

Informe Técnico-Científico sobre los Usos e Impactos del Insecticida Clorpirifos en Argentina

PNUD ARG/17/010 sobre el “Fortalecimiento de las capacidades nacionales para el manejo de productos químicos y desechos”

Argentina. Marzo 2021.



Ministerio de Ambiente
y Desarrollo Sostenible
Argentina



CONICET



C I T A A C

Ficha del ISBN

Informe técnico-científico sobre el uso e impactos del insecticida clorpirifos en Argentina /
Andrés Venturino ... [et al.]; dirigido por Andrés Venturino; coordinación general de Melina Álvarez. - 1a ed. -
Buenos Aires: Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo - PNUD; Ministerio de Ambiente y Desarrollo
Sostenible de la Nación, 2021.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-1560-86-8

1. Ambiente. 2. Contaminante. 3. Insecticidas. I. Venturino, Andrés, dir. II. Álvarez, Melina, coord.
CDD 363.7063

El presente informe ha sido realizado a solicitud del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación (MAYDS) en el marco de la ejecución del Proyecto PNUD ARG/17/010 sobre el “Fortalecimiento de las capacidades nacionales para el manejo de productos químicos y desechos”.

El análisis y las recomendaciones de políticas de esta publicación no reflejan necesariamente las opiniones del Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo, de su Junta Ejecutiva o de sus Estados Miembro.

Todos los derechos están reservados. Ni esta publicación ni partes de ella pueden ser reproducidas mediante cualquier sistema o transmitidas, en cualquier forma o por cualquier medio, sea este electrónico, mecánico, de fotocopiado, de grabado o de otro tipo, sin permiso escrito previo del editor.

Hecho el depósito que establece la Ley Nº 11723.

Se agradecen las contribuciones de Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Los Estados Unidos de América, Finlandia, Noruega, Países Bajos, Reino Unido, Suiza y la Unión Europea al fondo del Programa Especial.

Copyright © Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 2021

Esmeralda 130, Piso 13, C1035ABD

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

www.pnud.org.ar





Autoridades

Presidente de la Nación

Alberto Fernández

Vicepresidenta de la Nación

Cristina Fernández de Kirchner

Jefe de Gabinete de Ministros

Santiago Cafiero

Ministro de Ambiente
y Desarrollo Sostenible

Juan Cabandié

Titular de la Unidad
de Gabinete de Asesores

María Soledad Cantero

Secretaría de Control
y Monitoreo Ambiental

Sergio Federovisky

Dirección Nacional de Sustancias
y Productos Químicos

Jorge Luis Etcharrán

AUTORES

Equipo científico-técnico del Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue:

Dr. Andrés Venturino: Dirección CITAAC. Dr. de la Universidad de Buenos Aires, Investigador principal CONICET, Profesor Asociado Regular en Química Biológica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. Ana María Pechen: Vicedirección CITAAC. Dra. en Bioquímica, Profesora Consulta, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. Eugenia Parolo: Dra. en Química. Profesora adjunta, Secretaria de Posgrado de Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. María Martha Quintana: Dra. en Biología. Docente de Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue.

Mg. Mercedes Indaco: Magister en Tecnología de los Alimentos, Profesional Adjunta CONICET.

Dra. Natalia Guiñazú: Dra. en Ciencias Químicas, Investigadora Independiente CONICET, Profesora Asociada, Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue.

Mg. Berta Vera: Mg. en Ciencias Químicas, Profesora Adjunta Regular, Secretaria de Investigación y Vinculación Tecnológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. Soledad Jaureguiberry: Dra. en Ciencias Exactas, Investigadora Asistente CONICET, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. Ana Cecilia Mestre: Dra. de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas. Investigadora Postdoctoral CITAAC.

Dra. Cecilia Inés Lascano: Dra. en Biología, Investigadora Asistente CONICET, Docente de Química Biológica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue.

Dra. Flavia Bieczynski: Dra. en Biología, Investigadora Asistente CONICET.

Dra. Laura Beatriz Parra Morales: Dra. en Biología, Profesora adjunta, Facultad de Ciencias del Ambiente y de la Salud, Universidad Nacional del Comahue.

Equipo del Proyecto PNUD ARG/17/010 sobre el “Fortalecimiento de las capacidades nacionales para el manejo de productos químicos y desechos”:

Dra. Melina Álvarez: Dra. en Biología y profesora universitaria. Responsable del Proyecto ARG/17/010.

Vet. Hernán Agostini: Veterinario y docente universitario. Coordinador II del Proyecto ARG/17/010.

Equipo técnico de la Dirección Nacional de Sustancias y Productos Químicos:

Lic. Agustín Harte: Lic. en Ciencias Biológicas, Coordinador Técnico de la Dirección Nacional de Sustancias y Productos Químicos.

REVISIÓN GENERAL Y EDICIÓN

Dr. Andrés Venturino: Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC)

Dra. Ana María Pechen: Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC)

Dra. Melina Álvarez: Proyecto PNUD ARG/17/010 sobre el “Fortalecimiento de las capacidades nacionales para el manejo de productos químicos y desechos”

Vet. Hernán Agostini: Proyecto PNUD ARG/17/010 sobre el “Fortalecimiento de las capacidades nacionales para el manejo de productos químicos y desechos”

Lic. Agustín Harte: Dirección Nacional de Sustancias y Productos Químicos (DNSyPQ) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	11
2 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y DINÁMICA AMBIENTAL DEL CLORPIRIFOS	14
2.1 Conclusiones.....	24
2.2 Referencias.....	26
3 PRESENCIA DE CLORPIRIFOS EN ALIMENTOS	29
3.1 Introducción al problema en general.....	29
3.2 Niveles de clorpirifos hallados en alimentos en Argentina y otros países.....	30
3.3 Límites de residuos máximos de clorpirifos en alimentos.....	34
3.4 Conclusiones.....	36
3.5 Referencias.....	38
3.6 Webgrafía consultada por LMR.....	40
4 IMPACTOS EN SALUD HUMANA	41
4.1 Exposición humana a clorpirifos.....	41
4.2 Vías de exposición de los seres humanos a los plaguicidas.....	43
4.2.1 Exposición dérmica.....	44
4.2.2 Exposición respiratoria.....	47
4.2.3 Exposición oral.....	52
4.3 Proximidad a los sitios de aplicación.....	54
4.4 Subpoblaciones vulnerables.....	58
4.5 Toxicidad aguda.....	61
4.5.1 Exposición aguda.....	61
4.5.2 Exposición ocupacional.....	65
4.6 Toxicidad crónica.....	68
4.6.1 Disrupción endócrina.....	68
4.6.2 Neurotoxicidad.....	70
4.6.2.1 Estudios de efectos neurodegenerativos en modelos animales..	76
4.6.3 Relación del clorpirifos con la aparición de cáncer.....	78
4.6.3.1 Cáncer de mama.....	81
4.6.3.2 Cáncer de próstata y colorrectal.....	82
4.6.3.3 Cáncer de pulmón.....	83
4.6.3.4 Linfoma de Hodgkin.....	84
4.7 Inmunotoxicidad.....	84
4.8 Genotoxicidad.....	86
4.9 Conclusiones.....	89
4.10 Referencias.....	90
5 IMPACTOS EN LA BIOTA ACUÁTICA	106
5.1 Peces.....	107
5.1.1 Efectos tóxicos agudos: Concentración Letal 50 (CL50).....	108
5.1.2 Efectos tóxicos subletales.....	108
5.1.2.1 Neurotoxicidad.....	109
5.1.2.2 Efectos a nivel reproductivo.....	110
5.1.2.3 Alteraciones histopatológicas.....	111
5.1.2.4 Alteraciones bioquímicas, estrés oxidativo y genotoxicidad.....	112
5.1.3 Factores que influyen en la toxicidad de clorpirifos.....	114
5.1.3.1 Salinidad.....	114
5.1.3.2 Temperatura.....	115
5.1.3.3 Etapa de desarrollo y tiempo de exposición.....	116



5.1.4 Bioacumulación.....	116
5.1.5 Situación en Argentina.....	117
5.1.6 Conclusiones.....	121
5.2 Anfibios.....	123
5.2.1 Situación de los anfibios en la República Argentina.....	124
5.2.1.1 Estudios in situ y ex situ.....	124
5.2.1.2 Estudios en condiciones controladas de laboratorio.....	128
5.2.2 Situación a nivel mundial.....	133
5.2.2.1 Estudios sobre el organismo modelo <i>Xenopus laevis</i>	133
5.2.2.2 Estudios sobre anfibios anuros nativos.....	135
5.2.3 Consideraciones finales.....	144
5.3 Macroinvertebrados acuáticos.....	146
5.3.1 Efectos de clorpirifos a nivel de especie.....	146
5.3.2 Estudios a nivel de comunidad béntica.....	148
5.3.3 Efectos de clorpirifos en comunidades de macroinvertebrados.....	149
5.4 Evaluaciones de Riesgo Ambiental para organismos acuáticos.....	152
5.5 Conclusiones.....	163
5.6 Referencias Bibliográficas.....	165
6 IMPACTOS EN LA FAUNA TERRESTRE	177
6.1 Efectos sobre Vida Salvaje.....	177
6.1.1 Aves.....	177
6.1.2 Mamíferos.....	179
6.1.3 Reptiles.....	184
6.1.4 Invertebrados terrestres.....	185
6.1.5 Insectos benéficos.....	186
6.1.5.1 Impacto de clorpirifos en las abejas melíferas.....	188
6.1.5.2 Efectos adversos subletales de plaguicidas en abejas y otros insectos benéficos...	190
6.1.6 Evaluaciones de riesgo e impacto sobre ecosistemas terrestre.....	194
6.2 Efectos sobre animales de granja y domésticos.....	201
6.3 Conclusiones.....	203
6.4 Referencias.....	205
7 ASPECTOS LEGALES DEL USO DE CLORPIRIFOS	213
7.1 Usos de clorpirifos.....	213
7.2 Legislación Nacional e Internacional.....	214
7.3 Alternativas propuestas para reemplazo de clorpirifos a nivel nacional y mundial.....	217
7.4 Conclusiones.....	225
7.5 Referencias.....	226
8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	228
8.1 Recomendaciones.....	229
9. CONSIDERACIONES FINALES	230

5. IMPACTOS EN LA BIOTA ACUÁTICA

Flavia Bieczynski, Cecilia Lascano y Andrés Venturino

A nivel mundial se han establecido valores de referencia ambiental, que toman en cuenta los efectos observados tanto en peces como en otros organismos acuáticos. La Unión Europea, utilizando el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos, ha categorizado al clorpirifos como compuesto de toxicidad aguda 1 para el ambiente acuático (H400: muy tóxico para la vida acuática) y como compuesto de toxicidad crónica 1 (H410: muy tóxico para la vida acuática con efectos a largo plazo) (Watts, 2012). En una revisión reciente realizada por Huang et al. (2020) se compilan datos de toxicidad por clorpirifos en 87 especies de organismos acuáticos, de las cuales 46% son crustáceos, 37% son peces y un 8% son moluscos. En este trabajo se observa que hay marcadas diferencias entre especies, ya que los valores de CL50-96h registrados se encuentran en un intervalo muy amplio de concentración de clorpirifos, desde 0,029 µg/L para el camarón *Americamysis bahía*, hasta 50.000 µg/L para la almeja de agua dulce *Lamellidens marginalis*. A su vez, los autores, en base a los valores de CL50-96h registrados y al criterio de clasificación establecido por el Grupo de Expertos en Aspectos Científicos de Protección del Medioambiente Marino (GESAMP), determinaron que el clorpirifos es desde ligeramente tóxico (grupo 2 en la clasificación) para algunos peces, rotíferos y moluscos hasta extremadamente tóxico (grupo 6) para otras especies de peces y crustáceos.

De acuerdo a la EPA (2017) (acceso 6/10/2020), la evaluación determinística de riesgo de la ecotoxicidad en peces e invertebrados acuáticos puede realizarse a través de Cocientes de Riesgo, empleando como puntos finales las CL50 para evaluar los efectos agudos, y la NOAEC y LOAEC para efectos crónicos (Tabla 5.1). Estos parámetros se utilizan como divisores frente a las Concentraciones Ambientales Esperadas, que en el caso de efectos agudos suelen tomarse a partir de la máxima concentración detectada en agua, y en efectos crónicos pueden tomarse a partir de concentraciones medias anuales.

Tabla 5.1: Presunciones de riesgo para organismos acuáticos

Efecto	Cálculo de CR	Límite CR
Alto riesgo agudo	CEA/CL50	0.5
Uso restringido agudo	CEA/CL50	0.1
Riesgo de extinción de especies	CEA/CL50	0.05
Riesgo crónico	CEA/NOEC	1

Extraído de EPA (2017). CR: Cociente de Riesgo; CEA: Concentración Ambiental Esperada.

Existen numerosos estudios que demuestran que este compuesto se bioacumula en organismos acuáticos (Watts, 2012), es decir, se concentra en el individuo a partir de todas las fuentes potenciales de captación (agua y alimento). El coeficiente de partición octanol-agua (Kow) de este compuesto oscila entre 4,7 y 5,11, siendo 5 el valor de Kow establecido como de riesgo de bioacumulación (Watts, 2012). El factor de bioconcentración (FBC; calculado como la concentración de un tóxico en el organismo dividida por la concentración en el medio ambiente) es un parámetro que refleja la capacidad de un organismo de concentrar un compuesto tóxico del medio ambiente.

5.1 Peces

Los peces son un elemento clave para el monitoreo de la salud ambiental debido a que ocupan distintas zonas de la columna de agua, representan gran parte del espectro de hábitos tróficos y poseen un ciclo de vida que se desarrolla completamente en el agua (a diferencia de los anfibios e insectos). A su vez, son importantes como recurso económico y como componente de la dieta humana.

La exposición de los peces a clorpirifos ocurre mayormente por el contacto con los sedimentos del fondo, aunque también es incorporado al organismo desde la columna de agua y por la ingestión junto con el alimento. En este aspecto cabe mencionar el hecho de que la acuicultura ha sustituido en gran parte los ingredientes de origen animal por los de origen vegetal en la elaboración de alimentos balanceados. Por ejemplo, en la acuicultura del salmón del atlántico (*Salmo salar*), se utilizan alimentos balanceados que contienen aproximadamente un 70% de composición vegetal, como cereales y legumbres (Ytrestøl et al., 2015). Esta sustitución de ingredientes conlleva a la introducción de compuestos, tales como plaguicidas, en el ambiente acuático. Trabajos recientes han detectado la presencia del metabolito derivado, clorpirifos-metil, en alimentos balanceados de *S. salar* (en un intervalo de 0,006 a 0,03 mg/Kg) (Portolés et al., 2017) y en estudios de laboratorio se ha visto que peces silvestres, que se alimentan de los restos en las cercanías de las acuiculturas, pueden acumular este compuesto en sus tejidos (Olsvik et al. 2019). En otro trabajo, donde se analizó la presencia de clorpirifos en filete de pescado (provenientes tanto de acuicultura como de la pesca), se encontró que ambos tipos tenían clorpirifos acumulado, siendo mayor la concentración detectada en los peces de acuicultura (concentraciones máximas registradas de 0,46 y 0,07 µg/g, respectivamente) (Sun y Chen, 2008).

El ingreso de este compuesto al organismo ocurre por difusión (al atravesar las branquias o tegumento) o a través de la dieta (por el sistema gastrointestinal). Una vez que el clorpirifos es absorbido, alcanza la circulación sistémica y desde allí los diferentes órganos. Al igual que otros xenobióticos, sufre procesos de biotransformación de fase I y II, que ocurren principalmente en el hígado y dan lugar a conjugados más solubles que el compuesto original, para ser posteriormente eliminados a través del sistema

gastrointestinal. El efecto tóxico principal del clorpirifos es la inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y es el parámetro biomarcador por excelencia de exposición y/o toxicidad por compuestos organofosforados. Las reacciones de biotransformación dan como resultado el metabolito oxón de clorpirifos, que posee mayor afinidad por AChE en comparación con el compuesto parental, es decir, es más tóxico; aunque por otro lado es muy sensible a la degradación hidrolítica y por lo tanto se encuentra en muy bajos niveles en el ambiente acuático. Lo mismo ocurre con otro metabolito primario del clorpirifos, el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), el cual no inhibe AChE y no constituye un riesgo para los organismos acuáticos (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2008).

5.1.1 Efectos tóxicos agudos: Concentración Letal 50 (CL50)

El intervalo de CL50-96h para las especies de peces compiladas por Huang et al. (2020) se encuentra entre 0,5 µg/L (para juveniles del pez gato, *Clarias gariepinus*) y 13.030 µg/L (para embriones del pez cebra, *Danio rerio*). A partir de los datos de toxicidad, se evidencia que el 36% de las especies de peces analizadas en dicho estudio poseen valores de CL50-96h menores a 20 µg/L, indicando que el clorpirifos es extremadamente tóxico para organismos acuáticos.

En cuanto a las causas de mortalidad en peces expuestos a clorpirifos, la asfixia producida por parálisis muscular en branquias y la bradicardia serían las causas principales (Fulton y Key, 2000). Si bien la inhibición de las enzimas AChE cerebral y otras esterasas (como la AChE muscular) son factores determinantes en la toxicidad y letalidad de clorpirifos, no se observa una correlación clara entre la inhibición de estas enzimas y la mortalidad, siendo muy amplia la variabilidad registrada para distintas especies de peces (Ferrari et al., 2009).

5.1.2 Efectos tóxicos subletales

En exposiciones de peces a concentraciones subletales de clorpirifos, se ha observado que la actividad AChE se recupera, al menos en forma parcial. Este proceso es lento y depende, en gran parte, de la síntesis de nueva enzima (Ferrari et al., 2009; Giddings et al., 2014). Por ejemplo, en juveniles de salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) expuestos a 3,7 µg/L de clorpirifos por 96 h, se observó un 46% de inhibición de la AChE cerebral respecto de la actividad control. Luego de 23 días en ausencia de clorpirifos, esta actividad se fue recuperando, persistiendo un 20% de inhibición. La recuperación total de la actividad enzimática se observó recién al transcurrir 60 días (Eder et al., 2007). En otro estudio, adultos del pez mosquito (*Gambusia affinis*) expuestos a 100 µg/L de clorpirifos (1/3 de la CL50-96h, calculado a partir de Huang et al., 2020) por 48 h, sufrieron un 77% de inhibición de la actividad AChE cerebral y un 82% de inhibición de la AChE muscular. Luego de 4 días en ausencia de clorpirifos, sólo la AChE cerebral se recuperó hasta alcanzar el 38% respecto

de la actividad control (Boone y Chambers, 1996). En general, los estudios sobre esta recuperación enzimática son limitados: Giddings et al. (2014) sugieren que, en base a la información disponible, se podría estimar que entre 4 y 8 semanas sería el tiempo necesario para la recuperación completa de la actividad de AChE.

Si bien la inhibición de la enzima AChE es el parámetro indicador por excelencia de exposición a clorpirifos, numerosos estudios indican la presencia de otros blancos moleculares afectados. A su vez, se ha visto que las diversas alteraciones observadas en peces persisten aún en ausencia de dicho compuesto (Watts, 2012). En general, se describen efectos a nivel individual como ataxia, alteraciones de crecimiento y en la reproducción, deformidades, genotoxicidad, estrés oxidativo, daño neurológico, alteraciones del sistema inmune y endócrino, supresión de la actividad olfativa, así como también efectos a nivel poblacional y ecosistémico que incluyen teratogenicidad y disminución poblacional (Ferrari et al., 2009; Watts, 2012; Huang et al., 2020). A continuación, se detallan los efectos subletales más comúnmente documentados.

5.1.2.1 Neurotoxicidad

Trabajos recientes remarcan la importancia de utilizar indicadores de comportamiento neurológico para evaluar el efecto subletal de contaminantes en peces, dado que esto permitiría pasar del enfoque ecotoxicológico tradicional sobre el individuo (basado en estudios de CL50) a enfoques que consideren el nivel poblacional o de ecosistema. Algunos de estos trabajos, por ejemplo, se han centrado en la percepción olfativa y en el comportamiento de los peces expuestos a clorpirifos. Sandahl et al. (2004) registraron que adultos del salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) expuestos a 0,7 µg/L de clorpirifos durante 7 días, sufrieron la pérdida del 20% de la función sensorial olfatoria, lo cual afectaría la supervivencia y capacidad migratoria de esta especie. Besson et al. (2017) observaron que las larvas del pez de arrecifes *Acanthurus triostegus* poseen una alta lateralización: utilizan el ojo derecho (hemisferio izquierdo) para categorizar los estímulos y el ojo izquierdo (hemisferio derecho) para inspeccionar elementos novedosos e iniciar respuestas rápidas de comportamiento. Dichos autores observaron que este tipo de mecanismo se ve afectado en presencia de clorpirifos. Las larvas expuestas durante 5 días a 1 µg/L de clorpirifos, perdían en alrededor del 10% de la capacidad de respuesta lateralizada frente a un estímulo. Estos resultados sugieren un efecto negativo de este compuesto sobre la función cerebral de las larvas durante un estadio de desarrollo crítico, que podría resultar en una desventaja ecológica para la especie. Sumado a este efecto y con similar desventaja a nivel de supervivencia para la especie, en otro estudio, realizado también con larvas de *A. triostegus*, se observó que la exposición a 1 µg/L de clorpirifos por 2 días, redujo un 30% de la capacidad de memoria olfativa utilizada en el reconocimiento de un predador (Bertucci et al., 2018).

La disminución y modificación de la actividad natatoria son efectos también descriptos en peces expuestos a clorpirifos. Tilton et al. (2011) observaron que adultos de pez cebra (*D. rerio*), expuestos por 24

h a distintas concentraciones de clorpirifos (de 0,1 a 220 µg/L), presentaban disminución de la actividad natatoria (entre un 20 y 60% respecto del control) y periodos de inmovilidad (entre un 27 y 40% de los peces) a partir de 35 µg/L, siendo esta concentración 1/20 de la CL50-96h para la especie (Huang et al., 2020). En adultos de pez mosquito (*G. affinis*) expuestos por 20 días a 60 µg/L (1/5 de la CL50-96h para esta especie), se observó un 50% de disminución de la velocidad de nado a los 15 días de exposición y una disminución de la distancia recorrida, con efectos visibles a partir del día 4 (Rao et al., 2005). En juveniles de medaka (*Oryzias latipes*), expuestos durante 4 días a 18, 55 y 166 µg/L, se observó disminución de la velocidad de nado e hipoactividad a partir de la concentración más baja, que representa 1/7 de la CL50-96h para la especie. Este efecto fue acompañado de la inhibición concentración-dependiente de la AChE cerebral (52, 66 y 79%, respectivamente) y de mortalidad a partir de 55 µg/L. Por otro lado, en el mismo estudio, peces expuestos a 12 µg/L (1/10 de la CL50-96h) por 8 días sufrieron un 32% de inhibición de la actividad AChE cerebral acompañado de hiperactividad natatoria (Khalil et al., 2013). En resumen, se observan efectos neurotóxicos por exposición a clorpirifos a concentraciones sensiblemente menores que el valor de CL50 de cada especie. Los efectos neurotóxicos subletales traen consecuencias en cuanto a la capacidad de selección de hábitat, la conducta migratoria, la respuesta de escape frente a predadores y la capacidad para capturar presas, entre otros efectos deletéreos para la supervivencia.

5.1.2.2 Efectos a nivel reproductivo

Se han encontrado efectos tóxicos a nivel reproductivo en especies de peces expuestas a concentraciones subletales de clorpirifos, aunque los estudios al respecto son escasos. A continuación, se detallan algunos de los más recientes. De Silva y Samayawardhena (2005), luego de exponer adultos de pez guppy (*Poecilia reticulata*) por 14 días a 0,002 y 2 µg/L (cerca de 1/3000 y 1/3 de la CL50-96h) de formulado comercial de clorpirifos (40% de ingrediente activo), encontraron alteraciones en la conducta de apareamiento, más específicamente, en la cantidad de empujes gonopodiales, que disminuyeron aproximadamente un 30 y 60% para cada concentración ensayada, respectivamente. También observaron una disminución significativa en la cantidad de crías (aproximadamente un 10 y 60% menos respecto del control, para cada concentración) y la disminución de la supervivencia de las mismas (un 40 y 50% menor, respectivamente). Los efectos fueron significativos con ambas concentraciones testeadas, las cuales son muy inferiores de la CL50-96h de 7,2 µg/L, calculada para esta especie por los autores. En otro estudio, individuos de ambos sexos del pez cebra (*D. rerio*) expuestos a 200 µg/L de clorpirifos (aproximadamente 1/3 de la CL50-96h para esta especie; Huang et al., 2020) por 24, 48 y 96 h presentaron alteraciones en las concentraciones de hormonas importantes para la gametogénesis y diferenciación sexual (Manjunatha y Philip, 2015). En particular, los peces tratados sufrieron un incremento de los niveles de vitelogenina en plasma (en machos, a partir de 24 h y con un aumento del 400% a las 96 h), disminución de la concentración de 17-β-estradiol

(en hembras, a partir de las 48 h y alcanzando un 40% a las 96 h) y disminución de los niveles en plasma de 11-cetotestosterona (en machos, a partir de las 48h, con una inhibición máxima del 50% a las 96 h). Sumado a estos efectos, los autores registraron alteraciones histopatológicas en las gónadas de ambos sexos a partir de las 24 h de exposición, observando principalmente vacuolización, elongación de los túbulos seminíferos y atrofia folicular.

En otro estudio, se expusieron adultos de guramis (*Trichogaster fasciata*) a 15, 50, 150 y 500 µg/L de formulado comercial de clorpirifos (20% de principio activo), por 15, 30, 45, 60 y 75 días (Sumon et al., 2019). Los resultados indicaron daño histopatológico en ovarios (aglutinación y retracción citoplasmática, folículos atrésicos, necrosis, etc.) y en testículos (túbulos seminíferos de forma irregular y dañados, daño en células de Sertoli, entre otros), dependientes de la concentración de clorpirifos (efectos a partir de 50 µg/L) y del tiempo de exposición (efectos a partir de 15 días de exposición). La concentración de 50 µg/L (1/17 de la CL50-96h calculada por los autores) fue la concentración sin efectos adversos observados (NOAEC) luego de 60 días de exposición. Raibeemol y Chitra (2020) observaron que adultos de la especie *Pseudotroplus maculatus*, expuestos durante 15 y 30 días a 0,7 µg/L o 1,3 µg/L (representando 1/10 y 1/5 de la CL50-96h) sufrieron una disminución significativa de los niveles hormonales de cortisol, hormonas tiroideas, testosterona y estradiol, efectos que fueron concentración y tiempo dependientes. Además, los autores registraron lesiones histopatológicas en las gónadas femeninas y masculinas, acompañadas de la reducción de la cantidad y calidad de espermatozoides y ovocitos.

5.1.2.3 Alteraciones histopatológicas

Existen numerosos estudios realizados en peces que analizan el daño histopatológico causado por la exposición a clorpirifos. En general se describen efectos deletéreos en tejidos como gónadas (ya mencionados brevemente en la sección 5.1.2.2 sobre efectos a nivel reproductivo), branquias, cerebro, intestino, riñones e hígado; lo cual afecta la respiración, la regulación iónica y osmótica, la capacidad absorción y reserva de nutrientes, la capacidad de detoxificación, el crecimiento, la reproducción y, por lo tanto, la supervivencia del individuo.

En adultos de carpa común (*C. carpio*) expuestos a 1,16; 11,6 y 116 µg/L (1/500, 1/50 y 1/5 de la CL50-96h calculada por los autores) por 40 días, se observó, en todos los tratamientos, degeneración del tejido hepático (degeneración hidrópica, vacuolización, núcleos picnóticos, infiltración lipídica) y branquial (hipertrofia, telangiectasia, edema, necrosis general y descamación epitelial) (Xing et al., 2012). En adultos de la misma especie, expuestos durante 21 días a 100 y 200 µg/L (1/6 y 1/3 de la CL50), se evaluó el daño en cerebro, hígado, branquias, riñón y gónadas. Los tejidos presentaron efectos tales como degeneración neuronal, hiperemia, edema, células necróticas, inflamación, hemorragia, entre otros, a partir de la

concentración más baja de estudio (Altun et al., 2017). Khatun et al. (2016), expusieron juveniles de pez gato (*Heteropneustes fossilis*) a 280 y 1420 µg/L (1/10 y 1/50 de la CL50-96h para la especie) por 30 días y encontraron alteraciones histopatológicas severas (desorganización de cordones hepáticos, necrosis, edema en las lamelas branquiales, núcleos picnóticos, vacuolización, pérdida de la estructura glomerular en riñones, etc.), en forma dependiente de la concentración. Namdeo et al. (2020) expusieron juveniles de *Catla catla* a 0,73 µg/L de clorpirifos (aproximadamente 1/5 de la CL50-96h para la especie) por 96 h y encontraron daño histopatológico en hígado (hipertrofia de hepatocitos, proliferación de conductos biliares, necrosis, infiltración linfocítica). Edwin et al. (2019) estudiaron los efectos producidos por la exposición a clorpirifos en branquias de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y carpa común (*C. carpio*) expuestas por 10, 20 y 30 días a concentraciones entre 1,9 y 7,6 µg/L (*O. niloticus*: aproximadamente 1/500 y 1/143 de la CL50 registrada para la especie; Huang et al. 2020) y 0,7 y 2,8 µg/L (*C. carpio*: aproximadamente 1/800 y 1/200 de la CL50-96h). Los autores encontraron hiperplasia, edema, necrosis y fusión de lamelas en ambas especies, entre otros efectos, y concluyen que los daños son más severos a mayor concentración y mayor tiempo de exposición.

A diferencia de lo que ocurre con las especies de agua dulce, los estudios en especies marinas son escasos. En uno de ellos, se determinaron los valores de CL50-96h, LOAEC, NOAEC y de valor crítico, luego de una exposición de 30 días a clorpirifos (formulado comercial, 20% ingrediente activo), de larvas de dos especies marino-estuariales: la lisa, *Mugil cephalus* y el sabalote, *Chanos chanos* (Marigoudar et al., 2018). Se determinó daño a nivel del tejido branquial (hiperplasia, necrosis, etc.) y ocular (anormalidades de la retina), además de alteraciones a nivel bioquímico. Los autores determinaron, para *M. cephalus*, un valor de CL50-96h de 1,13 µg/L, mientras que los valores de LOAEC, NOAEC y de valor crítico fueron de 0,09; 0,16 y 0,13 µg/L, respectivamente (representando 1/12, 1/7 y 1/8 de la CL50 determinada). Para *C. chanos*, la CL50-96h fue de 3,2 µg/L, con LOAEC, NOAEC y valor crítico de 0,17; 0,32 y 0,25 µg/L, respectivamente (representando 1/20, 1/10 y 1/12 de la CL50).

