

UNIVERSIDAD ESTATAL A DISTANCIA  
VICERRECTORÍA ACADÉMICA  
ESCUELA DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
Programa de Maestría en Manejo de Recursos Naturales

Evaluación de la exposición a plaguicidas en una población de perezosos (*Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*: *Xenarthra*) en un paisaje agrícola y un centro de rescate del Caribe de Costa Rica

Tesis sometida a la consideración  
Del Tribunal Examinador del Programa de Maestría en Manejo de Recursos Naturales de la  
Escuela de Ciencias Exactas y Naturales para optar al grado de:  
Magíster Scientiae en Manejo de Recursos Naturales con Mención en Gestión de la  
Biodiversidad

Margaret Veronica Pinnock Branford

San José, Costa Rica

2010

Esta tesis fue aprobada por el Tribunal Examinador del Programa de Estudios de la Maestría Académica en Manejo de Recursos Naturales de la Escuela de Ciencias Exactas y Naturales de la UNED, como requisito para optar al grado de:

MAGÍSTER SCIENTIAE EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES CON MENCIÓN EN  
GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

---

Víctor Hugo Méndez Estrada, M. Sc.  
Representante Directora del Sistema de Estudios  
de Posgrado

---

Elba de la Cruz Malavassi, Ph. D.  
Directora de Tesis

---

Carolina Godoy Cabrera, M. Sc.  
Representante Director de la Escuela de Ciencias  
Exactas y Naturales

---

Mauricio Jiménez Soto, M. Sc.  
Lector

---

Zaidett Barrientos Llosa, M. Sc.  
Coordinadora del Programa de Maestría en  
Manejo de Recursos Naturales

---

Johnny Villarreal Orias, M. Sc.  
Lector

---

Margaret Veronica Pinnock Branford  
Estudiante

## DEDICATORIA

A † Sybil “Mam” le dedico esta tesis con todo mi amor. Ella me dio la vida, mucho amor y apoyo incondicional. Siempre me impulsó a seguir adelante y me enseñó que las metas se alcanzan con perseverancia. Ahora, tú eres parte de mí.

“If at first you don` t succeed, try and try again and to the last you will succeed”.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Christopher Vaughan la oportunidad de haber permitido la integración de este estudio a su proyecto y a la familia Hermelink (dueños de la finca agrícola), el espacio en la finca durante el trabajo de campo.

A mi comité de tesis, especialmente a Elba de la Cruz por creer en mí y por todo el apoyo antes y durante el desarrollo de ésta tesis.

Al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) los reactivos y la logística para realizar todos los análisis.

A mi amiga Karla Solano por la guía en el LAREP, por escucharme, por todos los consejos en los momentos de desesperación y estrés. Por todo lo que la hice correr con los resultados de los análisis de residuos de plaguicidas.

A mis amigas y compañeras del LAREP Marilu y Seyling por ese positivismo y las palabras de aliento en momentos críticos.

A Freylan por el apoyo en el campo y la ayuda con los primeros análisis de la actividad de las colinesterasas.

A Óscar Ramírez la captura de los perezosos y la disposición para ayudarme con los mapas y la ubicación de los puntos.

A Geovanny Herrera por la ayuda en el trabajo de campo.

Al Dr. Arroyo médico veterinario del centro de rescate Aviario del Caribe la disposición de los animales y la toma de las muestras de sangre de los perezosos.

Al Dr. Jiménez por la toma de las muestras de sangre y los estudiantes que me ayudaron en la toma de datos en el campo, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA.

Agradezco a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a que ésta tesis sea una realidad.

¡Mil gracias!

¡Hewalla!

