

# TOXICIDAD DE CLORPIRIFOS COMO ELEMENTO ACTIVO DE UN FORMULADO COMERCIAL EN JUVENILES DEL CANGREJO *Trichodactylus borellianus*

**MARCELA CECILIA MONTAGNA**

Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UNL).

E-mail: mcmontg@hotmail.com

## RESUMEN

En el cangrejo *Trichodactylus borellianus* se determinó la toxicidad letal aguda del insecticida clorpirifós, como elemento activo de un formulado comercial. Por otra parte, los efectos crónicos del insecticida se evaluaron sobre el crecimiento de los juveniles de *T. borellianus*. El valor de la  $CL_{50}$  fue 45,53  $\mu\text{g/L}$  a las 96 horas, siendo los límites inferior y superior del intervalo de confianza al 95 % de 25,28 y 67,75, respectivamente. Durante dos meses de exposición al insecticida, el incremento de tamaño por muda disminuyó significativamente en los cangrejos juveniles expuestos a la concentración 1,25  $\mu\text{g/L}$ . El período de intermuda fue también afectado por el agroquímico, incrementándose significativamente en todas las concentraciones ensayadas. Los resultados muestran una elevada sensibilidad de los juveniles de *T. borellianus* a la contaminación con clorpirifós, por lo cual esta especie podría ser considerada como centinela para estudios de monitoreo ambiental.

### Palabras clave:

*Trichodactylus borellianus*, clorpirifós,  $CL_{50}$ , crecimiento.

# TOXICITY OF CHLORPYRIFOS AS ACTIVE ELEMENT OF A COMMERCIAL FORMULATE ON JUVENILE CRAB *Trichodactylus borellianus*

**MARCELA CECILIA MONTAGNA**

Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UNL).

E-mail: mcmontg@hotmail.com

## ABSTRACT

The acute lethal toxicity of chlorpyrifos insecticide as an active element of a commercial formulate was determined for the crab *Trichodactylus borellianus*. On the other hand, the chronic effects of the insecticide were evaluated on the growth of juvenile *T. borellianus*.  $LC_{50}$  value was  $45.53 \mu\text{g L}^{-1}$  at 96 hours, being the lower and upper of confidence intervals for 95 % of 25.28 and 67.75 respectively. Over the two months of exposure to the insecticide, the increment in size per molt decreased significantly in juvenile crabs exposed to a concentration of  $1.25 \mu\text{g L}^{-1}$ . The intermolt period was also affected by the agrochemical, increasing significantly at all the concentrations assayed. Results show a high sensitivity of juvenile *T. borellianus* to contamination with chlorpyrifos. Therefore, this species could be considered as a sentinel for environmental monitoring studies.

## Key words:

*Trichodactylus borellianus*, chlorpyrifos,  $LC_{50}$ , growth.

## INTRODUCCIÓN

Los ambientes acuáticos son afectados por el uso de agroquímicos, que en gran medida ingresan al agua asociados a las partículas de sedimento transportadas por escorrentía desde áreas agrícolas (Walker *et al.*, 2001). Entre los plaguicidas organofosforados, clorpirifós es uno de los insecticidas de mayor uso en la Argentina. Este biocida resulta efectivo en el control de un amplio espectro de especies de insectos chupadores y masticadores de cultivos como la soja, maíz, sorgo, girasol, algodón, alfalfa, tabaco, papa, hortalizas y numerosas plantas frutales (CASAFE, 2007). En el caso de la soja, el incremento histórico en el área sembrada a 18,15 millones de hectáreas durante 2009/2010 (MAGyP, 2011) y la aplicación de agroquímicos en esta oleaginosa principalmente en los meses de Noviembre a Marzo, coincidente con momentos de lluvia intensa en la región pampeana, favorecen la deriva de los agrotóxicos de las zonas de cultivo. En ambientes acuáticos de esta región, clorpirifós fue detectado en concentraciones de 0,45 µg/L en agua, 13,5 µg/Kg en sedimento de fondo y 225,8 µg/Kg en partículas suspendidas luego de un evento de lluvia (Jergentz *et al.*, 2005).