5.1.2.4 Alteraciones bioquímicas, estrés oxidativo y genotoxicidad

Es extensa la cantidad de trabajos que analizan las alteraciones bioquímicas y los desbalances que llevan a estrés oxidativo en peces expuestos a clorpirifos. En la revisión de Huang et al. (2020) se compilan 14 estudios con peces (publicados entre 1997 y 2019), en los cuales se observaron efectos a nivel de actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasas (GST), glutatión peroxidasas (GPx), daño oxidativo a lípidos (como concentración de malondialdehído, MDA), cambios en la concentración de radicales libres de oxígeno (ROS) y de glutatión reducido (GSH). Estos efectos se registraron a concentraciones de clorpirifos entre 0,014 µg/L y 1000 µg/L, y en exposiciones de entre 48 h y 40 días de duración. Las especies en las que se observaron dichos efectos fueron *Astacus leptodactylus*, *Carassius*

auratus, *Cyprinus carpio*, *Chanos chanos*, *Cheirodon interruptus*, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Danio rerio*, *Gambusia yucatanana*, *Jenynsia multidentata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis mossambicus*, *Oryzias latipes* y *Poecilia reticulata*. A modo de ejemplo, Bonifacio et al. (2017) expusieron adultos de *C. interruptus* a 0,014 µg/L de un formulado comercial de clorpirifos por 48 h (48% de principio activo) y registraron una disminución del 73% de la actividad de CAT en cerebro. En otro estudio, adultos de carpa dorada (*C. auratus*) fueron expuestos por 96 h a 15 y 51 µg/L de clorpirifos (1/10 y 1/3 de la CL50-96h para la especie) (Ma et al., 2013). Los autores registraron efectos a partir de la concentración más baja y desde las 24 h de exposición. A las 96 h, en hígado, la actividad SOD se inhibió alrededor de un 40% en el tratamiento de 51 µg/L; CAT se inhibió más de un 20 y 30%, respectivamente y la concentración de MDA aumentó un 40 y 20%, respectivamente. En el cerebro, los cambios en la actividad de SOD fueron leves y la actividad de CAT se incrementó aproximadamente un 33 y 17%, respectivamente. Por último, en un trabajo reciente de Ali et al. (2020) realizado con larvas de *O. mykiss* expuestas a concentraciones de clorpirifos entre 2 y 6 µg/L y de 1 a 21 días, se observó que, entre otros efectos medidos, la actividad de las enzimas SOD y CAT en hígado sufrían inhibición, excepto para las concentraciones más bajas, que a los 7 días de exposición mostraron una actividad superior al control correspondiente. La inhibición máxima de SOD (más de un 70%) se registró a los 21 días en larvas expuestas a 6 µg/L de clorpirifos, mientras que la actividad de CAT resultó estimulada en un 40%, aproximadamente, en larvas expuestas a 2 µg/L de clorpirifos por 7 días.

Otro aspecto a considerar son los efectos genotóxicos reportados en varias especies de peces expuestas a clorpirifos. Ismail et al. (2017) evaluaron la frecuencia de micronúcleos (FMN) como medida de inestabilidad genética en eritrocitos de juveniles de rohu (*Labeo rohita*) expuestos durante 96 h a concentraciones entre 74 y 221 µg/L de formulado comercial de clorpirifos (40% principio activo) (1/6 y 1/2 de la CL50-96h para la especie). Los autores registraron un aumento significativo de micronúcleos en forma dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. La FMN observada varió entre 0,61% y 1,19%, con la concentración más alta ensayada, a las 48 y 96 h, respectivamente. Bhatnagar et al. (2016), en un ensayo de toxicidad crónica (hasta 35 días), expusieron larvas del pez mrigal (*Cirrhinus mrigala*), a 20, 40 y 80 µg/L de clorpirifos (formulado comercial, 50% principio activo), siendo estas concentraciones 1/20, 1/10 y 1/5 de la CL50-96h calculada por los autores. Se observó que la mayor inducción de micronúcleos en eritrocitos ocurría a partir de los 14 días de exposición con 80 µg/L (2400% de FMN en el tratado vs. 0,033% en el control), mientras que el efecto mínimo significativo fue a los 2 días de exposición con 40 µg/L (0,401% vs. 0,066%).

De los estudios sobre efectos subletales mencionados en esta sección, se observa que el clorpirifos afecta de manera negativa a los peces desde concentraciones que son de 1 a 3 órdenes de magnitud inferiores con respecto a la CL50 correspondiente a la especie en estudio. En total, con los datos compilados en Huang et al. (2020) y en esta sección, se analizaron 31 trabajos sobre efectos subletales (publicados entre

1997 y 2020). El intervalo de concentraciones de clorpirifos testeadas fue de 0,002 a 1420 µg/L y el tiempo de exposición fue de entre 24 h y 75 días. En total, se estudiaron los efectos del clorpirifos en 24 especies de peces. Huang et al. (2020), en su revisión (y en concordancia con lo detallado en esta sección), sugieren potenciales biomarcadores útiles para la detección de toxicidad por clorpirifos en peces. En primer lugar, mencionan al cerebro (antes que el hígado) como órgano blanco y, en segundo lugar, los parámetros biomarcadores sugeridos son: neurotoxicidad, defensas antioxidantes y daño oxidativo, genotoxicidad, alteraciones hematológicas, alteraciones de conducta e histopatología.

5.1.3 Factores que influyen en la toxicidad de clorpirifos

Los efectos tóxicos descriptos en las Secciones 4.1.1 y 4.1.2 no sólo dependen de la especie y la concentración de clorpirifos, ya que otra serie de factores también interactúan y modifican la toxicidad de este compuesto. Por ejemplo, se ha observado que factores tales como la salinidad del agua, la temperatura, las etapas del ciclo de vida de cada especie y el tiempo de exposición, son determinantes a la hora de evaluar la toxicidad de clorpirifos. Brevemente, se describen algunos estudios sobre estos efectos.

5.1.3.1 Salinidad

Se ha descripto que la salinidad influye en la toxicidad de clorpirifos. En las especies marinas y en aquellas que tienen parte de sus ciclos de vida en dicho ambiente (anádromas y catádromas), la toxicidad por organofosforados es más aguda en comparación con las especies de agua dulce. En la revisión de Huang et al. (2020), se colectaron datos de 32 especies de peces, observándose una mayoría de peces de agua dulce (84%). A partir de dichos datos se observa que el intervalo de CL50-96h para peces marinos varía entre 2 y 520 µg/L, siendo *Tilapia guineensis* la especie más sensible y *G. affinis* la menos afectada, mientras que para peces de agua dulce los valores registrados de CL50-96h se encuentran entre 2,1 µg/L (para el pez espinoso, *Pungitius pungitius*) y 13.030 µg/L (*D. rerio*). Se ha sugerido que esta diferencia de sensibilidad al clorpirifos entre especies marinas y de agua dulce estaría relacionada con la mayor bioactivación de los plaguicidas organofosforados en presencia de mayor salinidad, es decir, a la formación del metabolito oxón (Schlenk y Lavado, 2011). Sin embargo, son escasos los estudios realizados específicamente con clorpirifos y peces en condiciones salinas. Además, la situación contraria fue registrada para juveniles de truchas arcoíris (*O. mykiss*) aclimatadas a aguas salobres (Maryoung et al., 2014). En este trabajo, individuos expuestos a entre 20 y 150 µg/L de clorpirifos en aguas salobres (16 g de sal/kg de agua de mar), presentaron un tiempo efectivo medio de letalidad (TL50) mayor en todas las concentraciones, en comparación a los expuestos a clorpirifos en agua dulce (0,5 g de sal/kg de agua). Por ejemplo, el TL50 en condiciones de hipersalinidad para 100 µg/L de clorpirifos fue de 120 h, mientras que en agua dulce resultó de 49 h. Los autores sugieren que otros

mecanismos bioquímicos y moleculares (además de la vía de inhibición de AChE) estarían implicados en este efecto de la salinidad sobre la toxicidad del clorpirifos.

5.1.3.2 Temperatura

En cuanto al efecto de la temperatura, los estudios con peces expuestos a clorpirifos son muy escasos. Patra et al. (2015) observaron mayor toxicidad de clorpirifos a mayor temperatura. Los autores estudiaron este efecto en juveniles de tres especies de aguas templadas: la carpa plateada (*Bidyanus bidyanus*), el pez arcoíris (*Melanotaenia duboulayi*), la carpa occidental (*Hypseleotris klunzingeri*); y en una especie de aguas frías, la trucha arcoíris (*O. mykiss*). Para esto, los peces fueron aclimatados incrementando no más de 1°C la temperatura del agua por día hasta alcanzar la temperatura de estudio, donde se mantuvieron 15 días previo a la exposición. Las temperaturas testeadas para las especies de aguas templadas fueron de 15 a 35°C, mientras que para trucha arcoíris fueron de 5 a 25°C. Para todas las especies, los autores observaron un incremento de la toxicidad en función de la temperatura. Sólo con *B. bidyanus* se calculó la CL50 a 24, 48, 72 y 96 h a las distintas temperaturas de exposición: se observó que, a todos los tiempos, las CL50 a 35°C (con valores entre 1 y 2 µg/L) fueron alrededor de 1/5 de las CL50 registradas a 15°C. A su vez, se determinó el efecto de la temperatura a través del TL50, calculado para cada combinación de especie, temperatura y clorpirifos (se seleccionó una única concentración, para cada especie, en base a curvas de CE50: 6 µg/L *B. bidyanus*, 440 µg/L *M. duboulayi*, 8,5 µg/L *H. klunzingeri* y 22 µg/L *O. mykiss*). Para todas las especies, se observó una disminución lineal del TL50 al incrementar la temperatura, siendo de aproximadamente 100 h en las temperaturas iniciales (5°C para trucha arcoíris y 15°C para el resto de las especies) hasta ser de aproximadamente 0 – 10 h con las temperaturas más altas testeadas (25 y 35°C). Esto indica que una misma concentración de clorpirifos es letal en menos tiempo de exposición a medida que se incrementa la temperatura. En consecuencia, los autores mencionan la potencial interacción adversa que podría ocurrir en ambientes acuáticos con presencia de clorpirifos frente al incremento de temperatura causado por el cambio climático. En otro trabajo, luego de exponer individuos adultos de *P. reticulata* a un formulado comercial de clorpirifos (48% principio activo), se obtuvo un valor de CL50-96h de 15 µg/L a 17°C (Tapia Vilchez, 2017), el cual fue significativamente menor al reportado para la especie en condiciones óptimas de temperatura (CL50-96h de 176 µg/L a 24°C) (Sharbidre et al., 2011). Esto indicaría que, cuando las especies de peces se encuentran a temperaturas subóptimas (ya sean mayores o inferiores al óptimo), son más vulnerables a compuestos tóxicos como el clorpirifos. Por otro lado, Humphrey y Klumpp (2003) estudiaron los efectos combinados de la temperatura y la exposición a clorpirifos en embriones y larvas del pez *Melanotaenia splendida splendida*. Los autores expusieron embriones (entre 125 y 4000 µg/L) y larvas (entre 16 y 500 µg/L), a 25, 27 y 29°C por 96 h. Encontraron que el clorpirifos, para estos estadios, resultó altamente tóxico, presentando a su vez interacción significativa con la temperatura. Por ejemplo, embriones

incubados a 25°C no sufrieron mortalidad con 125 µg/L de clorpirifos, mientras que la misma concentración causó una mortalidad significativa del 13% a 29°C; de manera similar, la concentración más alta testada causó un 42% de mortalidad a 25°C y el 100% a 27 y 29°C. En las larvas, la concentración menor sólo causó una mortalidad significativa del 12% a 29°C, mientras que la concentración superior causó 96-100% de mortalidad a las tres temperaturas. Como se observa en este estudio, la etapa de desarrollo es también un factor que influye en la toxicidad por clorpirifos.

5.1.3.3 Etapa de desarrollo y tiempo de exposición

En el pez cebra (*D. rerio*) se describe mayor toxicidad por clorpirifos en el estadio larval (CL50-96h 280 µg/L), seguido por el estadio de juveniles (1.320 µg/L) y por último el estadio embrionario (13.030 µg/L) (Wang et al., 2017). En otro trabajo realizado con el rodaballo (*Psetta maxima*), Mhadhbi y Beiras (2012) registraron mayor sensibilidad de las larvas a la exposición de clorpirifos. Las CL50-96h para embriones y larvas fueron de 117 y 95 µg/L respectivamente. Humphrey y Klumpp (2003) analizaron la letalidad de distintos estadios del pez *M. splendida splendida* y encontraron que el orden de mayor a menor susceptibilidad a la exposición por clorpirifos fue: huevos expuestos previo a su fertilización (CL50-96h = 23 µg/L) < larvas de 16 días (117 µg/L) < adultos (396 µg/L) < huevos fecundados (2019 µg/L).

Por otro lado, a exposiciones más largas, la CL50 decrece; es decir, que concentraciones de clorpirifos que pueden resultar inocuas en un plazo corto pueden volverse tóxicas a mayor tiempo de exposición. Por ejemplo, en adultos de carpa común (*C. carpio*) expuestos a un formulado comercial de clorpirifos (40% principio activo), la CL50-24h fue de 861 µg/L mientras que a 96 h fue 203 µg/L (Banaee et al., 2013). En otro estudio, juveniles de *C. carpio* presentaron valores de CL50 a 24 h y 96 h de 794 y 394 µg/L, respectivamente; al igual que juveniles de *Liza abu*, con CL50 24 y 96 h de 371 y 215 µg/L, respectivamente. Lo mismo se observó en exposiciones subletales (300 µg/L clorpirifos) durante 5, 10 y 15 días. El porcentaje de mortalidad se incrementó a lo largo de los días, siendo de 13, 20 y 33%, respectivamente, para *C. carpio*; y de 33, 43 y 50% para *L. abu* (Aitte et al., 2018).

5.1.4 Bioacumulación

Los valores de FBC descriptos para especies de peces se encuentran entre 50 y 5000 para clorpirifos (El-Amrani et al., 2012; Watts, 2012). Esta gran dispersión en cuanto a valores FBC en peces, dependería de las condiciones de ensayo y de la especie de estudio. Por otro lado, si bien los peces bioacumulan este compuesto, también son capaces, al menos en parte, de eliminarlo del organismo. En este sentido, Rao et al. (2005), luego de exponer adultos del pez mosquito (*G. affinis*) a 60 µg/L (1/5 de la CL50-96h) por 20 días, registraron acumulación de clorpirifos en distintos tejidos. El FBC promedio por individuo (L/Kg) luego de 20

días de exposición fue de 38.000 en las vísceras, 3.000 en la cabeza y 2.000 en la carcasa. Además, la acumulación fue máxima dentro de los 4 primeros días de exposición y luego fue decreciendo. Los valores de clorpirifos acumulado por tejido a 4 y 20 días de exposición fueron: vísceras: 12 y 2 mg/Kg > cabeza: 0,8 y 0,2 mg/Kg > carcasa: 0,3 y menos de 0,2 mg/Kg. Por lo tanto, la tasa de depuración de clorpirifos de estos tejidos fue de 2,2; 1,7 y 0,4 ng/h, respectivamente. En otro estudio con embriones de *D. rerio* expuestos a 1 y 10 µg/L de clorpirifos por 48 h, los valores de FBC fueron aprox. 2700 y 5200 L/Kg, respectivamente y en concordancia con otros trabajos compilados por los autores (El-Amrani et al., 2012).

5.1.5 Situación en Argentina

En el país, el incremento de áreas cultivadas de las últimas décadas, junto con el uso intensivo de plaguicidas, han comprometido seriamente la calidad de los cuerpos de agua y a las comunidades biológicas que en ella habitan. Como se mencionó al comienzo de este capítulo, los peces son relevantes como centinelas a la hora de determinar qué compuestos tóxicos se encuentran, tanto de manera permanente como temporal, en dichos ambientes. En este sentido, en el país se estudian los efectos tóxicos del clorpirifos sobre peces y otros organismos acuáticos desde hace varios años. En la Tabla 5.2 se compilan los trabajos publicados en la última década sobre estudios de toxicidad de clorpirifos con distintas especies de peces. En total, se analizaron 18 trabajos (15 de exposición aguda, 1 de exposición crónica, 2 estudios realizados a campo). Dentro de los ensayos de laboratorio, 9 se realizaron con clorpirifos de grado analítico (Paracampo et al., 2014; Bonansea et al., 2016a, b; Bernal-Rey et al., 2017; 2020; López Aca et al., 2018; Caramello et al., 2019; De Anna et al., 2019; Argemi, 2020), mientras que en 8 estudios se evaluaron los efectos de formulados comerciales (Carriquiriborde, 2010; Mugni et al., 2012; Vera-Candioti et al., 2013; Bonifacio et al., 2016, 2017, 2020; Argemi, 2020; Gutierrez et al., 2020) (Tabla 5.2). Cabe mencionar que existen diferencias de sensibilidad frente a la exposición a clorpirifos de grado analítico o formulado comercial. En este sentido, Argemi (2020) comparó los efectos de un formulado comercial de clorpirifos (48% de principio activo) con los provocados por el compuesto analítico (95% de pureza) al exponer juveniles de chanchita (*A. facetus*). Los individuos registraron una CL50-96h de 251 µg/L para clorpirifos de grado analítico, en contraste con la CL50-96h de 39 µg/L para el formulado comercial. En este trabajo se menciona que el efecto de los coadyuvantes presentes en las soluciones comerciales podría potenciar la solubilidad del clorpirifos, aumentando la capacidad de dispersión y su letalidad.

En total, considerando todos los tipos de estudios compilados, las especies evaluadas fueron 12, siendo representantes de 8 órdenes taxonómicos: *Cyprinodontiformes*, *Characiformes*, *Perciformes*, *Atheriniformes*, *Salmoniformes*, *Cypriniformes*, *Mugiliformes* y *Siluriformes*. En cuanto a las etapas de desarrollo, los estudios registrados se realizaron mayormente con ejemplares adultos, salvo por 3 estudios que utilizaron juveniles de sábalo (*Prochilodus linneatus*; Caramello et al., 2019), trucha arcoíris (*O. mykiss*;

De Anna, 2019) y chanchita (*A. facetus*; Argemi, 2020); 2 estudios con estadios larvales de madrecita (*C. decemmaculatus*, Carriquiriborde, 2010) y de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*; López Aca et al., 2018); y un estudio sobre porcentaje de fecundidad, llevado a cabo con gametas de carpa común (*C. carpio*; Argemi, 2020). De los trabajos compilados, el valor más bajo de CL50 se registró para larvas de *O. bonariensis* (CL50-96h = 2,26 µg/L) mientras que el más alto fue para juveniles de *A. facetus* (CL50-96h = 251 µg/L). Estos valores se encuentran dentro de los intervalos de toxicidad descriptos previamente y concuerdan con la mayor susceptibilidad observada para los estadios larvales.

Del total de trabajos compilados, 9 se realizaron con la madrecita de agua, *C. decemmaculatus*, (1 estudio con crías y los restantes con ejemplares adultos). Cabe destacar que *C. decemmaculatus* es una especie nativa de Sudamérica, que se encuentra distribuida en Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Es un teleósteo de agua dulce, no migratorio, vivíparo, de hábitos bentónico-pelágicos; y es una especie muy utilizada en estudios de ecotoxicidad porque se colecta fácilmente y se aclimata a las condiciones de laboratorio. Las CL50-96h registradas para *C. decemmaculatus* fueron de 75 µg/L (para larvas expuestas a un formulado comercial de clorpirifos, 48% principio activo; Carriquiriborde, 2010); y 105 µg/L para adultos expuestos a clorpirifos de grado analítico (Paracampo et al., 2014). Además, Vera-Candioti et al. (2013) registraron una importante diferencia de sensibilidad de los adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a dos formulados comerciales distintos. Con uno de ellos, la CL50-96h fue de 30 µg/L mientras que con el otro resultó ser de 210 µg/L. En este trabajo, también se registraron valores de CL50-24h para los dos formulados y se observa que, a mayor tiempo de exposición, mayor es la toxicidad, tal como se describió anteriormente (CL50-24h = 130 y 400 µg/L, para cada formulado, respectivamente). Por un lado, al comparar todos estos valores de CL50 registrados para *C. decemmaculatus* con los de otras especies de peces (detallados en la Sección 5.1.1), se observa que esta especie se encuentra dentro de las más sensibles al clorpirifos (Paracampo et al., 2014). Por otro lado, se observan diferencias de sensibilidad, tanto frente al producto testado (formulado comercial o clorpirifos de grado analítico) como también según la etapa de desarrollo (larva o adultos). Al igual que lo descripto por Argemi (2020), uno de los formulados comerciales testados por Vera-Candioti et al. (2013) fue significativamente más tóxico que lo registrado para clorpirifos de grado analítico (30 vs. 105 µg/L); sin embargo, lo contrario se registró para el segundo formulado testado (210 vs. 105 µg/L). En cuanto a las etapas de desarrollo y en concordancia con lo descripto anteriormente, las larvas de esta especie fueron más sensibles que los individuos adultos. Por último, cabe mencionar que Mugni et al. (2012) estudiaron la mortalidad de adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a agua de escorrentía, colectada luego de simular lluvia sobre un cultivo de soja donde se realizaron 3 aplicaciones de un formulado comercial de clorpirifos (48% ingrediente activo; 960 g de ingrediente activo por ha). Se observó que la concentración de clorpirifos detectada decrecía a lo largo del tiempo con sucesivos eventos de escorrentía. Por ejemplo, la concentración de clorpirifos se redujo de 0,35 µg/L en el día 0 (día de aplicación) a 0,06 µg/L en el día 19. Las

muestras de agua de escorrentía del día 0 provocaron un 47% de mortalidad luego de 96 h de exposición de los individuos en el laboratorio; mientras que este porcentaje se redujo a un 5%, aproximadamente, para el agua colectada a partir del día 6. En la tercera aplicación, la mortalidad con las muestras de agua del día 0 fue de un 85%, y recién cesó luego de transcurridos 42 días (siendo aproximadamente un 5%). Esto indicaría que la toxicidad de este compuesto depende no sólo de la concentración, sino también de la cantidad de veces que se aplique a campo y de su persistencia en el ambiente.

En los trabajos compilados también se observan varios efectos subletales en los peces expuestos a clorpirifos. Estos efectos se presentan en detalle en la Tabla 5.2 y se describen brevemente a continuación:

Efectos neurotóxicos: Se registró la inhibición de las actividades AChE cerebral y muscular y de butirilcolinesterasa (BChE) muscular, a partir de 0,4 µg/L de clorpirifos (Bonansea et al., 2016a, b; Bonifacio et al., 2016; 2017; Bernal-Rey et al., 2017, 2020; López Aca et al., 2018). Resulta interesante destacar que, en un estudio realizado con larvas de *O. bonariensis*, se observaron diferencias de sensibilidad a clorpirifos órgano-dependientes en cuanto a la actividad AChE. Los autores registraron mayor sensibilidad de la AChE en la cabeza de las larvas, frente a la enzima del resto del cuerpo, en individuos expuestos de 0 a 20 µg/L durante 96 h (CI50-96h = 0,07 y 0,48 µg/L, respectivamente) (López Aca et al., 2018). Por otro lado, Bernal-Rey et al. (2020) estudiaron el efecto de clorpirifos sobre la actividad de AChE a lo largo de las cuatro estaciones del año, considerando la existencia de ritmos circanuales en la actividad base de estas enzimas. Luego de exponer *in vivo* a individuos de *C. decemmaculatus* durante 96 h a 1 y 5 µg/L de clorpirifos (aproximadamente 1/100 y 1/20 del promedio de CL50 registrado para la especie), los autores registraron la inhibición de la actividad AChE en presencia de este compuesto en todas las estaciones del año. El otoño fue la estación más susceptible a este efecto, alcanzando un 55 y 79% de inhibición de la actividad AChE a 1 y 5 µg/L de clorpirifos, respectivamente. En otro estudio, Bernal-Rey et al. (2017), midieron el efecto en la actividad de AChE en dos especies de peces (*C. decemmaculatus* y *G. affinis*) tras una exposición *in vivo* a 1 y 5 µg/L de clorpirifos durante 96 h, encontrando diferencias de sensibilidad entre ambas especies. *C. decemmaculatus* fue la especie que sufrió mayor inhibición enzimática con ambas concentraciones. En el mismo estudio, hicieron ensayos *in vitro* de inhibición de esta enzima con clorpirifos nativo y el metabolito derivado oxón y encontraron diferencias significativas entre las especies solamente con este último, siendo la CI50 de 10,2 nM para *C. decemmaculatus* y de 54,2 nM para *G. affinis*. Se sugiere que esta podría ser una de las causas de la diferente sensibilidad observada *in vivo* entre las especies estudiadas.

Alteración de la conducta natatoria: Se registraron efectos en la actividad natatoria a distintas concentraciones, siendo la menor de 4 µg/L de clorpirifos (Paracampo et al., 2014; Bonansea et al., 2016b; Bonifacio et al., 2016, 2017, 2020). Los cambios registrados fueron respecto a la velocidad de nado, la distancia recorrida y los sectores de la pecera por donde se desplazaban los peces. En adultos de *J. multidentata*, la concentración de 4 µg/L causó una disminución de la velocidad de nado y un incremento del

tiempo de permanencia en el fondo del acuario respecto de los peces control, siendo el efecto leve a las 24 h y muy marcado a las 96 h de exposición (Bonansea et al., 2016b). En correlación con este efecto, a las 96 h se detectó un 76% de inhibición significativa de la AChE muscular. Paracampo et al. (2014) también registraron alteraciones de la actividad natatoria en adultos de *C. decemmaculatus*, siendo estos efectos significativos a partir de 30 µg/L de clorpirifos (1/3 de la CL50-96h registrada por los autores) y a partir de 2 a 6 h de exposición. Con dicha concentración se observaron episodios de natación errática, y a partir de 50 µg/L se observó menor movilidad de los individuos. Adultos de esta especie, tanto en exposiciones agudas (de 48 y 96 h) como en una exposición crónica (42 días), con 0,2 y 1.022 µg/L de formulado comercial (48% principio activo), sufrieron una disminución significativa de la distancia y velocidad de nado, y mayor cantidad de periodos de inmovilidad (Bonifacio et al., 2016; 2017; 2020). Lo mismo se registró, bajo las mismas condiciones de exposición, para *C. interruptus* (Bonifacio et al., 2017).

Efectos a nivel bioquímico y estrés oxidativo: Se observaron alteraciones de las actividades enzimáticas a partir de 0,2 µg/L de formulado comercial (48% principio activo) y de 0,4 µg/L clorpirifos de grado analítico. Brevemente, la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) sufrió inhibiciones de entre 25 y 60% con estas concentraciones, en *C. decemmaculatus* y *J. multidentada* (Tabla 5.2; Bonansea et al., 2016a; Bonifacio et al., 2017). La enzima catalasa (CAT) presentó inhibiciones de entre 38 y 73%, en distintos tejidos de *C. interruptus* y *C. decemmaculatus*, con concentraciones de 0,2 y 1.022 µg/L de clorpirifos luego de 48 h de exposición, mientras que la actividad de esta enzima sufrió activación (24 y 94% de incremento, respectivamente) cuando la exposición fue crónica (42 días, efecto estudiado en *C. decemmaculatus*) (Bonifacio et al., 2016; 2017). Otras enzimas y parámetros serológicos afectados en *C. decemmaculatus* frente a la exposición por clorpirifos fueron la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) que fue inhibida un 48% con 0,2 µg/L e incrementada un 51% con 1.022 µg/L de formulado comercial de clorpirifos a 48 h de exposición, un incremento de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH; entre 254 y 408%) y del cortisol (un 193%) con las concentraciones de formulado comercial mencionadas (Vera-Candioti, 2013; Bonansea et al., 2016a, Bonifacio et al., 2016, 2017, 2020).

Genotoxicidad (frecuencia de micronúcleos) y alteración de la expresión génica: Se registraron cambios en la expresión de ARNm de citocromo P450 1A1 (CYP1A1), glicoproteína-P (Pgp), el receptor nuclear PXR y el receptor de hidrocarburo de arilos (AhR) a partir de 0,4 µg/L de clorpirifos (Vera-Candioti et al., 2013; Bonansea et al., 2016a; Caramello et al., 2019; De Anna et al., 2019; Bonifacio et al., 2020). Otro parámetro medido fue la frecuencia de micronúcleos y de alteraciones de la morfología nuclear, los cuales se incrementaron significativamente con clorpirifos (de grado analítico y formulados comerciales), entre 0,2 y 155 µg/L, en exposiciones de 48 a 96 h (Vera-Candioti et al., 2013; Caramello et al., 2019; Bonifacio et al., 2020).

Efectos a nivel reproductivo: Se registró una caída del 36% de la fecundación, en gametas de *C. carpio* expuestas *in vitro* a 2 µg/L de clorpirifos (Argemi, 2020). Por otro lado, en el mismo estudio, se evaluaron cambios en las hormonas reproductivas, en individuos de *A. facetus*, expuestos a distintas concentraciones de clorpirifos (entre 0,1 y 600 µg/L) durante 24-96 h. Se encontró que la concentración de andrógenos totales decrecía en forma significativa a partir de los 24 µg/L de clorpirifos de grado analítico (LOAEC; aprox. un 37% menos que el control); mientras que el formulado comercial (48% principio activo) causó este efecto a 38 µg/L (LOAEC, aproximadamente un 22% menos que el control). Por otro lado, se observó que la reducción en la concentración de andrógenos totales fue significativa a partir de las 24 h, y el efecto perduró hasta 9 días luego de la exposición.

En cuanto a la acumulación y bioconcentración de clorpirifos, Bonansea et al. (2016b) expusieron individuos de *J. multidentata* a 0,4 y 4 µg/L de formulado comercial de clorpirifos (48% principio activo) por 96 h, registrando acumulación de este compuesto mayormente en intestino (67 µg/kg), seguido de hígado (58 µg/kg) y por último en branquias (42 µg/kg) (Tabla 5.2). Los valores de FBC para estos órganos fueron entre 133 y 212 L/Kg, en concordancia con lo descripto para otras especies de peces (Sección 5.1.4 Bioacumulación). En otro estudio realizado a campo, se observó que las especies asociadas al fondo de los ambientes acuáticos (bentónicas) presentan mayor acumulación de clorpirifos que las especies que se desplazan a lo largo de toda la columna de agua (nectónicas) (Alvarez, 2014). En este estudio, las especies bentónicas *A. facetus* (chanchita) y *Rhamdia quelen* (bagre) presentaron valores de 2,2 y 1,3 µg/g pez, respectivamente; mientras que las especies nectónicas *Oligosarcus jenynsii* (dientudo) y *Mugil liza* (lisa) presentaron ambas una concentración de 0,3 µg/g. Como se menciona en dicho trabajo, la diferencia entre las especies de distintos hábitos de vida estaría asociada, en gran parte, a que la mayor concentración del plaguicida se encuentra en los sedimentos acuáticos (Gebremariam et al., 2012). Sin embargo, cabe destacar que todas las especies estudiadas acumularon clorpirifos en sus tejidos, siendo mayor lo acumulado en cerebro, hígado y gónadas, en comparación con el músculo (Tabla 5.2). Este patrón de acumulación estaría relacionado con el contenido graso de los tejidos (Alvarez, 2014). Por último, en otro muestreo a campo en el Río de la Plata, se registraron valores de clorpirifos en individuos de sábalo (*P. lineatus*) y carpa común (*C. carpio*), de entre 0,05 y 0,08 µg/g (en *P. lineatus*) y de 0,02 a 0,08 µg/g (para *C. carpio*) y se observa que la concentración de clorpirifos es mayor en los peces de mayor tamaño, lo cual está probablemente relacionado al mayor contenido lipídico de los mismos, además de una mayor longevidad y, por lo tanto, una mayor exposición (Da Rosa, 2019).

