

Listas de contenidos disponibles en [CienciaDirecta](#)

# quimiosfera

 revista Página de inicio: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)


## Evaluación comparativa de la toxicidad crónica individual y mixta del glifosato y el glufosinato de amonio en renacuajos de anfibios: un enfoque de múltiples biomarcadores

Ana P. Cuzziol Boccioni<sup>a,F</sup>, Alemán Lener<sup>b,F</sup>, Julieta Peluso<sup>c,F</sup>, Paola M Peltzer<sup>a,F</sup>, Andrés M. Attademo<sup>a,F</sup>, Carolina Aronzón<sup>c,F</sup>, María F. Simoniello<sup>d</sup>, Luisina D. Demonte<sup>mi,F</sup>, María R. Repetti<sup>mi</sup>, Rafael C. Lajmanovich<sup>a,F,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe, Argentina

<sup>b</sup>Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba-CONICET. Departamento de Química Teórica y Computacional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

<sup>c</sup>Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Escuela de Hábitat y Sostenibilidad (IIIA-UNSAM)-CONICET, Campus Miguelete, San Martín, Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup>Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina

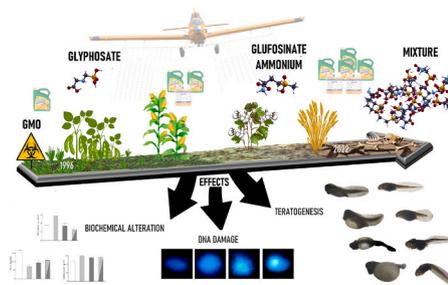
<sup>mi</sup>Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe, Argentina

<sup>F</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

### DESTACAR

- Los efectos subletales del glifosato (GLY) y el glufosinato (GA) difieren en la mezcla.
- La mezcla de ambos herbicidas resultó antagonista para la mayoría de los biomarcadores analizados.
- El herbicida a base de GA tiene mayor toxicidad que el herbicida a base de GLY para los renacuajos.

### GRÁFICAMENTE ABSTRACTO



### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Palabras clave:

Larvas de anuro  
Modelado computacional  
Alteraciones morfológicas  
Disrupción hormonal  
Actividad enzimática  
Daño en el ADN

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la ecotoxicidad de las mezclas de glifosato y glufosinato de amonio en los renacuajos de anfibios y el impacto potencial de la mezcla en la salud de los ecosistemas acuáticos. Se estudiaron las propiedades de unión de la mezcla con base en química computacional y un bioensayo experimental sobre morfología, daño en el ADN y biomarcadores bioquímicos en renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum*. Los resultados del análisis de la teoría funcional de la densidad mostraron tendencias de agrupación de pesticidas para formar mezclas exotérmicas, lo que sugiere la probabilidad de puntos calientes de pesticidas en sistemas acuáticos reales. Además, se estudiaron los efectos biológicos de pesticidas individuales y la mezcla en renacuajos durante un bioensayo crónico de 45 días. El bioensayo constó de cuatro tratamientos: un control negativo (CO), 2,5 mg L<sup>-1</sup> de un herbicida a base de glifosato (GBH), 2,5 mg

\* Autor correspondiente. Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), PC 3000 Santa Fe, Argentina.

Correos electrónicos: [anapaulacuzziolboccioni@gmail.com](mailto:anapaulacuzziolboccioni@gmail.com) (AP Cuzziol Boccioni), [lajmanovich@hotmail.com](mailto:lajmanovich@hotmail.com) (RC Lajmanovich).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136554>

Recibido el 25 de julio de 2022; Recibido en forma revisada el 6 de septiembre de 2022; Aceptado el 17 de septiembre de 2022

Disponible en línea el 26 de septiembre de 2022

0045-6535/© 2022 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

L-1de un herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH). Las tasas de anomalía morfológica fueron significativamente más altas en todos los tratamientos con herbicidas con respecto al CO a las 48 h de exposición. El edema abdominal fue el tipo de anomalía más frecuente registrado a las 48 h, 10 y 45 días de exposición. Se registró daño en el ADN en todos los tratamientos con herbicidas. La tiroxina aumentó solo en el tratamiento con GABH. La acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE) aumentaron significativamente en el tratamiento con GBH, lo que indica un efecto neurotóxico de GBH. La glutatión S-transferasa disminuyó en los tratamientos con GABH y GBH-GABH, mientras que la catalasa disminuyó en los tratamientos individuales con GBH y GABH. En general, la teratogenicidad, el daño en el ADN, la alteración hormonal (T4) y el estrés oxidativo fueron mayores en los renacuajos tratados con GABH que en los renacuajos tratados con GBH. Este estudio también destaca la robusta interacción química entre los ingredientes activos de ambos herbicidas, lo que se refleja en los antagonismos en la mayoría de los biomarcadores analizados, así como en la potenciación y aditividad en otros. Según nuestros resultados, el GABH tuvo una toxicidad más alta que el GBH para los renacuajos de anfibios.

## 1. Introducción

El aumento de pesticidas químicos aplicados a cultivos genéticamente modificados (GM) tolerantes al herbicida glifosato (GLY), se ha convertido en una de las mayores amenazas para la conservación ecológica y la salud pública a nivel mundial (Landrigan y Benbrook, 2015). Los cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas representan el 56% del uso de herbicidas a base de glifosato (GBH) en todo el mundo, según lo señalado por Duque (2018) para el contexto de los Estados Unidos (EE.UU.). En este sentido, el uso de GBH en hectáreas de cultivos de soja tolerantes a GLY en 2014 fue de 315,4 millones de toneladas métricas, con EE. UU. (108 millones de toneladas métricas), Brasil (94,5 millones de toneladas métricas) y Argentina (56 millones de toneladas métricas) representando el 82 % de la producción mundial (Benbrook, 2016). El promedio de GLY utilizado en los cultivos de soja transgénica desde 1996 fue de 3 L/Ha. Sin embargo, los agricultores argentinos utilizan más de 12 L/Ha desde 2013, generalmente mezclados con otros herbicidas (Astuto, 2017).

Además, los herbicidas a base de glufosinato de amonio (GA) (GABH) son un grupo de herbicidas de amplio espectro y su uso está aumentando en todo el mundo para controlar las malas hierbas resistentes a GLY (p. ej., trigo, soja, algodón y maíz; Áy et al., 2012; Ayala et al., 2019). Concentraciones de GLY y GA que superan los niveles máximos tolerables europeos se encontraron en ríos del noreste de Italia, (Masiol et al., 2018). Similarmente, Geng et al. (2021) informaron la amplia distribución espacial y estacional de GLY y GA en aguas subterráneas y superficiales en cuencas hidrográficas agrícolas de China. Estos autores destacaron el riesgo ambiental de GLY y GA para los organismos acuáticos que ocurren en los agroecosistemas y la posible contaminación del agua potable. Además, también se reportaron concentraciones de GLY y GA en menos del 60% de las muestras de agua de tanques de reservorio abierto del Medio Oriente de Argentina, que se encuentran en los campos agrícolas más cercanos y reciben agroquímicos por vía aérea (Demonte et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, GLY y GA se encuentran juntos en el medio ambiente, sin embargo, se sabe poco sobre su interacción a nivel químico. Un estudio reciente indica el riesgo ambiental del consumo de agua potable y la seguridad de los organismos acuáticos debido a la exposición a GLY y GA en aguas superficiales (Yan et al., 2022). Por lo tanto, es importante determinar las interacciones moleculares entre las estructuras de los plaguicidas cuando estos se combinan, mediante el estudio de los perfiles termoquímicos y las tendencias para formar mezclas (Dorofeeva y Moiseeva, 2006). Recientemente, la técnica de química computacional denominada Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) representa un excelente conjunto de herramientas para estudiar la termoquímica de mezclas e interfaces, propiedades de equilibrio y mecanismos reactivos (Schleder et al., 2019; Li et al., 2021; Makkar y Ghosh, 2021; Mandal et al., 2021; Mo et al., 2021). En un estudio previo, la mezcla de contaminantes interactuó y produjo efectos sinérgicos (Lajmanovich et al., 2022). Estos efectos incluyeron las energías de adsorción exotérmica y la interacción de la densidad electrónica para GLY y GA sobre interfaces de polietileno, lo que muestra la producción potencial de un nuevo complejo contaminante, que podría afectar a los organismos y al medio ambiente.

Es importante comprender los efectos de los pesticidas solos y mezclados en el ambiente acuático. Un estudio reciente en Argentina destacó los efectos de las mezclas de GLY y GA que se han encontrado en ambientes acuáticos sobre organismos centinelas como los renacuajos de anfibios, determinando la importancia de analizar los efectos relevantes.

El desarrollo y la metamorfosis de los anfibios incluye una serie de pasos de organogénesis caracterizados por un aumento en el metabolismo y el crecimiento, razones por las cuales algunos autores consideraron a los anfibios más sensibles que los mamíferos a los contaminantes (Cuaranta et al., 2009). Además, la metamorfosis de los anfibios es similar al desarrollo de otros vertebrados, como en la remodelación intestinal, el desarrollo del cerebro y la diferenciación ósea (Buchholz, 2015). La metamorfosis de los anfibios es un modelo perinatal paralelo significativo a la endocrinología del nacimiento de los mamíferos. Wada, 2008). Por lo tanto, la metamorfosis regulada por la tiroides es una característica ancestral de todos los cordados. Esta conservación de una red reguladora apoya la homología de la metamorfosis en el linaje cordado (Holzer y Laudet, 2013).

Varios estudios científicos (p. ej., Alavanja, 2009; Araújo et al., 2016). Gly y GBH producen anomalías branquiales y del eje corporal en *R. arenarum* embriones (Lajmanovich et al., 2003; Mottier et al., 2013; Bach et al., 2016; Babalola et al., 2019). De manera similar, las anomalías morfológicas de campo registradas en embriones de anfibios se vincularon con la actividad del ácido retinoico endógeno en anfibios en el medio este de Argentina (Peltzer et al., 2011; Teglia et al., 2015). Las concentraciones ambientales de GLY aumentaron la actividad del ácido retinoico endógeno en larvas de anfibios en sistemas acuáticos de Argentina (Paganelli et al., 2010). Además, se ha demostrado que la exposición materna a GBH produce anomalías congénitas intergeneracionales (Milesi et al., 2018).

De manera similar, en ratones perinatales expuestos a bajas dosis de GABH induce cambios en la morfología celular, proliferación, apoptosis y altera la neurogénesis (Herzine et al., 2016). Además, concentraciones ambientalmente relevantes de GABH produjeron efectos embriotóxicos y teratogénicos en embriones de anfibios (Babalola et al., 2021a), y provoca una posible alteración de la tiroides y el desarrollo larvario (Babalola et al., 2021b). Los efectos de las larvas de anfibios expuestas a GABH también inhibieron las B-esterasas y produjeron daño genotóxico (Peltzer et al., 2013; Lajmanovich et al., 2014). Además, tanto GLY como GA afectaron a biomarcadores de estrés oxidativo como la glutatión-S-transferasa (GST) y la catalasa (CAT; Murussi et al., 2016; Mora et al., 2018; Zhang et al., 2019).

El objetivo del presente estudio fue comparar y describir la interacción de GLY, GA y su combinación mediante modelado computacional. El estudio también tuvo como objetivo evaluar los efectos sobre la morfología, el ADN y los biomarcadores bioquímicos de esos herbicidas y su mezcla en renacuajos del sapo común *Rhinella arenarum*.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Modelado computacional de ingredientes activos de dos herbicidas

Según estudios previos (Hu et al., 2021; Kaczmarek et al., 2021; Mesnage et al., 2019, 2021; Lajmanovich et al., 2022) los principios activos principales GLY y GA fueron descritos como especies neutras.

Los cálculos de DFT se realizaron utilizando el código SIESTA con la base establecida como se describe en Soler et al. (2002). Los algoritmos funcionales y utilizados se describen en Lajmanovich et al. (2022). Todos los cálculos de dinámica fueron

realizado bajo la aproximación de Born-Oppenheimer durante 10-15 ps, tiempo tras el cual se relajaron las geometrías finales. Los cálculos incluyeron la relajación de la geometría de las moléculas aisladas de los dos herbicidas; luego se colocaron siete moléculas de cada plaguicida en grupos. Una vez que se optimizaron ambos grupos, se analizó la interacción entre ellos para formar una mezcla de acuerdo con la dinámica y la relajación (consulte los datos complementarios S1 para obtener más detalles).

La energía interna ( $\Delta U$ ) para las geometrías optimizadas se calculó como funciones de estado termodinámicas:

$$t_{U\text{clústerGA}} = t_{U\text{clústerGA}} - i \cdot t_{U\text{moléculaGA}} \quad (1)$$

$$\Delta U_{\text{clústerGLY}} = t_{U\text{clústerGLY}} - i \cdot t_{U\text{moléculaGLY}} \quad (2)$$

$$\Delta U_{\text{mezcla}} = t_{U\text{mezcla}} - t_{U\text{grupoGly}} + t_{U\text{clústerGA}} \quad (3)$$

donde  $i$  es el número de moléculas aisladas que forman el grupo.  $t_{U\text{clústerGA}}$ ,  $t_{U\text{clústerGLY}}$  y  $t_{U\text{mezcla}}$ , son las energías de la geometría final optimizada para el cluster de GA, cluster de GLY y mezcla GA-GLY respectivamente.