Si bien los biocidas organofosforados poseen baja persistencia en los ecosistemas acuáticos, su alta toxicidad y escasa selectividad incrementan el riesgo potencial de causar efectos adversos en especies vulnerables (Tang *et al.*, 2005). En este contexto, Jergentz *et al.* (2004) registraron una reducción del 10 al 100 % en la supervivencia del anfípodo *Hyalella curvispina* y del camarón *Macrobrachium borellii* en arroyos pampeanos contaminados con clorpirifós. En laboratorio, la toxicidad letal aguda del insecticida fue estudiada en numerosas especies de crustáceos, así como también su incidencia sobre la enzima acetilcolinesterasa y algunas células neurosecretoras (USEPA, 1986; Lund *et al.*, 2000; Key & Fulton, 2002; Senthilkumar *et al.*, 2007; Xuereb *et al.*, 2007). Sin embargo, son escasos los antecedentes que describen las alteraciones ocurridas en el crecimiento de crustáceos expuestos a clorpirifós.

El cangrejo *Trichodactylus borellianus*, Nobili 1896, con su ciclo de vida completo en ambientes dulciacuícolas, es una especie común de la familia Trichodactylidae y de amplia distribución en América del Sur (Lopretto, 1995; Magalhães *et al.*, 2003). En el valle aluvial del sistema del Río Paraná, este crustáceo decápodo es uno de los invertebrados más abundantes asociados a las raíces de plantas flotantes y al sedimento de las márgenes de las lagunas, arroyos y ríos aledaños a áreas de cultivo (Poi de Neiff & Neiff, 1980). La especie *T. borellianus* es omnívora y se alimenta de elementos del fitoplancton, zooplancton y bentos (Collins *et al.*, 2006, 2007), y es considerada un componente de la dieta de peces, anfibios, aves y mamíferos, por lo que cumple un rol fundamental en la transferencia de materia y energía en la comunidad acuática y terrestre (Bonetto *et al.*, 1963; Massoia, 1976; Oliva *et al.*, 1981; Beltzer & Paporello, 1984; Lajmanovich *et al.*, 2005). Esta característica de la especie, además de la alta disponibilidad en los ecosiste-

mas locales y la fácil obtención y mantenimiento en cautiverio, permiten su uso como organismo de prueba en estudios experimentales (Montagna & Collins, 2004, 2008).

En el presente trabajo se determinó la toxicidad letal aguda de un formulado comercial de clorpirifós sobre juveniles del cangrejo *T. borellianus*. También se evaluaron los efectos sobre el crecimiento de los juveniles de *T. borellianus* en términos del incremento de tamaño luego de la muda y de la duración del período de intermuda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *T. borellianus* se recolectaron de zonas litorales con abundante vegetación acuática flotante del Río Salado, tributario del río Paraná, en áreas cuyas características físicas y químicas presentaban un menor impacto antrópico. En el laboratorio, estos fueron colocados en acuarios de 50 L y mantenidos durante 7 días en condiciones similares a las experimentales:  $25 \pm 1$  °C; pH  $7,4 \pm 0,4$ ; conductividad  $900 \pm 150$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; dureza  $383 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$ ; oxígeno disuelto  $6,0 \pm 0,5$  mg/L y fotoperiodo 14–10 hs luz–oscuridad. Los cangrejos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta de 36 % de proteínas y 10 % de lípidos, preparada según Collins & Petriella (1996), suplementada con músculo de pescado fresco. El tamaño de los cangrejos utilizados en los ensayos no varió significativamente entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). El insecticida seleccionado fue Terminator Ciagro®, con 48,0 g de clorpirifós en 100 cm<sup>3</sup> de coadyuvantes (Ciagro S. A., Argentina), de gran uso por los agricultores de la región.