5.1.6 Conclusiones

Los trabajos analizados, realizados en el país durante la última década, presentan efectos subletales significativos en concentraciones que van desde 0,2 a 1.000 µg/L y resultan en general entre 1 y 3 órdenes

de magnitud inferiores a la CL50 correspondiente. Los tiempos de exposición fueron de 24 a 42 días y se observa que exposiciones sucesivas a clorpirifos generan mayor toxicidad. Por lo tanto, al finalizar la época de aplicaciones, nos encontraríamos frente al periodo de mayor riesgo para los peces. Además, si se tiene en cuenta que la actividad de AChE podría estar sujeta a variaciones estacionales (como se demostró que ocurre en *C. decemmaculatus*), resulta importante determinar valores de concentración de riesgo que consideren tanto el efecto de la periodicidad como el efecto de la estacionalidad.

Se puede considerar que, en vista de las concentraciones de clorpirifos registradas en ambientes acuáticos de Argentina y a las concentraciones que, como se detalló en esta sección, causan efectos deletéreos, las especies de peces del país se encuentran en situación de riesgo frente a la exposición de clorpirifos. En concordancia, Alvarez et al. (2019) mediante el estudio de la distribución de efectos crónicos (con datos de distintos grupos taxonómicos) determinaron que los peces están dentro de las especies más sensibles a este compuesto. Por otro lado, se observa que la toxicidad del clorpirifos en peces observada en el país, se asemeja a lo descrito para peces en general y a lo registrado en otros países.

Tabla 5.2. Efectos de la exposición a clorpirifos en peces. Estudios nacionales en especies autóctonas o introducidas

Especie/ estadio	Parámetro/ efecto	Referencia
Efectos agudos		
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>		
crías 15d	CL50: 300 µg/L (24 h); 75 µg/L (96 h) (FC)	Carriquiriborde, 2010
adultos	Mortalidad por escorrentía: 46% (d 0); 5% (d 6) (FC)	Mugni et al., 2012
adultos	CL50: 130 µg/L (24 h); 30 µg/L (96 h) (FC Lorsban) 8 - 25 µg/L (48 - 96h), genotoxicidad (FM), citotoxicidad: aumento CL50: 400 µg/L (24 h); 210 µg/L (96 h) (FC Zamba) 52 - 155 µg/L, genotoxicidad (FM) Citotoxicidad: aumento	Vera-Candiotti et al., 2013
adultos	CL50 96h: 105,3 µg/L (PA). 30 µg/L, 2h, actividad natatoria: alterada	Paracampo et al., 2014
adultos	1 µg/L (PA), AChE: inhibición	Bernal-Rey et al., 2017
adultos	1 µg/L (PA), inhibición de AChE estacional: Otoño: 45%; Invierno a Verano: 54-52%	Bernal-Rey et al., 2020
adultos	0,2 µg/L (FC), AChE, CAT, GST en músculo: inhibidas AST: inhibida; Actividad natatoria inhibida Cortisol, LDH séricos aumentados	Bonifacio et al., 2017 Bonifacio et al., 2020
adultos	0,05-15 µg/L (FC), bioacumulación: 10-15 µg/kg	Gutierrez et al., 2020
<i>Jenynsia multidentata</i> adultos	0,4 µg/L (PA): Pgp: aumento; GST: disminución en varios tejidos; bioacumulación: 42-67 µg/kg; Bioconcentración: 133-212 L/kg;	Bonanseña et al., 2016a Bonanseña et al., 2016b

	BChE cerebral: inhibición; BChE muscular: aumento	
<i>Cheirodon interruptus</i> adultos	0,014 µg/L (FC), CAT cerebral: inhibición	Bonifacio et al., 2017
<i>Odontesthes bonariensis</i> larvas	CL50-96 h: 2,26 µg/L (PA) AChE cerebral, CI50 0,07 µg/L; AChE corporal, CI50 0,48 µg/L	López Aca et al., 2018
<i>Prochilodus linneatus</i> juveniles	90 µg/L (PA), 7d, genotoxicidad (MN y AMN): aumentada	Caramello et al., 2019
<i>Australoheros facetus</i> juveniles	CL50: 251 µg/L (PA); 39 µg/L (FC) Andrógenos totales: caída	Argemi, 2020
<i>Cyprinus carpio</i>	2 µg/L (FC), fecundidad: caída	Argemi, 2020
<i>Oncorhynchus mykiss</i> juveniles	1,4 µg/L, 12h (PA), Intestino: Expresión PXR, ARNT: aumento; CYP1A, AhR: caída Hígado: Expresión Pgp, Mrp2: caída	De Anna et al., 2019
<i>Gambusia affinis</i> adultos	1-5 µg/L (PA), AChE: inhibición	Bernal-Rey et al., 2017
Efectos Crónicos		
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> adultos	0,2 µg/L, 42d, AChE cerebral, CAT hepática: aumento	Bonifacio et al., 2016
Estudios Ambientales - Bioacumulación (µg/g de tejido húmedo)		
<i>Oligosarcus jenynsii</i> adultos	Cerebro (0,16) > Hígado (0,09) > Músculo (0,03)	Alvarez, 2014
<i>Mugil liza</i> juveniles	Cerebro (0,27) > Músculo (0,02) > Hígado (0,01)	
<i>Australoheros facetus</i> adultos	Hígado (1,32) > Gónadas (0,57) > Cerebro (0,23) > Músculo (0,06)	
<i>Rhamdia quelen</i> adultos	Cerebro (0,73) > Hígado (0,37) > Gónadas (0,12) > Músculo (0,1)	
<i>Cyprinus carpio</i> adultos	Lomo (0,057); Hígado (0,038)	Da Rosa, 2019
<i>Prochilodus lineatus</i> adultos	Lomo (0,076); Hígado (0,052)	

Abreviaturas: FC: Formulado comercial; PA: principio activo; CL50: concentración letal-50%; CI50: concentración inhibitoria-50%; FM: frecuencia de micronúcleos; AMN: alteraciones de la morfología nuclear; AChE: acetilcolinesterasa; BChE: butirilcolinesterasa; CAT: catalasa; GST: glutatión-S-transferasa; AST: aspartato aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; Pgp: glicoproteína-P; Mrp2: proteína de resistencia a múltiples drogas-2; CYP1A: citocromo P450 1A; PXR: receptor X de pregnano; AhR receptor de hidrocarburo arilo; ARNT: traslocador nuclear del AhR.

5.2 Anfibios

La clase Amphibia está compuesta por 3 órdenes que en conjunto suman 6892 especies a nivel mundial. De éstas, 2276 se encuentran amenazadas (https://nc.iucnredlist.org/redlist/content/attachment_files/2020-2_RL_Stats_Table1b.pdf; acceso 18/08/2020), lo que representa un 33% del total de especies. A su vez, el 84% de las especies amenazadas a nivel global corresponden al orden Anura, al que pertenecen sapos y ranas, y sobre los cuales se centrará este capítulo.

En Argentina, de 304 especies amenazadas en total, 34 corresponden a anfibios (<https://www.iucnredlist.org/statistics>; Tabla 5; acceso 18/8/2020). Las principales causas directas de los cambios en la biodiversidad incluyen modificaciones en el uso de la tierra y el mar, explotación directa de los organismos, cambio climático, contaminación e introducción de especies invasivas (Díaz et al., 2019). En el

caso particular de los anfibios, entre las causas del descenso global observado desde 1980 se encuentran la pérdida y/o modificación del hábitat, la contaminación, el fuego, las enfermedades y patógenos, las especies invasoras, su uso y los desastres naturales (Stuart et al., 2004; Vaira et al., 2018). De acuerdo con Hoffmann et al. (2010), los anfibios enfrentan una situación especialmente complicada al encontrarse fuertemente amenazados y ser objeto de bajos niveles de esfuerzos de conservación. Además, existe escasa información respecto de su sensibilidad frente a sustancias tóxicas, que podría ser superior a la de las especies subrogantes de peces utilizadas en ensayos de toxicidad (Venturino et al., 2003; Ortiz-Santaliestra et al., 2017).

En Argentina, la principal amenaza para la supervivencia de los anfibios ha sido la pérdida y/o modificación del hábitat, seguida de la alteración del hábitat por contaminación química y biológica (Vaira et al., 2012). En lo que respecta a la contaminación química, Vaira et al. (2018) señalan que la mayor parte de las investigaciones en anfibios han sido desarrolladas bajo condiciones de laboratorio, y que los estudios realizados a campo o *in situ* resultan insuficientes. En un estudio recientemente publicado, Alvarez et al. (2019) señalan que existe entre un 35% y un 96% de probabilidad para efectos agudos y crónicos, respectivamente, de que las concentraciones ambientales de clorpirifos halladas en la Pampa Húmeda superen la concentración de riesgo para el 5% de las especies (HC5: 0,0637 µg/L para riesgo agudo y 0,0007 µg/L para riesgo crónico). A partir de la literatura relevada, los autores indican que los artrópodos y peces son los taxones más sensibles a la contaminación por clorpirifos, mientras que anuros y moluscos se ven afectados a mayores concentraciones. Además, Alvarez et al. (2019) señalan que el criterio de calidad de agua de Argentina (valor de referencia de 0,006 µg/L) se ve superado en 62% de los casos analizados en el estudio.

5.2.1. Situación de los anfibios en la República Argentina

5.2.1.1 Estudios *in situ* y *ex situ*

Diversos grupos de investigación han realizado exposiciones *in situ* y *ex situ* de anfibios y han analizado los plaguicidas presentes en las zonas de muestreo, tanto en agua como en sedimentos. Los estudios reportados aquí documentan una gama de efectos de clorpirifos sobre diferentes puntos finales y para diferentes especies anfibias nativas de Argentina. Se evaluó supervivencia e incidencia de malformaciones, velocidad de crecimiento y desarrollo, condición física, alteraciones genéticas e inmunológicas y alteraciones bioquímicas en las actividades de enzimas marcadoras de exposición a organofosforados y de enzimas que participan de la defensa antioxidante. Los resultados obtenidos en los estudios *in situ* y *ex situ* realizados en la República Argentina se encuentran compilados en la Tabla 5.3. En total se analizaron 8 trabajos de investigación.

Entre dichos estudios, Peltzer et al. (2008) realizaron ensayos *in situ* con *Scinax nasicus* durante 7 días en lagunas control y que recibían escorrentía procedente de plantaciones de soja en la provincia de Entre Ríos. Los resultados obtenidos indicaron que las lagunas mostraban eutrofización por la escorrentía recibida, y que esta afectó la supervivencia y la salud de larvas de *S. nasicus*. Los autores detectaron plaguicidas organoclorados en todos los sitios, incluyendo el de referencia. Además, observaron una inhibición significativa de la actividad de colinesterasa cerebral en larvas expuestas en las lagunas agrícolas, a pesar de que no se detectaron plaguicidas organofosforados. Además, las larvas se desarrollaron más lentamente que las de la zona de referencia, presentaron un elevado porcentaje de mortalidad y mayor lisis de eritrocitos, junto a una elevada prevalencia de parásitos intestinales. En un estudio de microcosmos utilizando sedimento extraído de lagunas ubicadas en sitios agrícolas de la provincia de Entre Ríos, Peltzer et al. (2013) caracterizaron su toxicidad para larvas de *Trachycephalus typhonius*. El ensayo tuvo una duración de 79 días. Los autores no observaron efecto del sedimento sobre la supervivencia (excepto hacia el final del ensayo), pero tuvo efectos subletales sobre la velocidad de desarrollo y el tamaño y forma de los individuos. Los metamorfos expuestos a los sedimentos de sitios contaminados tuvieron menor tamaño y mostraron daño en el ADN y alteraciones bioquímicas (con disminución de la actividad de butiril colinesterasa -BChE- y aumento de la actividad de glutatión S-transferasa-GST). El análisis de plaguicidas en sedimento indicó que los niveles de clorpirifos se encontraban por debajo del límite de detección de la técnica.

En otro estudio *in situ* desarrollado en la ecorregión de la pampa húmeda, Brodeur et al. (2011) determinaron la condición física, la carga de parásitos y la actividad de enzimas antioxidantes en adultos de diferentes especies (*Leptodactylus latinasus*, *R. fernandezae*, *Leptodactylus ocellatus* y *Boana pulchella*). Asimismo, realizaron determinaciones de plaguicidas en el agua de las lagunas muestreadas. Los autores utilizaron 3 sitios de referencia y 6 sitios que se encontraban en los márgenes o entre campos de soja. Las visitas para muestreo se realizaron al menos 3 semanas después de la aplicación de plaguicidas en los campos, de acuerdo con lo informado por los dueños y administradores. Clorpirifos fue detectado en el agua de 3 de los sitios muestreados de los campos de soja, en concentraciones que variaron entre 0,3 y 0,53 µg/L. No se observaron diferencias significativas en la carga de parásitos ni en la prevalencia de malformaciones externas. Se observó una menor condición física en los adultos provenientes de los campos de soja, por lo que la reproducción y supervivencia de las poblaciones que allí habitan podrían encontrarse reducidas. Se observaron tres modificaciones enzimáticas en hígado: aumento de la actividad de catalasa (CAT) y colinesterasa e inhibición de la actividad de GST. Los anuros muestreados en los campos de soja presentaron una, dos o tres de estas modificaciones, dependiendo del sitio y la especie. Las modificaciones bioquímicas observadas sugieren alteraciones fisiológicas y un mayor costo energético de mantenimiento en los anuros que habitan los campos de soja. Otra explicación para la reducción en su condición física podría ser la menor

área del hábitat que los anuros ocupan y la reducción en la disponibilidad de presas debido a las aplicaciones de plaguicidas que allí se realizan.

Agostini et al. (2013) analizaron la incidencia de malformaciones en el noroeste de la provincia de Buenos Aires sobre adultos de *R. fernandezae*, *B. pulchella*, *Scinax granulatus* y *Pseudis minuta*, y adultos y juveniles de *Leptodactylus latrans*. Se muestrearon 7 lagunas temporarias ubicadas en áreas cultivadas y 3 sitios de referencia. Se detectó clorpirifos en sedimentos de las lagunas de áreas cultivadas en una concentración de $5 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$. La prevalencia de malformaciones fue significativamente mayor en las áreas cultivadas respecto de la zona de referencia. Los autores señalan diversas razones que podrían contribuir al incremento de malformaciones en estas especies además de la presencia de plaguicidas, como la eutrofización de las lagunas (evidenciada en la disminución de concentración de oxígeno disuelto observada), infección por parásitos, predadores y radiación ultravioleta (aunque estas posibilidades no fueron analizadas en el estudio).

En la provincia de Santa Fe, Attademo et al. (2015) determinaron la actividad de enzimas antioxidantes, detoxificantes y marcadores de exposición a organofosforados en tejidos digestivos de adultos de *Lysapsus limellium* colectados en un campo de arroz y en un sitio de referencia. Los muestreos se realizaron 24 h y 168 h después de la aplicación aérea de clorpirifos (grado comercial, 48% ingrediente activo; $500 \text{ cm}^3/\text{ha}$). La concentración de clorpirifos hallada en agua del arrozal disminuyó desde $1388 \pm 0,2 \text{ ng}/\text{L}$, detectados 24 h post-aplicación, a $97 \pm 5,1 \text{ ng}/\text{L}$ luego de 7 días de su aplicación. Se observó mortalidad de individuos luego de la aplicación del insecticida en el arrozal, con inhibición de acetilcolinesterasa (AChE), carboxilesterasa (CabE), CAT y GST en tejidos digestivos. La toxicidad ejercida por clorpirifos a nivel bioquímico en *L. limellium* pondría en riesgo también a especies simpátricas. Asimismo, los autores indican que la medición de actividades enzimáticas como biomarcadores permitiría comprender los efectos de los plaguicidas sobre las especies anfibia expuestas, así como también establecer límites seguros de uso de estos productos en el ambiente.

Sansiñena et al. (2018) evaluaron la toxicidad de sedimentos extraídos de zonas de intensa actividad agrícola de las afueras de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, sobre larvas de *B. pulchella* durante 10 días. Los autores no observaron efecto de los sedimentos sobre la supervivencia de las larvas, pero sí observaron una inhibición significativa del crecimiento en individuos expuestos al sedimento de un sitio que contenía numerosos plaguicidas, entre los que se encontraba clorpirifos a una concentración de $26 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso seco. Además, observaron un incremento significativo de la frecuencia de malformaciones en larvas expuestas al sedimento de otro sitio que contenía diversos plaguicidas, incluyendo clorpirifos ($9 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso seco). Los autores resaltan la importancia de analizar puntos finales como la ocurrencia de alteraciones

morfológicas, que en este estudio permitió detectar toxicidad cuando otros puntos finales no resultaron afectados.

Huespe et al. (2017) analizaron la respuesta de marcadores de estrés oxidativo a nivel inmunohistológico (melanomacrófagos) y a nivel bioquímico (actividad de GST) en hígado de adultos de *Leptodactylus chaquensis* colectados en un arrozal de la provincia de Santa Fe, contrastando las respuestas con adultos colectados en un sitio de referencia. Los individuos fueron colectados 7 días después de la aplicación de clorpirifos (grado comercial, 48%; 800 cm³/ha). Los autores observaron una inhibición de la actividad de GST y un aumento del número de melanomacrófagos en hígado de individuos que habitaban el arrozal, en comparación con los del sitio de referencia. De acuerdo con los autores, estas respuestas son indicativas de estrés oxidativo en los individuos y representan el riesgo al que se encuentran expuestos debido al uso intensivo de clorpirifos en los arrozales.

Un estudio recientemente publicado por Agostini et al. (2020) analizó si las prácticas de manejo de plagas asociadas a la agricultura transgénica en la provincia de Santa Fe afectan a las especies anfibias nativas, realizando ensayos *in situ*. Los autores monitorearon efectos letales (mortalidad) y subletales (movilidad) en larvas de cuatro especies que habitan lagunas adyacentes a campos cultivados (n=71), midiendo los efectos luego de la aplicación de plaguicidas, y comparando con lagunas de referencia (n=20). Se evaluaron los efectos de 20 aplicaciones de plaguicidas durante las temporadas reproductivas de los anfibios (octubre a marzo) en los años 2010-2012 y 2016-2017. Se determinó la presencia de plaguicidas en agua antes de las aplicaciones, detectándose endosulfán (organoclorado) y clorpirifos en 7 de los sitios adyacentes a campos cultivados, en concentraciones que variaron entre 0,9 y 3,9 µg/L. Luego de su aplicación, se detectaron plaguicidas en 63 de las 71 lagunas adyacentes a campos cultivados. La concentración de clorpirifos detectada varió entre 176,9 y 256,6 µg/L. En los sitios muestreados en los que se aplicó clorpirifos (junto con glifosato) se observó una disminución significativa de la supervivencia de larvas de *B. pulchella* y *L. latrans*, lo que impidió determinar efectos sobre la movilidad ya que la supervivencia luego de 48 h de la aplicación fue inferior al 10%. Los autores sugieren que las prioridades en el área de conservación deberían centrarse en el desarrollo de una mejor legislación que regule el uso de plaguicidas y que proteja no sólo a los asentamientos humanos sino también a humedales y hábitats terrestres nativos.

Tabla 5.3 Estudios en anfibios *in situ* y *ex situ* con detección de clorpirifos– Argentina: Parámetros biológicos, bioquímicos y moleculares

Especie - Estadio	Parámetros afectados	Referencia
<i>Scinax nasicus</i> (larvas)	Supervivencia, velocidad de crecimiento y desarrollo, AChE: disminuido Parásitos, genotoxicidad (MN): aumentado	Peltzer et al. (2008)
<i>Leptodactylus latinasus</i>	Condición física: disminuido	Brodeur et al. (2011)

(adultos)		
<i>Rhinella fernandezae</i> (adultos)	Condición física: disminuido	Brodeur et al. (2011)
	Malformaciones: aumentado	Agostini et al. (2013)
<i>Leptodactylus ocellatus</i> (adultos)	AChE, CAT: aumentado; GST, Condición física: disminuido	Brodeur et al. (2011)
<i>Boana pulchella</i> (larvas)		
	Malformaciones: aumentado	Sansiñena et al. (2018)
	Velocidad de crecimiento: disminuido	Agostini et al. (2020)
	Supervivencia: disminuido	Agostini et al. (2013)
(adultos)	Malformaciones: aumentado	Brodeur et al. (2011)
	CAT: aumentado; GST: disminuido	
<i>Leptodactylus latrans</i> (larvas)		
(juveniles)	Supervivencia: disminuido	Agostini et al. (2020)
(adultos)	Malformaciones: aumentado	Agostini et al. (2013)
	Malformaciones: aumentado	
<i>Trachycephalus typhonius</i> (larvas)		
	Supervivencia, BChE: disminuido	Peltzer et al. (2013)
	Malformaciones, velocidad de crecimiento, días a metamorfosis, GST, genotoxicidad (MN): aumentado	
<i>Lysapsus limellium</i> (adultos)		
	Supervivencia, AChE, CabE, GST, CAT: disminuido	Attademo et al. (2015)
<i>Leptodactylus chaquensis</i> (adultos)		
	Melanomacrófagos: aumentado	Huespe et al. (2017)
	GST: disminuido	

MN: frecuencia de micronúcleos. AChE: acetilcolinesterasa; BChE: butirilcolinesterasa; CabE: carboxilesterasa; CAT: catalasa; GST: glutatión S-transferasa.

5.2.1.2 Estudios en condiciones controladas de laboratorio

Todos los parámetros analizados en ensayos de laboratorio sobre especies nativas en la República Argentina se encuentran sistematizados en la Tabla 5.4. Se analizaron en total 11 trabajos de investigación sobre el efecto de clorpirifos en embriones, larvas y adultos de anfibios nativos. En 5 de los trabajos se utilizaron larvas, 3 trabajos se realizaron con embriones, 2 trabajos con adultos y en 1 se utilizaron tanto embriones como larvas. Se observan diferencias de sensibilidad entre especies y entre estadios de vida para una misma especie, teniendo los embriones una CL50 superior a estadios de vida más avanzados, ya que la gelatina que contiene a los embriones tempranos, no eclosionados, puede actuar como una barrera protectora frente a la exposición a contaminantes.

Sotomayor et al. (2012) determinaron la CL50 a 48, 120 y 144 h para embriones de *Rhinella arenarum* (sin degelatinizar) expuestos desde fertilización a clorpirifos grado analítico. La CL50 disminuyó al transcurrir el tiempo de exposición, desde 23,3 mg/L (48 h) hasta 13,5 mg/L (144 h). También observaron un incremento en la frecuencia de aparición de malformaciones a 120 y 144 h de exposición y una disminución temprana de la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) en embriones expuestos por 48 h, acompañada por

una disminución de los niveles de poliaminas (indispensables para el desarrollo embrionario). Los autores sugieren la utilidad de ODC como biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados, al observarse un efecto inhibitorio sobre su actividad a concentraciones 12 veces menores que la CL50. En otro estudio publicado por Sotomayor et al. (2015), se calculó la EC50 para detención del desarrollo de embriones hasta el estadio de gástrula tardía como punto final, siendo ésta de 21,3 mg/L. A concentraciones subletales de clorpirifos (entre 2 y 14 m/L), los autores reportan un aumento de los niveles de GSH y una disminución de la actividad de GST, indicativos de una alteración del sistema de defensa antioxidante. Además, observaron inducción de la actividad de CAT y de los niveles nucleares de las proteínas c-Fos y Mek, que podrían actuar como nexos entre el estrés oxidativo y la alteración del desarrollo embrionario observada.

En un estudio realizado con larvas de 10 días de *R. arenarum*, Liendro et al. (2015) determinaron parámetros toxicológicos a 96 h para clorpirifos grado analítico, usando la mortalidad como punto final. La CL50 calculada fue de $1,46 \pm 0,27$ mg/L, la LC10 fue de 0,81 mg/L y la LC1 fue de 0,43 mg/L. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de malformaciones en larvas expuestas a 2 mg/L clorpirifos por 96 h. Se realizaron análisis bioquímicos sobre enzimas marcadoras de exposición a organofosforados y el sistema de defensa antioxidante en las larvas supervivientes a las exposiciones agudas. Se observó una disminución significativa de las actividades de AChE, CabE y CAT y un incremento de los niveles del antioxidante GSH. Además, los autores realizaron exposiciones agudas por 96 h a concentraciones subletales de clorpirifos (0,1 y 0,5 mg/L) y analizaron nuevamente dichos parámetros a 24, 48 y 96 h. Observaron una disminución significativa en la actividad de CabE y de AChE, y estimaron para esta última una IC50 de $0,113 \pm 0,026$ mg/L. La actividad de CAT disminuyó significativamente luego de 96 h de exposición, mientras que la actividad de GST no mostró cambios significativos. Los niveles de GSH se incrementaron inicialmente y a las 96 h retornaron a valores control. El potencial antioxidante reactivo total (TRAP) aumentó a las 24 h de exposición para luego volver a valores control. Los autores señalan que las concentraciones elevadas de clorpirifos que puedan alcanzarse en pequeñas lagunas o charcas luego de su aplicación amenazarían la supervivencia de las larvas que los habitan. Además, las concentraciones subletales generarían estrés oxidativo e inhibición de esterasas, comprometiendo el progreso del desarrollo.

Lajmanovich et al. (2015) utilizaron machos adultos de *R. arenarum* para evaluar los efectos de la exposición dérmica a 10 mg/L de un formulado comercial de clorpirifos (48% de ingrediente activo) durante 48 h (entre otros plaguicidas ensayados). Los autores no observaron alteraciones del comportamiento en los individuos. Las esterasas CabE y BChE resultaron inhibidas significativamente. Respecto de parámetros de estrés oxidativo, observaron un incremento de peróxidos lipídicos y no se registraron cambios en la actividad de GST. Los autores además detectaron un aumento en el daño al ADN en los individuos expuestos y no observaron signos de estrés para el sistema inmune al analizar indicadores hematológicos. Continuando con este tipo de estudios, Lajmanovich et al. (2018), analizaron nuevamente el efecto de la exposición dérmica a

5 y 10 mg/L de un formulado comercial de clorpirifos (48% de ingrediente activo) durante 48 h. Tal como se informó en el ensayo anterior, no se observaron alteraciones del comportamiento en los individuos expuestos. Los autores confirmaron la inhibición de BChE y CabE, así como también una situación de estrés oxidativo evidenciada por el aumento de la actividad de CAT como consecuencia de la exposición a clorpirifos.

Attademo et al. (2017) realizaron un ensayo de microcosmos con larvas de *R. arenarum* a fin de determinar si la dieta recibida (lechuga o pellets de alto contenido proteico y lipídico) influía sobre la capacidad de detoxificación de un formulado comercial de clorpirifos (48% ingrediente activo) en larvas de 5 días expuestas a 125 µg/L de clorpirifos durante 10 días. La dieta recibida no alteró la longitud ni el peso corporal de las larvas expuestas a clorpirifos. Se midieron las actividades de AChE y CabE en hígado e intestino de las larvas al final del ensayo. La actividad de CabE intestinal fue más sensible a la inhibición por clorpirifos que la actividad AChE. Además, el menor efecto inhibitorio del plaguicida sobre la CabE hepática sugeriría un papel fundamental de la CabE intestinal, al reducir la captación de clorpirifos y por ende su toxicidad al unir el metabolito clorpirifos-oxón. Los autores sugieren que el tracto gastrointestinal de las larvas sería un microambiente activo en lo que respecta al metabolismo de xenobióticos, que a su vez dependería de la dieta recibida.

En un estudio realizado con larvas y premetamorfos de *Ceratophrys ornata*, Salgado Costa et al. (2018) analizaron el efecto de un rango de concentraciones de clorpirifos (entre 0,01 y 0,7 mg/L) en exposiciones agudas (96 h) y crónicas (240 y 336 h) sobre la producción de sonidos y otros puntos finales (mortalidad, comportamiento, anormalidades morfológicas y crecimiento). Los autores observaron que las concentraciones de clorpirifos utilizadas, cercanas a las observadas en la naturaleza, afectan un comportamiento clave para *C. ornata* como lo es la emisión de sonidos (esencial para la supervivencia y la dinámica poblacional de la especie). A su vez, existe una progresión de efectos negativos que acompañan a las alteraciones en la emisión de sonidos, iniciando con las alteraciones de la natación, seguidas de malformaciones leves y severas, y culminando en la muerte de los individuos expuestos.

Quiroga et al. (2019) analizaron la sensibilidad de larvas de *R. arenarum* expuestas a concentraciones subletales de un formulado comercial de clorpirifos (48% ingrediente activo) sobre dos rasgos sensibles a la temperatura: el rendimiento natatorio y los límites de tolerancia térmica máximo y mínimo. Los autores observaron que a medida que la concentración de clorpirifos aumentaba, disminuía el rendimiento natatorio, la distancia recorrida y los límites máximo y mínimo de tolerancia térmica. Los autores sugieren que concentraciones subletales de clorpirifos podrían afectar la condición física y la supervivencia de las larvas y que podrían conducir a una merma poblacional, ya que producen efectos tóxicos sensibles a la temperatura. Asimismo, los autores indican que los efectos subletales de clorpirifos serían cada vez más evidentes en el futuro debido al aumento de la temperatura ambiental por el calentamiento global.

Pires et al. (2020) analizaron el efecto de concentraciones subletales de clorpirifos (0,5 y 1 mg/L) sobre el metabolismo de poliaminas en embriones de *R. arenarum* expuestos durante 10 días. Los autores indican que no se observan cambios en los niveles de poliaminas en embriones expuestos a clorpirifos, aunque la actividad de enzimas de degradación oxidativa de poliaminas sí se ve afectada. Los autores proponen la determinación de la actividad de poliamino oxidasa como biomarcador de exposición a clorpirifos, ya que su actividad se incrementa en embriones tempranos que no muestran alteración de la actividad de AChE, marcador clásico de exposición a organofosforados. Asimismo, sugieren que un incremento de la degradación oxidativa de poliaminas debido a la exposición a clorpirifos llevaría a un aumento en la producción de especies reactivas, con la consecuente alteración del sistema de defensa antioxidante.

En larvas de *Boana pulchella* expuestas durante 96 h a concentraciones ambientalmente relevantes de clorpirifos, Barreto et al. (2020) determinaron una CL50 de 0,976 mg/L y una EC50 (para alteraciones natatorias como punto final) de 0,439 mg/L. Los autores observaron una asociación entre la alteración del nado, la disminución observada de las actividades de AChE y CabE y el aumento de la actividad de GST. Esta asociación evidenciaría la alteración de mecanismos clave para las larvas de la especie y podría poner en juego la supervivencia de los individuos en la naturaleza.