## 2.2. Sustancias de prueba

El ensayo se realizó con formulaciones comerciales a base de principios activos GLY y GA, ya que esta es la forma en que estos se introducen al medio ambiente (Relyea y Jones, 2009). Las formulaciones comerciales elegidas fueron: el GBH Mifos®, Chemotecnica Co., Argentina (48% ingrediente activo [ai] GLY, *norte*-fosfometilglicina) y el GABH Timón®, Red Surcos SA, Argentina (20% ai GA, (metil)fosfinato de *dl*-homoalanin-4-ilo de amonio). Se corroboraron las concentraciones del ai de las formulaciones comerciales para asegurar cálculos exactos para la preparación de las concentraciones nominales de las soluciones utilizadas en el ensayo (Lajmanovich et al., 2019). Para confirmar la concentración del ai en las formulaciones comerciales, las muestras se diluyeron con agua destilada y se analizaron siguiendo, Demonte et al. (2018) procedimiento. A Espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS) utilizando un Acquity UPLC® En el análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos (Waters, Milford, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo equipado con una fuente ESI (TQD, Waters Micromass, Reino Unido). El procedimiento de cuantificación se realizó por triplicado utilizando como referencia la curva de calibración de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  hasta 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , que se construyó en matriz, (calibración emparejada con matriz). Los pasos de derivatización previa a la columna, el sistema cromatográfico y las condiciones de funcionamiento se describen en Datos complementarios (S2). La metodología completa fue validada según lo recomendado en el documento de orientación de la Comisión Europea sobre control de calidad analítico y procedimiento de validación de métodos para residuos de plaguicidas (SANTA, 2021). El error entre las concentraciones de prueba nominales y medidas no superó el 5% (las muestras de GBH dieron como resultado 45 $\pm$ 5, de GLY y muestras de GABH en 21 $\pm$ 2 de la AG).

## 2.3. Diseño experimental

Cadenas de huevos superficiales de *R. arenarum* fueron colectadas de pequeños estanques temporales situados en la planicie natural de inundación del río Paraná (31°11'31"S, 60°9'29"W). Este sitio se considera libre de contaminación por pesticidas como un sitio no contaminado según estudios previos (Peltzer et al., 2017; Fernández et al., 2020; Cuzziol Boccioni et al., 2021). La recolección fue autorizada por el Ministerio de Ambiente de la Provincia de Santa Fe (EXP. N-02101-0026248-0) de Argentina. Las ristas de huevos de varias oviposiciones (50 cm de cada rista) se transportaron inmediatamente en agua corriente de clorada (DTW) al laboratorio. Los huevos y los embriones incubables se aclimataron en condiciones de laboratorio durante un ciclo de 48 h: 12 h de luz/oscuridad con DTW, pH 7,4 $\pm$ 0,05, conductividad 162 $\pm$ 10,5  $\mu\text{mhos cm}^{-1}$ , concentración de oxígeno disuelto 6.5 $\pm$ 1,5 mg L $^{-1}$ , y temperatura de 24 $\pm$ 2°C.

El bioensayo consistió en cuatro tratamientos. Concentraciones nominales

de GBH (2.5 mg.L $^{-1}$ ) y GABH (2.5 mg.L $^{-1}$ ) se ensayaron individualmente y en mezcla (GBH-GABH) con el 50% de cada solución madre con la misma concentración de ensayo (nominal) que en los tratamientos individuales. También se incluyó un control negativo (CO) con agua corriente de clorada. Estas concentraciones individuales se consideraron relevantes en los peores escenarios a largo plazo para los sistemas acuáticos lénticos naturales (Mann y Bidwell, 1999; Cuzziol Boccioni et al., 2021; Lajmanovich et al., 2022). Las soluciones se prepararon con DTW que se utilizó como control negativo. Las soluciones se renovaron totalmente cada 48 h. El experimento se mantuvo en las condiciones de laboratorio antes mencionadas.

El bioensayo se realizó por triplicado, con un total de 12 tanques. Por cada tanque, 30 $\pm$ 5 huevos (Estadio Gosner, GS, 1-15, según Gosner, 1960) se colocaron con 8 L de solución (es decir=100 huevos expuestos a cada tratamiento). Cuando los organismos alcanzaron GS 23-24, se proporcionaron raciones alimentadas de aproximadamente 0,2 g de lechuga hervida cada 48 h. En este momento, el volumen de cada recipiente se redujo a la mitad (4 L). El ensayo crónico finalizó a los 45 días, cuando la mayoría de los individuos de control alcanzaron las etapas 31-34 (prometamorfosis).

Los huevos y renacuajos utilizados en los bioensayos se trataron de conformidad con las pautas estandarizadas de laboratorio experimental de la Sociedad Estadounidense de Ictiólogos y Herpetólogos (2004) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC). Los especímenes fueron sacrificados de acuerdo con la Guía de Eutanasia Animal propuesta por el Comité de Bioética y el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la FBCB-UNL (Res. CD N: 388/06) utilizando una solución de metanosulfonato de tricaina al 0,1% (v/v) (MS-222) tamponado a pH 7,8 con NaHCO<sub>3</sub>.

## 2.4. Análisis morfológico

Las anomalías morfológicas se evaluaron a los 2, 10 y 45 días de exposición. Diez individuos por tanque fueron recolectados aleatoriamente, sacrificados y fijados en formalina tamponada al 10% (v/v). Las muestras se analizaron con un Arcano estereoscópico@microscopio, y fotografiado. Las etapas de desarrollo se determinaron de acuerdo con Gosner (1960). Las anomalías registradas incluyeron alteraciones visibles externamente en todo el cuerpo, así como en órganos específicos, y siguieron Svartz et al. (2012) y Peltzer et al. (2013, 2019) clasificación. La ocurrencia de anomalías morfológicas se reporta como el porcentaje de individuos de cada tratamiento que presentan cada tipo de anomalía.

Además, se obtuvo la frecuencia de anomalías morfológicas durante los dos primeros días (48 h) de los bioensayos, ya que el desarrollo temprano se define como el período crítico en el que se produce la organogénesis y la morfogénesis (Peltzer et al., 2017, 2019; Sandoval et al., 2022). Para obtener el índice de anomalías morfológicas se obtuvieron tres fotografías de cada tanque por tratamiento a las 48 h de exposición en vista superior mediante una Moticam digital@ cámara. Las fotografías se evaluaron utilizando el software Image J (gratuito disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/>) para cuantificar la tasa de alteraciones morfológicas externas en cada tratamiento, identificando aquellas con apariencia normal y aquellas con alteración visible.

## 2.5. Análisis de daños en el ADN: ensayo cometa y ensayo cometa modificado para la detección de bases oxidadas (Endonucleasa III)

A los 45 días de exposición, se seleccionaron aleatoriamente ocho larvas de cada tanque para analizar el daño del ADN mediante el ensayo Comet. La sangre de cada larva se tomó seccionando detrás del opérculo y se recolectó con un tubo capilar heparinizado de 50  $\mu\text{L}$ . A continuación, se realizó el ensayo de cometa alcalino de acuerdo con el método descrito por Singh et al. (1988), con especificaciones previamente estandarizadas para renacuajos de anfibios (Lajmanovich et al., 2015). Las muestras de sangre se diluyeron 1:19 (% v/v) con medio PBS y se usaron inmediatamente. Luego, 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra de sangre diluida (aproximadamente 4,0 $\times$ 10<sup>8</sup> eritrocitos) a 100  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se preparó un portaobjetos. Se incluyeron controles negativos (NC) y positivos (PC) en cada corrida, en ambos casos

usando muestras de sangre de invidiosos sin ningún tratamiento. El control negativo consistió en una muestra de sangre sola y el control positivo consistió en 100 µL de 25 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>añadido al portaobjetos de muestra de sangre. Después de 5 min de tratamiento en hielo, cada gel se lavó dos veces en PBS, los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis y se siguió el protocolo de ensayo cometa (Soler et al., 2002). Después de la lisis, los portaobjetos se sumergieron en tampón alcalino (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) durante 10 min para el desenrollado del ADN y electroforesis en el mismo tampón. Las condiciones de electroforesis fueron: 10 min a 300 mA y 20 V (0,7 V/cm). Luego, los portaobjetos se neutralizaron en tampón Tris 0,4 M (pH 7,5) con tres cambios de 5 min cada uno, se deshidrataron en metanol durante 5 min y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los portaobjetos se tiñeron con bromuro de etidio (0,02 µg/mL) y se observaron imágenes de cometas usando un microscopio fluorescente (Olympus® CX-40) equipado con un filtro de excitación (Olympus® U-RFLT 50).

El sistema de puntuación visual, un total de 50 cometas en cada gel (duplicado) se clasificaron como pertenecientes a una de cinco categorías según la intensidad de la cola y la cabeza (diferentes niveles de daño). Cada categoría recibió un valor entre 0 y 4: tipo 0 = intacto, sin cola; I = daño bajo, II = daño medio, III = daño moderado y IV = daño severo, casi todo el ADN en la cola (Soler et al., 2002; Collins, 2014; Curi et al., 2017). Los ejemplos de cada tipo de tipo de cometa obtenidos en este ensayo se muestran en Fig. 3 C. Se calculó una puntuación global, Índice de Daño (DI), para cada gel aplicando la siguiente fórmula: (porcentaje de células en clase 0×0) + (porcentaje de celdas en clase 1×1) + (porcentaje de células en clase 2×2) + (porcentaje de células en clase 3×3) + (porcentaje de células en clase 4×4). En consecuencia, la puntuación total estuvo en el rango de 0 a 400.

Un aumento en DI después de la incubación con la enzima, en comparación con la incubación con tampón solo, indica la presencia de bases oxidadas. Entonces, el daño oxidativo al ADN se calculó restando las rupturas con el tampón de las rupturas con la Endonucleasa III (ENDO III, obtenida de Sigma®) como sigue:

Sitios Endo III = DI con Endo III – DI con tampón enzimático solo (Collins, 2009).

## 2.6. Análisis bioquímico

Al final del bioensayo, se evaluaron biomarcadores bioquímicos como parámetros adicionales a los biomarcadores morfológicos y de ADN. Los biomarcadores bioquímicos incluyeron hormonas tiroideas y cortisol, neurotoxicidad y enzimas de estrés oxidativo. Para estas mediciones se recolectaron 10 renacuajos de cada tanque, se sacrificaron y homogeneizaron individualmente a una temperatura entre 0 y 4°C, con un homogeneizador de vidrio de teflón y en sacarosa 25 mM enfriada con hielo, tampón Tris-HCl 20 mM (pH = 7,4) que contiene EDTA 1 mM, usando un polytron®trituradora de tejidos. Durante la homogeneización, las muestras se mantuvieron frías con hielo. Cada muestra de homogeneizado se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante resultante se utilizó para las mediciones (Lajmanovich et al., 2019, 2022). La concentración de proteína de las muestras se determinó por duplicado siguiendo el método de Bradford (Babalola et al., 2019), usando albúmina de suero bovino (BSA, Sigma®) como estándar. Los reactivos para las determinaciones de enzimas se obtuvieron de Sigma. La absorbancia se leyó a 595 nm.

### 2.6.1. hormonas

Los niveles de hormona tiroidea (tiroxina; T4) y cortisol (CRT) se midieron utilizando kits de inmunoensayo electroquimioluminiscente ligado a enzimas (ECLIA) (COBAS®, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EE. UU.) siguiendo las especificaciones para renacuajos de anfibios establecidas previamente en nuestro laboratorio (Lajmanovich et al., 2019; Cuzziol Boccioni et al., 2021). Los límites de detección fueron 0,42 µg. dl<sup>-1</sup> para T4 y 0,02 µg. dl<sup>-1</sup> para TRC.

### 2.6.2. Biomarcadores de neurotoxicidad

La actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) se determinó colorimétricamente según Ellman et al. (1961).

Para las reacciones se siguieron especificaciones previamente establecidas para renacuajos de anfibios (Attademo et al., 2021; Lourido et al., 2022). Los reactivos se cargaron Un coeficiente de extinción molar de 13,6×10<sup>3</sup> METRO<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> se utilizó para ambas enzimas. Las actividades de AChE y BChE se expresaron como nmol min<sup>-1</sup>miligramos<sup>-1</sup>proteína.

### 2.6.3. Biomarcadores de estrés oxidativo

La actividad de glutatión S-transferasa (GST) se determinó como se describe por Habig et al. (1974) y adaptado por Habdous et al. (2002), siguiendo especificaciones para renacuajos de anfibios previamente estandarizadas en nuestro laboratorio (Attademo et al., 2021; Lajmanovich et al., 2022). La actividad de GST se expresó como nmol min<sup>-1</sup>ml<sup>-1</sup>miligramos<sup>-1</sup>proteína usando un coeficiente de extinción molar de 9,6×10<sup>3</sup>METRO<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

La actividad de catalasa (CAT) se determinó mediante la tasa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Biopaque®)descomposición a 240 nm según Aeb (1984) y adaptado para R. arenarumpor Pelusa et al. (2020). Un coeficiente de extinción molar de 40 ×METRO<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y la actividad se expresó como mmol min<sup>-1</sup>miligramos<sup>-1</sup>proteína.

### 2.7. Índice de interacción

Para determinar el tipo de interacción entre los efectos de ambos plaguicidas, se calculó el Índice de Interacción (II) para cada biomarcador según Mansur et al. (2008): II= (M + C)/(A1+A2)

Donde todos los componentes representan los valores medios obtenidos para el biomarcador: M para el tratamiento mixto (GBH-GABH), A1 y A2 para los tratamientos individuales (GBH o GABH, respectivamente) y C para el tratamiento control. Los valores obtenidos para el II definen el tipo de interacción. En caso de efectos positivos (es decir aumento de biomarcador en los tratamientos respecto al control), si II>1 interacción se define como una potenciación, y II <1 antagonismo. Por el contrario, en caso de efectos negativos (disminución de biomarcador en tratamientos respecto al control), si II>1 interacción se define como antagonismo, y II<1 potenciación. En cualquier caso, si II = 1 la interacción se define como aditividad. Valores entre 0.95 y 1.05 fueron considerados los límites de una suma, según Mansur et al. (2008). Para el análisis de las interacciones solo se tuvieron en cuenta los tratamientos mixtos que provocaron diferencias significativas en los biomarcadores o cuando al menos una de las concentraciones individuales provocó diferencias significativas respecto al grupo control (Bonifacio y Hued, 2019).