## ÍNDICE GENERAL

|  |     |
|--|-----|
| DEDICATORIA .....  | iii |
| AGRADECIMIENTOS.....   | iv  |
| ÍNDICE GENERAL .....   | v   |
| LISTA DE CUADROS.....  | vi  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | vii |
| Resumen .....  | II  |
| Abstract.....  | III |
| 1. Marco teórico .....   | 1   |
| 1.1 Los plaguicidas y la agricultura en Costa Rica .....   | 1   |
| 1.2 La agricultura orgánica .....  | 4   |
| 1.3 El cultivo de cacao .....  | 4   |
| 1.4 El cultivo de banano.....  | 5   |
| 1.5 El cultivo de la piña.....   | 6   |
| 1.6 Los métodos utilizados para la aplicación de plaguicidas .....   | 7   |
| 1.7 La exposición a los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas (antiChE) .....  | 9   |
| 1.8 Los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas y enzimas colinesterasas .....   | 10  |
| 1.9 La exposición a los agentes químicos, vías de exposición y de eliminación de los plaguicidas .....   | 11  |
| 1.10 Características de las familias Bradypodidae y Megalonychidae .....   | 12  |
| 2. Introducción .....  | 16  |
| 3. Objetivos .....   | 18  |
| 3.1 Objetivo general.....  | 18  |
| 3.2 Objetivos específicos.....   | 18  |
| 4. Hipótesis .....   | 18  |
| 5. Metodología .....   | 19  |
| 5.1 Área de estudio.....   | 19  |
| 5.2 Captura de los individuos, toma de muestras y determinación de su utilidad en el análisis de exposición a plaguicidas .....  | 20  |
| 5.3 Análisis de residuos de plaguicidas.....   | 26  |
| 5.4 Determinación de los efectos .....   | 29  |
| 5.5 Encuesta y entrevistas para obtener información sobre la situación ambiental y de los perezosos en relación con el uso de plaguicidas.....   | 31  |
| 5.6 Análisis estadístico .....   | 31  |
| 5.7 Marco del proyecto y limitaciones.....   | 31  |
| 6. Resultados .....  | 33  |
| 6.1 Captura, caracterización de los individuos colectados y actividad de las colinesterasas .....  | 33  |
| 6.3 Comparación de las matrices analizadas .....   | 42  |
| 6.4 Percepción de la comunidad de la situación ambiental y de la salud de los perezosos .....  | 44  |
| 7. Discusión .....   | 50  |
| 7.1 Exposición a plaguicidas y actividad de las colinesterasas plasmática.....   | 50  |
| 7.2 Metodologías probadas .....  | 54  |
| 7.3 Situación ambiental y de la salud de los perezosos .....   | 58  |
| 8. Conclusiones .....  | 59  |
| 9. Recomendaciones .....   | 60  |
| 10. Referencias Bibliográficas .....   | 61  |
| ANEXO 1. Actividad de las colinesterasas plasmática en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ , especie, peso, sexo, estado de desarrollo y plaguicidas detectados en las muestras analizadas ... | 71  |
| ANEXO 2. Acción biocida, cultivos donde se usan y toxicidad de los plaguicidas detectados en las muestras analizadas.....  | 72  |
| ANEXO 3. Formularios de la encuesta .....  | 73  |
| ANEXO 4. Hoja de campo .....   | 77  |
| ANEXO 5. Como presentar manuscritos Revista Biología Tropical .....  | 78  |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Valores promedios del peso (kg) de los perezosos muestreados en la finca agrícola y el centro de rescate durante 2005, 2006 y 2008, según especie, sexo y estado de desarrollo (máximos, mínimos y desviación estándar).....  | 35 |
| <b>Cuadro 2.</b> Actividad enzimática promedio en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ de las dos especies de perezosos muestreados en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008, según sexo y estado de desarrollo (máximos, mínimos y desviación estándar)..... | 36 |
| <b>Cuadro 3.</b> Residuos de plaguicidas detectados en las muestras analizadas de perezosos de dos y tres dedos capturados en la finca agrícola durante el 2005 y 2006.....  | 38 |
| <b>Cuadro 4.</b> Valores promedios, máximos y mínimos de los residuos de plaguicidas detectados en las tres matrices analizadas de los perezosos de dos y tres dedos capturados en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008.....  | 39 |
| <b>Cuadro 5.</b> Perezosos de la finca agrícola y el centro de rescate detectados con residuos de plaguicidas en las diferentes matrices, durante el periodo de estudio.....   | 40 |
| <b>Cuadro 6.</b> Plaguicidas OP detectados en las muestras de los perezosos capturados en la finca agrícola, cercanía a los monocultivos de piña y banano durante el periodo de estudio.....   | 41 |
| <b>Cuadro 7.</b> Porcentaje de recuperación, límites de detección y de cuantificación de los plaguicidas analizados en las matrices de pelo y limpieza bucal realizados en el LAREP.....   | 42 |
| <b>Cuadro 8.</b> Análisis comparativo de las matrices utilizadas para la detección de residuos de plaguicidas en muestras de perezosos <i>B. variegatus</i> y <i>C. hoffmanni</i> .....  | 44 |
| <b>Cuadro 9.</b> Percepción y conocimiento de la comunidad de la situación ambiental y de la salud de los perezosos.....   | 47 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Maquinaria (boom) utilizada en la aplicación de plaguicidas en el cultivo de la piña.....8
- Figura 2.** Perezoso de tres dedos (*B. variegatus*), hembra con cría y un macho adulto con la mancha anaranjada y la línea central negra en la parte media de la espalda.....13
- Figura 3.** Perezoso de dos dedos (*C. hoffmanni*), hembra con cría en el saco utilizado para trasladarlos durante la captura.....13
- Figura 4.** Ubicación de la finca agrícola y el centro de rescate donde se realizó el estudio.....20
- Figura 5.** Diagrama de la toma, preservación y procesamiento de las muestras de perezosos colectadas en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008.....25
- Figura 6.** Finca agrícola con los sitios de captura de los perezosos detectados con residuos de plaguicidas durante el 2005 y 2006.....33