Recientemente, Cuzziol Boccioni et al. (2020) publicaron el primer trabajo que analiza de qué manera una mezcla de herbicida, insecticida y antibióticos afecta el estado de salud de larvas de anuros. Los autores midieron diferentes puntos finales a distintos niveles de organización. El estudio consistió en dos periodos de exposición: en el primero, se ensayaron diferentes concentraciones de herbicida basado en glifosato y del antibiótico ciprofloxacina solos y en combinación 50%-50% v/v sobre embriones de *R. arenarum* durante 14 días (desde embriones a larvas premetamórficas). Luego de que se utilizaron las larvas necesarias para medir los puntos finales (supervivencia, crecimiento, estadio de desarrollo alcanzado, alteraciones morfológicas y niveles de la hormona T4), las restantes (no malformadas) fueron transferidas a la segunda fase del experimento. En esta fase, las larvas fueron divididas en dos grupos: en el primero, continuaron sometidas a los mismos tratamientos del periodo anterior, y el segundo grupo fue expuesto a nuevos tratamientos. Estos tratamientos consistieron en mezclas binarias del herbicida y el insecticida clorpirifos, y de ciprofloxacina y amoxicilina (ambas combinaciones al 50% v/v); y sus mezclas cuaternarias (25% herbicida-25% clorpirifos-25% ciprofloxacina-25% amoxicilina v/v). Cada tratamiento fue ensayado a dos concentraciones nominales. Las larvas fueron expuestas durante 4 semanas en la segunda fase del experimento (hasta prometamorfosis), con renovación de los medios cada 48 h. Los puntos finales medidos al final del segundo periodo de exposición fueron supervivencia, crecimiento, estadio de desarrollo alcanzado, niveles de la hormona T4, actividad de GST y actividad de AChE. Los autores señalan que los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que los contaminantes, por separado y mezclados, ejercen efectos tóxicos directos e indirectos sobre las

larvas, incluyendo el retardo del desarrollo, la ocurrencia de malformaciones y la alteración hormonal y enzimática, con aumento de los niveles de T4 y una disminución de las actividades de GST y AChE. El biomarcador más sensible frente a las mezclas complejas de contaminantes ensayadas fue la actividad de GST, que fue inhibida únicamente por las mezclas cuaternarias de herbicida + clorpirifos + ciprofloxacina + amoxicilina. La mortalidad observada en ambas fases del estudio fue mínima, lo que confirma que los contaminantes evaluados ejercen efectos subletales a concentraciones ambientalmente relevantes. La elevada frecuencia de malformaciones observada en la primera fase del estudio constituye evidencia del riesgo ecotoxicológico al que se enfrentan los estadios embrionarios tempranos de anfibios anuros cuando se encuentran expuestos a contaminantes teratogénicos, solos o en combinación, como los ensayados. Los autores indican que los resultados obtenidos resaltan la importancia de analizar biomarcadores a diferentes niveles de organización y de realizar evaluaciones a largo plazo. De este modo, las evaluaciones de riesgo deberían considerar el uso de ensayos crónicos con mezclas de contaminantes y la evaluación de diversos biomarcadores a lo largo del desarrollo de los anfibios, ya que podrían proveer mayor protección ambiental a sus poblaciones.

Recientemente también se aplicaron por primera vez en un anfibio de Argentina, técnicas de secuenciación masiva para analizar entre otros los efectos a escala transcriptómica del clorpirifos a concentraciones subletales (1/15 de la CL50) en larvas de *R. arenarum* (Ceschin, 2017; Ceschin et al., 2020). El análisis transcriptómico encontró efectos masivos del clorpirifos sobre la expresión de vías metabólicas y genes en particular, que permitirían identificar daños en forma muy temprana y mediante una técnica muy potente que podría servir a futuro como huella digital ambiental de un contaminante (Ceschin, 2017; Venturino, 2017).

Tabla 5.4 Estudios de laboratorio en anfibios de Argentina: Parámetros toxicológicos, morfofisiológicos, bioquímicos y moleculares

Especie/ estadio	Diseño – punto final de toxicidad	Parámetros biomarcadores	Referencia
<i>Rhinella arenarum</i> embriones	PA, 0-32 mg/L, agudo 24h CE50 arresto: 21,3 mg/L	Malformaciones: aumento CAT, GSH, expresión cFOS, MEK: aumento GST: disminución	Sotomayor et al. (2015)
embriones	PA, 0-16 mg/L, subcrónico 6d. CL50: 13,5 mg/L	Malformaciones: aumento Poliaminas, ODC: disminución	Sotomayor et al. (2012)
embriones	PA, 0,5 y 1 mg/L, 10d	PAOX: aumento DAO, SMOX: disminución	Pires et al. (2020)
larvas	PA, 96h. CL50 1,46 mg/L; CL10 0,81 mg/L; CL1 0,43 mg/L	Malformaciones, GSH: aumento AChE, CabE, CAT, TRAP: disminución	Liendro et al. (2015)
larvas	FC, 96h, 0,01 a 0,075 mg/L. 15 a 35°C	Tolerancia térmica, actividad natatoria: disminución	Quiroga et al. (2015)

larvas	FC 125 ug/L, microcosmos, 10d	AChE, CabE: disminución	Attademo et al. (2017)
larvas - prometamorfos	Mezcla cuaternaria + herbicida + antibióticos	Crecimiento: disminución	Cuzziol Boccioni et al. (2020)
adultos	FC, 5-10 mg vía dermal	BChE, CabE: disminución CAT, PL, daño ADN: aumento	Lajmanovich et al. (2015); (2018)
<i>Boana pulchella</i>	PA, 0,005-1 mg/L, 96h.	Alteraciones natatorias	Barreto et al. (2020)
larvas	CL50:0,976 mg/L		
<i>Ceratophrys ornata</i>	PA, 0,01 a 0,7 mg/L, agudo.	Crecimiento: disminución	Salgado Costa et al. (2018)
Larvas	Estadio 25: 96 h CL50: 0,185 mg/L EC50-nado: 0,02 mg/L Crónico. Estadio 25: 10 d CL50: 0,013 mg/L LOEC-nado: 0,025 mg/L	Malformaciones, nado: aumentado Alteraciones en emisión acústica	
premetamorfos	Agudo. Estadio 31: 96 h CL50: 0,121 mg/L EC50-nado: 0,069 mg/L Crónico. Estadio 31: 10-14 d CL50: 0,102 mg/L. EC50-nado: 0,066 mg/L		

PA: principio activo; FC formulado comercial; CE50: concentración de efecto 50%. AChE: acetil colinesterasa; BChE: butiril colinesterasa; CabE: carboxil esterasa; CAT: catalasa; DAO: diamino oxidasa; GSH: glutatión reducido; GST: glutatión S-transferasa; ODC: ornitina decarboxilasa; PAOX: N¹-acetilpoliamino oxidasa; PL: peróxidos lipídicos; SMOX: espermina oxidasa; TRAP: potencial antioxidante total reactivo; cFOS: factor de transcripción componente de la Proteína Activadora 1 (AP1); MEK: Proteína Quinasa extracelular activada por mitógeno.

5.2.2 Situación a nivel mundial

5.2.2.1 Estudios sobre el organismo modelo *Xenopus laevis*

Bonfanti et al. (2004) no observaron mortalidad, pero sí teratogenicidad en embriones sin degelatinizar de *X. laevis* expuestos durante 120 h a concentraciones de clorpirifos de entre 50 y 6000 µg/L. Los autores calcularon una EC50-120h (para teratogenicidad como punto final) de 161,54 µg/L. Las malformaciones más observadas involucraron torción de la aleta caudal y alteración del enrollamiento del intestino. El análisis histopatológico reveló daño muscular, que estaría asociado a la inhibición observada de la actividad de AChE. El mismo grupo de investigación confirmó que la disminución de la actividad de AChE en embriones de *X. laevis* expuestos a clorpirifos se encontraba asociada al daño observado a nivel muscular, determinado por estudios histológicos y ultraestructurales (Colombo et al., 2005).

El-Merhibi et al. (2004) analizaron el efecto de clorpirifos grado analítico solo y en combinación con piperonil butóxido (PBO) sobre embriones de *X. laevis* (degelatinizados) durante 96 h y 10 días. Los autores determinaron que el PBO inhibía la CYP 450 de embriones, disminuyendo la transformación de clorpirifos a su metabolito oxón, con la consecuente disminución de la toxicidad del plaguicida para los puntos finales

mortalidad y malformaciones. La CL50-96h fue de 2410 µg/L para embriones expuestos a clorpirifos, y aumentó a 3582 µg/L para su combinación con PBO. Luego de 10 días de exposición, la CL50 fue de 92,5 µg/L para clorpirifos y de 501,5 µg/L para su combinación con PBO. Sin embargo, el efecto protector de PBO no se observó luego de 10 días de exposición sobre la actividad de AChE. Los autores indican que esto se debería a una respuesta bifásica de CYP450, con una rápida inhibición inicial por PBO, seguida de un aumento de actividad y un lento retorno a valores control.

Watson et al. (2014) analizaron los efectos morfológicos y fisiológicos causados por la exposición de embriones de *X. laevis* durante 5 días a concentraciones de entre 0,1 y 1000 µM de clorpirifos grado analítico (0,035 mg/L a 350 mg/L; embriones degelatinizados). La CL50-5 días fue de 2 µM (1,75 mg/L). Los autores observaron una disminución dependiente de la dosis en el ritmo cardíaco y la velocidad de nado, así como una disminución de la longitud de la espina dorsal y cifosis en embriones expuestos a 10 µM de clorpirifos (3,5 mg/L).

En un análisis de las respuestas genéticas como medio para detectar exposiciones subletales a xenobióticos, San Segundo et al. (2013) expusieron embriones de *X. laevis* degelatinizados a 0,1; 0,5 y 2,5 mg/L de clorpirifos grado analítico durante 96 h (los embriones se transformaron en larvas en este periodo de tiempo). Los autores observaron un 80% de mortalidad frente a la mayor concentración ensayada, junto con un elevado porcentaje de larvas malformadas (95% para 0,5 mg/L y 100% de larvas expuestas a 2,5 mg/L de clorpirifos) y una disminución significativa de la longitud de los individuos expuestos a 0,5 y 2,5 mg/L clorpirifos. La expresión del gen *pax6* (involucrado en el desarrollo embrionario) aumentó a las 24 h de exposición con las tres concentraciones ensayadas, y su expresión disminuyó a las 96 h de exposición. La expresión de *hsp70* (involucrado en la respuesta general frente al estrés) se incrementó 4 h después de la exposición a 0,5 y 2,5 mg/L clorpirifos y se mantuvo elevada luego de 24 h de exposición, incluyendo a los individuos expuestos a 0,1 mg/L clorpirifos. Los autores señalan que la expresión génica es una respuesta más sensible frente a la exposición a clorpirifos que se manifiesta antes que las alteraciones morfológicas. Con el fin de profundizar en el efecto ocasionado por clorpirifos sobre la morfología de los individuos expuestos, Tussellino et al. (2016) realizaron una exposición a 10, 15 y 20 mg/L de clorpirifos grado analítico durante 7 días, sin renovación de medios (los autores no indican si los embriones fueron degelatinizados). Los autores analizaron la expresión de genes involucrados en el desarrollo temprano de estructuras anatómicas craneales derivadas de células de la cresta neural en embriones de *X. laevis*. Se observó una disminución de la transcripción de genes relacionados con la condrogénesis de la cresta neural craneal y el desarrollo craneofacial frente a la exposición a clorpirifos: *fgf8*, *bmp4*, *sox9*, *hoxa2* y *hoxb2*. Estos genes son reguladores claves de diferentes vías de desarrollo y podrían ser útiles a la hora de evaluar el daño ocasionado por plaguicidas organofosforados durante el desarrollo embrionario.

Richards and Kendall (2002) analizaron los efectos de diferentes concentraciones de clorpirifos grado analítico sobre premetamorfos y metamorfos de *X. laevis*. La CL50-96h para premetamorfos fue de 14,6 mg/L y para metamorfos fue de 0,56 mg/L. Los autores estimaron una EC50-96h (para malformaciones como punto final) de 1,71 mg/L para premetamorfos y de 0,24 mg/L para metamorfos y observaron una disminución significativa de la actividad de AChE en ambos estadios de desarrollo. Además, el Índice Teratogénico calculado fue de 8,54 para premetamorfos y de 2,41 para metamorfos, lo que indicó que clorpirifos era un compuesto que presentaba un riesgo teratogénico significativo para la especie. Continuando con sus estudios en esta especie y utilizando el mismo diseño experimental, Richards y Kendall (2003) analizaron la longitud y masa corporal y la capacidad de nado de premetamorfos y metamorfos. La exposición a clorpirifos disminuyó la longitud y la masa corporal y afectó la capacidad de nado de premetamorfos y metamorfos. Los metamorfos resultaron más susceptibles al clorpirifos que los premetamorfos y resultaron afectados incluso por la concentración más baja de clorpirifos ensayada (0,0001 mg/L).

5.2.2.2 Estudios sobre anfibios anuros nativos

Todos los efectos observados en los estudios realizados en anfibios no modelo expuestos a clorpirifos a nivel mundial, se encuentran sistematizados en la tabla 5.5.

América: La EPA indica que el clorpirifos ha sido usado como plaguicida desde 1965, tanto en entornos agrícolas como no-agrícolas (<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chlorpyrifos>). Los primeros ensayos de laboratorio que analizaron los efectos de clorpirifos sobre anfibios, se realizaron a mediados de la década de 1990. Swann et al. (1996) analizaron el efecto de clorpirifos grado analítico y de dos formulados comerciales de clorpirifos (con 6,7% y 40,7% de ingrediente activo) sobre cultivos de epitelio ciliado del paladar de *Lithobates pipiens*. Dicho epitelio es similar al epitelio ciliado tráqueo-bronquial humano y sería un modelo adecuado considerando el riesgo de toxicidad por inhalación de los formulados comerciales. Los autores observaron una disminución del movimiento ciliar y calcularon la EC50-24 h para este punto final de $2,6 \times 10^{-8}$ M (9,11 $\mu\text{g/L}$) para el formulado con 40,7% de ingrediente activo; $2,1 \times 10^{-7}$ M (73,62 $\mu\text{g/L}$) para el formulado con 6,7% de ingrediente activo y $4,8 \times 10^{-7}$ M (168,2 $\mu\text{g/L}$) para el clorpirifos grado analítico. La EC50-6 h fue de $3,4 \times 10^{-7}$ M (119,2 $\mu\text{g/L}$) para el formulado con 6,7% de ingrediente activo y de $2,8 \times 10^{-8}$ M (9,81 $\mu\text{g/L}$) para el formulado con 40,7% de ingrediente activo. Los valores de EC50 a 6 y 24 h para el formulado comercial con 40,7% de ingrediente activo son muy cercanos, lo que indica que el 50% de inhibición de movimiento de las cilias se alcanzaría alrededor de las 6 h de exposición. Los compuestos evaluados provocaron además daño mitocondrial en las células del epitelio ciliado. En una exposición de 96 h de embriones de la misma especie (*L. pipiens*) a concentraciones ambientalmente representativas de

clorpirifos grado analítico (10; 50; 100 y 200 µg/L), Gaizick et al. (2001) no observaron alteraciones morfológicas ni del tiempo de eclosión de los embriones.

Continuando con los estudios de laboratorio, Sparling and Fellers (2007) determinaron la CL50-96h en larvas de *Rana boylei* para clorpirifos y clorpirifos oxón, siendo de 3,0 mg/L para el compuesto parental. La CL50-96h no pudo ser determinada para el derivado oxón, ya que los individuos no sobrevivieron las primeras 24 h de exposición. Sin embargo, en función de los datos de mortalidad obtenidos y las concentraciones ensayadas, fue posible establecer que el derivado oxón es al menos 100 veces más tóxico que el compuesto parental. Continuando con sus estudios sobre el efecto de plaguicidas sobre los anfibios de California, Sparling y Fellers (2009) expusieron de manera crónica a larvas de *Pseudacris regilla* y *R. boylei* a clorpirifos grado analítico en condiciones de laboratorio. Las concentraciones ensayadas fueron ambientalmente relevantes (0,8; 3,12; 12,5; 50 y 200 µg/L clorpirifos) y la duración del ensayo varió en función del tiempo para alcanzar la metamorfosis de cada especie (*P.regilla*: 40-45 días para metamorfosis luego de la eclosión; *R. boylei*: 80-85 días para metamorfosis luego de la eclosión). Los autores determinaron una CL50 de 365 µg/L para *P. regilla* y de 66,5 µg/L para *R. boylei*. El tiempo para alcanzar metamorfosis se incrementó mientras que la actividad de AChE disminuyó a medida que aumentaba la concentración de clorpirifos ensayada. Los autores determinaron la concentración de clorpirifos en tejidos de metamorfos expuestos a la mayor concentración de clorpirifos ensayada, que fue de 588 ng/g peso seco para *P. regilla* (65,5 ng/g peso fresco) y de 9899 ng/g peso seco (1080 ng/g peso fresco) para *R. boylei*. A partir de los resultados obtenidos, Sparling y Fellers (2009) indican que los plaguicidas plantean un serio riesgo para las especies de anfibios que habitan las montañas de Sierra Nevada, California.

Cothran et al. (2013) analizaron la sensibilidad de larvas de diferentes poblaciones de *Lithobates sylvaticus*, colectadas en zonas con diferente cantidad de tierra cercana dedicada a la agricultura (en Pittsburgh, Pensilvania, EEUU), frente a clorpirifos. Realizaron un ensayo toxicológico de 48 h con clorpirifos grado analítico a una concentración de 1,75 mg/L y determinaron que aquellas poblaciones que viven más cerca de las zonas agrícolas eran más resistentes a clorpirifos. En ensayos de mesocosmos, los autores no observaron que dicha resistencia acarrearía un costo en el desempeño de los metamorfos de la especie, cuando se los enfrentó a situaciones de competencia y depredación. Los resultados observados serían consistentes con la evolución de resistencia frente a los plaguicidas. En relación con lo establecido en esta investigación, Hua et al. (2013) reportaron por primera vez que concentraciones subletales y ecológicamente relevantes de un insecticida pueden, dentro de la misma generación, inducir tolerancia adaptativa en anfibios. Esta tolerancia inducida depende de la concentración de insecticida y ocurre en estadios de vida muy tempranos. Ya que los sistemas naturales se encuentran expuestos a una amplia variedad de plaguicidas con diferentes modos de acción, Hua et al. (2014) exploraron la posibilidad de que la tolerancia inducida a

un plaguicida induzca tolerancia frente a otros de igual y diferente familia química y, por ende, modos de acción. Los autores observaron que la exposición de embriones tempranos de *L. sylvaticus* a concentraciones subletales de carbarilo (inhibidor de AChE) inducía tolerancia al mismo carbarilo y tolerancia cruzada a malatión (inhibidor de AChE) y cipermetrina (interfiere con canales de Na⁺). No observaron inducción de tolerancia frente a clorpirifos ni permetrina. Continuando con estudios que toman en cuenta la posible interacción entre plaguicidas en el ámbito natural, Dimitrie y Sparling (2014) analizaron los efectos combinados de endosulfán (organoclorado) y clorpirifos sobre la supervivencia, crecimiento y desarrollo de larvas de *P. regilla* en un ensayo crónico hasta su metamorfosis. Los efectos dependieron de la concentración y de la duración de la exposición. Por ejemplo, una concentración de 137 µg/L de clorpirifos inhibió los efectos adversos de endosulfán sobre el crecimiento y la supervivencia, pero la presencia de ambos facilitó la aparición de malformaciones axiales. La interacción de plaguicidas con diferentes modos de acción podría poner de manifiesto diferentes tipos de interacciones dependiendo de sus concentraciones y de los puntos finales analizados, por lo que resulta necesario realizar más investigaciones. En un estudio comparativo realizado con ratones y sapos, Anderson et al. (2018) compararon sus respuestas bioquímicas, funcionales y de comportamiento frente a clorpirifos-oxón. Los adultos de la especie *Anaxyrus cognatus* resultaron menos sensibles a la letalidad aguda del compuesto en comparación con ratones (77 mg/kg vs. 5,9 mg/kg) y mostraron hipoactividad. Los autores no observaron inhibición de AChE o BChE cerebral en sapos, pero sí observaron inhibición de la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) en hígado. La actividad AChE cerebral de los sapos fue menos sensible a la inhibición *in vitro* por clorpirifos-oxón, según lo revelaron las Concentraciones Inhibitorias-50 (CI50), determinadas a la temperatura óptima para ratón de 37°C a 20 min (CI50 = 101 nM para sapo vs 7.8 nM para ratón), o a la temperatura óptima de 26°C para anfibio (CI50 = 149 nM en sapo vs 6.2 nM en ratón). Los autores postulan que el cerebro de sapo contendría algún componente capaz de inactivar al clorpirifos-oxón y proteger a AChE de la inhibición, y que probablemente se trate de procesos de detoxificación muy efectivos. Señalan, asimismo, que la resistencia a la inhibición de colinesterasa hace de esta enzima un pobre biomarcador en *A. cognatus* frente a la exposición a compuestos anticolinesterásicos, y que las diferencias en sensibilidad frente a clorpirifos-oxón señalan la necesidad de incluir mayor cantidad de especies en los análisis de riesgo.

Para el año 1998, en el Valle de San Joaquín, estado de California, se aplicaba el 60% de los aproximadamente 5,8 millones de kilogramos de ingredientes activos aplicados en todo el estado, de los cuales 1,07 millones de kilogramos correspondían a clorpirifos (California Department of Pesticide Regulation, 2000). Los alarmantes datos condujeron a la realización de estudios sobre el impacto de los plaguicidas en las poblaciones naturales de anfibios anuros del estado. Estos trabajos pioneros establecieron una posible relación entre la contaminación química y la declinación de las poblaciones de anfibios que se observaba desde 1980. Entre dichos trabajos se encuentra el publicado por Datta et al. (1998), quienes

analizaron la concentración de clorpirifos en embriones y larvas de *P. regilla* colectados en regiones remotas y no remotas del estado de California. Los autores detectaron la presencia de clorpirifos en larvas colectadas en regiones remotas y no remotas en un rango que osciló entre los 9,2 y 17,4 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco. Los niveles de clorpirifos en embriones se encontraron por debajo del límite de detección. Los autores indican que el hecho de encontrar clorpirifos en anfibios de la Sierra Nevada sugiere una conexión entre el uso de productos químicos y su transporte y deposición en localizaciones lejanas a los puntos de aplicación.

A mediados de la década de 1980, diversos muestreos resultaron infructuosos en la detección de *Rana muscosa* en la zona de Tablelands, dentro del Parque Nacional de las Secuoyas, California. Luego de la reintroducción de la especie en 1994 y 1995, se realizó un relevamiento en 1997 y se observó que la reproducción de la especie había sido mínima e insuficiente para mantener la población de adultos. Por ello, los investigadores que habían realizado la reintroducción decidieron muestrear los animales encontrados y analizarlos en búsqueda de contaminantes en sus tejidos, al mismo tiempo que tomaron muestras de agua. Los resultados obtenidos se encuentran plasmados en el trabajo de Fellers et al. (2004). Los autores analizaron los niveles de diversos contaminantes, entre ellos clorpirifos, en tejidos de rana y en agua de la zona de Tablelands (que se encuentra al este del Valle Central de California y expuesta a los vientos predominantes provenientes del oeste) y la zona de Sixty Lakes Basin (no influenciada de modo tan directo por el transporte atmosférico de contaminantes desde el Valle Central debido a su orientación, y donde las poblaciones de *R. muscosa* prosperan). El clorpirifos fue detectado en el agua superficial de todos los sitios muestreados, y su concentración fue superior en los sitios de la zona de Tablelands, expuesta a los vientos, aunque también se detectó en Sixty Lakes Basin. No se detectó clorpirifos en tejidos de *R. muscosa*, pero sí se detectaron plaguicidas organoclorados y otros contaminantes en tejidos de ranas colectadas en todos los sitios muestreados. Los autores indican que los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que los contaminantes habrían tenido un papel relevante en el declive poblacional de *R. muscosa* dentro del parque nacional. Los autores señalan, además, que a pesar de que las concentraciones detectadas se encuentran en el orden de ng/L y son inferiores a las detectadas en otros trabajos, es importante considerar que la especie en estudio tarda alrededor de tres años en alcanzar la metamorfosis, por lo que el estadio larval es prolongado. Además, es una especie en la que los adultos pasan gran tiempo dentro del agua durante todo el año, con lo que se encontrarían más expuestos a los contaminantes ambientales.

En estudios de laboratorio y mesocosmos, Widder and Bidwell (2006) analizaron el efecto de diferentes concentraciones de un formulado comercial de clorpirifos (47,4% ingrediente activo; 1 a 200 $\mu\text{g/L}$) sobre larvas de *Rana sphenoccephala*. Los autores analizaron diferentes puntos finales como mortalidad, velocidad de nado, masa corporal y actividad de AChE. La exposición a clorpirifos no afectó la supervivencia de las larvas ni su velocidad de nado, pero sí provocó una disminución de la masa corporal y la actividad de AChE tanto en estudios de laboratorio como de mesocosmos. La presencia de un predador en los ensayos de

mesocosmos no afectó la velocidad de nado ni la supervivencia de las larvas, por lo que los autores señalan que una mayor depredación por invertebrados no sería uno de los factores que influyen sobre la relación disminución de AChE - descenso de anfibios. Los autores ampliaron su estudio a otras tres especies anfibias utilizando el mismo diseño experimental (cuya duración fue ajustada en función de la abundancia de larvas de cada especie) y midiendo los mismos parámetros. En este nuevo trabajo, Widder and Bidwell (2008) observaron que el tamaño corporal resultaba afectado por la exposición a clorpirifos y que, a la mayor concentración ensayada (200 µg/L) y en la especie más sensible, se observaba una relación entre la inhibición de AChE y la velocidad de nado. Los autores indican que las respuestas observadas son particulares dependiendo de la especie en estudio, por lo que alertan sobre la necesidad de tener precaución a la hora de realizar generalizaciones entre diferentes taxones de anuros. Las conclusiones a las que arriban Widder y Bidwell en ambos trabajos citados se contraponen en cierta medida a las enunciadas por Sparling et al. (2001) y Davidson (2004). En el primero de estos trabajos, los autores determinaron que la actividad de AChE se encontraba inhibida en larvas de *Pseudacris regilla* que habitaban al este del Valle Central de California (zona que recibe los vientos procedentes del área agrícola) en comparación con los individuos colectados en la zona costera y al norte del Valle. Además, los autores observaron que la actividad de AChE también se encontraba disminuida en áreas en las que el estatus poblacional era pobre o moderado, en comparación con sitios en los que había un buen estatus de la población de *P. regilla*. Asimismo, se detectaron concentraciones elevadas de plaguicidas organofosforados en los tejidos de larvas y adultos de la especie colectados al este del Valle Central, entre los que se encontró clorpirifos. Los resultados obtenidos abonan la hipótesis de que los plaguicidas estarían involucrados en el descenso de anfibios en la zona en estudio. El trabajo de Davidson (2004), basado en análisis de datos históricos, acompaña lo hipotetizado por Sparling et al. (2001) ya que reportó una fuerte asociación entre la aplicación de plaguicidas y el descenso de ranas en California, siendo los plaguicidas organofosforados los que se encontraban más fuertemente asociados. Sin embargo, utilizando a *P. regilla* como especie subrogante de *Rana cascadae* (cuya población ha disminuido precipitadamente en el norte de California), Davidson et al. (2012) no encontraron evidencia que apoye la hipótesis de que los contaminantes analizados hayan contribuido al descenso de *R. cascadae*. El clorpirifos fue el cuarto plaguicida detectado con mayor frecuencia (49% de frecuencia de detección en tejidos y 63% de frecuencia de detección en sedimentos). Los autores encontraron niveles similares de clorpirifos (y de los otros plaguicidas analizados) en sedimentos de zonas en la que aún está presente la especie y en zonas en las que ha desaparecido, así como tampoco encontraron diferencias en el nivel de plaguicidas en tejidos de los individuos muestreados. Los valores promedio fueron de 0,484 ng clorpirifos/g peso seco promedio en tejido y 0,754 ng clorpirifos/g peso de carbono orgánico en sedimento.

En un complejo estudio de mesocosmos, Relyea (2009) analizó cómo la comunidad acuática, que incluía larvas de *Hyla versicolor* y *L. pipiens* (además de cladóceros, zooplancton, fitoplancton, etc.),

respondía frente a diversos plaguicidas. El autor analizó cada plaguicida por separado y realizó mezclas de herbicidas, de 5 insecticidas y de 10 insecticidas. Las concentraciones de cada compuesto fueron de entre 2 y 16 $\mu\text{g/L}$ y la concentración final nominal de las mezclas en los tanques fue de 10 $\mu\text{g/L}$. La exposición tuvo una duración de 57 días. La exposición a clorpirifos solo no alteró la supervivencia hasta metamorfosis, la masa de los individuos al momento de metamorfosis ni el tiempo para alcanzarla en ninguna de las dos especies anfibias evaluadas. Los individuos de la especie *L. pipiens* no sobrevivieron a la exposición a las mezclas de 5 y 10 insecticidas, mientras que la mezcla de herbicidas no tuvo efecto sobre los parámetros analizados. Los individuos de la especie *H. versicolor* sobrevivieron a la exposición a las mezclas de 5 y 10 insecticidas, pero su masa fue significativamente mayor al momento de la metamorfosis (probablemente porque no había competencia con larvas de la otra especie). Este ensayo de mesocosmos demostró que los plaguicidas solos y en combinación pueden tener efectos directos e indirectos sobre las comunidades acuáticas (incluyendo zooplancton, fitoplancton, perifiton y larvas de anfibios). En el caso de los anfibios, la mezcla de plaguicidas tuvo mayor impacto que los plaguicidas individuales, aunque no pudo determinarse si existía sinergismo. En el caso de *L. pipiens*, la gran mortalidad registrada ante la exposición a mezclas de insecticidas podría impactar negativamente sobre la población con el paso del tiempo, sobre todo si las exposiciones ocurren repetidamente. El autor señala que este hecho es importante en vista del descenso de las poblaciones de anfibios a nivel mundial, incluso en sitios relativamente prístinos pero que reciben bajas concentraciones de plaguicidas por transporte atmosférico desde áreas distantes.

Bishop et al. (2010) realizaron un ensayo de exposición *in situ* de embriones de *Spea intermontana*, *Anaxyrus boreas*, *P. regilla* y *Rana luteiventris* en lagunas de las tierras bajas del sur del Valle de Okanagan, Columbia Británica, Canadá. Las lagunas se encontraban en plantaciones frutales convencionales (con uso de plaguicidas), orgánicas y en sitios de referencia. Los autores analizaron el tiempo de eclosión de los embriones, la química del agua de las lagunas y cuantificaron los niveles de plaguicidas en ellas. Diecisiete plaguicidas, en concentraciones de ng/L , fueron detectados en el agua de las lagunas ubicadas en las plantaciones convencionales. Clorpirifos fue detectado entre concentraciones de 1,03 ng/L (en un sitio de referencia) y 2,36 ng/L (en una plantación convencional). El menor porcentaje de eclosión se registró en los sitios con producción convencional y el mayor porcentaje de eclosión se registró en un sitio de referencia no agrícola. Los autores observaron una correlación significativa entre la química del agua, los plaguicidas y el éxito de eclosión en el caso de *S. intermontana*. Los autores señalaron la gran variabilidad de sensibilidad de las diferentes especies y la importancia de incluir el análisis químico del agua para interpretar su calidad para la vida anfibia.