### 2.8. Análisis de los datos

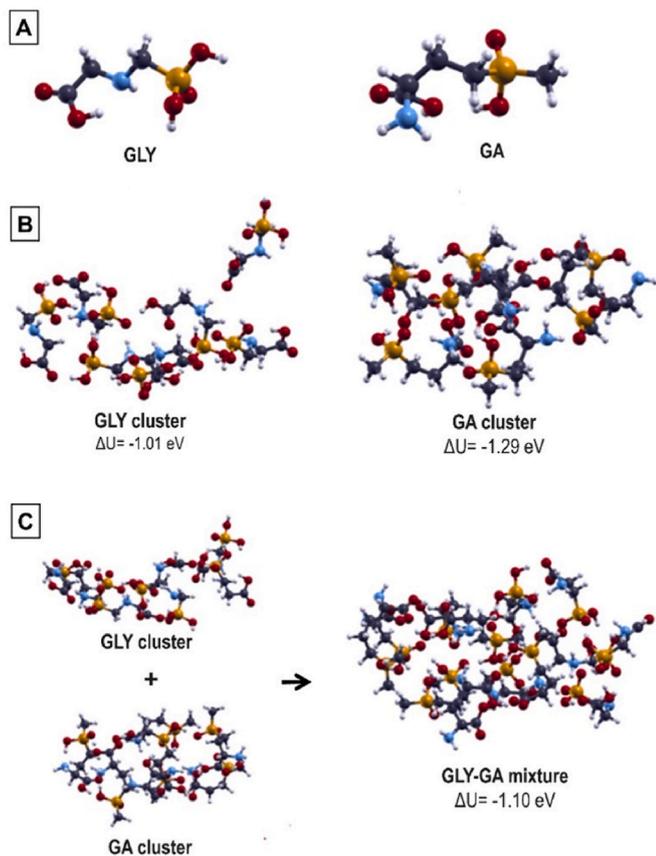
Para todos los parámetros, la normalidad se probó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Las tasas de anomalías morfológicas se analizaron mediante la prueba de proporción binomial (Margolin et al., 1983). La tasa de alteración morfológica se reporta como el porcentaje de individuos con alteración morfológica sobre el total de individuos contados.

El índice de daño del ADN, el daño oxidativo del ADN, el nivel de T4 y las actividades enzimáticas (AChE, BChE, GST, CAT) se informan como la media±SD y se analizaron con ANOVA y la prueba de Dunnett para comparaciones post-hoc. Dado que los niveles de CRT en algunas muestras de homogeneizado estaban por debajo de los límites de detección, los resultados se consideraron como % de muestras por encima de los límites de detección. Como la CRT se expresó como % de detección, este biomarcador se analizó utilizando una proporción de prueba binomial. Todos estos análisis estadísticos se realizaron con el software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003). un valor de pag <0,05 se consideró significativo.

## 3. Resultados

### 3.1. Modelado computacional de principios activos

El esquema termoquímico de reacción y la evolución dinámica molecular se muestran en Figura 1 y Figura S1 (Dato suplementario), respectivamente. Después de la optimización de las moléculas individuales de GLY y GA, los grupos se construyeron colocando siete moléculas distanciadas 5 Å.



**Figura 1.** Geometrías y energías finales de glifosato (GLY) y glufosinato de amonio (GA) obtenidas mediante modelado computacional (Teoría del Funcional de la Densidad). Las moléculas de GLY y GA (A) se agruparon por separado (B), y luego ambos agrupados se mezclaron (C).

La simulación de dinámica molecular mostró una tendencia a formar un clúster para ambos principios activos (ver [higos. S1 y S2](#) de datos complementarios). Las energías de formación después de la relajación de los cúmulos fueron  $-1,01$  eV y  $-1,29$  eV para GLY y GA respectivamente, indicando una tendencia exotérmica considerable principalmente en GA. El diferencial de pseudodensidad electrónica mostrado en [higos. S1 y S2](#) indica que en ambos sistemas los puentes de hidrógeno lograron la unión entre la estructura molecular.

En cuanto a la reacción de los clusters para obtener la mezcla, se construyó la geometría inicial colocando las geometrías optimizadas de los clusters a  $8 \text{ \AA}$  entre sí ([Figura S2](#)). La simulación de dinámica molecular mostró que los cúmulos puros tienden a desacoplarse, dando lugar a una mezcla. La densidad pseudoeléctrica diferencial que se muestra en [higos. S3](#) con puentes de hidrógeno como unión dominante entre las moléculas generando una *ovillo de lana* tipo partícula.

Durante la reacción termoquímica, la energía de formación de la mezcla fue de  $-1,10$  eV, lo que demuestra que la tendencia de los grupos de pesticidas para formar la mezcla es altamente exotérmica. La temperatura *versus* los diagramas de tiempo en la [Figura S 1-3](#) mostraron que la temperatura permaneció estable alrededor de  $300 \text{ K}$  durante todas las simulaciones para cada sistema.

### 3.2. Análisis morfológico

Todos los tratamientos mostraron una tasa de anomalías morfológicas iniciales más alta que CO ( $Z = -2,16$ ;  $PAGS = 0,01$  para GBH;  $Z = -4,09$ ,  $pag < 0,01$  para GABH;  $Z = -2,25$ ,  $PAGS = 0,01$  para GBH-GABH). Las tasas de anomalías morfológicas obtenidas a los dos días de exposición fueron del  $5,41 \%$  para el CO, del  $9,04 \%$  para el tratamiento con GBH, del  $14,08 \%$  para el tratamiento con GABH y del  $9,95 \%$  para el tratamiento con GBH-GABH. Edema abdominal, curvatura del dorsoventral

y la asimetría bilateral se registraron como los tipos de anomalías morfológicas más comunes en todos los tratamientos a los 2 y 10 días de exposición. [Figura 2](#). Configuración normal (CO) y anomalías morfológicas observadas en *Rinella arenarum* expuestos a un herbicida a base de glifosato (GBH), herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH). Las primeras dos filas corresponden a individuos de desarrollo temprano expuestos durante los primeros 2 días del ensayo, las siguientes dos filas a renacuajos prometamórficos a los 10 días de exposición y las últimas filas a renacuajos prometamórficos con 45 días de exposición. Referencias: BL: Asimetría bilateral; DV: curvatura del eje dorsoventral; DE: edema abdominal; A: otras alteraciones abdominales. Alteración en órganos específicos: E: Ojos (micro o macroftalmia), N: nariz; OD: disco oral, T: cola, alteración. Barra escala:  $2 \text{ mm}$ .

La cola y el abdomen anormales también se registraron con frecuencia en los tratamientos. También se observaron otros tipos de anomalías abdominales, microftalmia, alteraciones en la aleta caudal y en el disco oral ([Figura 2](#)).

Al final del bioensayo (45 días), los edemas fueron el tipo de anomalía más común registrado en GBH, mientras que las anomalías oculares fueron el único tipo observado en el tratamiento de GABH. En el tratamiento GBH-GABH se registraron edemas, asimetría bilateral y anomalías nasales.

### 3.3. Análisis de daños en el ADN

Los DI obtenidos para los controles negativos y positivos fueron  $117,25 \pm 8,61$  y  $230,25 \pm 13,41$ , respectivamente. La DI obtenida para el tratamiento con CO fue de  $128 \pm 15,27$ , mientras que en los tratamientos con herbicidas osciló entre  $179,5 \pm 19,5$  (tratamiento GBH);  $179,55 \pm 015,51$  (tratamiento GBH-GABH) y  $203,66 \pm 25,59$  (tratamiento GABH) ([Fig. 3A](#)). No hubo diferencia significativa entre NC y el tratamiento con CO. En cambio, el daño en el ADN fue significativamente mayor en PC y todos los tratamientos con herbicidas (79% en control positivo, 40% en tratamientos con GBH y GBH-GABH, y 59% en tratamiento con GABH) respecto al tratamiento con CO ( $F = 51,93$ ;  $pag < 0,01$ ).

El daño oxidativo al ADN basado en el cálculo de los sitios Endo III fue  $6,42 \pm 3,99$  para CO. En tratamientos con herbicidas varió entre  $29,87 \pm 17,76$  (tratamiento GBH),  $22,33 \pm 19,49$  (tratamiento GABH) y  $20,44 \pm 18,27$  (tratamiento GBH-GABH) ([Fig. 3B](#)). El daño oxidativo fue significativamente mayor en el tratamiento con GBH respecto al CO ( $F = 2,65$ ,  $pag < 0,05$ ).

### 3.4. Biomarcadores bioquímicos

#### 3.4.1. Actividad de las hormonas

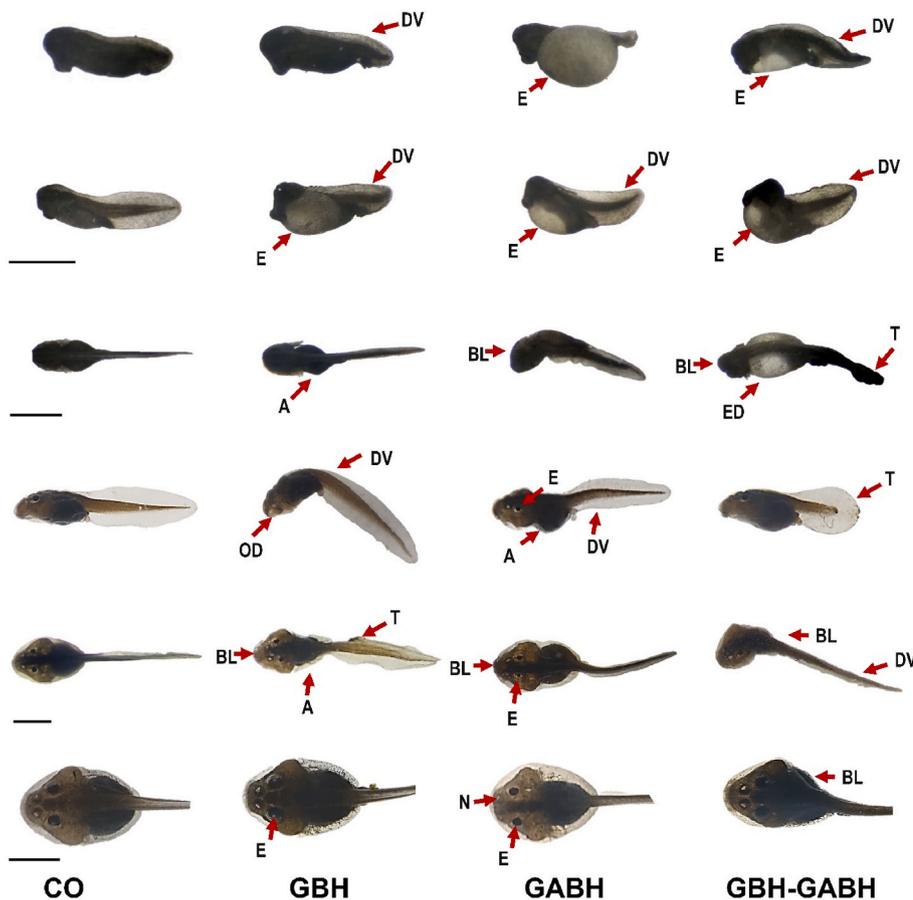
El nivel de T4 en CO fue de  $7,23 \pm 0,35 \text{ ng g}^{-1}$ , mientras que los valores de T4 en los tratamientos con herbicidas fueron  $7,238 \pm 0,38 \text{ ng g}^{-1}$  (tratamiento GBH);  $7,67 \pm 0,71 \text{ ng g}^{-1}$  (tratamiento GABH) y  $7,52 \pm 0,45 \text{ ng g}^{-1}$  (tratamiento GBH-GABH) ([Figura 4A](#)). Se observó un aumento significativo del  $6,15 \%$  en el tratamiento con GABH en CO ( $F = 3,99$ ;  $PAGS = 0,01$ ).

Solo el 20% de las muestras de CO tenían un nivel de CRT por encima de los límites de detección, mientras que el 40% de las muestras de GBH y GABH tenían un nivel de CRT por encima de los límites de detección ([Figura 4B](#)). Un porcentaje significativamente más alto (60%) de las muestras de tratamiento de GBH-GABH tenían un nivel de CRT por encima de los límites de detección ( $Z = -1,82$ ;  $pag < 0,05$ ) que las muestras de CO.

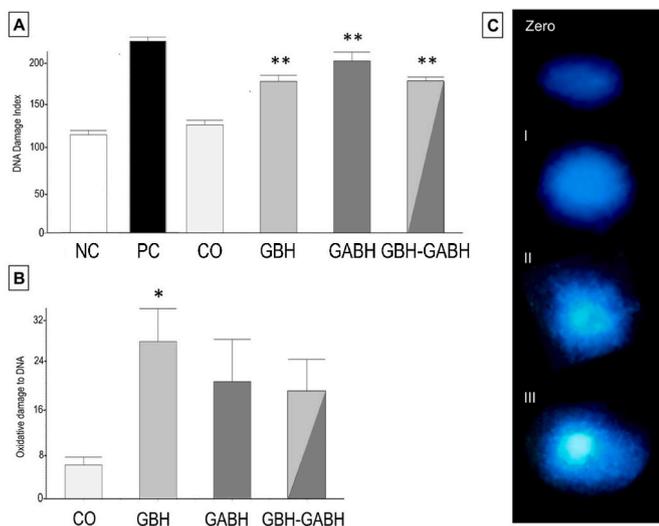
#### 3.4.2. Biomarcadores de neurotoxicidad

La actividad de AChE en CO fue de  $1,76 \pm 0,57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$ , mientras que la actividad de AChE en los tratamientos con herbicidas fue de  $2,87 \pm 1,03 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH),  $1,72 \pm 0,82 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GABH) y  $1,3 \pm 0,23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH-GABH) ([Figura 4 C](#)). Se registró un aumento significativo del  $63 \%$  en el tratamiento GBH con respecto al CO ( $F = 6,71$ ,  $pag < 0,01$ ).