## **Evaluación de la exposición a plaguicidas en una población de perezosos (*Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*: Xenarthra) en un paisaje agrícola y un centro de rescate del Caribe de Costa Rica**

Margaret Veronica Pinnock Branford

Maestría en Manejo de Recursos Naturales, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica,  
[mvpbranford@gmail.com](mailto:mvpbranford@gmail.com)

### **Resumen**

Para evaluar la exposición a plaguicidas se estudió una población de perezosos de una finca agrícola y una población de un centro de rescate del Caribe de Costa Rica. El estudio se realizó del 2005 al 2008, se muestrearon un total de 58 perezosos, 46 de la finca agrícola y 12 del centro de rescate. Se tomaron muestras de pelo, de lavado de los brazos (mezcla de isopropanol/agua) y de limpieza bucal de los perezosos para el análisis de residuos de plaguicidas y muestras de sangre para la determinación de la actividad de las colinesterasas en plasma. Los residuos de plaguicidas se determinaron por el método de análisis de multiresiduos con cromatografía de gases. Los plaguicidas incluidos han sido detectados en estudios ambientales en la zona y la mayoría de ellos se utilizan en los cultivos de piña y banano. Los perezosos capturados pesaron en promedio 3,64 kg la especie *B. variegatus* y 5,48 kg *C. hoffmanni*. La actividad de las colinesterasas en plasma se determinó mediante el método de Ellman *et al.* 1961. La actividad enzimática promedio de las dos especies de perezosos capturados en la finca agrícola fue de 1,07 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg prot<sup>-1</sup>. La actividad de las colinesterasas plasmática de los perezosos de tres dedos fue significativamente diferente entre los dos sitios (p<0,05). Se concluye que los perezosos están expuestos a los plaguicidas ametrina, clorpirifos, clorotalonil, diazinón, difeconazol, deet, etoprofos y tiabendazol. La exposición de estos animales es probablemente por la ingesta de alimento contaminado y por contacto directo con los plaguicidas. Se recomienda dar seguimiento a las poblaciones marcadas y realizar análisis de metabolitos de plaguicidas en las tres matrices estudiadas y en la orina de los animales que permita confirmar la presencia de las sustancias dentro del organismo. Es necesario realizar más análisis de la actividad de las colinesterasas para determinar el nivel base de estas enzimas y para conocer las condiciones fisiológicas y ambientales que hacen variar el nivel basal en los perezosos.

**Palabras clave:** Perezosos, exposición, plaguicidas, colinesterasas, plasma, Costa Rica.



## **Assessment of pesticide exposure in a population of sloths (*Bradypus variegatus* and *Choloepus hoffmanni*: *Xenarthra*) in an agricultural landscape and a rescue center in Costa Rica Caribbean**

Margaret Veronica Pinnock Branford

Maestría en Manejo de Recursos Naturales, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica,  
[mvpbranford@gmail.com](mailto:mvpbranford@gmail.com)