### TOXICIDAD AGUDA

Mediante ensayos estáticos de 96 horas (USEPA, 2002), se evaluó la toxicidad letal aguda del formulado Terminator Ciagro®, empleando la siguiente serie de concentraciones del ingrediente activo clorpirifós: 5,76; 14,40; 36,00; 90,00; 225,00 y 562,50  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Para cada concentración se utilizó un recipiente de vidrio de 26 cm de diámetro y 11 cm de alto, que contó con 3 L de agua de clorinada y 10 cangrejos asignados aleatoriamente. En los ensayos se usaron tres réplicas por concentración y control. Los cangrejos juveniles colocados en los recipientes tuvieron un ancho de caparazón (AC) medio de  $6,19 \pm 0,28$  mm. Los cangrejos muertos fueron contabilizados diariamente y retirados de los tratamientos.

### TOXICIDAD CRÓNICA

Durante un período de dos meses, se evaluó el efecto del formulado Terminator Ciagro® sobre el crecimiento de juveniles de *T. borellianus*. Previamente, los cangrejos (AC

medio de  $3,66 \pm 0,61$  mm) se mantuvieron aislados en recipientes de vidrio de 8 cm de diámetro y 7 cm de alto conteniendo 180 ml de agua sin tóxico. La talla inicial de referencia de los animales se midió con la primera muda. Una vez que estos alcanzaron la intermuda, se asignaron aleatoriamente 20 ejemplares al grupo control o a cada concentración del formulado: 0,62; 1,25 y 2,50  $\mu\text{g/L}$  del ingrediente activo clorpirifós. Estas concentraciones fueron seleccionadas según la sensibilidad de *T. borellianus* al insecticida (1/75, 1/32 y 1/18 de la  $CL_{50}$ -96hs, respectivamente) determinada en el presente trabajo, y a las concentraciones de clorpirifos detectadas en los ambientes acuáticos de la región pampeana (Jergentz *et al.*, 2004, 2005). Cada 48 horas, y previamente al suministro de alimento, se limpiaron los recipientes de restos de alimento y heces retirando el 60% del volumen de líquido de cada recipiente. Este mismo porcentaje se repuso inmediatamente con una nueva solución preparada en el momento. La eventual presencia de exuvias y cangrejos muertos se registró cada 24 horas. En cada tratamiento, se consideró el AC y el período de intermuda (PI) como variables del crecimiento de los crustáceos (Hartnoll, 1982; Petriella & Boschi, 1997), además de la supervivencia. A fin de reducir el estrés por manipulación, el valor del AC fue medido en la exuvia, considerando la distancia entre las primeras espinas postorbitales del caparazón. El incremento de tamaño luego de la muda (IM, en mm) fue definido como porcentaje del AC inicial o de premuda, de acuerdo con el siguiente algoritmo:

$$IM(\%) = \frac{(AC \text{ posmuda} - AC \text{ premuda})}{AC \text{ premuda}} \times 100$$

Mientras que el período de intermuda (PI, en días) fue determinado por el tiempo transcurrido entre mudas sucesivas (Renzulli & Collins, 2000; Carmona-Osalde *et al.*, 2004).

#### ANALISIS DE LOS DATOS

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ), así como los límites de confianza al 95% se determinaron en cada réplica cada 24 horas, mediante el método Probit (Finney, 1971). Las comparaciones entre los valores de  $CL_{50}$  se realizaron de acuerdo al estadístico propuesto en APHA *et al.* (1995). Para el análisis de los datos de crecimiento, se verificaron previamente tanto la normalidad (test de Shapiro-Wilks) como la homocedasticidad (test de Bartlett), en todas las concentraciones y controles. Luego, estos tratamientos se compararon mediante ANOVA, seguido de contrastes múltiples mediante el test de Tukey. Eventualmente, se utilizó el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de Nemeyi (Zar, 1996). La relación entre el IM (%) y el AC (premuda) fue evaluada mediante regresión, mientras que las pendientes resultantes se compararon mediante ANCOVA. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa PAST (Paleontological Statistics Software) de Hammer *et al.* (2001).