La actividad de BChE en CO fue de  $0,115 \pm 0,059 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$ , mientras que la BChE en los tratamientos con herbicidas fue de  $0,329 \pm 0,232 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH),  $0,128 \pm 0,72 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GABH) y  $0,297 \pm 0,202 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH-GABH) ([Figura 4D](#)). El incremento del  $186 \%$  y  $158 \%$  en los tratamientos GBH y GBH-GABH respecto al CO fue significativo ( $F = 4,84$ ,  $PAGS = 0,01$ ).



**Figura 2.** Configuración normal (CO) y anomalías morfológicas observadas en *Rhinella arenarum* expuesta a un herbicida a base de glifosato (GBH), herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH). Las primeras dos filas corresponden a individuos de desarrollo temprano expuestos durante los primeros 2 días del ensayo, las siguientes dos filas a renacuajos premetamórficos a los 10 días de exposición y las últimas filas a renacuajos prometamórficos con 45 días de exposición. BL: asimetría bilateral; DV: curvatura del eje dorsoventral; DE: edema abdominal; A: otras alteraciones abdominales. Alteración en órganos específicos: E: ojos (micro o macroftalmia), N: nariz; OD: disco oral, T: cola. Barra escala: 2 mm.



**Fig. 3.** Resultados del ensayo Comet para el índice de daño (A) y daño oxidativo al ADN basado en la detección de bases oxidadas (endonucleasa III, B) obtenidas para *Rhinella arenarum* expuestos a agua de clorada (CO), un herbicida a base de glifosato (GBH), un herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH). También se muestran controles negativos y positivos (NC y PC, respectivamente) para el ensayo del cometa. Ejemplos de células sin daño (cero), daño bajo (I), daño medio (II) y daño moderado (III) que se encuentran en los tratamientos se muestran en C (aumento 400×).

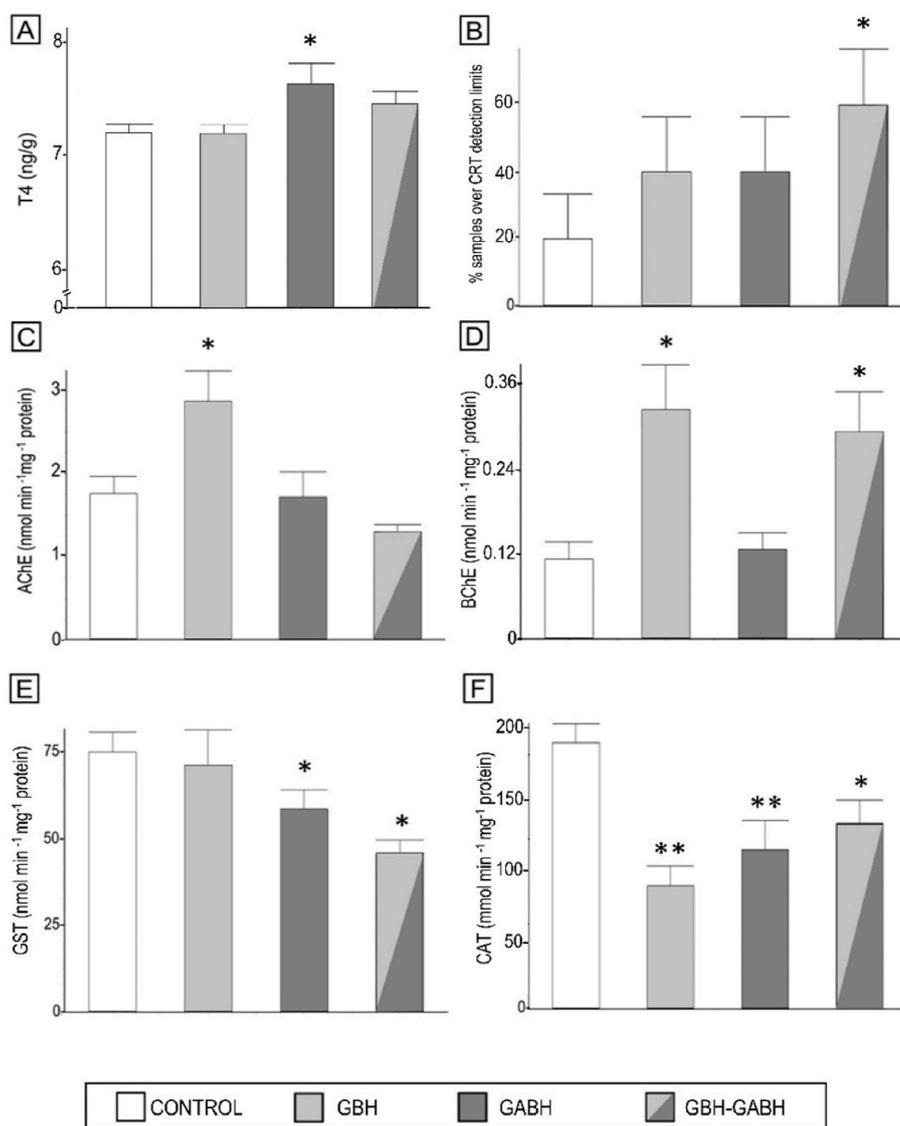
3.4.3. Biomarcadores de estrés oxidativo

La actividad GST en CO fue  $74.93 \pm 16,05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$ , mientras que en los tratamientos con herbicidas fueron  $71.03 \pm 029,24 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH);  $58.65 \pm 15,52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos de proteína}^{-1}$  (GABH) y  $45,8 \pm 10,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ miligramos de proteína}^{-1}$  en el tratamiento GBH-GABH (Figura 4MI). Se registró una disminución significativa del 21,73 % en los tratamientos GABH y del 39 % en los tratamientos GBH-GABH con respecto al CO ( $F = 3,78, P < 0,05$ ).

La actividad CAT en CO fue de  $192,26 \pm 45,4 \text{ mmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$ , mientras que en los tratamientos con herbicidas fueron  $88.86 \pm 52,4 \text{ mmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GBH);  $115.22 \pm 71,9 \text{ mmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ proteína}$  (GABH) y  $134.3 \pm 60,1 \text{ mmol min}^{-1} \text{ miligramos}^{-1} \text{ tratamiento con proteína}$  (GBH-GABH) (Figura 4F). Se registró una reducción significativa del 54%, 40% y 30% en los tratamientos GBH, GABH y GBH-GABH, respectivamente, con respecto al CO ( $F = 7.092; p < 0,01$ ).

3.5. Índice de interacción

Los nueve biomarcadores cuantitativos considerados para el Índice de Interacción se vieron significativamente afectados, al menos, por uno de los tratamientos ensayados con respecto al CO. Los biomarcadores más sensibles fueron la tasa de anomalías morfológicas, DI y CAT, que respondieron a ambos tratamientos individuales (GBH y GABH) y la mezcla (GBH-GABH). AChE solo reportó cambios significativos en el tratamiento GBH, mientras que T4 solo mostró cambios en el tratamiento GABH con respecto al CO. BChE mostró cambios en los tratamientos GBH y GBH-GABH, mientras que GST mostró cambios en los tratamientos GABH y GBH-GABH. Las interacciones entre los dos herbicidas fueron diferentes según el biomarcador considerado (tabla 1). La acción combinada de los herbicidas fue principalmente antagonista para la mayoría de los biomarcadores estudiados, con excepción de la aditividad para T4 y CRT. Solo se observó potenciación en el biomarcador GST.



**Figura 4.** Biomarcadores bioquímicos analizados en *Rinella arenarum* expuestos a un herbicida a base de glifosato (GBH), herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH): A. Tiroxina (T4); B. Cortisol (CRT); C. Acetilcolinesterasa (AChE); D. Butirilcolinesterasa (BChE); E. Glutación Stransferase (GST); F. Catalasa (CAT); Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\**pag* <0,05; \*\**pag* <0,01).

**tabla 1**

Resumen de resultados obtenidos para cada biomarcador en *Rinella arenarum* en acuarios expuestos a un herbicida a base de glifosato (GBH), herbicida a base de glufosinato de amonio (GABH) y su mezcla 50:50 (% v/v) (GBH-GABH). El tipo de interacción de ambos herbicidas en el tratamiento de mezcla (Potenciación, Antagonismo o Aditividad) se definió según el valor del Índice de Interacción (II) y los efectos individuales (↑ o ↓, considerando tratamientos con aumento o disminución significativos respecto al CO).

biomarcador	CO	GBH	GABH	GBH-GABH	II Efecto individual	Tipo de interacción	
Tasa de anomalías morfológicas (%)	5.418	<b>9.04</b>	<b>14.08</b>	<b>9.95</b>	0.23†	Antagonismo	
Índice de daño	128	<b>179.50</b>	<b>203.66</b>	<b>179.55</b>	0.80†	Antagonismo	
Daño oxidativo al ADN T4 (ng g <sup>-1</sup> )	6.43	<b>29.87</b>	22.33	20.44	0.22†	Antagonismo	
Cortisol (% de muestras por encima de los límites de detección)	7.24	7.24	<b>7.67</b>	7.52	0.99†	Aditividad	
AChE (nmol min <sup>-1</sup> miligramos <sup>-1</sup> proteína)	20	40	40	<b>60</b>	1†	Aditividad	
BChE (nmol min <sup>-1</sup> miligramos <sup>-1</sup> proteína)	1.76	<b>2.87</b>	1.72	<b>1.30</b>	0.38	↑	Antagonismo
CAT (mmol min <sup>-1</sup> miligramos <sup>-1</sup> proteína)	0.11	<b>0.329</b>	0.128	<b>0.29</b>	0.90	↓	Antagonismo
GST (nmol min <sup>-1</sup> miligramos <sup>-1</sup> proteína)	192	<b>88</b>	<b>115</b>	<b>134</b>	1.60	↑	Antagonismo
	74.94	71.04	<b>58.65</b>	<b>45.80</b>	0,93	↓	Potenciación

Los valores se expresan como media obtenida para cada tratamiento, en la unidad respectiva para cada biomarcador. Los números en negrita indican diferencias significativas en el tratamiento respecto al CO (*pag* <0,05).

**4. Discusión**

El glifosato y el glufosinato de amonio son los más empleados

herbicidas en muchos países del mundo (Geng et al., 2021). Según ArgenBio base de datos (2022), actualmente hay 23 eventos transgénicos aprobados para la tolerancia simultánea a ambos para GLY

y herbicidas GA, principalmente para maíz, soja y algodón. Sin embargo, el mayor riesgo ambiental por el uso de estos “evento de pilas” es el que conduce al uso masivo de estos dos herbicidas. Por ejemplo, China aprobó recientemente un evento de combinación transgénica para soja tolerante a la sequía, GLY y GA (ArgenBio [base de datos, 2022](#)). China es sin duda el mayor comprador de soja de Argentina (Astuto, 2017) y esta demanda masiva junto con el evento mencionado resultan en un aumento del uso de pesticidas, contaminación y expansión de cultivos de soja. La expansión de la soja hacia ecosistemas semiáridos y húmedales es exponencial, arrasando bosques en Argentina (Grau et al., 2005; Asociación para la Promoción de la Cultura, 2020). Estos escenarios, similares a los de América del Sur, contribuyen en gran medida al cambio climático (Siyum, 2020).

Existen numerosas evidencias de que la presencia simultánea de GLY y GA representa un riesgo para los organismos en diferentes matrices ambientales (por ejemplo, Demonte et al., 2018; Geng et al., 2021; Yan et al., 2022). Sin embargo, la interacción potencial de ambos herbicidas sigue siendo poco estudiada y merece más atención, especialmente en la actualidad, donde se han mejorado las tendencias para su aplicación conjunta.