### **Abstract**

To assess exposure to pesticides we studied a population of sloths inhabiting an organic farm and a population from a rescue center in the Caribbean of Costa Rica. The study was conducted from 2005 to 2008, a total of 58 sloths were sampling, 46 from the farm and 12 from de rescue center. Hair samples were taken, washes of front paws with isopropanol/water and mouth wipes for pesticide residue analysis. Blood samples were taken to determine the cholinesterase activity in plasma. Pesticide residues were determined based on gas chromatography multiresidue pesticide analysis. Pesticides that have been detected in other environmental studies in the area, most of them used in the cultivation of pineapple and banana were included. The pesticides detected in the sloth samples were ametrina, chlorpyrifos, chlorothalonil, diazinon, difeconazol, deet, ethoprophos and thiabendazole. The cholinesterase activity in plasma was determined by the method of Ellman *et al.* 1961. The enzyme activity was 1,07 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg prot<sup>-1</sup> for both species captured at the farm and we found significant different between the site for three toed sloths. The presence of pesticide residues in hair, wash of front paws and mouth wipe samples indicates that sloths are exposed to these pesticides. The exposure is probably due to the ingestion of contaminated food and to the direct contact with pesticides. Analysis of pesticides metabolites must be done in the three mentioned matrices; this will allow confirming the presence of theses substances. Also, analysis of urine is needed to determine the internal exposure. More analysis of plasma cholinesterase activity must be done to determine the base level of these enzymes for the studied species and to establish the physiological and environmental conditions that change the baseline.

**Keywords:** Sloths, exposure, pesticides, cholinesterase, plasma, Costa Rica.

## 1. Marco teórico

### 1.1 Los plaguicidas y la agricultura en Costa Rica

El desarrollo creciente de nuevos productos químicos para el control de plagas ha provocado la aparición de varias sustancias en el medio ambiente, por su persistencia y toxicidad hacen necesario el estudio de la distribución en los distintos compartimentos de los ecosistemas, así como, las vías de ingreso a los organismos. Los plaguicidas se fabrican con el objetivo de matar organismos vivos que se consideran plagas. Estos productos también afectan a otros organismos que son importantes para el mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas naturales.

La disminución de algunas poblaciones de aves a comienzos de los años cuarenta por causa del plaguicida organoclorado DDT fue una de las razones para que se restringiera su uso y posteriormente la prohibición en muchos países (Walker *et al.* 2001).

Los primeros plaguicidas orgánicos sintéticos que se fabricaron fueron los organoclorados. La era de los plaguicidas orgánicos sintéticos para la protección de los cultivos y la lucha contra los vectores de enfermedades inició con el insecticida DDT. Aunque, este compuesto se sintetizó en 1874, fue hasta 1939-1940 que se patentó (Dierksmeier 2001).

Los plaguicidas organoclorados se caracterizan porque tienen una alta persistencia en el ambiente, una baja solubilidad en agua y una alta lipofilia. Estos plaguicidas actúan por interferencia o inhibición de la enzima ATPasa que regula los iones de  $Ca^{++}$  en la membrana celular, impidiendo el rápido retorno al estado de equilibrio de la membrana nerviosa (Walker 1997, Dierksmeier 2001). Los plaguicidas organoclorados fueron utilizados ampliamente entre 1950-80, el uso se restringió en diferentes países y en muchos casos se dictó la prohibición por la toxicidad crónica, la transferencia a los tejidos adiposos de diferentes animales, la capacidad de acumularse en los seres vivos y por el desarrollo de resistencia en las plagas que combaten (Castillo y Ruepert 1993, Corson *et al.* 1998, Walker *et al.* 2001, de la Cruz y Castillo 2002, Walker 2003, de la Cruz *et al.* 2004, Ramírez y Orozco 2007, Ramírez *et al.* 2009).

En Costa Rica el Ministerio de Salud utilizó el DDT muy intensamente en salud pública para la erradicación del mosquito vector de la malaria. A mediados de los años 80 se restringió el uso y en 1988 se prohibió, al igual que el aldrín, el clordano, el dieldrín, el endrín y el toxafeno (MAG 2007).

A pesar de la sustitución de los plaguicidas organoclorados por otros menos persistentes en el ambiente como es el caso de los organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, piretroides, fenoxiácidos y derivados de anilidas; los organoclorados siguen siendo uno de

los principales contaminantes orgánicos presentes en los diversos ecosistemas (Ruepert *et al.* 2008).