## RESULTADOS

### TOXICIDAD AGUDA

A las 24 horas de ensayo, la mortalidad fue del 43,3 % en la concentración 225,00  $\mu\text{g/L}$  y del 100 % en 562,50  $\mu\text{g/L}$ . Mientras que a las 96 horas, el número de cangrejos muertos fue de 96,6 % en 90,00  $\mu\text{g/L}$  y del 10 % en la concentración 14,40  $\mu\text{g/L}$ . No se registraron individuos muertos en los controles durante el ensayo. En todas las concentraciones usadas, los individuos mostraron episodios de excitación y tendencia a apiñarse, algunos de ellos permanecían con el dorso hacia abajo y los pereiópodos contraídos hacia adentro, con frecuente pérdida de apéndices.

La  $CL_{50}$  de clorpirifós determinada cada 24 horas en la exposición aguda se muestra en la Figura 1. Las concentraciones a las 24, 48 y 72 horas de ensayo fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre las  $CL_{50}$  a las 72 y 96 horas, lo que indica la aproximación a un valor asintótico.

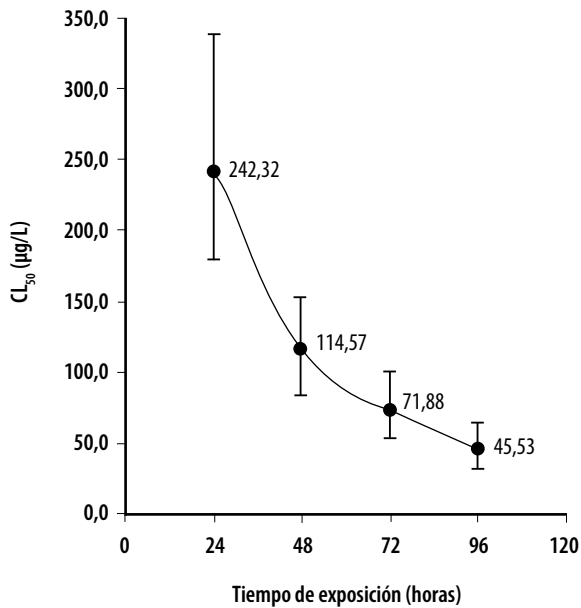


Figura 1. Valores de  $CL_{50}$  y límites de confianza al 95 % en el cangrejo *Trichodactylus borellianus* expuesto a un formulado con clorpirifós durante 96 horas.

### TOXICIDAD CRÓNICA

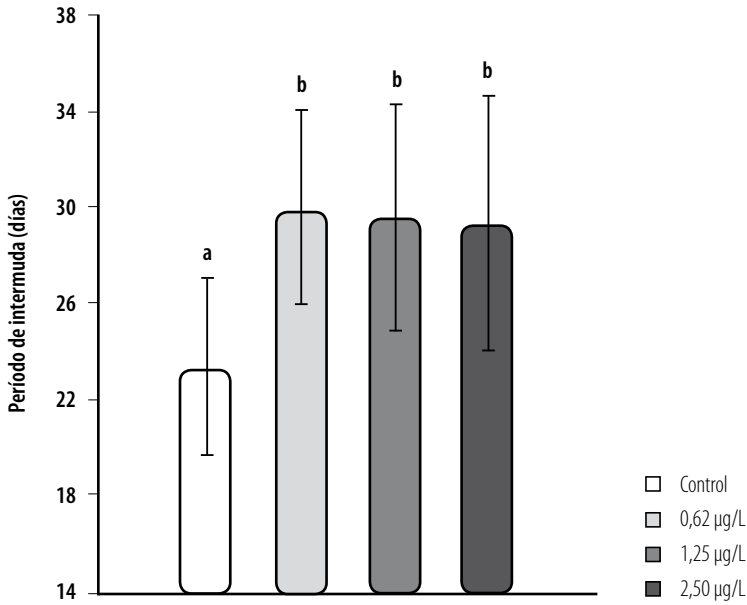
La supervivencia de los cangrejos fue mayor al 90 % en los controles. Sin embargo, en las concentraciones de clorpirifós la misma se redujo al 50 y 60 % de los cangrejos antes de la primera ecdisis y al 15 y 40 % luego esta, quienes pudieron completar dos ciclos de muda durante el período de ensayo. La muerte de los cangrejos fue importante durante la ecdisis, cuando la eliminación del viejo exoesqueleto es antecedida por la absorción de líquido del medio externo en la extensión de la nueva cutícula.