Los resultados de nuestro estudio son los primeros a nivel mundial que explican las interacciones biológico-toxicológicas entre los herbicidas a base de GLY y GA que termodinámicamente demuestran formar una mezcla exotérmica y antagonista. Los resultados del modelo computacional indicaron que GLY y GA, así como su grupo, eventualmente pueden interactuar para formar mezclas con una estructura electrónica diferente a la de las moléculas o grupos aislados, lo que podría cambiar el efecto de toxicidad. Además de la tendencia exotérmica de la forma de las mezclas, es importante señalar que la geometría final de la evolución de los clusters mostró que las moléculas de GLY y GA se encuentran en una distribución mixta (o no ordenada). Por lo tanto, los grupos funcionales (principalmente en el sitio de fósforo) ahora están involucrados en una interacción intramolecular estable. Este potencial produce un cambio en las interfaces de los principios activos (pesticidas) y los sitios activos (biológicos) en algún momento de sus mecanismos para cada biomarcador. Los cambios observados en la geometría de la mezcla podrían incrementar la relación superficie/volumen, lo que generalmente incrementa la reactividad hacia las interfaces. Aunque debería ser necesaria una simulación de acoplamiento molecular de mecánica cuántica para cada sistema para obtener una visión profunda de la interacción biomarcador-mezcla, se sugiere que la fuerte interacción de los grupos funcionales entre las moléculas de herbicida conduciría a una estructura electrónica diferente en la mezcla. Esto podría tener un papel importante en la actividad final y los diferentes comportamientos registrados en las pruebas de toxicidad (Los cambios observados en la geometría de la mezcla podrían incrementar la relación superficie/volumen, lo que generalmente incrementa la reactividad hacia las interfaces. Aunque debería ser necesaria una simulación de acoplamiento molecular de mecánica cuántica para cada sistema para obtener una visión profunda de la interacción biomarcador-mezcla, se sugiere que la fuerte interacción de los grupos funcionales entre las moléculas de herbicida conduciría a una estructura electrónica diferente en la mezcla. Esto podría tener un papel importante en la actividad final y los diferentes comportamientos registrados en las pruebas de toxicidad (Los cambios observados en la geometría de la mezcla podrían incrementar la relación superficie/volumen, lo que generalmente incrementa la reactividad hacia las interfaces. Aunque debería ser necesaria una simulación de acoplamiento molecular de mecánica cuántica para cada sistema para obtener una visión profunda de la interacción biomarcador-mezcla, se sugiere que la fuerte interacción de los grupos funcionales entre las moléculas de herbicida conduciría a una estructura electrónica diferente en la mezcla. Esto podría tener un papel importante en la actividad final y los diferentes comportamientos registrados en las pruebas de toxicidad (Aunque debería ser necesaria una simulación de acoplamiento molecular de mecánica cuántica para cada sistema para obtener una visión profunda de la interacción biomarcador-mezcla, se sugiere que la fuerte interacción de los grupos funcionales entre las moléculas de herbicida conduciría a una estructura electrónica diferente en la mezcla. Esto podría tener un papel importante en la actividad final y los diferentes comportamientos registrados en las pruebas de toxicidad (Aunque debería ser necesaria una simulación de acoplamiento molecular de mecánica cuántica para cada sistema para obtener una visión profunda de la interacción biomarcador-mezcla, se sugiere que la fuerte interacción de los grupos funcionales entre las moléculas de herbicida conduciría a una estructura electrónica diferente en la mezcla. Esto podría tener un papel importante en la actividad final y los diferentes comportamientos registrados en las pruebas de toxicidad (Zhan et al., 2013; Bhatt et al., 2021).

El desarrollo de los embriones de anfibios experimenta cambios morfológicos complejos que pueden verse afectados negativamente por la exposición a varios tipos de contaminantes (Vandenberg et al., 2012). En nuestro estudio, las altas tasas de anomalías morfológicas en las primeras etapas de todos los tratamientos con herbicidas indican que GBH y GABH son teratogénicos para los anfibios. Las tasas de anomalías morfológicas registradas para los renacuajos de control (≈5%) estaban de acuerdo con las tasas esperadas para las poblaciones silvestres de anfibios, típicamente por debajo del 5% (Blaustein y Johnson, 2003). Informes previos de nuestro laboratorio han mostrado efectos teratogénicos de concentraciones subletales de GBH en *Scinax nasicus* (deformidades craneofaciales y de la boca, colas curvas dobladas y anomalías oculares; Lajmanovich et al., 2003), otra especie común que coexiste con los renacuajos de *R. arenarum*. Un estudio más reciente sobre la evaluación de GBH y la exposición a ciprofloxacina determinó que GBH produjo tasas más altas de edema, organización visceral anormal, asimetría bilateral y anomalías oculares en renacuajos de *R. arenarum* (Cuzziol Boccioni et al., 2021). Una explicación puede estar relacionada con el aumento de la actividad retinoide endógena en los renacuajos de anfibios que inhibe la expresión de genes involucrados en múltiples procesos de desarrollo, como la asimetría izquierda-derecha, el mesodermo precordial y el desarrollo de la notocorda y el patrón dorsal-ventral del tubo neural, descrito por Paganelli et al. (2010) para GBH.

Además, los efectos teratogénicos de GA también se informaron previamente para renacuajos de anfibios y otras especies de vertebrados. Los efectos teratogénicos fueron más fuertes en GABH en la exposición inicial (dos días que

en los demás tratamientos herbicidas. Babalola et al. (2021b) estudió las alteraciones morfológicas de *Xenopus laevis* en acuajos expuestos a 1.6–3.0 mg L<sup>-1</sup> GAB. Coincidiendo con nuestras observaciones, estos autores reportaron edema, anomalías intestinales, alteraciones axiales, oculares y cefálicas como los tipos de anomalías observadas con mayor frecuencia. También se informaron efectos teratogénicos de GA para larvas de pez cebra y embriones de ratón expuestos a GA, produciendo alteraciones de la curvatura de la cola y la cabeza, respectivamente (Watanabe e Iwase, 1996; Wang et al., 2016).

Se observaron daños en el ADN de muestras de renacuajos expuestas a tratamientos con GBH, GABH y GBH-GABH. Los GBH ya han sido reportados como genotóxicos que pueden afectar la integridad genética de varias especies de anfibios (por ejemplo, Herek et al., 2021; Pavan et al., 2021). La genotoxicidad de GABH en renacuajos de *R. arenarum* ya se ha informado a través de la evaluación de eritrocitos micronucleados y otras anomalías nucleares de eritrocitos (Lajmanovich et al., 2014). Mouchet et al. (2006) sugirió que los ensayos comet parecen ser un método sensible y adecuado para detectar genotoxicidad en anfibios. Por lo tanto, el aumento del daño en el ADN observado en nuestro estudio para los renacuajos expuestos a GABH confirma y refuerza el efecto genotóxico de GABH y GBH en los renacuajos de *R. arenarum*. Hay varios otros estudios que difieren sobre la genotoxicidad del GA. Según algunos autores (Ebert et al., 1990; Schulte-Hermann et al., 2006), GA no presenta riesgo genotóxico, mientras que estudios más recientes advierten sobre los efectos genotóxicos tanto de GA como de GABH (Kanaya y Tsubokawa, 2007; Xiong et al., 2019).

Además, el daño oxidativo se verificó mediante el ensayo cometa modificado solo en renacuajos tratados con GBH. Este resultado está de acuerdo con los estudios de Odetti et al. (2020) y López González et al. (2022), ambos estudios realizados en *Caimán latirostris* expuestos a GLY, cuyo daño oxidativo se detectó tanto con Endo III (pirimidinas oxidadas) como con FPG (purinas oxidadas) a concentraciones altas y bajas de GLY.

La exposición crónica con diferentes tratamientos con herbicidas indica que los niveles de T4 aumentaron solo en el tratamiento con GABH. Babalola et al. (2021b) Alteración confirmada del eje tiroideo de *Xenopus laevis* en acuajos expuestos a un GABH. Para las especies de vida silvestre acuática, la alteración de la tiroides, por lo tanto, podría comprometer la salud, el estado físico y, en última instancia, la supervivencia debido a los diversos procesos en los que median las hormonas, incluido el crecimiento, el desarrollo y la reproducción (Marlatt et al., 2013; Grott et al., 2022). Es más, Cuzziol Boccioni et al. (2021) y Liu et al. (2021) sugirió que la alteración de los niveles de T4 estaría relacionada con alteraciones morfológicas en renacuajos expuestos a pesticidas (p. ej., GBH) en mezcla con otros contaminantes de preocupación emergente (p. ej., antibióticos).

El glucocorticoide cortisol juega un papel clave en los ajustes iónicos y metabólicos necesarios para la respuesta al estrés. Soso et al., 2007). La exposición crónica de larvas de *R. arenarum* a la mezcla de GBH y GABH mostró un aumento significativo en el porcentaje de CRT (60 %, en comparación con el 20 % de CO). De manera similar, se observa un CRT alto en renacuajos de anfibios cuando se exponen a herbicidas como la atrazina y GLY. Burraco y Gómez-Mestre, 2016; McMahon et al., 2017). En este sentido, durante la exposición crónica de los renacuajos a factores estresantes (es decir, Roundup™), el eje hipotálamo-pituitario interrenal (HPI) puede verse afectado y el efecto del aumento de la CRT se vuelven inmunosupresores (Gabor et al., 2019).

Los resultados de nuestro estudio con respecto a la neurotoxicidad, sugieren un posible efecto colinérgico de GBH sobre el aumento de la actividad de AChE y BChE. Tanto la AChE como la BChE se consideran componentes esenciales de las sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso. Franjesevic et al., 2019). Se reconoce que BChE es más sensible a la exposición a pesticidas que AChE, ya que BChE es menos específica en términos de sustratos y, por lo tanto, tiene un papel más importante que AChE en la biotransformación de xenobióticos. Sánchez-Hernández, 2007; Peluso et al., 2021). También se registró un aumento significativo en la BChE en el tratamiento GBH-GABH. Su mayor actividad conduce a una mayor liberación de neurotransmisores en las hendiduras sinápticas colinérgicas y, en consecuencia, a la sobreestimulación de los receptores postsinápticos. Por lo tanto, es probable asumir que dicho aumento está relacionado con los efectos del estrés oxidativo inducido por el GBH (Malafai et al., 2021). Aunque los mecanismos específicos a través del aumento de ambas enzimas

en presencia de GBH en exposición crónica, la disrupción en el sistema nervioso por alteración de estas enzimas puede conducir a cambios de comportamiento que representan un riesgo para la supervivencia de los organismos (Sánchez-Hernández, 2007).

AChE ni BChE se vieron significativamente afectados por la exposición a 2,5 mg L<sup>-1</sup> GEORGIA. Por el contrario, los ensayos agudos previos de nuestro laboratorio mostraron una inhibición significativa de las actividades de ambas enzimas en *Boana pulchellus* renacuajos expuestos a 15 mg L<sup>-1</sup> GA e inhibición de AChE en *Scinax squallirostris* renacuajos expuestos a 6,25 mg L<sup>-1</sup> GA (Peltzer et al., 2013; Lajmanovich et al., 2022). Estas diferencias sugerirían una respuesta distintiva según la acción específica de la especie, el tiempo de exposición o los efectos a concentraciones más altas que las probadas en el presente estudio. Sin embargo, no se debe subestimar el efecto conocido de GA sobre el sistema nervioso. Varios estudios alertaron sobre las consecuencias de la exposición a los GA en los sistemas nerviosos, incluida la alteración estructural del tejido (Calas et al., 2008; Lee y Kang, 2021; Yeon et al., 2022) y otros parámetros relacionados con el funcionamiento nervioso como el funcionamiento locomotor y la función muscular (Kutlesa y Caveney, 2001; Peltzer et al., 2013).

El GST juega un papel clave en la fase II del proceso de biotransformación que protege a las células de los contaminantes (Van der Oost et al., 2003). Se espera que GST aumente en los procesos de desintoxicación, ya que contribuye a proteger los tejidos del estrés oxidativo (Livingstone, 2001). Varios estudios informan la inducción de GST, cuando los animales estuvieron expuestos de forma aguda a contaminantes individuales y mixtos (Lajmanovich et al., 2014; Güngördü et al., 2016; Freitas et al., 2017). Sin embargo, en el presente estudio, la actividad de GST disminuyó en la exposición crónica a GABH y GBH-GABH. La activación de la actividad de GST en respuesta a la exposición aguda en contraste con la variedad de respuesta en la exposición crónica prolongada dependiendo de los tratamientos (ausencia de cambios en el tratamiento de GBH y disminución en los tratamientos de GABH y GBH-GABH), sugiere una respuesta dependiente del tiempo y del compuesto. acción. Esta respuesta crónica de GST también se observó en un estudio previo con la misma especie de renacuajo (Cuzziol Boccioni et al., 2021). Este patrón puede estar relacionado con la inactivación de GST por tóxicos; al agotamiento de la conjugación de glutatión, lo que lleva a GST a perder su actividad (Ensibi et al., 2012), o bien a una adaptación fisiológica de estos organismos a los contaminantes. La disminución de GST en el tratamiento con GABH puede estar relacionada con la conocida interferencia de GA en la biosíntesis de glutatión debido a la similitud estructural con el glutamato y, en consecuencia, a la interferencia de su función (Suter y Sachsse, 1986; Ebert et al., 1990).

La actividad de CAT está relacionada con la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el proceso de bioactivación de xenobióticos (Sk y Bhattacharya, 2006), por lo que la inducción de CAT proporciona una primera línea de defensa contra ROS (Costa et al., 2008). En el presente estudio, la disminución de la actividad de CAT en todos los tratamientos podría sugerir un deterioro en la respuesta hacia una mayor generación de ROS. Ya se ha descrito una disminución en la actividad de CAT para anfibios expuestos a diferentes pesticidas, incluidos GLY y GA (Sotomayor et al., 2015; Ferrari et al., 2011; Reichert et al., 2022). Pelusa et al. (2020) informó la respuesta diferencial de CAT en embriones y renacuajos de *R. arenarum* expuesto a la solución GLY. El cambio temporal en la actividad de CAT que terminó en una disminución en los renacuajos puede indicar exposición a sustancias que generan estrés oxidativo como se observa aquí en renacuajos expuestos a GBH, GABH y GBH-GABH. En general, las enzimas estudiadas de los mecanismos de defensa antioxidantes necesarios para los procesos de protección y bioactivación se alteraron, lo que sugiere un deterioro de la respuesta normal de CAT en la exposición a GBH, GABH y GBH-GABH.