Los plaguicidas organofosforados (OP) derivados orgánicos del ácido fosfórico, se caracterizan porque son volátiles, la degradación en el ambiente es rápida, tienen un poder de toxicidad relativamente alto, la solubilidad en agua es variable y una solubilidad alta en grasas y solventes orgánicos (García 1997, Walker 1997).

El mecanismo de acción de los plaguicidas organofosforados es la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas. La pérdida de la función enzimática hace que se acumule la acetilcolina en la sinapsis nerviosa. Como resultado se pierde el control normal de la transmisión de los impulsos nerviosos que van desde las fibras nerviosas hasta las células musculares y hacia otras células nerviosas del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Dierksmeier 2001, Tecles y Cerón 2003, Cobos *et al.* 2006).

Los plaguicidas organofosforados son considerados de alto riesgo por su capacidad de producir intoxicaciones agudas, la mayoría de las mortalidades masivas de vida silvestre son causadas por esos compuestos. La exposición a dosis sub-letales puede inducir a la “anorexia por plaguicidas”, haciendo que los animales pierdan hasta el 40% de su peso corporal. Estos plaguicidas también ocasionan alteraciones en el comportamiento, la reproducción y un aumento en la susceptibilidad a enfermedades y a la depredación (Uhart y Zaccagnini 1999, Cobos *et al.* 2006).

Entre 1995 y 1996 en Argentina hubo una mortalidad masiva del gavián de Swainson (*Buteo swainsoni*), se estimó que se murieron más de 5 000 aves, el 1% de la población mundial por la exposición al insecticida monocrotofos (Hooper 1998, Goldstein *et al.* 1999). Este insecticida organofosforado utilizado para controlar plagas de insectos, fue restringido su uso en Costa Rica en 1995 y en el 2007 se prohibió en las actividades agrícolas (MAG 2007, Ramírez *et al.* 2009). A pesar de la restricción y prohibición del uso de algunos plaguicidas de alta toxicidad en Costa Rica, cada año ocurren eventos de contaminación en ecosistemas naturales con muertes masivas de animales silvestres asociados con plaguicidas (de la Cruz *et al.* 2004).

Los carbamatos son plaguicidas derivados del ácido carbámico, se caracterizan porque son inestables ante la presencia de la luz y el aire, no se bioacumulan y son menos persistentes en el ambiente que los organoclorados. Al igual que los organofosforados (OP), los carbamatos, actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas de los animales (Walker 1997).

Los plaguicidas organofosforados y carbamatos también causan problemas de salud pública y ambiental como, intoxicaciones, afecciones respiratorias, desarrollo de plagas resistentes, destrucción de depredadores naturales y la contaminación ambiental. Estos

plaguicidas tienen una toxicidad aguda mayor a los organoclorados, penetran con facilidad la piel, la vía respiratoria y ocasionan problemas de comportamiento en los animales; en casos agudos les ocasiona la muerte (Chaverri *et al.* 2000, Sánchez-Hernández y Walker 2000, Dierksmeier 2001, de la Cruz y Castillo 2002, Galloway y Handy 2003, Sánchez-Hernández 2003).

El sector agrícola es de gran importancia para la economía de Costa Rica, no obstante, el tipo de modelo agrícola hace de este sector el mayor consumidor de los plaguicidas importados. Los plaguicidas se usan en grandes cantidades, una gran variedad y con mucha frecuencia (Chaverri *et al.* 2000, de la Cruz *et al.* 2004, Ramírez y Orozco 2007).

Según, Sepsa (2009) en el año 2008 las frutas frescas con mayor área sembrada en Costa Rica fueron el banano (44 313 ha), la piña (33 488 ha), el melón (8 640 ha) y el mango (8 500 ha). Los cultivos de exportación que utilizan la mayor cantidad de plaguicidas por hectáreas son el melón, las plantas ornamentales, el banano, la piña, el café y la naranja (de la Cruz *et al.* 2004, Sepsa 2007). Se estimó que el cultivo de banano utilizó 49,29 kg i.a./ha/año en el periodo 2000-2006, más de la tercera parte del volumen de plaguicidas importado en Costa Rica; seguido por el cultivo de la piña con 24,55 kg i.a./ha/año. Hay que destacar que el cultivo de piña mostró una expansión de un 208 por ciento en el mismo periodo (Castillo *et al.* 2006, Programa Estado de la Nación 2007).