Al término del ensayo, las concentraciones de 0,62 y 1,25 µg/L de clorpirifós provocaron una reducción del IM de los cangrejos en relación a los otros grupos. La pendiente de la regresión entre el IM (%) y el AC (premuda) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones menores y el grupo control (Tabla 1).

La exposición al formulado con clorpirifós causó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la duración del PI de los cangrejos en las tres concentraciones con respecto al grupo control (Figura 2).

<b>IM (%) = a + b * AC (premuda)</b>				
<b>Parámetros de la regresión</b>				
<b>Grupos</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Control	32,72	-3,98a	0,71	0,0003
0,62 µg/L	45,26	-7,92b	0,87	0,0005
1,25 µg/L	38,36	-7,21b	0,88	0,0003
2,50 µg/L	29,33	-3,16a	0,84	0,0003

**Tabla 1.** Valores de la regresión entre el incremento en muda (%) y el ancho de caparazón de *Trichodactylus borellianus*. a: intercepción al eje Y, b: pendiente, r: coeficiente de correlación y p: significancia de la regresión. Valores de pendiente con distinta letra indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Períodos de intermuda del cangrejo *Trichodactylus borellianus* en tres concentraciones de un formulado con clorpirifós. Barras de valores medios y desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el formulado con clorpirifós es altamente tóxico a los juveniles de *T. borellianus*. La comparación de las  $CL_{50}$  en relación al tiempo de exposición no mostró diferencias entre las 72 y 96 horas, lo que sugiere que la  $CL_{50}$  a las 96 horas de 45,53 µg/L estaría cercana al valor umbral de concentración letal incipiente (APHA *et al.*, 1995). Con respecto a otras especies, *T. borellianus* muestra mayor sensibilidad a clorpirifós que los cangrejos *Spiralothelphusa hydrodroma* con  $CL_{50}$  a las 96 horas de 120,00 µg/L (Senthilkumar *et al.*, 2007), y *Oziotelphusa senex senex* con 200,00 µg/L (Radhakrishnaiah *et al.*, 1995). Por otra parte, las diferencias estructurales entre los grupos de crustáceos, dadas principalmente en la dureza del exoesqueleto y el tamaño de la abertura de las cámaras branquiales, podrían influir en el ingreso de los contaminantes al organismo. Esto explicaría los reducidos valores de  $CL_{50}$  de clorpirifós a las 96 horas registrados en los camarones *Palaemonetes argentinus* (0,49 µg/L) (Montagna & Collins, 2007), *P. pugio* (0,37 µg/L) (Key & Fulton, 1993) y *Palaemon macrodactylus*



(0,25 µg/L) (USEPA, 1986), y en los anfípodos *Ampelisca abdita* (0,16 µg/L) (USEPA, 1986) y *Gammarus palustris* (0,30 µg/L) (Leight & Van Dolah, 1999), los que resultan aproximadamente 150 veces menores que el obtenido en el cangrejo en el presente trabajo.

El cambio en el comportamiento de *T. borellianus* provocado por clorpirifós puede estar asociado con el modo de acción tóxica de los compuestos organofosforados de configuración fosforotionatos (como son clorpirifós, paratión y diazinón). La bioactivación del metabolito activo del insecticida, clorpirifós oxón en el caso de clorpirifós, resulta inhibidor de la actividad de la enzima colinesterasa (ChE) (Pope, 2005; Tang *et al.*, 2005). Esta inhibición provoca la acumulación de acetilcolina en las terminales sinápticas, y por lo tanto, un cambio en la transmisión normal de los impulsos nerviosos. Como consecuencia de esta interferencia, en vertebrados e invertebrados acuáticos fueron reportadas distintas manifestaciones neurológicas tales como irritabilidad, temblores musculares, movimientos bruscos de los apéndices y convulsiones que terminan en insuficiencia respiratoria y la muerte del animal (WHO, 1986; Rodríguez & Lombardo, 1991).