La mezcla GBH-GABH tuvo una respuesta antagónica en la mayoría de los biomarcadores evaluados, mientras que solo la respuesta hormonal mostró aditividad y potenciación de GST. La diversidad de efectos combinados de los contaminantes sobre los anfibios ha sido bien explicada desde diferentes aspectos bioecológicos. Algunos autores concluyeron que el efecto combinado depende de la concentración a la que se estudien los contaminantes, produciendo antagonismo a bajas concentraciones y sinergia a mayores concentraciones (Kunz y Fent, 2009; Ma et al., 2016). Otros autores consideran la proporción de cada compuesto sobre la mezcla como estas

informó un efecto sinérgico de la mezcla no equitóxica a diferencia de la mezcla equitóxica (Peluso et al., 2022). Otros autores también evaluaron los cambios en la interacción de los componentes de la mezcla a diferentes tiempos de exposición, y encontraron antagonismo en exposiciones agudas y sinergia en exposiciones crónicas a mezclas de xenobióticos (Svartz et al., 2012). Además, los biomarcadores se encuentran distribuidos en diferentes lugares de los organismos, lo que aumenta la complejidad del sistema al evaluar mecanismos biológicos sobre sitios activos y comportamientos. Además, la toxicidad de las mezclas de herbicidas en *R. arenarum* que varían de aditivo a antagonista también fueron reportados por Ruiz Arcaute et al. (2020) al evaluar la interacción de GLY-dicamba y GLY-fluorocloridona. Estos autores también destacaron las consideraciones de excipientes desconocidos en formulaciones comerciales adicionales a los ingredientes activos en bioensayos de mezcla para tener una conclusión realista.

Coalova et al. (2014) propusieron que la toxicidad de los coadyuvantes puede ser aditiva a la toxicidad del ingrediente activo y que, por lo tanto, estas sustancias juegan un papel importante en el efecto que la formulación comercial de plaguicidas pueda tener sobre los organismos. Es importante señalar que el hecho de que los biomarcadores aquí estudiados mostraran un efecto no aditivo revela la alta dificultad para asignar una toxicidad esperada, que puede ser diferente en la diversidad de las matrices ambientales.

En general, el análisis de biomarcadores de diferentes niveles de organización proporciona información precisa sobre diferentes aspectos del desarrollo de las larvas, lo que puede permitir una mejor comprensión de los efectos subletales de estos factores estresantes en la disminución de las poblaciones de anfibios (Van der Oost et al., 2003; Peltzer et al., 2017) y la precisión de las evaluaciones de riesgos ambientales (ERA). Varias revisiones sobre ERA para GBH y GABH en ambientes acuáticos han minimizado el riesgo de estos pesticidas para los anfibios en función de los puntos finales de mortalidad (por ejemplo, Soso et al., 2007; Güngördü et al., 2016; Geng et al., 2021; Babalola et al., 2021a) han minimizado el riesgo de estos plaguicidas para los anfibios. Sin embargo, debido a su fisiología única y dependencia del ambiente acuático durante el desarrollo temprano o durante más tiempo para algunas especies, y al hecho de que el momento de la reproducción ocurre al mismo tiempo que las aplicaciones de pesticidas y que su distribución coincide ampliamente con los cultivos GM, los anfibios son altamente sensible a la exposición ambiental a ambos herbicidas como lo sugiere Lajmanovich et al. (2003). En su estudio de la región centro-oriental de Argentina, estos autores describieron efectos teratológicos en anfibios silvestres, que junto con otros factores, podrían tener una fuerte asociación con el uso intensivo de agroquímicos que caracteriza a la región. Por lo tanto, los autores lograron compilar y caracterizar el primer catálogo de malformaciones relacionadas con sitios agrícolas para América del Sur (Peltzer et al., 2011). También en zonas perirurales del norte de Entre Reichert et al. (2022) informó la primera evidencia en el país sobre el efecto de la deriva agrícola en los órganos diana (testículos) como indicativo de alteración endocrina. Por lo tanto, está más que claro que los efectos subletales merecen una consideración fundamental en las evaluaciones de riesgo ambiental de pesticidas y otros contaminantes, pero también destacamos que es necesario tener en cuenta la evaluación del efecto conjunto de las mezclas de contaminantes. Como se muestra en este y estudios anteriores (Cuzziol Boccioni et al., 2021; Lajmanovich et al., 2022), los efectos de los contaminantes individuales pueden diferir en mezclas complejas, que es la forma más probable en que se encuentran en condiciones ambientales reales.

## 5. Conclusiones

La mayor toxicidad y la implicación ecológica de GABH se determinaron en un estudio anterior (Lajmanovich et al., 2022), donde GABH fue quinientos por ciento más tóxico que GBH. En esta misma línea de evidencia, la presente investigación demostró que existe una fuerte interacción química entre los principios activos de ambos herbicidas, la cual se demuestra principalmente como antagónica en la mayoría de los biomarcadores analizados. En este estudio, la tendencia de mayor toxicidad de GABH en comparación con GBH también se observó principalmente en relación con el efecto teratogénico, el daño en el ADN, la alteración hormonal (T4) y el estrés oxidativo. De hecho, la mayor toxicidad de GABH y la mezcla con GBH aumentó la conocida

riesgo ecotoxicológico para los organismos acuáticos y la salud de los sistemas acuáticos. Finalmente, se necesita un alto urgente a la aprobación continua de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas, como los AG, que carecen de evaluaciones bioéticas y avales a nivel científico multidisciplinario y poblacional.

#### Declaración de contribución del autor

Ana P. Cuzziol Boccioni: Metodología, Análisis formal, Investigación, Redacción del borrador original, Germán Lener: Metodología, Investigación, Redacción-Revisión, Julieta Peluso: Metodología, Revisión y edición, Paola M. Peltzer: Análisis formal, Investigación, Redacción-Revisión & Edición, Andrés M. Attademo: Supervisión. Metodología, Revisión, Carolina Aronzon: Metodología, Revisión, María F. Simoniello: Metodología, Revisión, Luisina D. Demonte: Metodología, María R. Repetti: Metodología, Rafael C. Lajmanovich: Redacción-Revisión & Edición, Supervisión.

#### Declaración de competencia de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo informado en este documento.

#### Disponibilidad de datos

Los datos estarán disponibles a petición.

#### Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a la memoria de Carlos Vicente, (ONG Granos y fundador de la UCCSNAL), referente en la lucha por las semillas libres y la soberanía alimentaria. Sus luchas campesinas y ecológicas han promovido en las comunidades el cuidado de la biodiversidad y la defensa de sus territorios y la subsistencia, y han motivado a científicos comprometidos con la sociedad y la naturaleza.

Este estudio fue apoyado en parte por la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y la Tecnología (ANPCyT FONCYT PICT, 2019 N° 3293 y 2017 N°1069), y el Curso de Acción para la Investigación y Promoción de la Ciencia (CAI+D-UNL, PIC No. 50620190100036LI), Argentina.

#### Apéndice A. Datos complementarios

Los datos complementarios a este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136554>.

#### Referencias

- Aebi, H., 1984. Catalasa *in vitro*. *Métodos Enzymol.* (105), 121–126.
- Alavanja, MC, 2009. Uso y exposición a pesticidas extensos en todo el mundo. *Rev. Medio Ambiente. Salud* 24 (4), 303–309. <https://doi.org/10.1515/revh.2009.24.4.303>.
- Delgado, IF, Paumgarten, FJ, 2016. Glifosato y embarazo adverso resultados, una revisión sistemática de estudios observacionales. *Publicación de BMC. Salud* 16 (1), 472. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3153-3>.
- Arcaute, CR, Brodeur, JC, Soloneski, S., Larramendy, ML, 2020. Toxicidad para *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) de mezclas de herbicidas comúnmente utilizadas para tratar malezas resistentes que contienen barbechos: glifosato-dicamba y glifosato-fluorocloridona. *Quimiosfera* 245, 125623.
- Asociación para la Promoción de la Cultura, y, 2020. La deforestación de nuestros bosques nativos. APCD, Argentina el Desarrollo (APCD).
- Attademo, AM, Lajmanovich, RC, Peltzer, PM, Cuzziol Boccioni, AP, Martinuzzi, C., Simoniello, F., Repetti, MR, 2021. Efectos del herbicida emulsionable Dicamba en renacuajos de anfibios: ¿un riesgo de toxicidad subestimado? *Reinar. ciencia contaminar Res.* 28 (24), 31962–31974. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13000-x>.
- Áy, Z., Mihály, R., Cserhádi, M., Kótai, É., Pauk, J., 2012. The effect of high concentrations of glufosinato de amonio en los componentes de rendimiento del trigo de primavera transgénico (*Triticum aestivum* L.) que expresa constitutivamente el gen bar. *ciencia Mundo J.*, 657945. <https://doi.org/10.1100/2012/657945>, 2012.
- Ayala, F., Fedrigo, GV, Burachik, M., Miranda, PV, 2019. Equivalencia compositiva del evento IND-ØØ412-7 al trigo no transgénico. *Res. transgénica.* 28 (2), 165–176. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00111-y>.
- Ayres, M., Ayres, M., Ayres, DL, Santos, AS, 2003. *BioStat 3.0. Sociedad Civil Mamirauá/MCT-CNPq, Belém.*

- Babalola, OO, Truter, JC, van Wyk, JH, 2019. Mortalidad, teratogenicidad y crecimiento inhibición de tres formulaciones de glifosato mediante el ensayo de teratogénesis de embriones de rana-Xenopus. *Aplicación J. Toxicol.* 39 (9), 1257–1266. <https://doi.org/10.1002/jat.3811>.
- Babalola, OO, Truter, JC, Van Wyk, JH, 2021a. Impactos letales y teratogénos de formulaciones de herbicidas de imazapir, dibromuro de dicuat y glufosinato de amonio utilizando el ensayo de teratogénesis de embriones de rana-Xenopus (FETAX). *Arco. Reinar. contacto Toxicol.* 80 (4), 708–716. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00756-5>.
- Babalola, OO, Truter, JC, Archer, E., van Wyk, JH, 2021b. Impactos de exposición de concentraciones ambientalmente relevantes de una formulación herbicida de glufosinato de amonio sobre el desarrollo larvario y la histología tiroidea de *Xenopus laevis*. *Arco. Reinar. contacto Toxicol.* 80 (4), 717–725. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00758-3>.
- Bach, NC, Natale, GS, Somoza, GM, Ronco, AE, 2016. Efecto sobre el crecimiento y desarrollo e inducción de anomalías por una formulación comercial de glifosato y su ingrediente activo durante dos etapas de desarrollo de la rana criolla sudamericana, *Leptodactylus latrans*. *Reinar. ciencia contaminar Res.* 23 (23), 23959–23971. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7631-z>.
- Benbrook, CM, 2016. Tendencias en el uso de herbicidas de glifosato en los Estados Unidos y globalmente. *Reinar. ciencia EUR.* 28 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- Bhatt, P., Joshi, T., Bhatt, K., Zhang, W., Huang, Y., Chen, S., 2021. Interacción vinculante de glifosato con glifosato oxidoreductasa y liasa C-P: estudios de simulación de dinámica molecular y acoplamiento molecular. *J. Material de peligro.* 409, 124927. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124927>.
- Blaustein, AR, Johnson, PJ, 2003. La complejidad de los anfibios deformados. *Fronte. Ecol. Reinar.* 1, 87–94.
- Bonifacio, AF, Hued, AC, 2019. Efectos únicos y conjuntos de la exposición crónica a pesticidas a base de clorpirifos y glifosato en biomarcadores estructurales en *Cnesterodon decemmaculatus*. *Quimiosfera* 236, 124311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>.
- Buchholz, DR, 2015. Más similar de lo que piensas: la metamorfosis de la rana como modelo de Endocrinología perinatal humana. *desarrollo Biol.* 408 (2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.02.018>.
- Burraco, P., Gomez-Mestre, I., 2016. Respuestas fisiológicas al estrés en larvas de anfibios a múltiples factores estresantes revelan marcados efectos antropogénicos incluso por debajo de niveles letales. *Fisiol. Bioquímica Zool.* 89, 462–472. <https://doi.org/10.1086/688737>.
- Calas, AG, Richard, O., Mème, S., Beloeil, JC, Doan, BT, Gefflaut, T., Montécot, C., 2008. La exposición crónica al glufosinato de amonio induce alteraciones de la memoria espacial, modificaciones en la resonancia magnética del hipocampo y activación de la glutamina sintetasa en ratones. *Neurotoxicología* 29 (4), 740–747.
- Coalova, I., Ríos de Molina, M., del, C., Chaufan, G., 2014. Influencia de la aspersión adyuvante sobre los efectos de toxicidad de una formulación de glifosato. *Toxicol. Vitro* 28, 1306–1311. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.014>.
- Collins, AR, 2009. Investigando el daño oxidativo del ADN y su reparación usando el cometa ensayo. *Mutat. Res.* 681, 24–32.
- Collins, AR, 2014. Medición del daño oxidativo al ADN y su reparación con el cometa ensayo. *BBA-Temas generales* 1840 (2), 794–800.
- Costa, MJ, Monteiro, DA, Oliveira-Neto, AL, Rantin, FT, Kalinin, AL, 2008. Biomarcadores de estrés oxidativo y función cardíaca en renacuajos de rana tordo expuestos a Roundup Original. *Ecotoxicología* 17 (3), 153–163.
- Curi, LM, Peltzer, PM, Martinuzzi, C., Attademo, MA, Seib, S., Simoniello, MF, Lajmanovich, RC, 2017. Desarrollo alterado, estrés oxidativo y daño en el ADN en larvas de *Leptodactylus chaquensis* (Anura: leptodactylidae) expuestas a la cama de aves de corral. *ecotoxicol. Reinar. seguro* 143, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.007>.
- Cuzziol Boccioni, AP, Lajmanovich, RC, Peltzer, PM, Attademo, AM, Martinuzzi, C. S., 2021. Evaluación de toxicidad en diferentes escenarios experimentales con glifosato, clorpirifos y antibióticos en renacuajos de *Rhinella arenarum* (Anura: bufonidae). *Quimiosfera* 273, 128475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128475>. base de datos, ArgenBio©.2022. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Cultivos transgénicos aprobados en Argentina. Disponible en: <http://www.argenbio.org/cultivos-transgenicos>. (Consultado el 3 de julio de 2022).
- Demonte, LD, Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, CG, Beldoménico, HR, Repetti, MR, 2018. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en agua de granjas lecheras de Argentina utilizando un método UHPLC-MS/MS simplificado. *ciencia Entorno Total.* 645, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.340>.
- Dorofeeva, OV, Moiseeva, NF, 2006. Estudio computacional de la termoquímica de compuestos organofosforados (III). *J. física. química* 110 (28), 8925–8932. <https://doi.org/10.1021/jp060982f>.
- Duke, SO, 2018. La historia y el estado actual del glifosato. *Manejo de plagas ciencia* 74 (5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>.
- Ebert, E., Leist, KH, Mayer, D., 1990. Resumen de estudios de toxicidad de evaluación de seguridad de glufosinato de amonio. *Química alimentaria Toxicol.* 28 (5), 339–349.
- Ellman, GL, Courtney, KD, Andres Jr., V., Featherstone, RM, 1961. Una nueva y rápida determinación colorimétrica de la actividad de la acetilcolinesterasa. *Bioquímica Farmacol.* 7 (2), 88–95.
- Ensihi, C., Moreno, DH, Rodríguez, FS, Yahya, MD, Míguez-Santayán, MP, Pérez-López, M., 2012. Efectos de la exposición subcrónica a carbofurano sobre el sistema de defensa antioxidante y niveles de malondialdehído en carpa común (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicol. Reinar. química* 94 (4), 748–759.
- Fernández, LP, Brasca, R., Attademo, AM, Peltzer, PM, Lajmanovich, RC, Culzoni, MJ, 2020. Bioacumulación y actividad de glutatión S-transferasa en *Rhinella arenarum* renacuajos después de una exposición a corto plazo a los antirretrovirales. *Quimiosfera* 246, 125830.