Considerando el efecto neurotóxico de clorpirifos, Woodley et al. (2015) analizaron la plasticidad cerebral de *L. pipiens* al exponer larvas a señales de predadores, cantidades reducidas de alimento y concentraciones subletales de clorpirifos (5 y 20 $\mu\text{g/L}$) en ensayos de mesocosmos. Las larvas expuestas

mostraron menor masa corporal, aunque no se vio alterada la velocidad de desarrollo ni la supervivencia. Las larvas expuestas a señales del predador o a 20 µg/L de clorpirifos mostraron alteración de la forma corporal. Los cerebros de las larvas expuestas a señales del predador y a 5 µg/L de clorpirifos fueron más angostos y cortos en comparación con larvas control y sometidas a cantidades reducidas de alimento. Los cambios observados a nivel cerebral no persistieron en la metamorfosis, lo que señalaría que la morfología cerebral es un rasgo plástico durante el desarrollo, capaz de responder frente a factores naturales y antropogénicos. A fin de determinar si estos efectos fueron el resultado directo de la exposición al plaguicida o si se debieron a la disrupción de la cadena trófica debido a la disminución del zooplancton (como consecuencia de la exposición al plaguicida), McClelland et al. (2018) analizaron el impacto de clorpirifos (grado analítico; 1 µg/L) sobre el desarrollo de *L. pipiens* en presencia de zooplancton resistente y sensible a clorpirifos en ensayos de mesocosmos. Los autores observaron alteraciones en el desarrollo cerebral de los individuos expuestos a clorpirifos, independientemente del tipo de población de zooplancton presente, por lo que corroboraron que clorpirifos impacta de manera directa sobre el desarrollo cerebral a concentraciones ambientalmente representativas.

Recientemente, da Silva et al. (2020a, 2020b) analizaron el efecto de la exposición a un formulado comercial del clorpirifos (48% de ingrediente activo) sobre el perfil leucocitario y sobre el ADN de larvas de *Odontophrynus carvalhoi*, una especie nativa de Brasil. Las concentraciones ensayadas en ambos estudios fueron de 10, 100, 200 y 400 µg/L de clorpirifos, y la duración de las exposiciones fue de 192 h para el análisis de fórmula leucocitaria y de 96 h para el análisis de genotoxicidad. Las larvas expuestas a clorpirifos mostraron una reducción del número de linfocitos, monocitos y basófilos, y un aumento de neutrófilos y eosinófilos. La exposición al plaguicida alteró la proporción de tipos celulares, lo que podría a su vez afectar la capacidad de respuesta de las larvas a estresores ambientales, haciéndolas más susceptibles a enfermedades y comprometiendo su supervivencia. Además, los eritrocitos de larvas expuestas al plaguicida mostraron un aumento en la frecuencia de micronúcleos a partir de las 24 h en individuos expuestos a 100 µg/L. Alcanzadas las 48 y 96 h de exposición, todos los tratamientos realizados arrojaron un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos respecto del control.

Rutkoski et al. (2020) analizaron mortalidad y las respuestas morfológicas y bioquímicas en larvas de *Physalaemus gracilis* (especie distribuida en Argentina, Brasil y Uruguay) expuestas a un formulado comercial de clorpirifos (48% de ingrediente activo). En el ensayo estático de toxicidad aguda, los autores determinaron una CL50-96 h de 893,59 µg/L. El ensayo de toxicidad crónica se extendió por 7 días y se utilizaron 11, 30, 90, 250 y 500 µg/L de clorpirifos. Los autores observaron movilidad reducida y espasmos musculares en larvas expuestas a todas las concentraciones de clorpirifos. Las anomalías morfológicas se observaron principalmente en larvas expuestas a las concentraciones más altas, con alteraciones de la boca e intestinos.

A nivel bioquímico, la actividad de AChE disminuyó con las dos concentraciones superiores, mientras que la actividad de CAT se vio aumentada en todos los casos. Las actividades de SOD y GST se incrementaron a partir de 90 µg/L y 30 µg/L de clorpirifos, respectivamente. El nivel de tioles no proteicos se incrementó a partir de 30 µg/L de clorpirifos, mientras que los niveles de proteínas carboniladas se incrementaron a partir de 90 µg/L de clorpirifos. Los autores no observaron cambios en los niveles de peróxidos lipídicos. El análisis de riesgo ecológico sugirió que clorpirifos presenta riesgo agudo y crónico para *P. gracilis*.

Asia: En un estudio realizado a campo en Filipinas, Calumpang et al. (1997) analizaron el efecto de la aplicación de diferentes plaguicidas, entre ellos clorpirifos (como parte del formulado combinado: clorpirifos 21% + fenobucarb 10,5%; 0,32 kg ingrediente activo/ha) sobre la mortalidad de *Rhinella marina* expuesto *in situ* en jaulas sobre los canales de drenaje de un arrozal (esta especie ha sido introducida en Filipinas). Luego de aplicar el plaguicida 15 días después del trasplante del arroz, se simuló la inundación por lluvias, de modo que los plaguicidas alcanzaran los canales. Se observó la mortalidad del 100% de los individuos ubicados en el canal de drenaje a una distancia de 25 m del arrozal inmediatamente después de la aplicación. La concentración máxima detectada de clorpirifos en agua fue de 0,0016 mg/L a 10 metros del arrozal inmediatamente después de la inundación y fue detectado hasta 24 h después del tratamiento.

La exposición en laboratorio a un formulado comercial de clorpirifos (40% de ingrediente activo) provocó genotoxicidad en larvas de *Bufo gargarizans*, una especie de amplia distribución en China. Yin et al. (2009) expusieron larvas de dicha especie durante 96 h a concentraciones relativamente elevadas de clorpirifos (entre 0,32 y 2,56 mg/L) para determinar la CL50 a 24, 48, 72 y 96 h. Además, realizaron exposiciones a concentraciones subletales de entre 0,08 y 0,64 mg/L de clorpirifos para analizar genotoxicidad. Los valores de CL50 calculados fueron de 3,63; 1,17; 0,819 y 0,8 mg/L para 24, 48, 72 y 96 h de exposición, respectivamente. Los autores observaron un aumento significativo de la cantidad de micronúcleos, así como un incremento significativo de daño al ADN en eritrocitos y células hepáticas de las larvas.

Wijesinghe et al. (2011) analizaron el efecto de un formulado comercial de clorpirifos (40% de ingrediente activo) sobre larvas de *Duttaphrynus melanostictus*, una especie común en el sur de Asia. Las larvas fueron expuestas durante 14 días a concentraciones de clorpirifos de entre 1 y 1500 µg/L, y monitoreadas por una semana adicional al pasar a agua libre de plaguicida. Los individuos expuestos a concentraciones superiores a 100 µg/L sufrieron una elevada mortalidad dependiente de la dosis, con valores calculados de CL50-7 días de 3003 µg/L hasta una CL50-21 días de 462 µg/L. El crecimiento de las larvas disminuyó por la exposición a clorpirifos y su duración. Además, el número de larvas que alcanzaban la metamorfosis fue menor a medida que aumentaba la concentración de clorpirifos y, para las mayores concentraciones, las larvas no lograron alcanzarla. En lo que respecta a la actividad, la exposición a clorpirifos

afectó a las larvas haciéndolas permanecer más quietas y, aquellas expuestas a las mayores concentraciones, se alimentaron mucho menos, mostraron anomalías morfológicas en la aleta caudal que dificultaban el nado y fueron incapaces de alcanzar la superficie del agua. En otro estudio realizado en la misma especie, Jayawardena et al. (2011) expusieron larvas a 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mg/L de clorpirifos durante 48 h para el cálculo de la CL50, que arrojó un valor de 1,47 mg/L. Además, realizaron exposiciones crónicas de larvas a concentraciones ambientalmente representativas (0,05; 0,1; 0,25 y 0,5 mg/L clorpirifos) hasta que alcanzaron la metamorfosis. La supervivencia de las larvas disminuyó hasta un 60% respecto de los controles, requirieron más tiempo para llegar a la metamorfosis, tuvieron mayor tamaño y peso y desarrollaron malformaciones. Se observó una correlación positiva significativa entre la concentración de clorpirifos y el aumento de tamaño y frecuencia de malformaciones. Los autores resaltan la importancia de realizar este tipo de estudios en zonas agrícolas para determinar los efectos que los plaguicidas tienen sobre organismos no-blanco. Bandara et al. (2012) profundizaron en el análisis de los efectos de clorpirifos sobre la histopatología de *D. melanostictus*. Los autores expusieron larvas durante dos semanas a un formulado comercial (40% ingrediente activo) en concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 mg/L. Las larvas expuestas a la mayor concentración mostraron alteración de la estructura branquial, con menor cantidad de lamelas y vasos sanguíneos y con alteración del epitelio branquial. En el hígado se observó vacuolación, núcleos hipercromáticos y fragmentación nuclear, entre otras alteraciones. Las alteraciones musculares en la aleta caudal fueron evidentes a concentraciones más bajas de clorpirifos e incluyeron degeneración y atrofia muscular. En un estudio con embriones de *D. melanostictus* aún dentro de su ristra gelatinosa, Kharkongor et al. (2018) calcularon una CL50-48 h de 57,5 mg/L de un formulado comercial de clorpirifos con 20% de ingrediente activo. Además, realizaron exposiciones subletales de los embriones durante 96 h a 0,1; 0,5 y 1 mg/L del formulado comercial. Los autores observaron una disminución significativa del porcentaje de eclosión en embriones expuestos a 0,5 y 1 mg/L, una disminución significativa del largo y del ancho de los embriones, y un aumento de malformaciones en embriones expuestos a todas las concentraciones de clorpirifos ensayadas.

Europa: En un estudio de laboratorio realizado con larvas de *Rana dalmatina* (distribuida en norte, centro y sur de Europa), Bernabò et al. (2011) determinaron una CL50-96 h para clorpirifos grado analítico de 5,2 mg/L. Realizaron además exposiciones crónicas a concentraciones subletales ambientalmente relevantes de clorpirifos (0,025; 0,05 y 0,1 mg/L). Durante estas exposiciones, los autores no observaron efectos sobre la supervivencia, crecimiento, longitud, estadio de desarrollo o número de individuos que alcanzaban la metamorfosis. Sin embargo, se observó la aparición de malformaciones que condujeron a la alteración del nado de los individuos. Además, el análisis de la morfología y ultraestructura de las branquias de los individuos expuestos a clorpirifos mostró alteraciones tempranas, luego de 8 días de exposición. Estos efectos se manifestaron antes de observarse alteraciones morfológicas y de comportamiento y podrían implicar dificultades respiratorias con consecuencias para la salud de las larvas que, junto a las alteraciones

musculares y esqueléticas observadas, podrían llevar a una disminución de la supervivencia de juveniles en la naturaleza. Profundizando en sus estudios, Bernabò et al. (2011a) realizaron la exposición crónica de larvas de *R. dalmatina* a 0,025 y 0,05 mg/L de clorpirifos grado analítico hasta completación de la metamorfosis. Los autores no observaron efectos sobre la supervivencia, desarrollo o metamorfosis, pero el análisis morfológico e histológico de las gónadas de individuos expuestos a clorpirifos reveló alteraciones. En los testículos se encontraban ovocitos y, aunque la exposición al plaguicida no alteró la proporción de hembras y machos, redujo el porcentaje de machos con testículos histológicamente normales. Los autores indican que concentraciones ambientalmente relevantes de clorpirifos podrían interferir con la diferenciación sexual y el desarrollo reproductivo de *R. dalmatina* por mecanismos de disrupción endocrina.

Por su parte, Nozdrenko et al. (2016) observaron efectos no colinérgicos de clorpirifos en *Rana temporaria*. Los autores reportaron la inhibición de la actividad de Ca^{2+} Mg^{2+} -ATPasa en retículo sarcoplásmico y la disminución de las propiedades contráctiles dinámicas de fibras musculares expuestas a concentraciones de entre 10^{-6} y 10^{-5} M (0,35 y 3,5 mg/L) de clorpirifos.

5.2.3 Consideraciones finales

En este capítulo se analizaron 65 trabajos de investigación, de los cuales 21 corresponden a estudios realizados en la República Argentina sobre especies nativas. La gran mayoría de los estudios analizados reportan efectos deletéreos sobre embriones, larvas e individuos adultos en un amplio rango de concentraciones. El clorpirifos ejerce su acción insecticida por inhibición de la actividad de AChE, siendo éste un parámetro bioquímico ampliamente medido. Sin embargo, la evidencia indica claramente que otros procesos bioquímicos y moleculares se encuentran afectados cuando el organismo es expuesto a clorpirifos, entre los que se encuentran la alteración del estado inmunológico, del sistema de defensa antioxidante y de la actividad de otras esterasas, además de las alteraciones morfológicas registradas a campo y en ensayos de laboratorio. Estos efectos subletales tienen profundas implicancias para los individuos en su hábitat natural, ya que podrían poner en riesgo su supervivencia. Se ha documentado incluso la alteración de la emisión de señales acústicas en una especie nativa de la República Argentina, un comportamiento comunicativo indispensable entre individuos de una misma especie.

Es interesante señalar que, en comparación con los estudios realizados en el exterior, los grupos de investigación en nuestro país analizan habitualmente alteraciones bioquímicas, sobre todo del sistema de defensa antioxidante, tanto en ensayos *in situ* como en exposiciones *ex situ* y en laboratorio. Los primeros trabajos sobre el efecto de plaguicidas organofosforados en el metabolismo antioxidante en nuestro país fueron publicados en 2001 para *R. arenarum* (Anguiano et al., 2001; Venturino et al., 2001). Luego se caracterizó el metabolismo antioxidante a lo largo del desarrollo embrionario en dicha especie (Ferrari et al.,

2008). Su estudio posteriormente se expandió y aplicó a otros estadios de vida y otros plaguicidas, así como a otras especies nativas del territorio argentino, y actualmente se está avanzando a nivel molecular sobre la caracterización del efecto de plaguicidas organofosforados a partir de la secuenciación del transcriptoma de *R. arenarum* (Ceschin et al., 2020). A pesar de que las respuestas moleculares, de factores de transcripción y vías de señalización, por ejemplo, no son utilizadas como biomarcadores para establecer niveles de protección y su efectividad es cuestionada, se ha comprobado que son las más sensibles frente a la exposición de *R. arenarum* a arsénico como contaminante (Mardirosian, 2015).

Considerando la importancia que poseen los anfibios como parte fundamental de las cadenas tróficas durante todos sus estadios de desarrollo, la multiplicidad de efectos documentada como consecuencia de la exposición a clorpirifos podría tener serias repercusiones a nivel ecológico.

Tabla 5.5 Estudios de Laboratorio – Situación mundial en anfibios no modelo: Parámetros toxicológicos, morfofisiológicos, bioquímicos y moleculares

Especie/ estadio	Diseño – punto final de toxicidad	Parámetros biomarcadores	Referencia
<i>Lithobates pipiens</i> cultivo paladar	CE50-24h, movimiento ciliar: PA: 48 µM; FC 6,7-40,7%: 21-26 µM		Swann et al. (1996)
<i>Rana boylei</i> Larvas	PA, 96h, CL50 3,0 mg/L Oxón: 100 veces más tóxico	AChE: inhibición	Sparling y Fellers (2007)
larvas	PA, 0,8 a 200 µg/L, Crónico 85d a metamorfosis. CL50: 66,5 µg/L	Tiempo a metamorfosis: aumentado AChE: inhibición	Sparling y Fellers (2009)
<i>Hyla chrysoscelis</i> larvas	FC, 1-200 µg/L, con o sin sedimento, 96h-12d	AChE: CI25 4,34-7,66 µg/L; 0,59-0,81 µg/L Velocidad nado: disminución	Widder y Bidwell (2008)
<i>Rana sphenocephala</i> larvas	FC, 1-200 µg/L, con o sin sedimento, 96h-12d	AChE: CI25 71,7-77,7 µg/L; 56,6-115 µg/L Crecimiento: aumentado.	Widder y Bidwell (2008)
<i>Acris crepitans</i> larvas	FC, 1-200 µg/L, con o sin sedimento, 96h-12d	AChE: CI25 37,0-56,3 µg/L Crecimiento: disminuido	Widder y Bidwell (2008)
<i>Gastrophryne olivacea</i> larvas	FC, 1-200 µg/L, con o sin sedimento, 96h-12d	AChE: CI25 4,44-4,49 µg/L Crecimiento, velocidad nado: disminuido	Widder y Bidwell (2008)
<i>Pseudacris regilla</i> larvas	PA, 0,8 a 200 µg/L, Crónico 45d a metamorfosis. CL50: 365 µg/L	Tiempo a metamorfosis: aumentado AChE: inhibición	Sparling y Fellers (2009)
<i>Bufo gargarizans</i> larvas	PA, 0,32-2,56 mg/L, 96h CL50 0,80 mg/L	Daño a ADN: aumentado	Yin et al. (2009)
<i>Rana dalmatina</i> larvas	PA, 96h. CL50: 5,2 mg/L 57d subletal, 0,025-0,1 mg/L	Malformaciones: aumentado Alteraciones natatorias Alteraciones gonadales en machos	Bernabó et al. (2011a,b)
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	FC, 14d + recuperación 7d CL50-14d: 1245 µg/L	Metamorfosis exitosa: disminuido Malformaciones: aumento	Wijesinghe et al. (2011)

larvas	CL50-14+7d: 462 µg/L		
larvas	FC, 0,5 a 2,5 mg/L, 48h CL50: 1,47 mg/L 0,05 a 0,5 mg/L, crónico a metamorfosis	Metamorfosis: 39%, aumento en tiempo. Longitud, peso, malformaciones: aumento	Jayawardena et al. (2011)
larvas	FC, 14d	Histopatologías en hígado, branquias, músculo aleta caudal	Bandara et al. (2012)
Embriones en ganga	FC, CL50-48h 57,5 mg/L Subletal 96h, 0,1-1 mg/L	Largo, ancho, eclosión: disminuido Malformaciones: aumento	Kharkongor et al. (2018)
<i>Odontophrynus carvalhoi</i>	FC, 10-400 µg/L, 96h	Alteración fórmula leucocitaria	da Silva et al. (2020a,b)
larvas	192h	Genotoxicidad (MN): aumentado	
<i>Physalaemus gracilis</i>	FC, CL50-96h 0,89 mg/L	Malformaciones, CAT, GST, GSH: aumento	Rutkoski et al. (2020)
larvas	Subletal, 11-500 µg/L, 7d	Movilidad, AChE: reducido. Nado alterado, espasmos	
<i>Anaxyrus cognatus</i>	PA oxón, inyección	CI50 (AChE) [20 min, 26°C]: 149 nM	Anderson et al. (2018)
adultos	máxima dosis tolerada: 77 mg/kg	Hipoactividad	

PA: principio activo; FC: formulado comercial; CE50: concentración de efecto 50%; CI: concentración inhibitoria; AChE: acetil colinesterasa; CAT: catalasa; GST: glutatión-S-transferasa; GSH: glutatión reducido; MN: micronúcleos.

5.3 Macroinvertebrados acuáticos

5.3.1 Efectos de clorpirifos a nivel de especie

Van Wijngaarden estudió la respuesta del efemenóptero *Cloeon dipterum* a clorpirifos en microcosmos de laboratorio y en estanques artificiales exteriores, encontrando valores similares de NOEC en el orden de 0,2 µg/L, mientras que la CE10 en laboratorio fue de 0,3 µg/L; la recolonización fue dependiente de la concentración de clorpirifos remanente en el estanque, llevando 56 días alcanzar los valores normales de la población (van Wijngaarden, 1993). También es importante tener en cuenta algunos efectos subletales en los macroinvertebrados, como la inmovilidad que causa el clorpirifos en una importante cantidad de especies. El clorpirifos causa efectos subletales en *Hyaella azteca*, afectando por ejemplo el peso corporal a una CE50 de 25 ng/L que resulta la mitad de la CL50, de 50,4 ng/L (Hasenbein et al., 2015). En la exposición de *Daphnia pulex* tanto a campo como en laboratorio, el clorpirifos provoca la inmovilización de los individuos durante varios días antes de provocar su muerte, con concentraciones del orden de 0,2 a 0,4 µg/L en los 2 primeros días de vida, que son 5 a 10 veces menores que las CL50 (van der Hoeven y Gerritsen, 1997). En el camarón *Neomysis integer*, se encontró que la exposición a niveles subletales y ambientalmente relevantes de clorpirifos (38 ng/L, 45% de la CL50) causa alteraciones importantes en el comportamiento natatorio que pueden tener consecuencias trascendentales sobre sus poblaciones (Roast et al., 2000).

La importancia de estos efectos observables a concentraciones subletales de clorpirifos, se traduce en una distribución de las sensibilidades de estas especies bentónicas que determina riesgos mayores a los que predicen las respectivas CL50, como ha sido demostrado, sugiriendo que los porcentajes de especies

afectadas y por tanto las alteraciones de la estructura de las comunidades bentónicas son mayores a los que establecen los índices comúnmente empleados (Rubach et al., 2011). Se han reportado también resultados que demuestran un aumento de hasta el doble de la toxicidad de clorpirifos hacia *Hyalella azteca* cuando se producen exposiciones previas o simultáneas a otros contaminantes, por ejemplo, herbicidas (Anderson y Lydy, 2002). Otra cuestión importante para la estructura comunitaria es la resultante de la exposición a clorpirifos en especies de importancia vital en la cadena trófica, como lo es el caso de las larvas del mosquito acuático, *Chironomus tentans*, que es fuertemente afectado a 0,1 µg/L (Rakotondravelo et al., 2006).

A partir de la información de la toxicidad aguda y crónica de clorpirifos sobre distintas especies de invertebrados acuáticos, se han desarrollado curvas de distribución de la sensibilidad (SSD) que demuestran que este biocida es muy tóxico para el grupo, considerado como el más sensible hacia plaguicidas organofosforados (Marrochi, 2018; Alvarez et al., 2019). Se muestra en la Figura 5.1 la curva de distribución de sensibilidad para efectos crónicos reportada por Alvarez et al. (2019), donde se determina que la concentración máxima permisible en agua para clorpirifos, que protege al 95% de las especies de invertebrados acuáticos (HC5) se estima en 0,7 ng/L. Este valor se encuentra incluso muy por debajo de todos los criterios de calidad de agua y niveles guía utilizados en diferentes países (Alvarez et al., 2019).

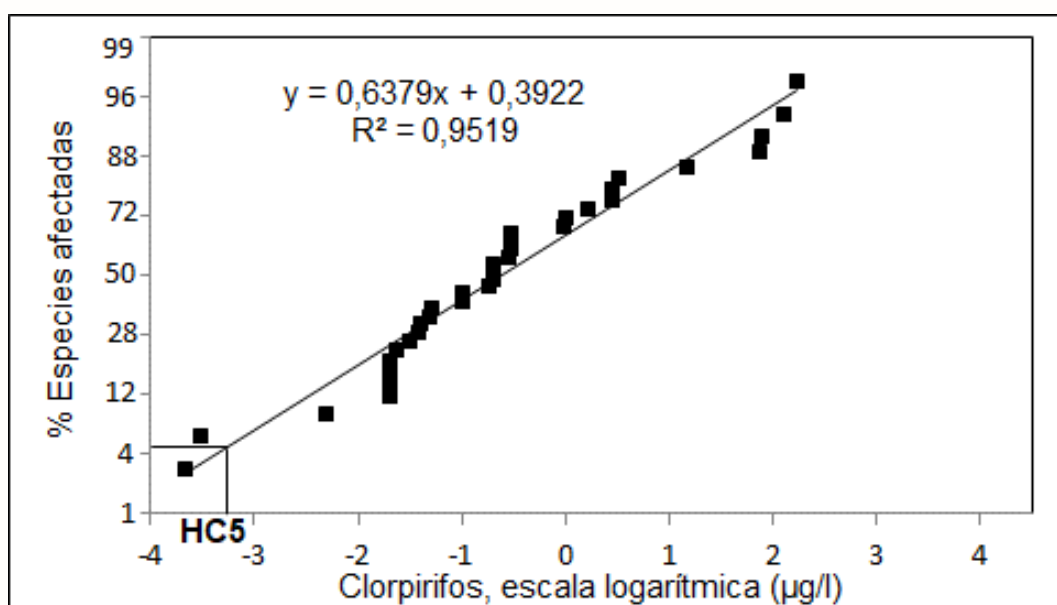


Figura 5.1: Curva de Distribución de Sensibilidad de Especies (SSD) para los efectos crónicos de clorpirifos sobre macroinvertebrados bentónicos.

Se marca la HC5, concentración que evita potencialmente efectos crónicos en el 95% del total de especies bentónicas. Datos extraídos de: (Ibrahim y Christensen, 1992); (Hooftman et al., 1993); (van Wijngaarden, 1993); (EPA, 1994); (Olima et al., 1997); (van der Hoeven y Gerritsen, 1997); (Leight y Van Dolah, 1999); (Roast et al., 2000); (Anderson y Lydy, 2002); (Sherrard et al., 2002); (Printes y Callaghan, 2004); (Bellas et al., 2005); (Rakotondravelo et al., 2006); (Zalizniak y Nugegoda, 2006); (Bringolf et al., 2007); (Montagna y Collins, 2007); (Rao et al., 2007); (Beiras y Bellas, 2008); (Satapornvanit et al., 2009); (Rubach et al., 2011); (Buono et al., 2012); (Hasenbein et al., 2015).

5.3.2 Estudios a nivel de comunidad béntica

Desde hace varias décadas, la evaluación de las comunidades de macroinvertebrados en los ecosistemas acuáticos viene proporcionando una excelente alternativa en el diagnóstico de la calidad del agua (Galdean et al., 2001; Li et al., 2010). El estudio de estas comunidades se ha incrementado a consecuencia de su aplicación como organismos bioindicadores dentro del proceso de evaluación de la calidad del agua, ya que mediante el análisis de la composición taxonómica y la estructura de las comunidades de macroinvertebrados se puede inferir el grado de afección producido por diversas perturbaciones antrópicas (Loeb y Spacie, 1994).

Los macroinvertebrados presentan adaptaciones evolutivas a determinadas condiciones ambientales y distintos límites de tolerancia frente a alteraciones como los cambios en la conectividad por sequías, cambios en las temperaturas y lluvias (Bonada et al., 2006, 2007). La diversidad es baja en aguas contaminadas debido a la eliminación de las especies menos resistentes (Macchi et al., 2018). Por lo tanto, variaciones en la composición y estructura de las comunidades de los cursos de agua pueden interpretarse como signos evidentes de algún tipo de variación ambiental. De esta forma el uso de macroinvertebrados como indicadores biológicos es una buena alternativa metodológica para detectar alteraciones en los ecosistemas acuáticos (Barbour et al., 2006) y estimar el grado de las mismas, dada su capacidad diferencial de tolerancia (Bonada et al., 2006).

La utilización de los macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores presenta ciertas ventajas respecto a otros componentes de la biota acuática. Según Rosenberg y Resh (1993), se destacan entre otras cosas por su presencia en prácticamente todos los sistemas acuáticos continentales, su naturaleza sedentaria, permitiendo un análisis espacial y temporal de los efectos debido a las perturbaciones en el ambiente, la facilidad en el análisis de las muestras, la utilización de equipos simples y de bajo costo, la disponibilidad de métodos e índices para el análisis de datos, y la validación que ha sido realizada en diferentes ríos del mundo.

Los plaguicidas pueden producir efectos adversos en las comunidades de macroinvertebrados disminuyendo la riqueza específica y la abundancia (Liess y Ohe, 2005; Schäfer et al., 2011; Egler et al., 2012). Estos cambios pueden alterar ciertas funciones del ecosistema como el flujo de energía, la productividad y los procesos de descomposición. La relación potencial entre la contaminación por plaguicidas y la estructura de la comunidad macrobéntica se basa en la diferencia fisiológica que presentan estos organismos, la movilidad y el tipo de respiración (a través de branquias o la piel), los que pueden influir notablemente en la absorción de los contaminantes a través del cuerpo (Buchwalter et al., 2002). Además, la duración de los ciclos de vida afectará la capacidad de ciertas especies para reaccionar a corto plazo ante una perturbación (van den Brink et al., 1996; Sherratt et al., 1999). La alta sensibilidad de las comunidades de macroinvertebrados a la contaminación por plaguicidas permite considerarlos buenos indicadores de la

calidad del agua y de los procesos ecológicos de los ecosistemas acuáticos (Overmyer et al., 2005). Al considerar las diferentes variables que pueden afectar la comunidad béntica, el arrastre de plaguicidas por la escorrentía aparece como uno de los factores de mayor peso en las variaciones de abundancia y riqueza de los macroinvertebrados en arroyos de zonas agrícolas (Berenzen et al., 2005).

5.3.3 Efectos de clorpirifos en comunidades de macroinvertebrados

Existe una importante cantidad de estudios que evidencian que la riqueza, la diversidad y la abundancia de macroinvertebrados se reducen drásticamente en ecosistemas acuáticos, a medida que aumentan las concentraciones de clorpirifos (Ward et al., 1995; van den Brink et al., 1996; Anderson et al., 2006; Cornejo et al., 2019).

Trabajos preliminares sobre los efectos de clorpirifos en especies de macroinvertebrados autóctonos en Holanda sirvieron de base para la evaluación posterior de efectos a nivel de microcosmos, con concentraciones tóxicas que variaron entre 0,02 y 6 µg/L (van Wijngaarden et al., 1993). Un trabajo pionero de Ward et al. (1995), aplicó clorpirifos en un nivel bajo de 0,1 µg/L en forma crónica en arroyos, demostrando pérdidas en la riqueza y la reducción en la abundancia en 13 de 19 taxones de quironómidos y en 9 de otros 36 taxones, encontrando un único taxón que se incrementó, *Physastra*. Estudios realizados sobre microcosmos con concentraciones de hasta 0,5 veces la CL50 de clorpirifos para la especie estándar más sensible, mostraron efectos muy significativos sobre la comunidad de macroinvertebrados; los taxones de Crustacea y Quironomidea *Corynoneura* fueron muy sensibles a partir de exposiciones de 0,05 µg/L, mientras que algunas especies como los gastrópodos *Valvata piscinalis*, *Physa fontinalis*, y anélidos *Stylaria lacustris* y el grupo Nemertea mostraron un aumento en el número de individuos (Cuppen et al., 2002). La aplicación de 0,05 veces la CL50 de *Daphnia magna*, considerada como la especie estándar más sensible, equivalente a 0,05 µg de clorpirifos/L, fue la mínima concentración que causó efectos deletéreos en microcosmos de agua dulce; la comunidad de zooplancton fue afectada, disminuyendo las poblaciones de Cladocera (*Daphnia galeata/magna*, *Bosmina longirostris*, *Alona rectangula*), Copepoda (*Cyclopoidea sp.*, *Nauplii*) y Ostracoda (*sp.*), mientras que aumentaron las rotíferas (*Mytilina mucronata*, *Mytilina bicarinata*, *Lecane sp.*) (van den Brink et al., 2002).