El crecimiento somático de los crustáceos ocurre en el tiempo mediante la pérdida del exoesqueleto en sucesivas mudas o ecdisis. Esto permite el incremento en masa o volumen corporal de los individuos que tiene lugar durante el período de intermuda (Passano, 1960). Sin embargo, niveles bajos de diversos contaminantes provocan alteraciones en los parámetros del crecimiento (incremento de tamaño por muda y período de intermuda), y en algunos casos un efecto inhibidor sobre la muda y regeneración de apéndices (Fingerman, 1985). En el presente trabajo, las concentraciones menores de clorpirifós determinaron una disminución en el crecimiento de los juveniles de *T. borellianus*, dada por una reducción del incremento de tamaño después de la muda y un alargamiento del período de intermuda. El efecto adverso de clorpirifós sobre el incremento por muda puede ser atribuido a una reducción en los niveles de proteínas en el organismo, las que son necesarias para la construcción y reparación de tejidos. Bajo condiciones de estrés extremo, las proteínas resultan proveedoras de energía al metabolismo y a las reacciones bioquímicas. En este contexto, Senthilkumar *et al.* (2007) registraron un decrecimiento significativo del contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas en el tejido muscular, hepatopáncreas, branquias, hemolinfa, ganglios torácicos, ovario y espermateca del cangrejo *Spiralothelphusa hydrodroma* en exposición a concentraciones subletales de clorpirifós. Verslycke *et al.* (2004), observaron en el místico *Neomysis integer* una mayor reducción de proteínas, por requerimiento energético celular, con el aumento en el tiempo de exposición a clorpirifós.

El incremento en la duración del período de intermuda provocado por clorpirifós en el presente trabajo, fue también observado en el camarón *P. argentinus* expuesto al mismo formulado comercial (Montagna & Collins, 2007). Esta alteración del período de intermuda puede ser debido a perturbaciones ocurridas a nivel del órgano-Y y el

complejo órgano-X/glándula del seno, localizados en los pedúnculos oculares. En la hemolinfa, altos niveles de la hormona inhibidora de la muda (HIM), sintetizada por el órgano-X y secretada por la glándula del seno, provoca la retención de ecdisona en el órgano-Y, la que se convierte en la hormona de la muda 20-HE (20-Hidroxiecdisona) (Chang, 1995). La reducción en los niveles de ecdiesteroides en la circulación y el incremento de algunas enzimas detoxificantes dependientes del citocromo P450, son algunos de los efectos reportados por diversos compuestos disruptores endocrinos (CDE) en crustáceos (Fingerman *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2007).

### CONCLUSIONES

El insecticida clorpirifós afectó el crecimiento de los cangrejos *T. borellianus* por reducción del incremento en talla y alargamiento del ciclo de muda. La alta mortalidad de los cangrejos durante la exposición crónica al formulado con clorpirifós muestra que a pesar de la  $CL_{50}$  determinada a las 96 horas, el efecto letal del insecticida continúa con el tiempo de exposición en concentraciones muy inferiores al valor umbral de concentración letal incipiente. Esto indica que la presencia de clorpirifós en los ambientes acuáticos, en concentraciones de 0,62  $\mu\text{g/L}$ , puede afectar la supervivencia de los juveniles de *T. borellianus* principalmente durante el momento de muda, impidiendo el crecimiento de los mismos. Además, el efecto observado sobre el crecimiento puede incidir en la estación reproductiva del cangrejo, debido al posible decrecimiento en el número de individuos sexualmente maduros.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto PICTO UNL N° 01-13232.