- Ferrari, A., Lascano, C., de D'Angelo, AMP, Venturino, A., 2011. Efectos del azinfol metilo y carbarilo en las esterasas de larvas de *Rhinella arenarum* y enzimas antioxidantes. *compensación Bioquímica Physiol., Parte C: Toxicol. Farmacol.* 153 (1), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.csc.2011.03.001>.
- Sillart, SB, Beck, JM, Vyas, S., Callam, CS, Hadad, CM, 2019. Resurrección y reactivación de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. *química Eur J.* 25 (21), 5337–5371.
- Freitas, JS, Felício, AA, Teresa, FB, de Almeida, EA, 2017. Efectos combinados de temperatura y clomazona (Gamtit®) sobre las respuestas al estrés oxidativo y la actividad de la B-esterasa de *Physalaemus nattereri* (Leuopidae) y *Rinella schneideri* (Bufonidae) renacuajos. *Quimiosfera* 185, 548–562.
- Gabor, CR, Perkins, HR, Heitmann, AT, Forsburg, ZR, Aspbury, AS, 2019. Redondeo™ con corticosterona funciona como un infodisruptor de la respuesta antidepredadora en renacuajos. *Frente. Ecol. Evol.* 7, 114.
- Geng, Y., Jiang, L., Zhang, D., Liu, B., Zhang, J., Cheng, H., Wang, L., Peng, Y., Wang, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Liu, X., 2021. Glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato de amonio en aguas subterráneas y superficiales agrícolas en China de 2017 a 2018: ocurrencia, principales impulsores y evaluación de riesgos ambientales. *ciencia Entorno Total.* 769, 144396 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144396>. Gosner, KL, 1960. Una tabla simplificada para la estadificación de embriones y larvas de anuros con notas en la identificación. *Herpetológica* 16 (3), 183–190.
- Grau, HR, Aide, TM, Gasparri, NI, 2005. Globalización y expansión de la soja en ecosistemas semiáridos de Argentina. *Ambiente* 34 (3), 265–266. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-34.3.265>.
- Grott, SC, Israel, N., Lima, D., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, TC, de Almeida, EA, 2022. Influencia de la temperatura en el crecimiento, desarrollo y metabolismo tiroideo de los renacuajos de la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) expuestos al herbicida tebutiuron. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 94, 103910 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103910>.
- Güngördü, A., Uçkun, M., Yoloğlu, E., 2016. Evaluación integrada de bioquímica marcadores en renacuajos premetamórficos de tres especies de anfibios expuestos a pesticidas a base de glifosato y metadifenil en formas únicas y combinadas. *Quimiosfera* 144, 2024–2035.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., Siest, G., 2002. Espectrofotometría rápida método para la actividad sérica de glutatión S-transferasas. *clin. quim. Acta* 326 (1–2), 131–142. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00329-7).
- Habig, WH, Pabst, MJ, Jakoby, WB, 1974. La glutatión S-transferasa es la primera paso enzimático en la formación del ácido mercaptúrico. *En t. J. Biol. química* 249 (22), 7130–7139.
- Herek, JS, Vargas, L., Trindade, SAR, Rutkowski, CF, Macagnan, N., Hartmann, PA, Hartmann, MT, 2021. Efectos genotóxicos del glifosato en los renacuajos de *Physalaemus*. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 81, 103516.
- Herzine, A., Laugeray, A., Feat, J., Menuet, A., Quesniaux, V., Richard, O., Pichon, J., Mintéon-Dubourg, C., Perche, O., Mortaud, S., 2016. La exposición perinatal al herbicida glufosinato de amonio afecta la neurogénesis y la migración de neuroblastos a través de la desestabilización del citoesqueleto. *Frente. Célula. Neurosci.* 10, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00191>.
- Holzer, G., Laudet, V., 2013. Hormonas tiroideas y desarrollo postembrionario en amniotas actual Parte superior. *desarrollo Biol.* 103, 397–425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00014-9>.
- Hu, X., Gong, H., Hollowell, P., Liao, M., Li, Z., Ruane, S., Liu, H., Pambou, E., Mahmoudi, N., Daigliesh, RM, Padia, F., Bell, G., Lu, JR, 2021. ¿Qué sucede cuando los pesticidas se solubilizan en micelas mixtas binarias iónicas/zwitteriónicas-no iónicas? *J. Interfaz coloidal Sci.* 586, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.083>.
- Kaczmarek, DK, Rzemieniecki, T., Gwiazdowska, D., Kleiber, T., Praczyk, T., Pernak, J., 2021. Líquidos iónicos a base de colina como adyuvantes en la formulación de plaguicidas. *J. Mol. Liq.* 327, 114792 <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114792>.
- Kanaya, N., Tsubokawa, T., 2007. Inducción de micronúcleos por herbicidas en medaka (*Oryzias latipes*) células branquiales. *Hiyoshi Rev. Nat. ciencia* 41, 1–14.
- Kunz, PY, Fent, K., 2009. Actividad estrogénica de mezclas de filtros UV ternarios en peces (*Pimephales promelas*)—un análisis con isoblogramas no lineales. *Toxicol. aplicación Farmacol.* 234 (1), 77–88.
- Kutlesa, NJ, Caveney, S., 2001. Actividad insecticida del glufosinato a través de la glutamina. *agotamiento en una oruga. Manejo de plagas ciencia* 57 (1), 25–32.
- Lajmanovich, RC, Sandoval, MT, Peltzer, PM, 2003. Inducción de mortalidad y malformación en *Scinax nasicus* renacuajos expuestos a formulaciones de glifosato. *Toro. Reinar. contacto Toxicol.* 70 (3), 612–618. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>.
- Lajmanovich, RC, Cabagna-Zenkhusen, MC, Attademo, AM, Junges, CM, Peltzer, P. M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Inducción de micronúcleos y anomalías nucleares en renacuajos del sapo común (*Rhinella arenarum*) tratados con los herbicidas Liberty® y glufosinato de amonio. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Reinar. Mutageno.* 769, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>. Lajmanovich, RC, Attademo, AM, Simoniello, MF, Poletta, GL, Junges, CM, Peltzer, PM, Cabagna-Zenkhusen, MC, 2015. Efectos nocivos de la ingesta dérmica de formulaciones comerciales que contienen clorpirifos, 2, 4-D y glifosato en el sapo común *Rhinella arenarum* (Anura: bufonidae). *Contaminación del suelo del aire del agua.* 226 (12), 1–12.
- Lajmanovich, RC, Peltzer, PM, Attademo, AM, Martinuzzi, CS, Simoniello, MF, Colussi, CL, Sigrist, M., 2019. Primera evaluación de los nuevos efectos sinérgicos potenciales de la mezcla de glifosato y arsénico en *Rhinella arenarum* (Anura: bufonidae) renacuajos. *Heliyon* 5 (10), e02601.
- Lajmanovich, RC, Attademo, AM, Lener, G., Cuzziol Boccioni, AP, Peltzer, PM, Martinuzzi, CS, Demonte, LD, Repetti, MR, 2022. Glifosato y glufosinato de amonio, herbicidas de uso común en cultivos genéticamente modificados, y sus interacción con microplásticos: ecotoxicidad en renacuajos de anuros. *ciencia Entorno Total.* 804, 150177 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150177>.
- Landrigan, PJ, Benbrook, C., 2015. OGM, herbicidas y salud pública. *N. ingl. J. Medicina.* 373 (8), 693–695. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1505660>.
- Lee, HJ, Kang, JH, 2021. Disfunción cognitiva prolongada en pacientes con esplenio Lesión del cuerpo calloso causada por intoxicación por glufosinato de amonio. *Turco. J. Emerg. Medicina.* 21 (2), 82.
- Li, Y., Yang, Y., Lei, J., Liu, W., Tong, M., Liang, J., 2021. Las vías de degradación de carbamazepina en el proceso de oxidación avanzada: una mini revisión junto con el cálculo de DFT. *ciencia Entorno Total.* 779, 146498 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146498>.
- Liu, R., Qin, Y., Diao, J., Zhang, H., 2021. *Xenopus laevis* renacuajos expuestos a metamorfosis: cambios en el crecimiento, puntos finales de comportamiento, neurotransmisores, sistema antioxidante y desarrollo de la tiroidea. *ecotoxicol. Reinar. seguro* 220, 112417 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112417>.
- Livingstone, DR, 2001. Producción de especies reactivas de oxígeno estimuladas por contaminantes y daño oxidativo en organismos acuáticos. *Contaminación de marzo. Toro.* 42 (8), 656–666.
- López González, E., Odetti, LM, Latorre, MA, Ávila, OB, Contini, LE, Siroski, PA, Poletta, GL, 2022. Un enfoque integral que utiliza múltiples biomarcadores para detectar daños inducidos por pesticidas en caimanes de hocico ancho (*Caimán latirostris*) en condiciones exsitu. *Heliyon* 8 (1), e08667. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021. e08667>.
- Lourido, M., Peluso, J., Aronzon, CM, 2022. Efectos letales y subletales de los emergentes oxitetraciclina contaminante en el desarrollo embrionario-larvario de *Rinella arenarum*. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 89, 103783 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103783>.
- Ma, M., Chen, C., Yang, G., Li, Y., Chen, Z., Qian, Y., 2016. Efectos citotóxicos combinados de mezclas de pesticidas presentes en la dieta china en línea celular de hepatocarcinoma humano. *Quimiosfera* 159, 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.050>.
- Makkar, P., Ghosh, NN, 2021. Una revisión sobre el uso de DFT para la predicción de la propiedades de los nanomateriales. *RSC Avanzado.* 11, 27897–27924. <https://doi.org/10.1039/d1ra04876g>.
- Malafaia, G., Nascimento, Í.F., Estrela, FN, Guimarães, ATB, Ribeiro, F., da Luz, TM, de Lima Rodrigues, AS, 2021. Enfoque de toxicología verde que involucra biomarcadores de ácido poliláctico y renacuajos neotropicales: ¿Eco seguridad toxicológica o peligro ambiental? *ciencia Entorno Total.* 783, 146994.
- Mandal, A., Kumar, A., Singh, N., 2021. Mecanismos de sorción de la eliminación de plaguicidas de matriz de efluentes usando biocarbón: conclusiones de estudios de modelado molecular validados por experimentos de soluto simple, binario y ternario. *J. Medio Ambiente. Administrar* 295, 113104 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113104>.
- Mann, RM, Bidwell, JR, 1999. La toxicidad del glifosato y varios glifosato formulaciones a cuatro especies de ranas del suroeste de Australia. *Arco. Reinar. contacto Toxicol.* 36, 193–199.
- Mansour, SA, Heikal, TM, Mossa, AH, Refaie, AA, 2008. Efectos tóxicos de cinco insecticidas y su mezcla en ratas albinas macho. *J. Egipto. Soc. Toxicol.* 39, 85–94.
- Margolin, BH, Collings, BJ, Mason, JM, 1983. Análisis estadístico y tamaño de muestra determinaciones para experimentos de mutagenicidad con respuestas binomiales. *Reinar. Mutageno.* 5 (5), 705–716.
- Marlatt, VL, Veldhoen, N., Lo, BP, Bakker, D., Rehaume, V., Vallée, K., Helbing, CC, 2013. La exposición al triclosán altera el desarrollo postembrionario en una rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*) Ensayo de metamorfosis de anfibios (TREEMA). *agua Toxicol.* 126, 85–94.
- Masiol, M., Gianni, B., Prete, M., 2018. Herbicidas en agua de río en el noreste Italia: presencia y patrones espaciales de glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato de amonio. *Reinar. ciencia contaminar Res.* 25 (24), 24368–24378. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2511-3>.
- McMahon, TA, Boughton, RK, Martin, LB, Rohr, JR, 2017. Exposición al herbicida la atrazina afecta de forma no lineal los niveles de corticosterona en renacuajos. *J. Herpetol.* 51, 270–273. <https://doi.org/10.1670/16-126>.
- Mesnage, R., Benbrook, C., Antoniou, MN, 2019. Información sobre la confusión sobre coformulantes de surfactantes en herbicidas a base de glifosato. *Química alimentaria Toxicol.* 128, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ftc.2019.03.053>.
- Mesnage, R., Mazzacava, F., Caldwell, A., Halket, J., Antoniou, MN, 2021. Urinario excreción de coformulantes de herbicidas después de la exposición oral a Roundup Mon 52276 en ratas. *Reinar. Res.* 197, 111103 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111103>.
- Milesi, MM, Lorenz, V., Pacini, G., Repetti, MR, Demonte, LD, Varayoud, J., Luque, E. H., 2018. La exposición perinatal a un herbicida a base de glifosato afecta los resultados reproductivos femeninos e induce efectos adversos de segunda generación en ratas Wistar. *Arco. Toxicol.* 92 (8), 2629–2643. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2236-6>. Mo, Q., Yang, X., Wang, J., Xu, H., Li, W., Fan, Q., Gao, S., Yang, W., Gao, C., Liao, D., Li, Y., Zhang, Y., 2021. Mecanismo de adsorción de dos pesticidas en microplásticos de polietileno y polipropileno: cálculos DFT y efectos del tamaño de partículas. *Reinar. contaminar* 291, 118120 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118120>.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, JM, Jha, AN, Costil, K., 2013. Efectos de los herbicidas a base de glifosato sobre el desarrollo embrionario-larvario y la metamorfosis en la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. *agua Toxicol.* 128, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.002>.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrer, V., Devaux, A., 2006. Comparativo evaluación de la genotoxicidad del captan en larvas de anfibios (*Xenopus laevis* y *Pleurodeles waltl*) mediante el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos. *Reinar. Toxicol.* 21 (3), 264–277.
- Moura, FR, da Costa Marisco, P., Sinhoro, AP, Sinhoro, VDG, 2018. Toxicidad aguda y efectos de Roundup Original® en pintado da Amazonia. *Reinar. ciencia contaminar Res.* 25 (25), 25383–25389. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2630-x>.
- Murussi, CR, Costa, MD, Leitemperger, JW, Guerra, L., Rodrigues, CC, Menezes, C. C., Severo, ES, Flores-Lopes, F., Salbego, J., Loro, VL, 2016. Exposición a diferentes