La dispersión de los plaguicidas en el ambiente depende de las propiedades físicas y químicas de los mismos, tales como la estructura molecular, peso molecular, solubilidad en agua, persistencia, presión de vapor, cargas eléctricas, coeficiente de partición octanol/agua, el tipo de formulado y la polaridad y de factores ambientales como la temperatura, la velocidad del viento y la circulación de las corrientes de aire (Dierksmeier 2001, Walker *et al.* 2001).

Los plaguicidas que se emplean en Costa Rica pertenecen a diversas familias de compuestos químicos, con características físicas y químicas diferentes (Ramírez *et al.* 2009). Las diferencias físicas y químicas hacen que influyan en el medio ambiente de manera distinta. Los más volátiles se encuentran principalmente en el aire; los más polares en los ecosistemas acuáticos o en aguas subterráneas; y los menos polares en las partículas del aire, del agua, en el sedimento fino y en los organismos.

Técnicamente no es posible analizar todos los plaguicidas utilizados en los cultivos de banano y piña porque se requiere de la elaboración de métodos, técnicas de extracción para cada uno y contar con equipos con detectores para ultravioleta y fluorescencia. No es posible tener un procedimiento único y uniforme de extracción porque, la variedad de ingredientes activos utilizados en estos cultivos es grande y existen un gran número de solventes utilizables para la extracción (Dierksmeier 2001, Lyytikäinen, 2003).

## 1.2 La agricultura orgánica

La agricultura orgánica en Costa Rica se ha venido desarrollando desde finales de los años ochentas en diferentes regiones del territorio por pequeños productores motivados por la conservación de los recursos naturales, por el mejoramiento de la calidad de los suelos y por la producción sana. Esta iniciativa fue favorecida por el reconocimiento del país por sus políticas de conservación de los Recursos Naturales, la ubicación estratégica y las condiciones climáticas que permiten mantener algunos agro ecosistemas en producción durante todo el año. Además, con la producción orgánica se reducen los costos de producción y se incrementa la rentabilidad por hectárea cultivada. Los cultivos tradicionales como el cacao, el banano tradicional, el café, la vainilla y la mora que no utilizaban o que utilizaban muy pocos insumos agrícolas y con importante potencial para ser exportados fueron los primeros cultivos orgánicos nacionales. Actualmente existe la Asociación Nacional de Agricultura Orgánica (ANAO) y se exportan café, banano, cacao, piña, azúcar, mora, jugo de naranja, mango, jengibre y vainilla. El café fue el primer producto orgánico exportado por Costa Rica. Existen 2 921 productores orgánicos certificados y 10 711 ha con cultivos orgánicos (de la Cruz y Castillo 2002, Granados y Álvarez 2006, Programa Estado de la Nación 2007).

## 1.3 El cultivo de cacao

El árbol de cacao (*Theobroma cacao* L. familia Sterculiaceae) es originario de la Amazonía. Existen tres variedades de esta planta tropical el forastero, criollo y trinitario. La variedad forastero es la más conocida, representa el 90% del cacao producido en el mundo. La variedad criollo, produce "cacao fino y de aroma". La variedad trinitario es un cruce entre el criollo y el forastero. El árbol de cacao normalmente alcanza una altura entre 4 y 8 m, aunque, puede llegar a medir hasta 10 m de alto si recibe sombra de árboles grandes. El fruto puede alcanzar una longitud de 15 a 25 cm, conteniendo entre 30 y 40 semillas. Estos árboles necesitan una precipitación anual entre 1 150 y 2 500 mm y temperaturas entre 21 y 32°C. El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, Asia, América Central y Suramérica. Los principales países productores en el mundo son: Costa de Marfil, Gana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia, los cuales representan el 90% de la producción mundial (UNCTAD 2002a).

El método de propagación recomendado es por medio de semillas híbridas certificadas, aunque se puede hacer por la propagación vegetativa (injertos, acodos y estacas enraizadas) (MAG 1991). El cacao se siembra en hileras, a una densidad de 950 a 1 330 árboles/ha, dependiendo de la fertilidad de la tierra y del clima. A pesar de que el cacao

madura 24 meses después de la siembra inicial, los árboles llegan a ser productivos después de cinco años. En condiciones normales, los árboles tradicionales rinden entre 300 y 500 kg/ha por año. Los árboles híbridos presentan rendimientos mayores, por encima de los 1 000 kg/ha (UNCTAD 2002a).

