 1960. *Herpetologica*, 16, 183–190.

Gristo et al. 2002. MVOTMA, DINAMA.

Habig et al. 1974. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hammer et al. 2001. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1-9.

Hoffman et al. 2003. Lewis Publishers, CRC press.

Hopkins. 2007. *ILAR journal*, 48(3), 270-277.

Hu et al. 2025. *Animals*, 15(13), 1928.

IUCN 2026. *The IUCN Red List of Threatened Species*, Version 2025-2.

Josende et al. 2015. *Ecological Indicators*, 49, 83–87.

Junges et al. 2012. *Chemosphere*, 87(11), 1348-1354.

Kostyuk & Potapovich. 1989. *Biochemistry International*, 19(5), 1117-1124.

Krishnamurthy & Smith. 2011. *Ecotoxicology*, 20, 1361-1367.

Lajmanovich et al. 2009. *Journal of Environmental Biology*, 30(5), 923-926.

Lajmanovich et al. 2005. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72.

Lajmanovich et al. 2014. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12.

Lema et al. 2014. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(2), 831.

Li et al. 2025. *Environmental Research*, 278, 121735.

Marco et al. 1999. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), 2836-2839.

Margolin et al. 1983. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705–716.

Martino et al. 2008. En *GEOUruguay - Informe del estado del ambiente*, 56–117. PNUMA, CLAES, DINAMA.

Meintières et al. 2001. *Mutagenesis*, 16(3), 243–250.

Monteiro et al. 2003. *Analytica Chimica Acta*, 477(1), 125–129.

Nardo et al. 2015. *INNOTEC*, (10), 64–70.

Ndlovu & Basopo. 2022. *Advances in Biological Chemistry*, 12(6), 292–305.

Nuñez et al. 2007. *Revista INIA*, 12, 17–22.

Peltzer et al. 2021. En Pareyra et al. (Eds.), *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina*, 250–265.

Peltzer et al. 2024. En Alves de Almeida & Silberschmidt Freitas (Eds.), *Toxicology of Amphibian Tadpoles*. CRC Press.

Peltzer et al. 2013. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 142–151.

Peluso 2021. En Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología*, 268–290.

Pereira et al. 2024. *Limnetica*, 43(2), 1.

Pérez-Iglesia et al. 2015. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15–24.

Pollo et al. 2019. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 177, 32–38.

Relyea & Werner. 2000. *Copeia*, 2000(1), 178–190.

Sansiñena et al. 2018. *Ecological Indicators*, 93, 100–110.

Schmid. 1975. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15

Silva et al. 2021. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 16(1), 13–18.

Silva et al. 2020. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 15(1), 37–42.

Smith & Green. 2005. *Ecography*, 28(1), 110–128

Soutullo et al. 2020. *Environmental Conservation*, 47(2), 97–103.

Teplitsky et al. 2003. *Oecologia*, 134, 270–277.

Unrine et al. 2007. *Environmental Pollution*, 149(2), 182–192.

USEPA 1975. *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians* (EPA 660/3-375-009).

USEPA. (1996). *Ecological Effects Test Guidelines*. OPPTS 850.1800. Tadpole/Sediment Subchronic Toxicity Test.

Venesky et al. 2010. *Biological Bulletin*, 218(2), 160–168.

Wells. 2007. The University of Chicago Press.

Zar. 2010. *Biostatistical Analysis* (5th ed.). Prentice Hall.

Zhu et al. 2016. *Mixtox: An R Package for Mixture Toxicity Assessment*. R J., 8(2), 421.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)