**Recibido | Received:** 12 de Noviembre de 2010

**Aceptado | Accepted:** 11 de Julio de 2011

## REFERENCIAS

- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) & WPCF (Water Pollution Control Federation).** 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waster Water. 19<sup>th</sup> edition, American Public Health Association, Washington, DC.
- Beltzer, A.H. & G. Paporello.** 1984. Alimentación de aves en el valle aluvial del río Paraná. IV *Agelaius cyanopus cyanopus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Icteridae). *Iheringia. Ser. Zool.* 62: 55–60.
- Bonetto, A.A., C. Pignalberi & E. Cordiviola.** 1963. Ecología alimentaria del amarillo y moncholo, *Pimelodus clarias* (Bloch) y *Pimelodus albicans* (Valenciennes) (Pisces, Pimelodidae). *Physis* 24 (67): 87–94.
- Carmona-Osalde, C., M. Rodríguez-Serna, M.A. Olvera-Novoa & P.J. Gutiérrez-Yurrita.** 2004. Gonadal development, spawning, growth and survival of the crayfish *Procambarus llamasii* at three different water temperatures. *Aquaculture* 232: 305–316.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria & Fertilizantes de la República Argentina).** 2007. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Tomo I: Generalidades–Herbicidas–Fertilizantes. Tomo II: Insecticidas–Fungicidas–Productos Varios, 2248 pp.
- Chang, E.S.** 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193:1–14.
- Collins, P.A., F. Giri & V. Williner.** 2006. Population dynamics of *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) and interactions with the aquatic vegetation of the Paraná River (South America, Argentina). *Ann. Limnol.* 42 (1): 19–25.
- Collins, P.A. & A. Petriella.** 1996. Crecimiento y supervivencia del camarón *Macrobrachium borellii* (Decapoda: Palaemonidae) alimentado con dietas artificiales. *Neotropica* 42: 3–8.
- Collins, P.A., V. Williner & F. Giri.** 2007. Trophic relationships in crustacean decapods of a river with a floodplain (59–86). En A.M.T. Elewa (ed.), Predation in organisms a distinct phenomenon. Springer Berlin Heidelberg.
- Fingerman, S.W.** 1985. Non-metal environmental pollutants and growth (219–234). En A.M. Wenner (ed.), Crustacean ISSUES 3. Factors in adult growth. A.A. Balkema Rotterdam.
- Fingerman M., Jackson N.C. & Nagabhushanam R.** 1998. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120: 343–350.
- Finney, D.J.** 1971. Probit Analysis. 3<sup>a</sup> edición, Cambridge University Press. London. 333 pp.
- Hammer, O., D.A.T. Harper & P.D. Ryan.** 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9 pp. ([http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)).
- Hartnoll, R.G.** 1982. Growth. En D. Bliss (ed.), The Biology of Crustacea, Vol. 2. Academic Press. New York. 111–185 pp.
- Jergentz, S., P. Pessacq, H. Mugni, C. Bonetto & R. Schulz.** 2004. Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59 (2): 133–141.
- Jergentz, S., H. Mugni, C. Bonetto & R. Schulz.** 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817–826.
- Key, P.B. & M.H. Fulton.** 1993. Lethal and sub-lethal effects of chlorpyrifos exposure on adult and larval stages of the grass shrimp. *Palaemonetes pugio*. *J. Environ. Sci. Health B* 28: 621–640.