Los árboles de cacao florecen dos veces al año. El principal periodo de floración es entre junio y julio. La segunda floración es más pequeña y se da durante los meses de septiembre y octubre. La maduración de los frutos fluctúa entre cuatro y seis meses, dependiendo de la temperatura y la altura sobre el nivel del mar. Los frutos maduran a lo largo del año y normalmente se llevan a cabo dos cosechas en un año, la principal es entre octubre y diciembre y la intermedia entre marzo y abril (ANACAFE 2004).

En los cultivos de cacao las plagas se controlan principalmente con una fertilización adecuada, la poda del cacao, la regulación de la sombra, la limpieza de acequias o canales de drenaje y el control de la maleza. Las infecciones por hongos son las principales enfermedades que atacan al cacao. La mayoría de estas enfermedades se combate con las buenas prácticas agrícolas y solo en casos especiales se recomienda el uso de fungicidas mancozeb, maneb, fungicidas a base de cobre, clorotalonil y mezclas de mancozeb con benomil y endosulfan (MAG 1991).

En los cacaotales en producción no se aconseja el uso de insecticidas para combatir las plagas, porque el cacao se poliniza por medio de insectos, principalmente la mosquita *Forcipomyia* sp. Este insecto debe protegerse para asegurar una población adecuada durante los periodos de mayor floración.

En el año 2008 se sembró 4 543 ha de cacao en Costa Rica. Las regiones del Huetar Atlántico, del Huetar Norte, el Pacífico Central y el Pacífico Sur poseen las condiciones agroclimáticas adecuadas para su cultivo (MAG 1991, Sepsa 2009).

#### **1.4 El cultivo de banano**

La planta de banano pertenece al género de las *Musa* (familia *Musaceae*). Se cree que provienen de las especies silvestres *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB), de las selvas del sudeste de Asia (Malasia, Indonesia o Filipinas), donde aún existen una gran variedad de especies silvestres. La planta de banano es perenne, se desarrolla a partir de vástagos o rizomas y puede alcanzar hasta 15 m de altura. Existen aproximadamente 1 000 variedades de banano en todo el mundo dividido en 50 grupos. La variedad Cavendish es la más común y se produce para los mercados de exportación (UNCTAD 2002b).

La producción de banano es durante todo el año y la cosecha del fruto es de 9 a 12 meses después de la siembra. Esta planta crece en las regiones tropicales con temperaturas promedio de 27°C y precipitaciones anual entre 2 000 y 2 500 mm (UNCTAD 2002b).

Durante el año 2004 América Latina y el Caribe aportaron el 70% del total de la exportación mundial y los países líderes fueron, Ecuador, Costa Rica, Filipinas, Colombia y Guatemala.

En Costa Rica se sembró 44 313 ha de banano durante el año 2008, con un incremento del 1,13% respecto al año 2007 (UNCTAD 2002b, Sepsa 2009).

El banano es muy vulnerable a las plagas y enfermedades, como los nemátodos, la sigatoca negra o amarilla; para combatirlos se usan fungicidas, insecticidas y nematicidas (UNCTAD 2002b).

Bravo (2007), identificó el uso de 28 plaguicidas en el cultivo de banano en la zona del Caribe durante el 2006. Estos plaguicidas son: los fungicidas (mancozeb, tridemorf, benomil, clorotalonil, pirimetanil, spiroxamine, difenoconazol, piraclostrobina, azoxistrobina, bitertanol, tebuconazol, imazalil, tiabendazol, trifloxystobina y propiconazol); los nematicidas (terbufos, fenamifos, carbofuran, etoprofos, cadusafos y oxamil), los herbicidas (glifosato, paraquat, diuron, diquat y glufosinato) y los insecticidas (bifentrina y clorpirifos).