En el mismo sentido, a partir de las toxicidades individuales en algunas especies, se desarrollaron estudios del impacto crónico de clorpirifos y 2 piretroides en mesocosmos a campo durante 4 meses, con aplicaciones repetidas simulando escorrentía, observándose niveles detectables de clorpirifos aún a 6 semanas de su aplicación; las especies más afectadas fueron el caracol *Radix sp.*, el anfípodo *H. azteca*, la pulga acuática *Daphnia magna*, y los copépodos en general, para un total de 12 sobre 15 especies de macroinvertebrados halladas y a la concentración ambientalmente relevante de 5 ng de clorpirifos/L,

mientras que *Anopheles sp.* presentó un incremento en su abundancia (Hasenbein et al., 2016). La contaminación urbana y periurbana de arroyos también fue analizada como fuente de llegada de clorpirifos a partir de usos diversos en jardines y plazas, encontrándose en concentraciones relevantes en 6 arroyos analizados en Georgia, EE.UU., en valores medios de 0,4 a 0,8 ng/L y máximos entre 4,8 y 8,0 ng/L, con una frecuencia de detección de alrededor de 60% en agua, y concentraciones de hasta 3,9 µg/L en sedimentos; se determinó una correlación significativa entre el índice de toxicidad de plaguicidas y la alteración negativa de la comunidad béntica del arroyo, que mostró una caída en especies bioindicadoras sensibles como el escarabajo *Anchytarsus spp.*, la mosca de las piedras *Leuctra spp.* y la efímera *Habrophlebiodes spp.*, y un incremento en la abundancia de Chironomidae como respuesta adaptativa (Overmyer et al., 2005). Otro estudio, realizado sobre 24 sitios de arroyos en áreas agrícolas al Sureste de Australia, encontró también niveles y frecuencias de detección de clorpirifos importantes como para influir en los índices de toxicidad (máximos: 40 ng/L en agua, 42 µg/kg en sedimentos, y 110 µg/L en muestreadores al cabo de 28 días), que se correlacionan con indicadores mostrando una disminución en la abundancia de taxones sensibles (Schäfer et al., 2011).

Estudios realizados en el laboratorio confirmaron la alta sensibilidad de especies bentónicas hacia el clorpirifos en concentraciones halladas en el Río Salinas, California (71-162 ng/L), tales como el anfípodo *Hyaella azteca*, la efímera *Proclleon sp.* y el mosquito de agua *Chironomus dilutus* (CL50 70-86 ng/L) (Anderson et al., 2006), siendo que trabajos previos demostraron una disminución del número de individuos del taxón Ephemeroptera, de la riqueza taxonómica y porcentaje de especies de Chironomidae y también efectos negativos sobre *H. azteca*. Un estudio sobre múltiples estresores en 13 arroyos de zonas agrícolas en Panamá ha determinado los efectos de plaguicidas sobre las comunidades de macroinvertebrados, encontrando una correlación con la disminución de la abundancia y la riqueza taxonómica; los análisis químicos determinaron la presencia de clorpirifos en todos los sitios de muestreo, con concentraciones medias de 0,01 a 0,785 µg/L, y se asociaron con la sensibilidad de los grupos taxonómicos Hyalellidae, Leptophyphidae, Leptophlebiidae, Planariidae, Planorbidae, Ptilodactylidae, Odontoceridae y Tabanidae, mientras que Chironomidae, Lumbriculidae y Psychodidae se asociaron a niveles altos de plaguicidas (Cornejo et al., 2019). Una observación interesante del estudio es que la cantidad de plaguicidas en Unidades Tóxicas tuvo influencia significativa en el índice BMWP/PAN (por “grupo de trabajo de biomonitorio” adaptado a Panamá) que contempla las especies y comunidades locales, y no así en otro índice SPEAR (por “especies en riesgo”) que no estuvo adaptado, lo que demuestra lo esencial de la utilización de las especies nativas para toda evaluación de riesgo en profundidad (Tiers 3 y 4) (Cornejo et al., 2019).

Cabe entonces analizar aparte los reportes disponibles al respecto en nuestro país. Varios autores reportan efectos de la aplicación de clorpirifos o contaminación por deriva o escorrentía, sobre invertebrados acuáticos, en la República Argentina. En Pampa Húmeda se observaron tasas de mortalidad del 30% al 100%

sobre el anfípodo *Hyalella curvispina* y 100% para *Macrobrachium borelli*, relacionados a concentraciones de clorpirifos en los arroyos La Horqueta y Brown de hasta 0,3 y 0,45 µg/L en agua, y 150 y 226 µg/kg de sedimento, respectivamente (Jergentz et al., 2005). La escorrentía de hasta 17 µg de clorpirifos/L en agua de arroyo causó 100% de mortalidad en *H. curvispina*, mientras que los sedimentos causaron la misma letalidad hasta un mes después (Mugni et al., 2011). En un estudio de sedimentos del arroyo Carnaval en la zona hortícola de La Plata-Buenos Aires, los mayores niveles encontrados de clorpirifos (2,26 mg/kg) y otros biocidas para uno de los sitios de muestreo coincide con la mayor toxicidad en un bioensayo de sedimentos con *H. curvispina* (50 – 100% de mortalidad) y la mayor reducción en el tamaño corporal (Mac Loughlin et al., 2017).

La contaminación estacional causa alteraciones en las comunidades bénticas de la Pampa Húmeda, llevando a un incremento en la abundancia de taxones más tolerantes como Chironomidae y Oligochaeta, y su disminución en los más sensibles, Ephemeroptera y Odonata (Crettaz-Minaglia et al., 2014). Los cambios en la estructura de la comunidad de macroinvertebrados se han correlacionado con las concentraciones reportadas de clorpirifos principalmente en arroyos de la zona de la Pampa Húmeda, donde las especies del género *Hyalella* son las más abundantes y las más sensibles (Hunt et al., 2017). No obstante, debe considerarse la altísima capacidad de desarrollo de resistencia de la especie *H. curvispina*, reportada en estudios del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, hacia insecticidas organofosforados y carbamatos y a hidrocarburos (Anguiano et al., 2014; del Brio et al., 2018).

En un estudio realizado en arroyos de la Provincia de Buenos Aires, entre La Plata y Punta Indio, se compararon sitios de uso hortícola con aplicación de plaguicidas, entre ellos clorpirifos, con sitios no impactados, encontrando niveles entre 0,76 y 4,71 µg/kg de sedimento (Solis et al., 2016). Los resultados mostraron también una disminución significativa de la riqueza y densidad en los ensambles de macroinvertebrados en aquellos sitios impactados (Solis, 2017). Fueron observados cambios en la composición de los ensambles, con la desaparición o reducción de la abundancia de taxones sensibles en los arroyos impactados como *Hyalella curvispina* (Hyalellidae), y los insectos del orden efemeróptera (familias Baetidae y Caenidae) y tricóptera (familias Hydroptylidae y Polycentropodidae) y familias Coenagrionidae, Caenidae, Polycentropodidae, Stratiomyidae y Corixidae. En cambio, en esos sitios sobresalieron taxones tolerantes como platelmintos (familia Dugesidae), sanguijuelas (familia Glossiphoniidae), Entomobyridae (Collembola), los gastrópodos *Biomphalaria peregrina* (Planorbidae), *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae) y familias Ancyliidae, Sphaeriidae, Scirtidae, Hirudinea, Aeshnidae, Libellulidae (Solis et al., 2016, 2017; Solis, 2017).

Un estudio realizado en las zonas rurales de La Plata y Arrecifes determinó frecuencias de detección de clorpirifos en sedimentos de arroyos entre el 67% y el 100% en la primera zona y del 100% en todos los casos para Arrecifes, entre finales del año 2011 y comienzos de 2012. Los valores medios de clorpirifos

variaron entre 0,8 y 5,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sedimento, con máximos de hasta 7,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Marrochi, 2018). Los análisis de la comunidad de macroinvertebrados establecen que el clorpirifos afecta negativamente a las familias Palaemonidae y Caenidae y a los órdenes a los cuales pertenecen, Decapoda y Ephemeroptera respectivamente, además del orden Crustacea, mientras que se correlaciona positivamente a un incremento en el grupo taxonómico de Oligochaeta. Un estudio ampliado sobre los arroyos de las zonas agrícolas de Arrecifes (2011 – 2014), estableció el efecto negativo de clorpirifos sobre los grupos taxonómicos de Platyhelminthes, Nematoda, Bivalvia, Ancyliidae y Ostracoda (Marrochi, 2018).

En un estudio realizado en canales de drenaje y desagüe en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, la riqueza y la densidad de macroinvertebrados se redujeron durante el período de aplicación de clorpirifos, cuyas concentraciones máximas detectadas en el agua fueron 1,42 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Macchi et al., 2018). En este estudio también se observaron cambios en la composición y abundancia de los ensambles, en aquellos drenajes impactados estuvieron ausentes diversas especies de efemeróptera (familias Baetidae y Leptophlebiidae), en cambio se destacaron por su abundancia larvas de insectos de la familia Chironomidae (principalmente de la subfamilia Chironominae), junto a moluscos (Gastropoda), anélidos (Oligochaeta y Glossiphoniidae) y platelmintos (familia Dugesiidae) (Macchi et al., 2018), considerados en diversos estudios como taxones tolerantes a la contaminación con plaguicidas (Liess y Ohe, 2005; Overmyer et al., 2005; Van Wijngaarden et al., 2005).

Se puede considerar, en síntesis, para la situación de las comunidades bénticas en nuestro país:

- 1- que existe una presión significativa de los plaguicidas utilizados habitualmente, entre los cuales el clorpirifos continúa teniendo una prevalencia importante en cuanto a la masa de insecticidas que se aplica en nuestro país y particularmente en la región Pampeana, causando graves alteraciones sobre la estructura de las comunidades de macroinvertebrados en las aguas superficiales de las zonas agrícolas.
- 2- que los efectos causados por clorpirifos entre otros plaguicidas, es semejante en nuestro país a lo que se describen como taxones tolerantes o sensibles a la contaminación para otras regiones del mundo.

5.4 Evaluaciones de Riesgo Ambiental para organismos acuáticos

Existen diversos reportes y trabajos publicados que analizan riesgos ambientales asociados al uso de clorpirifos como agroquímico en nuestro país, en distintos niveles de profundidad.

Se considera habitualmente una aproximación basada en etapas o “tiers” como lo más adecuado para realizar la evaluación de riesgo del uso de un plaguicida en ecosistemas específicos (ECOFRAM, 1999, acceso 15/10/2020). En una primera etapa o tier 1, la información disponible permite comparar, a través de los cálculos de Cocientes de Riesgo, las concentraciones ambientales máximas determinadas o esperadas de acuerdo a los esquemas de aplicación del agroquímico (posición conservativa) con parámetros de toxicidad

reportados para especies estandarizadas a nivel internacional. En función de ello, para nuestro país se encuentran ampliamente superados los valores límites recomendados de acuerdo a lo que se calcula para los riesgos potenciales de clorpirifos sobre invertebrados acuáticos y peces (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Cocientes de Riesgo para clorpirifos a partir de las concentraciones máximas reportadas en Argentina, para la evaluación en el Tier 1

Grupo	Riesgo	Cocientes de Riesgo por Región	
		Pampa Húmeda	Patagonia
		10,8 µg/L ⁽¹⁾	1,45 µg/L ⁽²⁾
	Agudo (µg/L)		
Algas	400 ⁽³⁾	0,027	0,0036
Invertebrados	0,01 ⁽⁴⁾	1080	145
Peces	0,58 ⁽⁵⁾	18,6	2,5
	Crónico (µg/L)		
Algas	100 ⁽³⁾	0,108	0,015
Invertebrados	0,00021 ⁽⁶⁾	51429	6905
Peces	0,002 ⁽⁷⁾	5400	725

Valores calculados para dos regiones con diferente tipo de uso; ⁽¹⁾ valor máximo citado en (Alvarez et al., 2019); ⁽²⁾ (Macchi et al., 2018). ⁽³⁾ valores de NOEC extraídos de US EPA (2014) <http://www.epa.gov/ecotox>; ⁽⁴⁾ valor para *Paratyta australensis*, <http://www.epa.gov/ecotox>; ⁽⁵⁾ *Morone saxatilis*, Pesticide Action Network: <http://www.pesticideinfo.org/ECOTOX> database; ⁽⁶⁾

Daphnia magna, (Printes y Callaghan, 2004); ⁽⁷⁾ *Poecilia reticulata*, (De Silva y Samayawardhena, 2005).

En consecuencia, debe procederse con una segunda etapa o tier 2 de evaluación de riesgo. En este tier se comparan distribuciones de Sensibilidad de Especies (SSD del inglés), con las situaciones de exposición regional. En las Tablas 5.7 y 5.8 se reúnen los valores de parámetros ecotoxicológicos para efectos agudos y crónicos respectivamente de clorpirifos sobre distintas especies, reunidos a partir de trabajos publicados en revistas internacionales. La revisión incluye Concentraciones de Efecto 50 (letalidad como CL50, y otros efectos CE50), Mínima Concentración de Efecto Observable (LOEC), Máxima Concentración de No Efecto (NOEC) y otros, tanto para exposiciones a corto plazo (efectos agudos) como a largo plazo o crónico. Las condiciones de aceptación del dato, además de estar publicado en revista internacional, incluye la revisión por pares, la descripción completa del modelo experimental, inclusión de controles, replicados de tratamientos, control de la concentración efectiva de clorpirifos, rango adecuado de concentraciones cubriendo los parámetros ecotoxicológicos, y análisis estadístico para determinar límites de confianza y/o ajuste de modelos para obtener los parámetros por métodos probabilísticos. Se destacan en ambas tablas las especies autóctonas o presentes en Argentina, para comparar con otras especies, principalmente del hemisferio norte.

Tabla 5.7 Parámetros de ecotoxicidad aguda para clorpirifos en especies acuáticas

Especie	Parámetro	Efecto	Clorpirifos (µg/L)
Crustacea			
Cladocera			
<i>Daphnia magna</i>	48h-CL50	Mortalidad	0,1
<i>Daphnia carinata</i>	48h-CL50	Mortalidad	0,24
<i>Daphnia pulex</i>	48h-CL50	Mortalidad	0,33
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48h-CL50	Mortalidad	0,06
Decapoda - Caridea			
<i>Neomysis integer</i>	96h-CL50	Mortalidad	0,15
<i>Artemia sp.</i>	24h-CL50	Mortalidad	18
<i>Palaemonetes pugio</i>	96h-CL50	Mortalidad	0,15
<i>Mysidopsis bahia</i> ⁽¹⁾	CL50	Mortalidad	0,035
- Amphipoda			
<i>Hyalella azteca</i> ⁽²⁾	48h- CL50	Mortalidad	0,1
<i>Gammarus palustris</i>	96h-CL50	Mortalidad	0,30
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	48h- CL50	Mortalidad	7,29
<i>Gammarus fasciatus</i>	96h-CL50	Mortalidad	0,32
- Brachyura			
<i>Callinectes sapidus</i> ⁽³⁾	48h-CL50	Sin datos	5,2
<i>Trichodactylus borellianus</i> ⁽⁴⁾	96h-CL50	Desarrollo	45,53
Insecta			
<i>Chironomus sp,</i>	24h-CL50	Mortalidad	0,60
<i>Chironomus tentans</i> ⁽²⁾	48h-CL50	Mortalidad	0,3
<i>Aedes aegypti</i>	24h-CL50	Mortalidad	0,43
Odonata	24h-CL50	Mortalidad	11,4
<i>Quinquefasciata</i>	24h-CL50	Mortalidad	0,50
<i>Notonecta undulata</i>	24 h-CL50	Mortalidad	35,2
<i>Pteronarcys californica</i>	CL50	Sin datos	50
Mollusca			
<i>Biomphalaria alexandrina</i>	24h-CL50	Mortalidad	3000

<i>Lymnaea stagnalis</i>	96h-CL50	Mortalidad	> 94
Nematoda			
<i>Caenorhabditis elegans</i>	24h-CL50	Sin datos	966
Peces			
<i>Morone saxatilis</i>	96h-CL50	Mortalidad	0,58
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ⁽⁵⁾	96h-CL50	Mortalidad	7,1
<i>Cyprinus carpio</i>	96h-CL50	Mortalidad	8
<i>Gambusia affinis</i>	24h-CL50	Mortalidad	110
<i>Poecilia reticulata</i>	96h-CL50	Mortalidad	7,17
<i>Tilapia mossambica</i>	96h-CL50	Mortalidad	26
<i>Lepomis macrochirus</i> ⁽⁵⁾	CL50	Sin datos	1,8
<i>Pimephales promelas</i> ⁽²⁾	48h-CL50	Mortalidad	162,7
<i>Pungitius pungitius</i> ⁽⁶⁾	48h-CL50	Mortalidad	4,7
<i>Anguilla Anguilla</i>	48h-CL50	Mortalidad	690
<i>Cyprinodon variegatus</i>	96h-CL50	Mortalidad	136
<i>Mugil cephalus</i> ⁽⁵⁾	96h-LC5	Sin datos	5,4
Amphibia			
<i>Rinella arenarum (embrión)</i> ⁽⁷⁾	144h-CL50	Mortalidad	13500
<i>Rhinella arenarum (larva)</i> ⁽⁸⁾	96h-CL50	Mortalidad	1410
<i>Xenopus laevis</i> ⁽⁹⁾	96h –CL50	Sin datos	511
<i>Rana pipiens</i> ⁽⁵⁾	24h-CL50	Toxicidad	3000
<i>Bufo americanus</i> ⁽⁵⁾	24h-CL50	Toxicidad	1

Se marcan en color azul las especies autóctonas o introducidas que se encuentran en Argentina. Datos recolectados de: Pesticide Action Network: <http://www.pesticideinfo.org/> ECOTOX database; ⁽¹⁾ (EPA, 2002); ⁽²⁾ (Moore et al., 1998); ⁽³⁾ (Mayer y Eilersieck, 1986); ⁽⁴⁾ (Montagna, 2010); ⁽⁵⁾ (Buckler et al., 2003); ⁽⁶⁾ (Munn y Gilliom, 2001); ⁽⁷⁾ (Sotomayor et al., 2012); ⁽⁸⁾ (Liendro et al., 2015); ⁽⁹⁾ (CCME, 2008)

Si se comparan las curvas de Distribución de Sensibilidad de Especies para todos los organismos en general contra los organismos autóctonos o presentes en Argentina, se observa prácticamente la misma distribución (Figura 5.2). Los ajustes de modelos log Probit permiten determinar una HC5 de 10 ng/L para la protección de los organismos acuáticos autóctonos, es decir un nivel de clorpirifos que podría afectar al 5% de las especies más sensibles, y se observa que las especies autóctonas coinciden con la parte más extensa general de la distribución para todas las especies, probablemente por la escasa cantidad de macroinvertebrados relevados en nuestro país y que tienen una mayor sensibilidad en general a los

organofosforados. De esta manera, el ajuste de una única distribución Probit para los efectos agudos de clorpirifos para todas las especies en general arroja un valor de HC5 de 14 ng/L, similar al estimado para las especies locales. El ajuste de un modelo bi-Probit permite corregir ese valor de HC5 a 60 ng/L cuando se considera particularmente a las especies más sensibles. Para visualizar los taxones que involucran los distintos grados de sensibilidad, se han presentado los datos discriminados en la Figura 5.3. Se puede observar que los macroinvertebrados pertenecientes a Cladocera (*Daphnia*), Amphipoda y Caridea (camarones) y algunos insectos se encuentran entre los organismos más sensibles a efectos tóxicos agudos de clorpirifos, mientras que moluscos y vertebrados son menos sensibles.

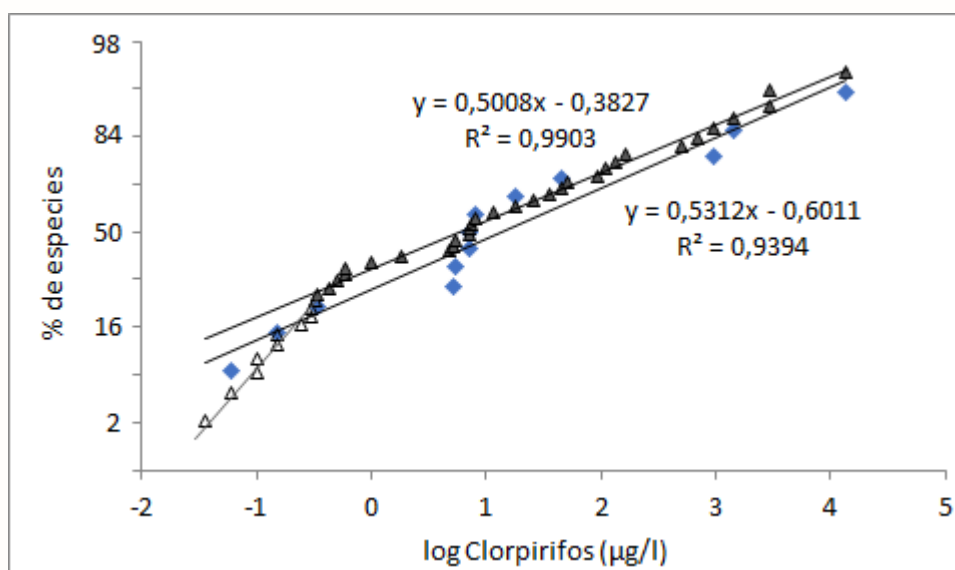


Figura 5.2 Curvas de Distribución de Sensibilidad de Especies para organismos acuáticos en Argentina y a escala global. Efectos agudos de clorpirifos

Especies locales: rombos en azul; especies a escala global: triángulos abiertos y en gris para diferentes respuestas de sensibilidad. Figura elaborada en base a la información de Tabla 5.7.

Para el análisis de los efectos tóxicos crónicos de clorpirifos, se observa primeramente una escasa cantidad de información para las especies locales. Esto imposibilita realizar un ajuste de la Distribución de Sensibilidad. Si se compara la situación de especies locales y autóctonas de Argentina con las especies a escala global, se puede observar en principio que abarcan un rango semejante de sensibilidades (Figura 5.4). Los valores de puntos finales de toxicidad crónica utilizados para el ajuste de la Distribución de Sensibilidad se muestran en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8 Valores de toxicidad crónica para clorpirifos en especies acuáticas

Grupo	Especie	Punto final	Referencia
Taxonómico		(µg/ml)	
Cladocera	<i>Daphnia magna</i>	0,00021	(Printes y Callaghan, 2004)
Amphipoda	<i>Hyalella azteca</i>	0,0003	(Anderson y Lydy, 2002)

Pez	<i>Poecilia reticulata</i>	0,002	(De Silva y Samayawardhena, 2005)
Cladocera	<i>Daphnia carinata</i>	0,005	(Zalizniak y Nugegoda, 2006)
Pez	<i>Chirostoma jordani</i>	0,007	(Dzul-Caamal et al., 2012)
Caridea	<i>Americamysis bahia</i>	0,02	(EPA, 1994)
Insecta	<i>Chironomus tentans</i>	0,02	(Rakotondravelo et al., 2006)
Amphipoda	<i>Gammarus palustris</i>	0,02	(Leight y Van Dolah, 1999)
Amphipoda	<i>Gammarus pulex</i>	0,02	(van Wijngaarden et al., 1993)
Caridea	<i>Palaemonetes argentinus</i>	0,023	(Montagna y Collins, 2007)
Insecta	<i>Chironomus riparius</i>	0,032	(Hooftman et al., 1993)
Caridea	<i>Neomysis integer</i>	0,038	(Roast et al., 2000)
Caridea	<i>Paratya australiensis</i>	0,04	(Olima et al., 1997)
Cladocera	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,05	(Sherrard et al., 2002)
Cladocera	<i>Daphnia pulex</i>	0,052	(van der Hoeven y Gerritsen, 1997)
Insecta	<i>Cloeon dipterum</i>	0,1	(van Wijngaarden et al., 1993)
Caridea	<i>Palaemon serratus</i>	0,1	(Bellas et al., 2005)
Pez	<i>Pimephales promelas</i>	0,12	(Jarvinen et al., 1983)
Insecta	<i>Chaoborus obscuripes</i>	0,18	(van Wijngaarden et al., 1993)
Insecta	<i>Chironomus dilutus</i>	0,2	(Hasenbein et al., 2015)
Cladocera	<i>Daphnia longispina</i>	0,2	(van Wijngaarden et al., 1993)
Caridea	<i>Procambarus spec.</i>	0,2	(Rubach et al., 2011)
Caridea	<i>Palaemonetes pugio</i>	0,28	http://www.pesticideinfo.org/
Camarodonta	<i>Paracentrotus lividus</i>	0,29	(Buono et al., 2012)
Caridea	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0,293	(Satapornvanit et al., 2009)
Insecta	<i>Caenis horaria</i>	0,3	(van Wijngaarden et al., 1993)
Cladocera	<i>Simocephalus vetulus</i>	0,3	(van Wijngaarden et al., 1993)
Pez	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	0,57	(Sandahl et al., 2004)
Insecta	<i>Sialis lutaria</i>	0,96	(Rubach et al., 2011)
Insecta	<i>Corixa punctata</i>	1	(van Wijngaarden et al., 1993)
Anura	<i>Rana sphenoccephala</i>	1	(Widder y Bidwell, 2008)
Anura	<i>Smilisca phaeota</i>	1	(Gallo-Delgado et al., 2006)
Isopoda	<i>Asellus aquaticus</i>	1,4	(van Wijngaarden et al., 1993)
Insecta	<i>Anax imperator</i>	1,63	(Rubach et al., 2011)

Pez	<i>Pungitius pungitius</i>	2,1	(van Wijngaarden et al., 1993)
Insecta	<i>Notonecta maculata</i>	2,78	(Rubach et al., 2011)
Insecta	<i>Parapoynx stratiotata</i>	2,86	(Rubach et al., 2011)
Insecta	<i>Ranatra linearis</i>	3,33	(Rubach et al., 2011)
Pez	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	3,8	(van Wijngaarden et al., 1993)
Anura	<i>Hyla chrysoscelis</i>	10	(Widder y Bidwell, 2008)
Mollusca	<i>Lampsilis siliquoidea</i>	15	(Bringolf et al., 2007)
Anura	<i>Xenopus laevis</i>	20	(El-Merhibi et al., 2004)
Anura	<i>Pseudacris regilla</i>	50	(Sparling y Fellers, 2009)
Anura	<i>Rana boylii</i>	50	(Sparling y Fellers, 2009)
Anura	<i>Bufo melanostictus</i>	50	(Jayawardena et al., 2011)
Caridea	<i>Artemia salina</i>	75	(Rao et al., 2007)
Mollusca	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	80	(Beiras y Bellas, 2008)
Anura	<i>Acris crepitans</i>	100	(Widder y Bidwell, 2008)
Anura	<i>Gastrophryne olivacea</i>	100	(Widder y Bidwell, 2008)
Mollusca	<i>Biomphalaria alexandrina</i>	125	(Ibrahim et al., 1992)
Caridea	<i>Neocaridina denticulata</i>	171	(Rubach et al., 2011)
Anura	<i>Rhinella arenarum</i> larva	500	(Liendro et al., 2015)
	embrión	8000	(Sotomayor et al., 2012)

Se marcan en color azul las especies autóctonas o introducidas que se encuentran en Argentina.

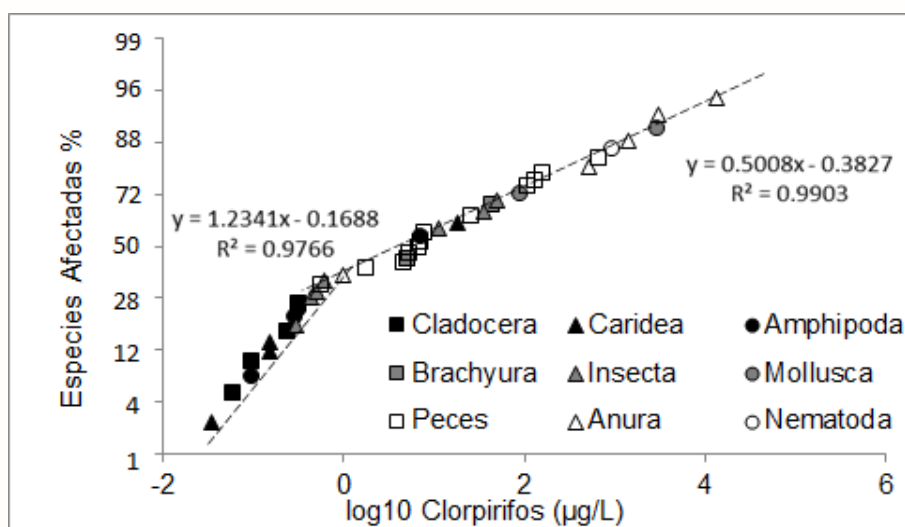


Figura 5.3 Distribución de Sensibilidad de Especies para toxicidad aguda de clorpirifos discriminada por grupo taxonómico

Información de Tabla 5.7. Modificada de Alvarez et al. (2019).

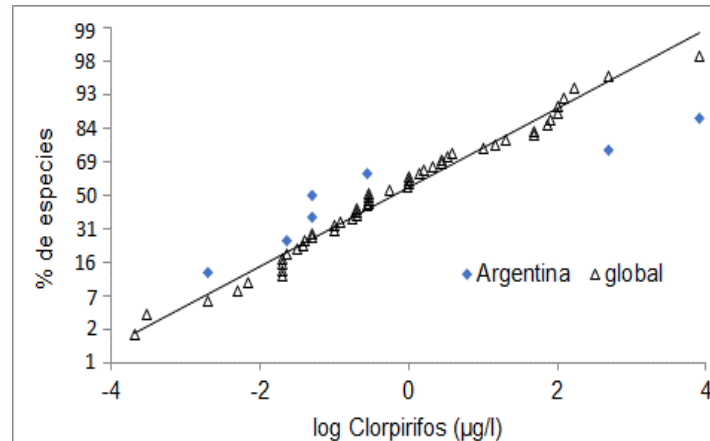


Figura 5.4 Distribución de Sensibilidad de Especies para efectos crónicos de clorpirifos en especies de Argentina y a escala global

Figura elaborada en base a la información de Tabla 5.8.

El análisis a nivel de taxones, mostrado en la Figura 5.5, permite observar que los macroinvertebrados acuáticos, junto con algunos peces, son los más sensibles a los efectos crónicos del clorpirifos (Alvarez et al., 2019). A partir del ajuste de un modelo Probit, se puede estimar un índice de riesgo crónico a partir del HC5 de 1,0 ng de clorpirifos/L. Considerando que los macroinvertebrados acuáticos son el grupo más sensible a clorpirifos, al igual que para otros plaguicidas organofosforados y compuestos orgánicos en general (van den Brink et al., 2002), es apropiado aplicar como nivel de riesgo para calidad de aguas el HC5 estimado para este grupo taxonómico, que arroja un valor de 0,7 ng/L según se muestra en la Figura 5.1. Dicho valor ha sido sugerido para establecer como límite máximo permitido en aguas para la protección de la vida acuática (Alvarez et al., 2019), reemplazando al antiguo Nivel Guía para clorpirifos establecido por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005), de 6 ng/L. El límite propuesto de 0,7 ng/L como valor para el criterio de calidad de aguas para clorpirifos, es incluso menor que cualquier otro criterio establecido actualmente a nivel mundial (Alvarez et al., 2019).