- Key, P.B. & M.H. Fulton.** 2002. Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pest. Biochem. Physiol.* 72: 186–192.
- Lajmanovich, R.C, J.A. López, M.M. Arias & P.M. Peltzer.** 2005. Dieta y variación morfológica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en tres localidades del centro–este de Argentina. *Bol. Esp. Herpetol.* 16 (1–2): 32–39.
- Leight, A.K. & R.F. Van Dolah.** 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (5): 958–964.
- Lopretto, E.** 1995. Crustacea Eumalacostraca (1001–1039). En E.C. Lopretto y G. Tell (eds.), Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio II. Ediciones Sur. La Plata.
- Lund, S.A., M.H. Fulton & P.B. Key.** 2000. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. *Aquat. Toxicol.* 48: 127–134.
- Magalhães, C., G. Bond–Buckup, G.A. De Melo & L. Buckup.** 2003. Famílias Palaemonidae e Trichodactylidae (143–398). En G.A. De Melo (ed.), Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Museu de Zoologia. São Paulo.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería & Pesca). Presidencia de la Nación.** 2011. Estimaciones agrícolas mensuales, cifras oficiales al 15/09/2010. Campaña Agrícola 2010/2011 ([http://www.sia.gov.ar/estimaciones\\_agricolas/02–mensual](http://www.sia.gov.ar/estimaciones_agricolas/02–mensual)).
- Massoia, E.** 1976. Mammalia (1–128). En R.A. Ringuelet (ed.), Fauna de Agua Dulce de la República Argentina, Vol. 44. FECIC. Buenos Aires.
- Montagna, M. & P. Collins.** 2004. Efecto de un formulado del herbicida glifosato sobre el cangrejo *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda: Brachyura). *FABICIB* 8: 227–234.
- Montagna, M.C. & P.A. Collins.** 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 371–378.
- Montagna, M.C. & P.A. Collins.** 2008. Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92: 150–155.
- Oliva, A., C.A. Ubeda, I.E. Vignes & A. Iriondo.** 1981. Contribución al conocimiento de la ecología alimentaria del bagre amarillo (*Pimelodus maculatus* Lacépède 1803) del río de la Plata (Pisces, Pimelodidae). *Com. Mus. Arg. Cs. Nat. y Ecol.* 1: 31–50.
- Passano, M.L.** 1960. Molting and its control (473–536). En T.H. Waterman (ed.), The physiology of Crustacea. Academic Press. New York.
- Petriella, A.M. y E.E. Boschi.** 1997. "Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina." *Invest. Mar. Valparaíso* 25: 135–157.
- Poi de Neiff, A. & J.J. Neiff.** 1980. Los camalotes de *Eichhornia crassipes* en aguas lóxicas del Paraná y su fauna asociada. *Ecosur* 7 (14): 185–199.
- Pope, C.N.** 2005. Central Nervous System effects and neurotoxicity (271–291). En R. Gupta (ed.), Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Academic Press. New York.
- Radhakrishnaiah, K., B. Sivaramakrishna, A. Suresh & P. Chamundeswari.** 1995. Pesticidal impact on the protein metabolism of freshwater field crab, *Oziotelphusa senex senex* (Fabricius). *Biomed. Environ. Sci.* 8 (2): 137–48.
- Renzulli, P. & P. Collins.** 2000. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Eumalacostraca). *FABICIB* 4: 129–136.
- Rodríguez, E.M. & R.J. Lombardo.** 1991. Acute toxic

city of parathion and 2,4 D to estuarine adult crabs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 576–582.

**Rodríguez, E.M., D.A. Medesani & M. Fingerman.** 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 661–671.

**Senthilkumar, P., K. Samyappan, S. Jayakumar & M. Deecaraman.** 2007. Effect of chlorpyrifos on the nutritive value in a freshwater field crab, *Spiralothelphusa hydrodroma*. *Res. J. Agric. and Biol. Sci.* 3 (6): 760–766.

**Tang J., R.L. Rose & J.E. Chambers.** 2005. Metabolism of Organophosphorus and Carbamate Pesticides (127–143). Capítulo 10. En R. Gupta (ed.), Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Academic Press. New York

**USEPA (United States Environmental Protection Agency).** 1986. Ambient water quality criteria for Chlorpyrifos. Washington, DC.

**USEPA (United States Environmental Protection Agency).** 2002. Methods for Measuring the Acute

Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Washington DC.

**Verslycke, T., S.D. Roast, J. Widdows, M.B. Jones & C.R. Janssen.** 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *J. Exp. Marine Biol. and Ecol.* 306: 1–16.

**Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly & D.B. Peakall.** 2001. Principles of Ecotoxicology. 2ª. edición. Taylor y Francis. London. 309 pp.

**WHO (World Health Organization).** 1986. Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. *Environmental Health Criteria* 63. Geneva.

**Xuereb, B., P. Noury, V. Felten, J. Garric & O. Gelfard.** 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236: 178–189.

**Zar, J.H.** 1996. Biostatistical Analysis. 3ª. edición. Prentice Hall. 662 pp.