- formulaciones de glifosato sobre el estado oxidativo e histológico de *Rhamdia quelen*. Fisiol de pescado. *Bioquímica* 42 (2), 445–455. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0150-x>.
- Odetti, LM, González, EL, Romito, ML, Simoniello, MF, Poletta, GL, 2020. Genotoxicidad y estrés oxidativo en *Caimán latirostris* crías expuestas a formulaciones de pesticidas y sus mezclas durante el periodo de incubación. *ecotoxicol. Reinar. seguro* 193, 110312.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, SL, Carrasco, AE, 2010. A base de glifosato los herbicidas producen efectos teratogénicos en los vertebrados al alterar la señalización del ácido retinoico. *química Res. Toxicol.* 23 (10), 1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>.
- Pavan, FA, Samojeden, CG, Rutkoski, CF, Folador, A., Da Fré, SP, Müller, C., Hartmann, MT, 2021. Efectos morfológicos, conductuales y genotóxicos del glifosato y la mezcla 2,4-D en renacuajos de dos especies nativas de anfibios sudamericanos. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 85, 103637.
- Peltzer, PM, Lajmanovich, RC, Sánchez, LC, Attademo, AM, Junges, CM, Bionda, C., Martino, L., Bassó, A., 2011. Anomalías morfológicas en poblaciones de anfibios del medio oriente argentino. *Herpetol. Conservar Biol.* 6, 432–442. Peltzer, PM, Junges, CM, Attademo, AM, Bassó, A., Grenón, P., Lajmanovich, RC, 2013. Actividades de colinesterasa y cambios de comportamiento en *Hypsiboas pulchellus* (Anura: hylidae) renacuajos expuestos al herbicida glufosinato de amonio. *Ecotoxicología* 22 (7), 1165–1173. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1103-8>. Peltzer, PM, Lajmanovich, RC, Attademo, AM, Junges, CM, Teglia, CM, Martinuzzi, C., Goicoechea, HC, 2017. Ecotoxicidad de los antibióticos veterinarios enrofloxacin y ciprofloxacina en larvas de anfibios anuros. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 51, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>.
- Peltzer, PM, Lajmanovich, RC, Martinuzzi, C., Attademo, AM, Curi, LM, Sandoval, MT, 2019. Biotoxicidad del diclofenaco en dos larvas de anfibios: evaluación del desarrollo, crecimiento, función y ritmo cardíaco, comportamiento y sistema antioxidante. *ciencia Entorno Total.* 683, 624–637.
- Peluso, J., Aronzon, CM, Pérez Coll, CS, 2019. Evaluación de la calidad ambiental de cuerpos de agua próximos a zonas agrícolas de la provincia de Buenos Aires (Argentina) mediante estudios ecotoxicológicos con *Rhinella arenarum*. *J. Medio Ambiente. ciencia Sanar.* B 54 (8), 655–664. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1622979>.
- Peluso, J., Aronzon, CM, de Molina, MDCR, Rojas, DE, Cristos, D., Coll, CSP, 2020. Análisis integrado de la calidad de los cuerpos de agua de la cuenca baja del río Paraná con diferentes usos productivos mediante indicadores fisicoquímicos y biológicos. *Reinar. contaminar* 263, 114434 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114434>. Peluso, J., Pérez Coll, CS, Cristos, D., Rojas, DE, Aronzon, CM, 2021. Integral evaluación de la calidad del agua a través de diferentes enfoques: parámetros fisicoquímicos y ecotoxicológicos. *ciencia Entorno Total.* 800, 149510.
- Peluso, J., Furió Lanuza, A., Pérez Coll, CS, Aronzon, CM, 2022. Efectos sinérgicos de mezclas de plaguicidas a base de glifosato y 2, 4-D en *Rhinella arenarum* larvas. *Reinar. ciencia contaminar Res.* 29 (10), 14443–14452.
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., Lippe, C., 2009. ¿Por qué los anfibios son más sensibles que los mamíferos a los xenobióticos. *PLoS Uno* 4 (11), e7699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>.
- Reichert, LMM, de Oliveira, DR, Papaleo, JL, Valgas, AAN, Oliveira, GT, 2022. Marcadores bioquímicos y de condición corporal en renacuajos de *Rhinella icterica* expuestos a herbicidas a base de atrazina, glifosato y quinclorac en concentraciones ecológicamente relevantes. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 93, 103884 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103884>.
- Relyea, RA, Jones, DK, 2009. La toxicidad de Roundup Original Max® a 13 especies de larvas de anfibios. *Reinar. Toxicol. química* 28 (9), 2004–2008. Sanchez-Hernandez, JC, 2007. Perspectivas ecotoxicológicas de las B-esterasas en el evaluación de la contaminación por plaguicidas. *Reinar. ciencia polaco* 1–45, 2007.
- Sandoval, MT, Gaona, R., Curi, LM, Abrelano, F., Lajmanovich, RC, Peltzer, PM, 2022. Desarrollo del corazón de anuros y periodos críticos de desarrollo: un análisis comparativo de tres especies de anuros neotropicales. *Anat. rec.* 1–15 <https://doi.org/10.1002/ar.24933>.
- SANTE, 2021. Procedimientos Analíticos de Control de Calidad y Validación de Métodos para Plaguicidas Análisis de Residuos en Alimentos y Piensos. Documento N° SANTE/2021/11312. [https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmp/rt\\_article.asp?CntID=727](https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmp/rt_article.asp?CntID=727).
- Schleder, GR, Padilha, ACM, Acosta, CM, Costa, M., Fazzio, A., 2019. De DFT a aprendizaje automático: enfoques recientes de la ciencia de los materiales: una revisión. *J Phys Mater* 2 (3), 032001. <https://doi.org/10.1088/2515-7639/ab084b>.
- Schulte-Hermann, R., Wogan, GN, Berry, C., Brown, NA, Czeizel, A., Giavini, E., Sullivan, FM, 2006. Análisis de toxicidad reproductiva y clasificación de glufosinato de amonio. *Reg. Toxicol. Farmacol.* 44 (3), 1–76.
- Singh, NP, McCoy, MT, Tice, RR, Schneider, EL, 1988. Una técnica simple para cuantificación de niveles bajos de daño en el ADN en células individuales. *Exp. Resolución celular* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- Siyum, ZG, 2020. Dinámica del bosque seco tropical en el contexto del cambio climático: síntesis de impulsores, lagunas y perspectivas de gestión. *Proceso Ecol* 9, 25. <https://doi.org/10.1186/s13717-020-00229-6>.
- Sk, UH, Bhattacharya, S., 2006. Prevención de la peroxidación lipídica inducida por cadmio, agotamiento de algunas enzimas antioxidantes y glutatión por una serie de nuevos organoselenocianatos. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 22 (3), 298–308.
- Sly, MJH, 2017. La parte argentina de la cadena productiva de la soja. *Palgrave Común* 3 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1057/palcomms.2017.95>.
- Soler, JM, Artacho, E., Gale, JD, García, A., Junquera, J., Ordejón, P., Sánchez-Portal, D., 2002. El método SIESTA para la simulación de materiales de orden N ab initio. *J. física. condensa. Asunto* 14, 2745–2779. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/14/11/302>.
- Soso, AB, Barcellos, LJG, Ranzani-Paiva, MJ, Kreutz, LC, Quevedo, RM, Anzilero, D., Finco, JA, 2007. La exposición crónica a una concentración subletal de un herbicida a base de glifosato altera los perfiles hormonales y afecta la reproducción de hembras Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 23 (3), 308–313. Sotomayor, V., Chiriotto, TS, Pechen, AM, Venturino, A., 2015. Bioquímica biomarcadores de efectos subletales en la gástrula tardía de *Rhinella arenarum* expuesta al organofosforado clorpirifos. *pesticida Bioquímica Fisiol.* 119, 48–53.
- Suter, P., Sachsse, K., 1986. Estudio combinado de toxicidad crónica/oncogenicidad en la rata. *Administración dietética. Informe AG de la empresa de investigación y consultoría*, 018505. Svartz, GV, Aronzon, CM, Pérez Coll, CS, 2012. Combinación de endosulfán y toxicidad inducida por cipermetrina para el desarrollo embrionario-larvario de *Rhinella arenarum*. *J. Toxicol. Reinar. Salud, Parte A* 35, 373–374. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1126211>.
- Teglia, CM, Attademo, AM, Peltzer, PM, Goicoechea, HC, Lajmanovich, RC, 2015. Concentración de retinoides plasmáticos en *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: leptodactylidae) de agroecosistemas arroceros, provincia de Santa Fe, Argentina. *Quimiosfera* 35, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.063>. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, NP, 2003. Bioacumulación de peces y biomarcadores en evaluación de riesgos ambientales: una revisión. *Reinar. Toxicol. Farmacol.* 13 (2), 57–149.
- Vandenbergh, LN, Colborn, T., Hayes, TB, Heindel, JJ, Jacobs Jr., DR, Lee, DH, Myers, JP, 2012. Hormonas y sustancias químicas disruptoras endocrinas: efectos de dosis bajas y respuestas a dosis no monotónicas. *Endoc. Rev.* 33 (3), 378–455.
- Wada, H., 2008. Glucocorticoides: mediadores de transiciones ontogenéticas de vertebrados. *general compensación Endocrinol.* 156 (3), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2008.02.004>.
- Wang, F., Chen, X., Yang, D., Yang, J., Kang, J., Zhao, B., Li, X., Pu, Y., Zheng, N., Dong, W., 2016. Toxicidad del glufosinato de amonio en embriones y larvas de pez cebra. *Barbilla. J. Pesticida Sci.* 18 (3), 323–329. <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2016.0044>.
- Watanabe, T., Iwase, T., 1996. Efectos dismorfogénicos y de desarrollo del glufosinato amonio en embriones de ratón en cultivo. *Teratog. Carcinog. Mutageno.* 16 (6), 287–299.
- Xiong, G., Deng, Y., Li, J., Cao, Z., Liao, X., Liu, Y., Lu, H., 2019. Inmunotoxicidad y Análisis del transcriptoma de embriones de pez cebra en respuesta a la exposición al glufosinato de amonio. *Quimiosfera* 236, 124423. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124423>.
- Yan, B., Lei, L., Chen, X., Men, J., Sun, Y., Guo, Y., Yang, L., Wang, Q., Han, J., Zhou, B., 2022. Glifosato y glufosinato de amonio en estanques de acuicultura y productos acuáticos: ocurrencia y evaluación de riesgos para la salud. *Reinar. contaminar* 296, 118742. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118742>.
- Yeon, S., Kim, SH, Sim, J., Kim, S., Lee, Y., Kim, H., Cha, YS, 2022. Componente principal causando toxicidad neurológica en la intoxicación aguda por glufosinato de amonio: determinación de glufosinato, 1-metoxi-2-propanol y amoniaco en suero y líquido cefalorraquídeo. *clin. Toxicol.* 60 (3), 286–292.
- Zhan, T., Zhang, K., Chen, Y., Lin, Y., Wu, G., Zhang, L., Liu, Z., 2013. Mejorando actividad de oxidación de glifosato de la glicina oxidada de *Bacillus cereus* por evolución dirigida. *PLoS One* 8 (11), e79175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079175>.
- Zhang, L., Chen, L., Meng, Z., Zhang, W., Xu, X., Wang, Z., Qin, Y., Deng, Y., Liu, R., Zhou, Z., Diao, J., 2019. Bioacumulación, cambios de comportamiento y alteraciones fisiológicas con dependencia del género en lagartos (*Emmias argos*) después de la exposición a glufosinato de amonio y l-glufosinato de amonio. *Chemosphere* 226, 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.007>.