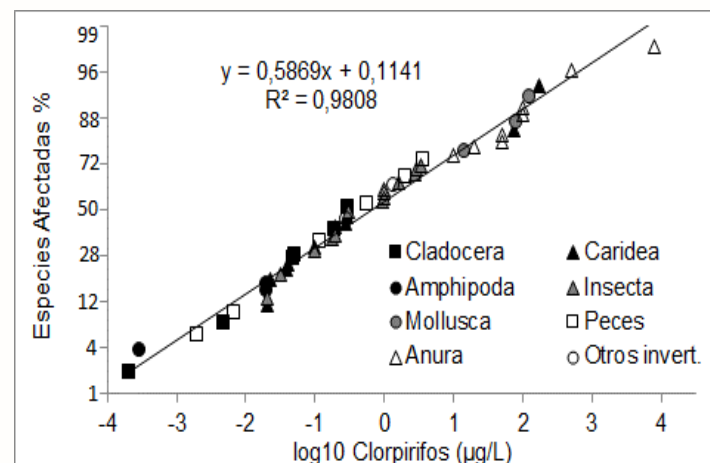


Figura 5.5 Efectos crónicos de clorpirifos por grupo taxonómico

Información de Tabla 5.8. Modificada de Alvarez et al. (2019).

A continuación, se debe comparar la Distribución de Sensibilidad de Especies para clorpirifos con los valores de concentración del tóxico que han sido descriptos en nuestro país. Para esta instancia de evaluación se dispone de una importante recolección de datos de concentración ambiental de clorpirifos enfocadas en una revisión sobre la región de la Pampa Húmeda (Alvarez et al., 2019), y un trabajo reciente sobre la región Norpatagónica del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Macchi et al., 2018). Puede observarse en la Figura 5.6 que las determinaciones realizadas en diferentes zonas del país muestran en algunos casos diferentes rangos de concentración hallados, que pueden deberse a distintos factores, como épocas y años de realización de los muestreos y metodologías de análisis químico. Sin embargo, algunas que tienen una mayor amplitud de rangos de concentración de clorpirifos en aguas, y que coincidentemente tienen una mayor cantidad de sitios muestreados y de determinaciones, cubren todo el espectro de concentraciones de clorpirifos para el país.

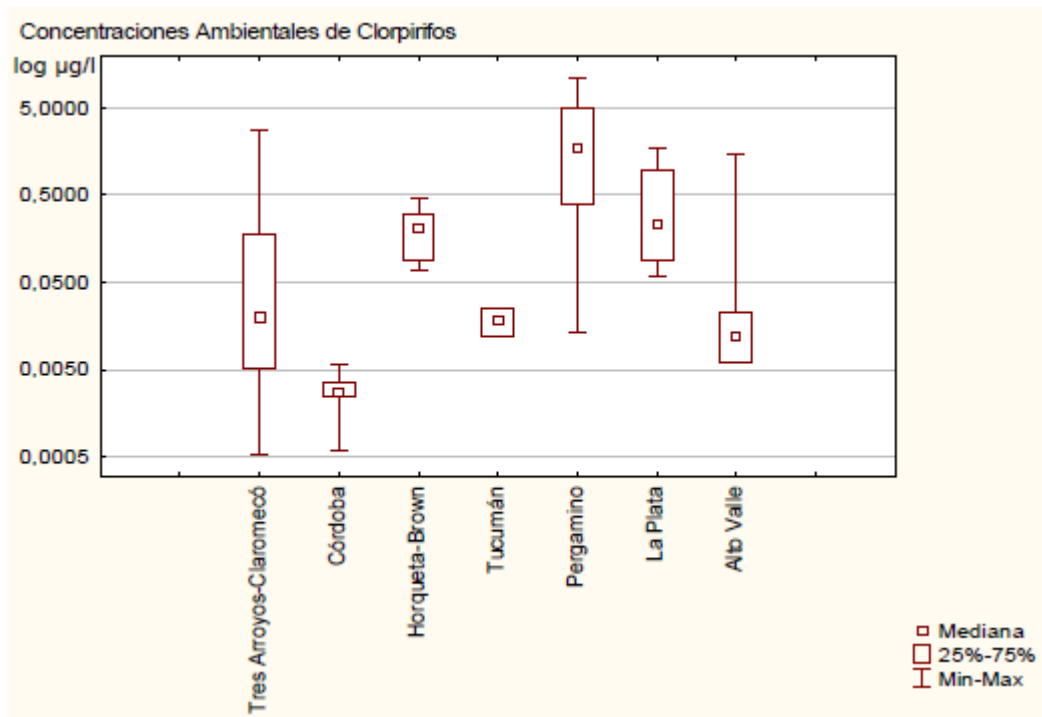


Figura 5.6 Rangos de concentración ambiental de clorpirifos en aguas de distintas regiones del país. Datos para cada zona reportados en: (Alvarez et al., 2019); (Bonansea et al., 2013); (Jergentz et al., 2005); (De Gerónimo et al., 2014); (Marino y Ronco, 2005; Ronco, 2015); (Demetrio, 2012); comunicación personal de (Macchi et al., 2018).

En el trabajo de (Alvarez et al., 2019) se comparan y reúnen las concentraciones ambientales para la zona de Pampa Húmeda, comparativamente con lo reportado para la región del Alto Valle del Río Negro y Neuquén, realizando el análisis probabilístico conjunto con las Distribuciones de Sensibilidad de Especies para clorpirifos, tanto para efectos agudos como crónicos. Los autores indican que las máximas concentraciones ambientales reportadas para clorpirifos afectarían a un 55% de las especies acuáticas en

forma aguda, mientras que este porcentaje se ubica en un 76% de especies afectadas en forma crónica. Más aún, comparando los valores límite recomendables para la protección de especies acuáticas con las concentraciones ambientales reportadas en Pampa Húmeda para clorpirifos, el 35% de las veces las concentraciones en agua excederían el HC5 para efectos agudos, es decir, se estaría excediendo el límite recomendable; para efectos crónicos de clorpirifos, el porcentaje de veces que las concentraciones en agua exceden el límite recomendable es inaceptable, alcanzando un 96%. Se presenta en la Figura 5.7 un gráfico de Probabilidad Conjunta para los riesgos agudos y crónicos debidos a clorpirifos en especies acuáticas y las concentraciones ambientales esperables de clorpirifos en base a los niveles reportados para la zona Pampa Húmeda (datos recolectados por Álvarez et al., 2019) y para la región frutícola del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (datos provistos por Macchi et al., 2018).

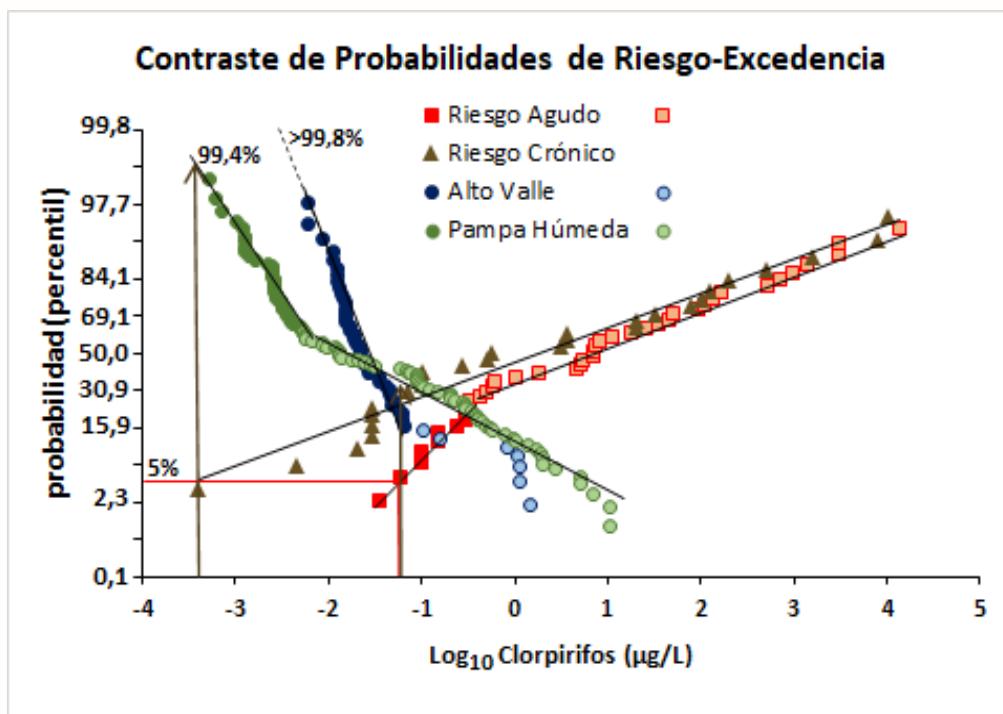


Figura 5.7 Probabilidad Conjunta para la Distribución de Sensibilidad de Especies acuáticas y Concentraciones Ambientales de clorpirifos en aguas de Argentina

Se marcan los niveles de excedencia del HC5 (flechas color marrón) para efectos agudos y crónicos (línea horizontal roja al 5%). Figura basada en la información de Tablas 5.7 y 5.8, Macchi et al. (2018) y Alvarez et al. (2019).

La información que brinda esta figura permite concluir que los riesgos de la exposición a clorpirifos son inaceptables para los organismos acuáticos, principalmente para aquellos efectos a largo plazo. Los niveles de clorpirifos hallados en agua superan cerca del 100% el nivel crítico de especies afectadas según la SSD para efectos crónicos, mientras que para los efectos agudos superan entre un 20 a 40% de las veces según las regiones. Por tanto, es conveniente pasar a una tercera etapa para refinar la Evaluación de Riesgo.

Para el tercer tier, se han considerado los efectos de la exposición a clorpirifos sobre el ensamble de la comunidad de macroinvertebrados bénticos. En este caso, existen varios niveles límite sugeridos para

clorpirifos con el fin de proteger la comunidad béntica. La Comisión Europea ha propuesto un valor límite de 0,1 µg/L para clorpirifos como protección de los ecosistemas acuáticos y de las comunidades de macroinvertebrados, tomando este valor como concentración predicha de no efecto (NOEC) para el ecosistema acuático (European Commission, 2005), indicando que concentraciones de clorpirifos desde 1 µg/L ya provocan efectos relevantes sobre los ecosistemas acuáticos de Europa. En consonancia, Brock et al., (2006) consideran este límite de protección de 0,1 µg/L para clorpirifos analizando la información de microcosmos y mesocosmos en un modelo ecosistémico utilizado como tier 3. Una revisión posterior de datos de ecotoxicidad en microcosmos y mesocosmos aplicados a la Evaluación de Riesgo de clorpirifos en EE. UU, tomando también en consideración el valor de HC5 de la Distribución de Sensibilidad de Especies como protector de los ecosistemas, mantiene el valor de 0,1 µg/L para clorpirifos como suficiente (Giddings et al., 2014). Este valor límite de 0,1 µg de clorpirifos/L estaría excedido un 31% de las veces en aguas de la región de la Pampa Húmeda según puede estimarse en el modelo ajustado de la Figura 5.7. Una medida más conservativa como límite propone el uso de la CL50 para la especie más sensible del ensamble de macroinvertebrados o del ecosistema, multiplicado por un factor de 0,05 (van den Brink et al., 2002). Esta aproximación, utilizando la CL50 para *Daphnia magna*, arroja un valor límite de 0,05 µg/L, y se encuentra excedido en 41% de probabilidad en aguas de la Pampa Húmeda. Sin embargo, un estudio basado en la recopilación de los efectos de plaguicidas en comunidades de invertebrados acuáticos de diferentes partes del mundo encuentra efectos significativos muy por debajo del límite sugerido en los Principios Uniformes de la Unión Europea para el registro de plaguicidas únicos, de 1/100 de la CE50 para *Daphnia magna*. En consecuencia, un valor límite de 1/1000 de la CE50 aguda para *Daphnia magna* es sugerido para la derivación de Estándares de Calidad Ambiental (Schäfer et al., 2012). Este es el valor límite más conservativo y apropiado a aplicar para la protección del ensamble de macroinvertebrados bentónicos, dando una concentración máxima de 1 ng/L para clorpirifos en aguas. Este límite máximo, aplicado a las concentraciones ambientales registradas para clorpirifos en aguas superficiales de Argentina demuestra ser excedido en el 95,6% de los casos, lo cual es también inaceptable desde el punto de vista de los impactos ambientales esperados. Por otra parte, este valor límite para los efectos sobre la comunidad béntica es muy cercano al límite de protección de efectos crónicos para especies acuáticas determinado en la Distribución de Sensibilidad de Especies a través del parámetro HC5 que protege al 95% de las especies (Alvarez et al., 2019).

Dado que el límite de protección para la comunidad de invertebrados acuáticos está ampliamente excedido por las concentraciones ambientales registradas de clorpirifos en aguas, es necesario pasar a la última etapa de refinamiento en la Evaluación de Riesgo, que considera los efectos en estudios realizados a campo sobre organismos, poblaciones y ecosistema en general, además de otros aspectos como la posibilidad de recuperación de los mismos a través de distintos mecanismos. En este aspecto, no son muchos los estudios que se han abocado a esta problemática en Argentina. Varios de estos estudios se han descrito

en el punto previo sobre los efectos del clorpirifos sobre los macroinvertebrados acuáticos y el ensamble de las comunidades bénticas. En forma resumida, se han reportado tasas de mortalidad que van del 30 al 100% para *Hyalella curvispina* en arroyos contaminados con clorpirifos (Jergentz et al., 2004; Mugni et al., 2011). Los ensambles comunitarios de macroinvertebrados se afectan estacionalmente en cursos de agua de la Pampa Húmeda, incrementándose la abundancia relativa de los taxones más resistentes y disminuyendo la abundancia de aquellos grupos sensibles (Crettaz-Minaglia et al., 2014), lo que altera profundamente el equilibrio comunitario ecosistémico. Estos cambios en la estructura de la comunidad béntica están correlacionados con las concentraciones de insecticidas en aguas, siendo clorpirifos uno de los principales (Hunt et al., 2017). Las comunidades bénticas en los canales, arroyos y ríos en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén se ven afectadas estacionalmente por las contaminaciones derivadas del uso de plaguicidas en los tratamientos fitosanitarios de la producción frutícola. Dichas comunidades se impactan negativamente en forma correlativa con la detección de picos de contaminación principalmente por clorpirifos durante las aplicaciones, disminuyendo significativamente la abundancia y la riqueza taxonómica, con un desbalance también hacia la predominancia de especies resistentes en detrimento de las especies más sensibles (Macchi et al., 2018). Estos cambios en la estructura comunitaria también se pueden ver reforzados a largo plazo, por la aparición de poblaciones resistentes en algunas especies, como la resistencia reportada para poblaciones de *Hyalella curvispina* en canales de riego, drenajes y arroyos contaminados en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Anguiano et al., 2014; del Brio et al., 2018).

Finalmente, puede concluirse que el clorpirifos impacta profundamente en las especies acuáticas de la República Argentina. Si bien no está establecido el grado de afectación o un mapeo de la situación actual, los riesgos ambientales del uso frecuente y excesivo de clorpirifos y/o los modos de su aplicación que pueden implicar una mayor transferencia indeseada a los cursos de agua, significan una seria preocupación por las consecuencias que puedan generar en el mediano plazo.

5.5 Conclusiones

Los trabajos analizados en este capítulo aportan evidencia clara respecto de la toxicidad que clorpirifos ejerce sobre organismos acuáticos, su transporte a largas distancias y su potencial de bioacumulación. Dichos trabajos aportan datos consistentes con los que recientemente ha postulado la Comisión de Compuestos Químicos de la Unión Europea, ECHA, para sustentar la propuesta de incorporación de clorpirifos como COP ante el Convenio de Estocolmo (<https://echa.europa.eu/documents/10162/bb4342c2-64f1-d184-e8d8-334f02842f9b>).

El relevamiento bibliográfico demuestra que el clorpirifos ejerce múltiples efectos dañinos sobre los organismos acuáticos. Los efectos observados incluyen alteraciones del crecimiento, del desarrollo, de la

reproducción, del comportamiento, del sistema inmune y endocrino y de parámetros bioquímicos relacionados a esterasas y estrés oxidativo, entre otros procesos. A nivel histopatológico, clorpirifos afecta tejidos como gónadas, branquias, cerebro, intestino, hígado y riñones, lo cual afecta la respiración, la regulación iónica y osmótica, la capacidad de absorción y reserva de nutrientes, la capacidad de detoxificación, el crecimiento y la reproducción, entre otros procesos.

Los efectos neurotóxicos subletales observados a nivel individual (que en peces se manifiestan desde concentraciones que son de 1 a 3 órdenes de magnitud inferiores a la CL50) podrían afectar la supervivencia de los individuos expuestos y tener repercusiones a nivel poblacional, ya que pueden afectar la capacidad de selección de hábitat, la conducta migratoria, la respuesta de escape frente a predadores y/o la capacidad para capturar presas, la comunicación entre individuos, la respuesta frente a enfermedades infecciosas, etc.

A nivel de comunidad, se ha comprobado que la exposición a clorpirifos altera la composición taxonómica y estructura de las comunidades de macroinvertebrados, siendo este grupo considerado como el más sensible frente a plaguicidas organofosforados.

Los niveles ambientales esperados de clorpirifos en aguas superficiales prácticamente de toda la República Argentina y las frecuencias de detección que han sido observadas en las últimas décadas sugieren que los riesgos y los niveles de daño sobre los organismos acuáticos son elevados, calificándolos como inaceptables.

5.6 Referencias Bibliográficas

- Agostini M, Kacolis F, Demetrio P, Natale G, Bonetto C, Ronco A. 2013. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Dis. Aquat. Organ.* 104, 163–171. <https://doi.org/10.3354/dao02592>
- Agostini MG, Roesler I, Bonetto C, Ronco AE, Bilenca D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biol. Conserv.* 241, 108355. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>
- Aitte SA. 2018. Study the Effect of the Duration Exposure for Lethal and Sub-Lethal Concentrations of Organophosphorus Chlorpyrifos Pesticide for Freshwater Fish Common Carp (*Cyprinus carpio*) (Linn) and Liza abu (Haeckel) Fishes. *J. Chem. Pharm. Res.* 10 (6), 48-57.
- Ali M, Majid M, Hussain I, Kali S, Naz T, Niazi MBK, Khan MRA, Zafar MI. 2020. Chlorpyrifos mediated oxidative damage and histopathological alterations in freshwater fish *Oncorhynchus mykiss* in Northern Pakistan. *Aquaculture Research.* 51 (11), 4583-4594. DOI: 10.1111/are.14804
- Altun S, Ozdemir S, Arslan H. 2017. Histopathological effects, responses of oxidative stress, inflammation, apoptosis biomarkers and alteration of gene expressions related to apoptosis, oxidative stress, and reproductive system in chlorpyrifos exposed common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Pollut.* 230, 432-443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.085>
- Alvarez M, Du Mortier C, Jaureguiberry S, Venturino A. 2019. Joint probabilistic analysis of risk for aquatic species and exceedence frequency for the agricultural use of chlorpyrifos in the Pampean region, Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1748–1755. <https://doi.org/10.1002/etc.4441>
- Alvarez M. 2014. Estudios tendientes a establecer el comportamiento ambiental del insecticida clorpirifos en ambientes acuáticos de Tres Arroyos, Prov. de Buenos Aires. Tesis doctoral. Fac. Ciencias Vet. Univ. Buenos Aires, Argentina.
- Anderson BS, Phillips BM, Hunt JW, Connor V, Richard N, Tjeerdema RS. 2006. Identifying primary stressors impacting macroinvertebrates in the Salinas River (California, USA): Relative effects of pesticides and suspended particles. *Environ. Pollut.* 141, 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.056>
- Anderson T, Liu J, McMurry S, Pope C. 2018. Comparative in vitro and in vivo effects of chlorpyrifos oxon in the outbred CD-1 mouse (*Mus musculus*) and great plains toad (*Anaxyrus cognatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1898–1906. <https://doi.org/10.1002/etc.4139>
- Anderson T, Lydy M. 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1507–1514.
- Anguiano OL, Caballero de Castro A, Pechen de D'Angelo AM. 2001. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 128, 35–43. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(00\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(00)00174-5)
- Anguiano OL, Castro C, Venturino A, Ferrari A. 2014. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyalella curvispina*. *Environ. Toxicol.* 29, 1043-1053.
- Argemi F. 2020. Efectos letales y subletales en peces por la exposición a agroquímicos empleados en cultivos de la provincia de Buenos Aires. Tesis doctoral. Fac. Ciencias Exactas y Naturales. Univ. Buenos Aires, Argentina.
- Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Cabagna-Zenkhusen M, Junges CM, Lorenzatti E, Aró C, Grenón P. 2015. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.021>
- Attademo AM, Sanchez-Hernandez JC, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C. 2017. Effect of diet on carboxylesterase activity of tadpoles (*Rhinella arenarum*) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.012>
- Banaee M, Haghi BN, Ibrahim ATA. 2013. Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos on Common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758): biochemical response. *Int. J. Aquat. Biol.* 1(6), 281-288. DOI: <https://doi.org/10.22034/ijab.v1i6.144>
- Bandara MGDK, Wijesinghe MR, Ratnasooriya WD, Priyani AAH. 2012. Chlorpyrifos-induced Histopathological Alterations in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) Tadpoles: Evidence from Empirical Trials. *J. Trop. For. Environ.* 2, 27–36. <https://doi.org/10.31357/jtfe.v2i2.592>
- Barbour MT, Stribling JB, Verdonschot PFM. 2006. The multihabitat approach of USEPA's rapid bioassessment protocols: Benthic macroinvertebrates. *Limnetica* 25, 839-850.

- Barreto E, Salgado Costa C, Demetrio P, Lascano C, Venturino A, Natale GS. 2020. Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) Tadpoles to Environmentally Relevant Concentrations of Chlorpyrifos: Effects at the Individual and Biochemical Levels. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 834–841. <https://doi.org/10.1002/etc.4664>
- Beiras R, Bellas J. 2008. Inhibition of embryo development of the *Mytilus galloprovincialis* marine mussel by organic pollutants; assessment of risk for its extensive culture in the Galician Rias. *Aquaculture* 277, 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.002>
- Bellas J, Beiras R, Mariño-Balsa JC, Fernández N. 2005. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: A comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14, 337–353. <https://doi.org/10.1007/s10646-004-6370-y>
- Berenzen N, Kumke T, Schulz HK, Schulz R. 2005. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: Impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.010>
- Bernabò I, Gallo L, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E. 2011a. Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 315A, 314–327. <https://doi.org/10.1002/jez.678>
- Bernabò I, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E. 2011b. Toxicity of Chlorpyrifos to Larval *Rana dalmatina*: Acute and Chronic Effects on Survival, Development, Growth and Gill Apparatus. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 704–718. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9655-1>
- Bernal-Rey DL, Cantera CG, dos Santos Afonso M, Menéndez-Helman RJ. 2020. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109673. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109673>
- Bernal-Rey DL, Dos Santos Afonso M, Menendez-Helman RJ. 2017. Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity in two freshwater fish species (*Cnesterodon decemmaculatus* and *Gambusia affinis*). *Int. J. Environ. Heal.* 8, 316–330. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2017.088113>
- Bertucci F, Jacob H, Mignucci A, Gache C, Roux N, Besson M, Berthe C, Metian M, Lecchini D. 2018. Decreased retention of olfactory predator recognition in juvenile surgeon fish exposed to pesticide. *Chemosphere* 208, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.017>
- Besson M, Gache C, Bertucci F, Brooker RM, Roux N, Jacob H, Berthe C, Sovrano VA, Dixon DL, Lecchini D. 2017. Exposure to agricultural pesticide impairs visual lateralization in a larval coral reef fish. *Sci. Rep.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09381-0>
- Bhatnagar A, Yadav AS, Cheema N. 2016. Genotoxic Effects of Chlorpyrifos in Freshwater Fish *Cirrhinus mrigala* Using Micronucleus Assay. *Adv. Biol.* 2016, Article ID 9276963, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9276963>
- Bishop CA, Ashpole SL, Edwards AM, van Aggelen G, Elliott JE. 2010. Hatching success and pesticide exposures in amphibians living in agricultural habitats of the South Okanagan Valley, British Columbia, Canada (2004–2006). *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1593–1603. <https://doi.org/10.1002/etc.202>
- Bonada N, Rieradevall M, Prat N, Resh VH. 2006. Benthic macroinvertebrate assemblages and macrohabitat connectivity in Mediterranean-climate streams of northern California. *J. North Am. Benthol. Soc.* 25, 32–43. [https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[32:BMAAMC\]2.0.CO;2](https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1899/0887-3593(2006)25[32:BMAAMC]2.0.CO;2)
- Bonada N, Rieradevall M, Prat N. 2007. Macroinvertebrate community structure and biological traits related to flow permanence in a Mediterranean river network. *Hydrobiologia* 589, 91–106. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0723-5>
- Bonansea RI, Amé MV, Wunderlin DA. 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere* 90, 1860–1869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.007>
- Bonansea RI, Marino DJG, Bertrand L, Wunderlin DA, Amé MV. 2016a. Tissue-specific bioconcentration and biotransformation of cypermethrin and chlorpyrifos in a native fish (*Jenynsia multidentata*) exposed to these insecticides singly and in mixtures. *Environ Toxicol Chem.* 36 (7), 1764–1774. <https://doi.org/10.1002/etc.3613>
- Bonansea RI, Wunderlin DA, Amé MV. 2016b. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.043>
- Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Andrioletti M, Bacchetta R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara C. 2004. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquat. Toxicol.* 70, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.09.007>



- Bonifacio AF, Ballesteros ML, Bonansea RI, Filippi I, Amé MV, Hued AC. 2017. Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 188, 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.156>
- Bonifacio AF, Cazenave J, Bacchetta C, Ballesteros ML, De Los Ángeles Bistoni M, Amé MV, Bertrand L, Hued AC. 2016. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecol. Indic.* 67, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.011>
- Bonifacio AF, Zambrano MJ, Hued AC. 2020. Integrated ecotoxicological assessment of the complex interactions between chlorpyrifos and glyphosate on a non-target species *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Chemosphere*. 261, Article 127782. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127782>
- Boone JS, Chambers UE. 1996. Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fundam. Appl. Toxicol.* 29, 202-207. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0023>
- Bringolf RB, Cope WG, Barnhart MC, Mosher S, Lazaro PR, Shea D. 2007. Acute and chronic toxicity of pesticide formulations (atrazine, chlorpyrifos, and permethrin) to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(10), 2101-2107. <https://doi.org/10.1897/06-555R.1>
- Brock TC, Arts GH, Maltby L, Van den Brink PJ. 2006. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union Legislation. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2, 20-46. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630020402>
- Brodeur JC, Suarez RP, Natale GS, Ronco AE, Elena Zaccagnini M. 2011. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1370–1380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>
- Buchwalter DB, Jenkins JJ, Curtis LR. 2002. Respiratory strategy is a major determinant of [3H]water and [14C]chlorpyrifos uptake in aquatic insects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1315-1322. <https://doi.org/10.1139/f02-107>
- Buckler D, Mayer F, Eilersieck M, Asfaw A. 2003. Evaluation of minimum data requirements for acute toxicity value extrapolation with aquatic organisms : final report. U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Gulf Ecology Division
- Buono S, Manzo S, Maria G, Sansone G. 2012. Toxic effects of pentachlorophenol, azinphos-methyl and chlorpyrifos on the development of *Paracentrotus lividus* embryos. *Ecotoxicology* 21, 688-697. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0827-6>
- California Department of Pesticide Regulation. 2000. Report: Summary of Pesticide Use Report Data Indexed by Chemical. Sacramento, CA.
- Calumpang SMF, Medina MJB, Tejada AW, Medina JR. 1997. Toxicity of Chlorpyrifos, Fenubucarb, Monocrotophos, and Methyl Parathion to Fish and Frogs After a Simulated Overflow of Paddy Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 909–914. <https://doi.org/10.1007/s001289900420>
- Canadian Council of Ministers of the Environment. 2008. Canadian environmental quality guidelines for the protection of aquatic life: Chlorpyrifos. *Can. Environ. Qual. Guidel.* 1999, Canadian Counc. Minist. Environ. Winnipeg 1-9.
- Caramello CS, Cowper CF, Jorge MJ, Pérez JE, Jorge LC. 2019. Anormalidades morfológicas nucleares en hematías del pez *Prochilodus lineatus* expuesto al clorpirifos. *Rev. Vet.* 30, 64. <https://doi.org/10.30972/vet.3024136>
- Carriquiriborde P. 2010. Toxicidad de Glifosato en Peces Autóctonos: Estudios de Laboratorio y Campo. *Taller Asp. Ambient. del Uso Glifosato.* 53-64.
- CCME. 2008. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Chlorpyrifos. Technical Report, Canadian Council of Ministers of the Environment.
- Ceschin DG. 2017. Toxicogenomics: new strategies for ecotoxicology studies in autochthonous species II. The “omic” era in non-model species. Transcriptome analysis for biomarker screening. *Int. J. Environ. Heal.* 8, 213. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2017.086180>
- Ceschin DG, Pires NS, Mardirosian MN, Lascano CI, Venturino A. 2020. The *Rhinella arenarum* transcriptome: de novo assembly, annotation and gene prediction. *Sci. Rep.* 10, 1053. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57961-4>

- Colombo A, Orsi F, Bonfanti P. 2005. Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere* 61, 1665–1671. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.005>
- Cornejo A, Tonin AM, Checa B, Tuñón AR, Pérez D, Coronado E, González S, Ríos T, Macchi P, Correa-Araneda F, Boyero L. 2019. Effects of multiple stressors associated with agriculture on stream macroinvertebrate communities in a tropical catchment. *PLoS One* 14, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220528>
- Cothran RD, Brown JM, Relyea RA. 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evol. Appl.* 6, 832–841. <https://doi.org/10.1111/eva.12069>
- Crettaz-Minaglia M, Juárez R, Aguer I, Borro E, Peruzzo R. 2014. Aplicación de índices de calidad de agua en un arroyo pampeano utilizando macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores (Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina). *Biol. Acuática* 30, 93-105.
- Cuppen JGM, Crum SJH, Van Den Heuvel HH, Smidt RA, Van Den Brink PJ. 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: I. Fate of chlorpyrifos and lindane and responses of macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 11, 165-180. <https://doi.org/10.1023/A:1015470731330>
- Cuzziol Boccioni AP, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Martinuzzi CS. 2020. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere. Article* 128475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128475>
- Da Rosa G. 2019. Determinación de la Presencia de Contaminantes en Sedimentos y Peces del Río de La Plata. *Inf. Práctica Prof. Supervisada. UTN La Plata*, 1-10.
- da Silva MB, Fraga RE, Nishiyama PB, Costa NLB, da Silva ISS, Queiroz TS, Rocha MA, Juncá FA. 2020a. Genotoxic effect of the insecticide Chlorpyrifos on the erythrocytes of *Odontophrynus carvalhoi* tadpoles (Amphibia: Odontophrynidae). *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 15, 9–13. <https://doi.org/10.5132/eec.2020.01.02>
- da Silva MB, Fraga RE, Nishiyama PB, da Silva ISS, Costa NL., de Oliveira LAA, Rocha MA, Juncá FA. 2020b. Leukocyte Profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) Tadpoles Exposed to Organophosphate Chlorpyrifos Pesticides. *Water, Air, Soil Pollut.* 231, 372. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04726-4>
- Datta S, Hansen L, McConnell L, Baker J, LeNoir J, Seiber JN. 1998. Pesticides and PCB Contaminants in Fish and Tadpoles from the Kaweah River Basin, California. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 829–836. <https://doi.org/10.1007/s001289900702>
- Davidson C, Stanley K, Simonich SM. 2012. Contaminant residues and declines of the Cascades frog (*Rana cascadae*) in the California Cascades, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1895–1902. <https://doi.org/10.1002/etc.1902>
- Davidson C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 14, 1892–1902. <https://doi.org/10.1890/03-5224>
- De Anna JS. 2019. Efectos de la interacción entre compuestos tóxicos en Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctoral. CRUB. Univ. Nac. del Comahue. Bariloche, Argentina.
- De Gerónimo E, Aparicio VC, Bárbaro S, Portocarrero R, Jaime S, Costa JL. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>
- De Silva PMCS, Samayawardhena LA. 2005. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* 58, 1293-1299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.030>
- del Brio J, Montagna CM, Lares BA, Parolo ME, Venturino A. 2018. Chemical characterization and toxicity of water-accommodated fraction of oil on the South American native species *Hyalella curvispina*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 60. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.022>
- Demetrio P. 2012. Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.
- Díaz S, Settele J, Brondízio ES, Ngo HT, Agard J, Arneth A, Balvanera P, Brauman KA, Butchart SHM, Chan KMA, Garibaldi LA, Ichii K, Liu J, Subramanian SM, Midgley GF, Miloslavich P, Molnár Z, Obura D, Pfaff A, Polasky S, Purvis A, Razaque J, Reyers B, Chowdhury RR, Shin Y-J, Visseren-Hamakers I, Willis KJ, Zayas CN. 2019. Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science* (80-.). 366, eaax3100. <https://doi.org/10.1126/science.aax3100>

- Dimitrie DA, Sparling DW. 2014. Joint Toxicity of Chlorpyrifos and Endosulfan to Pacific Treefrog (*Pseudacris regilla*) Tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 444–452. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0062-2>
- Dzul-Caamal R, Lilia Domínguez-López M, García-Latorre E, Vega-López A. 2012. Implications of cytochrome 450 isoenzymes, aryl-esterase and oxonase activity in the inhibition of the acetylcholinesterase of *Chiostoma jordani* treated with phosphorothionate pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.008>
- ECOFRAM. 1999. Ecological committee on FIFRA risk assessment methods: report of the aquatic workgroup. Washington, D.C.
- Eder KJ, Köhler HR, Werner I. 2007. Pesticide and pathogen: Heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1233-1242. <https://doi.org/10.1897/05-462R2.1>
- Edwin T, Ihsan T, Rahmatika A, Darlis N. 2019. Impact of chlorpyrifos toxicity on gill damage of two species of freshwater fish in Lake Diatas. *Environ. Health Eng. Manag.* 6 (4), 241–246. doi: 10.15171/EHEM.2019.27.
- Egler M, Buss D, Moreira J, Baptista D. 2012. Influence of agricultural land-use and pesticides on benthic macroinvertebrate assemblages in an agricultural river basin in southeast Brazil. *Brazilian J. Biol.* 72, 437-443. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000300004>
- El-Amrani S, Pena-Abaurrea M, Sanz-Landaluze J, Ramos L, Guinea J, Cámara C. 2012. Bioconcentration of pesticides in Zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 425, 184–190. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.02.065
- El-Merhibi A, Kumar A, Smeaton T. 2004. Role of piperonyl butoxide in the toxicity of chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia* and *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 202–212. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00082-4)
- EPA U. 1994. US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs. Data Evaluation Record. MRID No. 426649-01. Mysis Chlorpyrifos Chronic.
- EPA U. 2002. Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. EPA 738-R-01-007. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. WASHINGTON D.C. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/chlorpyrifos_ired.pdf, EPA/IREDD.
- EPA U. 2017. Technical Overview of Ecological Risk Assessment: Risk Characterization [WWW Document]. US Environ. Prot. Agency Off. Pestic. URL <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-risk>
- European Commission. 2005. Common implementation strategy for the Water Framework Directive. Environmental quality standards (EQS) substance datasheet. Priority substance no. 9, chlorpyrifos. CAS no. 2921-88-2. Brussels, Belgium. <https://circabc.europa.eu/sd/d/b19baa2f-04e6-4c23-ab>.
- Fellers GM, McConnell LL, Pratt D, Datta S. 2004. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2170. <https://doi.org/10.1897/03-491>
- Ferrari A, Anguiano L, Lascano C, Sotomayor V, Rosenbaum E, Venturino A. 2008. Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 259–267. <https://doi.org/10.1002/jbt.20236>
- Ferrari A. 2009. Chapter 2: Primary and secondary targets of action-response to AChE pesticide exposure in fish: Trends in underlying molecular mechanisms, en: Kanzantzakis, C.M. (Ed.), *Progress in Pesticides Research*, Kanzantzakis, C.M. (Ed.). pp. 357-369. <https://doi.org/10.1002/mrdd>
- Fulton MH, Key PB. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Gaizick L, Gupta G, Bass E. 2001. Toxicity of Chlorpyrifos to *Rana pipiens* Embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 386–391. <https://doi.org/10.1007/s001280017>
- Galdean N, Callisto M, Barbosa FA. 2001. Biodiversity assessment of benthic macroinvertebrates in altitudinal lotic ecosystems of Serra do Cipó (MG, Brazil). *Braz. J. Biol.* 61, 239-248. <https://doi.org/10.1590/s0034-71082001000200006>
- Gallo-Delgado SM, Palacio-Baena JA, Gutiérrez-C P. 2006. Efectos del insecticida clorpirifos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae). *Actual Biol* 28, 51-58.



- Gebremariam SY, Beutel MW, Yonge DR, Flury M, Harsh JB. 2012. Adsorption and Desorption of Chlorpyrifos to Soils and Sediments. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 215. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1463-6>
- Giddings JM, Williams MW, Solomon KR, Giesy JP. 2014. Risks to Aquatic Organisms from Use of Chlorpyrifos in the United States, en: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States.* pp. 119-162. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_5
- Gutierrez MF, Molina FR, Frau D, Mayora G, Battauz Y. 2020. Interactive effects of fish predation and sublethal insecticide concentrations on freshwater zooplankton communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196, 110497. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110497>
- Hasenbein S, Connon RE, Lawler SP, Geist J. 2015. A comparison of the sublethal and lethal toxicity of four pesticides in *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 11327-11339. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4374-1>
- Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE. 2016. A long-term assessment of pesticide mixture effects on aquatic invertebrate communities. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 218-232. <https://doi.org/10.1002/etc.3187>
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks TM, Butchart SHM, Carpenter KE, Chanson J, Collen B, Cox NA, Darwall WRT, Dulvy NK, Harrison LR, Katariya V, Pollock CM, Quader S, Richman NI, Rodrigues ASL, Tognelli MF, Vié J-C, Aguiar JM, Allen DJ, Allen GR, Amori G, Ananjeva NB, Andreone F, Andrew P, Ortiz ALA, Baillie JEM, Baldi R, Bell BD, Biju SD, Bird JP, Black-Decima P, Blanc JJ, Bolaños F, Bolivar-G. W, Burfield IJ, Burton JA, Capper DR, Castro F, Catullo G, Cavanagh RD, Channing A, Chao NL, Chenery AM, Chiozza F, Clausnitzer V, Collar NJ, Collett LC, Collette BB, Fernandez CFC, Craig MT, Crosby MJ, Cumberlidge N, Cuttelod A, Derocher AE, Diesmos AC, Donaldson JS, Duckworth JW, Dutson G, Dutta SK, Emslie RH, Farjon A, Fowler S, Freyhof J, Garshelis DL, Gerlach J, Gower DJ, Grant TD, Hammerson GA, Harris RB, Heaney LR, Hedges SB, Hero J-M, Hughes B, Hussain SA, Icochea M. J, Inger RF, Ishii N, Iskandar DT, Jenkins RKB, Kaneko Y, Kottelat M, Kovacs KM, Kuzmin SL, La Marca E, Lamoreux JF, Lau MWN, Lavilla EO, Leus K, Lewison RL, Lichtenstein G, Livingstone SR, Lukoschek V, Mallon DP, McGowan PJK, McIvor A, Moehلمان PD, Molur S, Alonso AM, Musick JA, Nowell K, Nussbaum RA, Olech W, Orlov NL, Papenfuss TJ, Parra-Olea G, Perrin WF, Polidoro BA, Pourkazemi M, Racey PA, Ragle JS, Ram M, Rathbun G, Reynolds RP, Rhodin AGJ, Richards SJ, Rodríguez LO, Ron SR, Rondinini C, Rylands AB, Sadovy de Mitcheson Y, Sanciangco JC, Sanders KL, Santos-Barrera G, Schipper J, Self-Sullivan C, Shi Y, Shoemaker A, Short FT, Sillero-Zubiri C, Silvano DL, Smith KG, Smith AT, Snoeks J, Stattersfield AJ, Symes AJ, Taber AB, Talukdar BK, Temple HJ, Timmins R, Tobias JA, Tsytsulina K, Tweddle D, Ubeda C, Valenti S V., Paul van Dijk P, Veiga LM, Veloso A, Wege DC, Wilkinson M, Williamson EA, Xie F, Young BE, Akçakaya HR, Bennun L, Blackburn TM, Boitani L, Dublin HT, da Fonseca GAB, Gascon C, Lacher TE, Mace GM, Mainka SA, McNeely JA, Mittermeier RA, Reid GM, Rodriguez JP, Rosenberg AA, Samways MJ, Smart J, Stein BA, Stuart SN. 2010. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science* (80-.). 330, 1503–1509. <https://doi.org/10.1126/science.1194442>
- Hooftman R, van de Gutche K, Roghair C. 1993. Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint Report N° 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. <https://rivm.openrepository.com/bitstream/handle/10029/10412/719102022.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hua J, Jones DK, Relyea RA. 2014. Induced Tolerance from a Sublethal Insecticide Leads to Cross-Tolerance to Other Insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4078–4085. <https://doi.org/10.1021/es500278f>
- Hua J, Morehouse NI, Relyea R. 2013. Pesticide tolerance in amphibians: induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evol. Appl.* 6, 1028–1040. <https://doi.org/10.1111/eva.12083>
- Huang X, Cui H, Duan W. 2020. Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 200. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110731>
- Huespe I, Cabagna-Zenklusen M, Curi LM, Peltzer P, Attademo MA, Villafañe N, Lajmanovich RC. 2017. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta Biológica Colomb.* 22, 234–237. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.60823>
- Humphrey C, Klumpp DW. 2003. Toxicity of Chlorpyrifos to the Early Life History Stages of Eastern Rainbowfish *Melanotaenia splendida splendida* (Peters 1866) in Tropical Australia. *Environ. Toxicol.* 18, 418–427. DOI 10.1002/tox.10144
- Hunt L, Bonetto C, Marrochi N, Scalise A, Fanelli S, Liess M, Lydy MJ, Chiu MC, Resh VH. 2017. Species at Risk (SPEAR) index indicates effects of insecticides on stream invertebrate communities in soy production

- regions of the Argentine Pampas. *Sci. Total Environ.* 580, 699-709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.016>
- Ibrahim W, Furu P, Ibrahim AM, Christensen NO. 1992. Effect of the organophosphorous insecticide, chlorpyrifos (Dursban), on growth, fecundity and mortality of *Biomphalaria alexandrina* and on the production of *Schistosoma mansoni* cercariae in the snail. *J. Helminthol.* 66, 79-88. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00012633>
- Ismail M, Ali R, Shahid M, Khan MA, Zubair M, Ali T, Khan QM. 2017. Genotoxic and hematological effects of chlorpyrifos exposure on freshwater fish *Labeo rohita*. *Drug Chem. Toxicol.* 1-5. DOI: 10.1080/01480545.2017.1280047
- Jarvinen AW, Nordling BR, Henry ME. 1983. Chronic toxicity of Dursban (Chlorpyrifos) to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) and the resultant acetylcholinesterase inhibition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7, 423-434. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(83\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(83)90008-8)
- Jayawardena UA, Navaratne AN, Amerasinghe PH, Rajakaruna RS. 2011. Acute and chronic toxicity of four commonly used agricultural pesticides on the Asian common toad, *Bufo melanostictus schneideri*. *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka* 39, 267-276. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v39i3.3631>
- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61, 817-826. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.036>
- Jergentz S, Pessacq P, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.007>
- Khalil F, Kang IJ, Undap S, Tasmin R, Qiu X, Shimasaki Y, Oshima Y. 2013. Alterations in social behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemos.* 92, 125-130. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.042
- Kharkongor M, Hooroo RNK, Dey S. 2018. Effects of the insecticide chlorpyrifos, on hatching, mortality and morphology of *Duttaphrynus melanostictus* embryos. *Chemosphere* 210, 917-921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.097>
- Khatun N, Rahman T, Mahanta R. 2016. Histopathological Studies of Chlorpyrifos Toxicity in Catfish. *Glob. J. Med. Res. C.* 16, 3, 49-54.
- Lajmanovich RC, Attademo AM, Simoniello MF, Poletta GL, Junges CM, Peltzer PM, Grenón P, Cabagna-Zenkhusen MC. 2015. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 427. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>
- Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Colussi CL, Martinuzzi CS. 2018. Blood biomarkers of common toad *Rhinella arenarum* following chlorpyrifos dermal exposure. *Interdiscip. Toxicol.* 11, 148-154. <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0011>
- Leight AK, Van Dolah RF. 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 958-964. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180521>
- Li L, Zheng B, Liu L. 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environ. Sci.* 2, 1510-1524. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>
- Liendro N, Ferrari A, Mardirosian M, Lascano CI, Venturino A. 2015. Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.022>
- Liess M, Ohe PC Von Der. 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954-965. <https://doi.org/10.1897/03-652.1>
- Loeb S, Spacie A. 1994. *Biological Monitoring of Aquatic Systems*. CRC Press.
- López Aca V, Gonzalez PV, Carriquiriborde P. 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicology* 27, 968-979. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1941-5>
- Ma J, Liu Y, Niu D, Li X. 2013. Effects of Chlorpyrifos on the Transcription of CYP3A cDNA, Activity of Acetylcholinesterase, and Oxidative Stress Response of Goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Toxicol.* 30 (4), 422-9. doi: 10.1002/tox.21918
- Mac Loughlin TM, Peluso L, Marino DJG. 2017. Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci. Total Environ.* 598, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.116>

- Macchi P, Loewy RM, Lares B, Latini L, Monza L, Guiñazú N, Montagna CM. 2018. The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 10668-10678. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1330-x>
- Manjunatha B, Philip GH. 2015. Reproductive toxicity of chlorpyrifos tested in zebrafish (*Danio rerio*): Histological and hormonal end points. *Toxicol. Ind. Health*, 1-9. Doi: 10.1177/0748233715589445
- Mardirosian MN. 2015. Ecotoxicología del arsénico y mecanismos de acción en el desarrollo del anfibio *Rhinella arenarum*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Marigoudar SR, Nagarjuna A, Karthikeyan P, Mohan D, Sharma KV. 2018. Comparative toxicity of chlorpyrifos: Sublethal effects on enzyme activities and histopathology of *Mugil cephalus* and *Chanos chanos*. *Chemosphere*, 211, 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.137>
- Marino D, Ronco A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 820-826. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0824-7>
- Marrochi MN. 2018. Impacto de agroquímicos sobre los ensambles de macroinvertebrados en arroyos rurales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67760>
- Maryoung LA, Lavado R, Schlenk D. 2014. Impacts of hypersaline acclimation on the acute toxicity of the organophosphate chlorpyrifos to salmonids. *Aquat. Toxicol.* 152, 284–290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.017>
- Mayer F, Eilersieck M. 1986. Manual of acute toxicity : interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- McClelland SJ, Bendis RJ, Relyea RA, Woodley SK. 2018. Insecticide-induced changes in amphibian brains: How sublethal concentrations of chlorpyrifos directly affect neurodevelopment. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2692–2698. <https://doi.org/10.1002/etc.4240>
- Mhadhbi L, Beiras R. 2012. Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 5917-5930. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1328-9>
- Montagna MC, Collins PA. 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 371-378. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0209-x>
- Montagna MC. 2010. Toxicidad de clorpirifos como elemento activo de un formulado comercial en juveniles del cangrejo *Trichodactylus borellianus*. *Nat. Neotrop.* 41, 31-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.14409/natura.v1i41.3884>
- Moore MT, Huggett DB, Gillespie WB, Rodgers JH, Cooper CM. 1998. Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 152-157. <https://doi.org/10.1007/s002449900299>
- Mugni H, Ronco A, Bonetto C. 2011. Insecticide toxicity to *Hyaella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 350-354. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.030>
- Munn M, Gilliom R. 2001. Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms: U.S. Geological Survey. Water-Resources Investigations Report 01-4077, 55 p. <http://pubs.water.usgs.gov/wri014077>
- Namdeo A, Tembhre M, Sharma R. 2020. Assessment of *Datura stramonium* and Chlorpyrifos-Induced Cytotoxicity in Liver of *Catla catla*. *Asian J. Exp. Sci.* 34, 2, 25-29.
- Nozdrenko DM, Miroshnychenko MS, Soroca VM. 2016. The effect of chlorpyrifos upon ATPase activity of sarcoplasmic reticulum and biomechanics of skeletal muscle contraction. *Ukr. Biochem. J.* 88, 82–88. <https://doi.org/10.15407/ubj88.02.082>
- Olima C, Pablo F, Lim RP. 1997. Comparative tolerance of three populations of the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) to the organophosphate pesticide, chlorpyrifos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 321-328. <https://doi.org/10.1007/s001289900482>
- Olsvik PA, Larsen AK, Berntssen MHG, Goksøyr A, Karlsen OA, Yadetie F, Sanden M, Kristensen T. 2019. Effects of agricultural pesticides in aquafeeds on wild fish feeding on leftover pellets near fish farms. *Front. Genet.* 10:794. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00794>
- Ortiz-Santaliestra ME, Maia JP, Egea-Serrano A, Brühl CA, Lopes I. 2017. Biological relevance of the magnitude of effects (considering mortality, sub-lethal and reproductive effects) observed in studies with

- amphibians and reptiles in view of population level impacts on amphibians and reptiles. EFSA Support. Publ. 14(7), 1251E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1251>
- Overmyer JP, Noblet R, Armbrust KL. 2005. Impacts of lawn-care pesticides on aquatic ecosystems in relation to property value. *Environ. Pollut.* 137, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.006>
- Paracampo A, Solis M, Bonetto C, Mugni H. 2014. Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *Int. J. Environ. Health Res.* 25, 96-103. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.903903>
- Patra RW, Chapman JC, Lim RP, Gehrke PC, Sunderam RM. 2015. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1809-1817. <https://doi.org/10.1002/etc.2990>
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Junges CM, Cabagna-Zenklusen MC, Repetti MR, Sigrist ME, Beldoménico H. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.010>
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sánchez-Hernandez JC, Cabagna MC, Attademo AM, Bassó A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.005>
- Pires N, Maia S, Venturino A, Lascano C. 2020. Differential effects of azinphos-methyl and chlorpyrifos on polyamine oxidative metabolism during the embryonic development of *Rhinella arenarum* and its relation to oxidative stress. *Pestic. Biochem. Physiol.* 163, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.007>
- Portolés T, Ibáñez M, Garlito B, Nácher-Mestre J, Karalazos V, Silva J, Alm M, Serrano R, Pérez-Sánchez J, Hernández F, Berntssen MHG. 2017. Comprehensive strategy for pesticide residue analysis through the production cycle of gilthead sea bream and Atlantic salmon. *Chemosphere* 179, 242-253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.099>
- Printes LB, Callaghan A. 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1241-1247. <https://doi.org/10.1897/03-202>
- Quiroga LB, Sanabria EA, Fornés MW, Bustos DA, Tejedo M. 2019. Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? *Chemosphere* 219, 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.059>
- Raibeemol KP, Chitra KC. 2020. Induction of immunological, hormonal and histological alterations after sublethal exposure of chlorpyrifos in the freshwater fish, *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795). *Fish Shellfish Immunol.* 102, 1-12
- Rakotondravelo ML, Anderson TD, Charlton RE, Zhu KY. 2006. Sublethal effects of three pesticides on larval survivorship, growth, and macromolecule production in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 352-359. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0219-0>
- Rao J, Begum G, Pallela R, Usman PK, Nageswara Rao R. 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 478-483. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005030013>
- Rao JV, Kavitha P, Jakka NM, Sridhar V, Usman PK. 2007. Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp, *Artemia salina* 232, 227-232. doi.org/10.1007/s00244-006-0226-9
- Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363–376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>
- Richards S, Kendall R. 2003. Physical Effects of Chlorpyrifos on two Stages of *Xenopus Laevis*. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 66, 75–91. <https://doi.org/10.1080/15287390306461>
- Richards SM, Kendall RJ. 2002. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1826–35.
- Roast SD, Widdows J, Jones MB. 2000. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 47, 227-241. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00016-8)
- Ronco A. 2015. Algunas respuestas sobre los impactos del uso de plaguicidas para el control de plagas en agroecosistemas de la Región Pampeana. *Cienc. Invest.* 65, 63-71.
- Rosenberg D, Resh V. 1993. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates, en: Rosenberg, D., Resh, V. (Eds.), *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman/Hall, New York, pp. 1-9.

- Rubach MN, Crum SJH, Van Den Brink PJ. 2011. Variability in the dynamics of mortality and immobility responses of freshwater arthropods exposed to chlorpyrifos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 708-721. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9582-6>
- Rutkoski CF, Macagnan N, Folador A, Skovronski VJ, do Amaral AMB, Leitemperger J, Costa MD, Hartmann PA, Müller C, Loro VL, Hartmann MT. 2020. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere* 250, 126162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126162>
- Salgado Costa C, Ronco AE, Trudeau VL, Marino D, Natale GS. 2018. Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environ. Pollut.* 235, 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.096>
- San Segundo L, Martini F, Pablos MV. 2013. Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2018–2025. <https://doi.org/10.1002/etc.2267>
- Sandahl JF, Baldwin DH, Jenkins JJ, Scholz NL. 2004. Odor-evoked field potentials as indicators of sublethal neurotoxicity in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to copper, chlorpyrifos, or esfenvalerate. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 404-413. <https://doi.org/10.1139/f04-011>
- Sansiñena JA, Peluso L, Salgado Costa C, Demetrio PM, Mac Loughlin TM, Marino DJG, Alcalde L, Natale GS. 2018. Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyalella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecol. Indic.* 93, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.061>
- Satapornvanit K, Baird DJ, Little DC. 2009. Laboratory toxicity test and post-exposure feeding inhibition using the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Chemosphere* 74, 1209-1215. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.033>
- Schäfer RB, Pettigrove V, Rose G, Allinson G, Wightwick A, Von Der Ohe PC, Shimeta J, Kühne R, Kefford BJ. 2011. Effects of pesticides monitored with three sampling methods in 24 sites on macroinvertebrates and microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1665-1672. <https://doi.org/10.1021/es103227q>
- Schäfer RB, Von Der Ohe PC, Rasmussen J, Kefford BJ, Beketov MA, Schulz R, Liess M. 2012. Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5134-5142. <https://doi.org/10.1021/es2039882>
- Schlenk D, Lavado R. 2011. Impacts of climate change on hypersaline conditions of estuaries and xenobiotic toxicity. *Aquat. Toxicol.* 105, 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.023>
- Sharbidre AA, Metkari V, Patode P. 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 132-141. [doi:10.1016/j.pestbp.2011.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.09.002)
- Sherrard RM, Murray-Gulde CL, Rodgers JH, Shan YT. 2002. Comparative toxicity of chlorothalonil and chlorpyrifos: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol.* 17, 503-512. <https://doi.org/10.1002/tox.10091>
- Sherratt T, Roberts G, Williams P, Whitfield M, Biggs J, Shillabeer N, Maund S. 1999. A life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2512-2518.
- Solis M, Mugni H, Fanelli S, Bonetto C. 2017. Effect of agrochemicals on macroinvertebrate assemblages in Pampasic streams, Buenos Aires, Argentina. *Environ. Earth Sci.* 76, 180. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6476-1>
- Solis M, Mugni H, Hunt L, Marrochi N, Fanelli S, Bonetto C. 2016. Land use effect on invertebrate assemblages in Pampasic streams (Buenos Aires, Argentina). *Environ. Monit. Assess.* 188, 539. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5545-3>
- Solis M. 2017. Impacto de agroquímicos en arroyos de cuencas rurales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/58758>
- Sotomayor V, Chiriotto TS, Pechen AM, Venturino A. 2015. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 119, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.006>
- Sotomayor V, Lascano C, de D'Angelo AMP, Venturino A. 2012. Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2052–2058. <https://doi.org/10.1002/etc.1921>

- Sparling D, Fellers G. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ. Toxicol.* 28(8), 1696-1703. <https://doi.org/10.1897/08-336.1>
- Sparling DW, Fellers G. 2007. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. *Environ. Pollut.* 147, 535-539. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.036>
- Sparling DW, Fellers GM, McConnell LL. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1591-1595. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200725>
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* (80-.). 306, 1783-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. 2005. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos. Buenos Aires, Argentina. <https://www.mininterior.gov.ar/obras-publicas/pdf/DOCUMENTO35.pdf>.
- Sumon KA, Yesmin MF, Van den Brink PJ, Bosma RH, Peeters ETHM, Rashid H. 2019. Effects of long-term chlorpyrifos exposure on mortality and reproductive tissues of Banded Gourami (*Trichogaster fasciata*). *J. Environ. Sci. Health, B*, 54:7, 549-559. DOI: 10.1080/03601234.2019.1614399
- Sun F, Chen H. 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere.* 71 (10) 1866-1869. [10.1016/j.chemosphere.2008.01.034](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.034)
- Swann JM, Schultz TW, Kennedy JR. 1996. The effects of the organophosphorous insecticides DursbanTM and LorsbanTM on the ciliated epithelium of the frog palate In Vitro. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 188-194. <https://doi.org/10.1007/BF00215797>
- Tapia Vilchez FJ. 2017. Interacción de temperatura y Clorpirifos (PYRINEX®) sobre la estabilidad genética de *Poecilia reticulata* "GUPI". Tesis doctoral. Fac. de Ciencias biológicas. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP. 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 153, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.008>
- Tussellino M, Ronca R, Carotenuto R, Pallotta MM, Furia M, Capriglione T. 2016. Chlorpyrifos exposure affects *fgf8*, *sox9*, and *bmp4* expression required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis in *Xenopus laevis* embryos. *Environ. Mol. Mutagen.* 57, 630-640. <https://doi.org/10.1002/em.22057>
- USEPA. 2002. Interim Reregistration eligibility decision for chlorpyrifos. United States Environ. Prot. Agency.
- Vaira M, Akmentins M, Attademo M, Baldo D, Barrasso D, Barrionuevo S, Basso N, Blotto B, Cairo S, Cajade R, Céspedes J, Corbalán V, Chilote P, Duré M, Falcione C, Ferraro D, Gutierrez R, Marangoni F, Ingaramo R, Junges C, Lajmanovich R, Lescano J, Martinazzo L, Marti R, Moreno L, Natale GS, Pérez Iglesias JM, Peltzer P, Quiroga L, Rosset S, Sanabria E, Sanchez L, Schaefer E, Úbeda C, Zaracho V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuad. Herpetol.* 26, 131-159.
- Vaira M, Akmentins MS, Lavilla EO. 2018. Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina, Cuadernos de Herpetología. [https://doi.org/10.31017/CdH.2018.\(2018-s1\)](https://doi.org/10.31017/CdH.2018.(2018-s1))
- van den Brink PJ, Hartgers EM, Gylstra R, Bransen F, Brock TCM. 2002. Effects of a mixture of 2 insecticides in freshwater microcosms, Responses of plankton and Ecological Risk Assessment. *Ecotoxicology* 11 181-197
- van den Brink PJ, van Wijngaarden R, Lucassen W, Brock T, Leeuwangh P. 1996. Effects of the insecticide Dursban 4E (active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: II. Invertebrate community responses and recovery. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1143-1153.
- van der Hoeven N, Gerritsen AAM. 1997. Effects of Chlorpyrifos on Individuals and Populations of *Daphnia Pulex* in the Laboratory and Field. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2438. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161202>
- van Wijngaarden R, Leeuwangh P, Lucassen W, Romijn K, Ronday R, van der Velde R, Willigenburg W. 1993. Acute toxicity of chlorpyrifos to fish, a newt, and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 716-723.
- van Wijngaarden R. 1993. Comparison of response of the mayfly *Cloeon dipterum* to chlorpyrifos in a single species toxicity test, laboratory microcosms, outdoor ponds and experimental ditches. *Sci. Total Environ.* 134, 1037-1046. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80109-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80109-3)

- van Wijngaarden RPA, Brock TCM, Van Den Brink PJ. 2005. Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems: A review. *Ecotoxicology* 14, 355-380. <https://doi.org/10.1007/s10646-004-6371-x>
- Venturino A. 2017. Toxicogenomics: new strategies for ecotoxicology studies in autochthonous species I. A glade in the entangled path towards the "fingerprint" of environmental impact? *Int. J. Environ. Heal.* 8, 203. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2017.086179>
- Venturino A, Anguiano OL, Gauna L, Cocca C, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM. 2001. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 130, 191-198. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00241-1)
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero De Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich De Schroeder T, Pechen De D'Angelo AM. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8, 167-186. <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>
- Vera-Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML. 2013. Chlorpyrifos-Based Insecticides Induced Genotoxic and Cytotoxic Effects in the Ten Spotted Live-Bearer Fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Wiley Period. Inc. Env. Toxicol* 1-9. <https://doi.org/10.1002/tox.21869>
- Wang Y, Lv L, Yu Y, Yang G, Xu Z, Wang Q, Cai L. 2017. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). *Chemosphere* 170, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>
- Ward S, Arthington AH, Pusey BJ. 1995. The effects of a chronic application of chlorpyrifos on the macroinvertebrate fauna in an outdoor artificial stream system: Species responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 2-23. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1002>
- Watson FL, Schmidt H, Turman ZK, Hole N, Garcia H, Gregg J, Tilghman J, Fradinger E a. 2014. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1337-1345. <https://doi.org/10.1002/etc.2559>
- Watts M. 2012. Technical Report: Chlorpyrifos as a possible global POP. Pesticide Action Network North America. Oakland, CA. *Pestic. Action Netw. North Am.* 1-34.
- Widder PD, Bidwell JR. 2006. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2446. <https://doi.org/10.1897/05-522R.1>
- Widder PD, Bidwell JR. 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 88, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.008>
- Wijesinghe MR, Bandara MGD, Ratnasooriya WD, Lakraj GP. 2011. Chlorpyrifos-Induced Toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) Larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 690-696. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9577-3>
- Woodley SK, Mattes BM, Yates EK, Relyea RA. 2015. Exposure to sublethal concentrations of a pesticide or predator cues induces changes in brain architecture in larval amphibians. *Oecologia* 179, 655-665. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3386-3>
- Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X. 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 74-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.007>
- Yin X, Zhu G, Li XB, Liu S. 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (*Amphibian: Anura*) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 680, 2-6. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.018>
- Ytrestøyl T, Aas TS, Åsgård T. 2015. UtiliSation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365-374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>
- Zalizniak L, Nugegoda D. 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.015>