### **1.5 El cultivo de la piña**

La piña (*Ananas comosus* L. Merr., familia Bromeliaceae) es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne, originaria de América del Sur, entre Brasil y Uruguay. Dependiendo de la variedad y el objetivo de la plantación, la densidad de siembra varía entre las 30 000 y las 70 000 plantas/ha (MAG 1991). La propagación de la piña es por semillas o por retoños de la planta madre (hijuelos, brote del tallo, bulbillo y la corona). La planta produce una inflorescencia que contiene entre 100 y 200 flores en forma de espiral, fusionado al eje central. La inducción de la floración se logra con la hormona fiomona (ácido naftalenacético), el etrel (ácido 2 cloro-etil fosfórico) o el carburo de calcio. Esto permite que la floración y la cosecha sean uniformes, que se obtengan frutos de tamaño homogéneos y que disminuyan los costos por recolección. La floración dura entre 30 y 60 días y el fruto madura 135 días después de haber emergido la flor. Se obtienen las primeras cosechas a los dos años y medio después de la siembra. La piña se produce en elevaciones entre el nivel del mar y los 900 msnm. Requiere de temperaturas entre 23 y 30°C, de una alta luminosidad y de suelos suelto y aireado para evitar el ataque de patógenos al sistema radical y para obtener una buena calidad de los frutos y un buen rendimiento (MAG 1991).

Los países con mayor producción de piña son: Hawai, México, Costa Rica, Brasil, Colombia, Honduras, República Dominicana, Malasia, India, Congo, Kenia, China, Taiwán, Vietnam, Australia, Filipinas, Bangadesh, Tailandia, Indonesia, Sur África, Zaire y Costa de Marfil. Esta fruta tropical junto con el banano ocupa los primeros lugares en importancia a nivel mundial. En Costa Rica se producen comercialmente las variedades Cayena lisa y el Monte

lirio o criolla. La producción promedio por cosecha de la variedad Monte lirio varía entre 35 y 45 ton/ha y la variedad Cayena lisa entre 70 y 120 ton/ha (MAG 1991).

Los insectos, las malezas, los nemátodos y los hongos son las plagas que atacan el cultivo de piña. Para disminuir el ataque por estas plagas se recomienda un buen sistema de drenaje, el manejo adecuado de malezas, la desinfección de semillas antes de la siembra y la alternación con cultivo que no son huéspedes de nematodos. Se recomienda la desinfección de las semillas con benomil y diazinon; en las plantaciones de retoño el uso de carbofuran y terbufos para evitar los nemátodos e insectos del suelo; para combatir las malezas el diuron mezclado con ametrina y fluazifop-butil; contra los insectos el diazinon, permetrina, cipermetrina, deltametrina, clorpirifos, metamidofos y carbaril. Otros plaguicidas recomendados para este cultivo en Costa Rica son el fosetil aluminio, bromacil, glifosato, carbaril, etoprofos, foxim, mefosfolan, oxamil y brodifacouma (MAG 1991, Chaverri 2002).

## **1.6 Los métodos utilizados para la aplicación de plaguicidas**

Los métodos de aplicación de plaguicidas en la agricultura se clasifican según el vehículo que soporta al producto, que puede ser sólido, líquido o gaseoso. El espolvoreo, la pulverización, la fumigación, la aplicación de cebos, el tratamientos vía riego y las aplicación en el suelo son los métodos más utilizados en la agricultura.

Estos métodos de aplicación también se agrupan en aéreos (avionetas o helicópteros) y terrestres (rociado con equipo manual, mecánico, portátil, motorizado y aplicación de cebos a mano).

### **1.6.1 Maquinaria de aplicación de plaguicidas**

#### **1.6.1.1 Máquinas espolvoreadoras**

Las máquinas espolvoreadoras se emplean para distribuir el formulado en forma de polvo a través de una corriente de aire. La corriente se produce por un ventilador que entra en el depósito, arrastrando el polvo y distribuyéndolo de forma más o menos homogénea sobre el vegetal. La emisión del producto se regula abriendo o cerrando la abertura del regulador de salida del polvo, variando las revoluciones del ventilador y regulando la entrada de aire en el depósito. Las principales características a tener en cuenta en un espolvoreador son el tamaño de la partícula y el caudal de aire del ventilador.



### 1.6.1.2 Máquinas pulverizadores

Las máquinas pulverizadores están constituidas por un depósito con agitadores que mantienen en íntima unión el producto y el agua y por una bomba que obliga al agua a salir a través de las boquillas, fragmentándola en gotas de diámetro variable y dispersándolas sobre el terreno o plantas (García 1997, Infoagro 2008).

Se conoce como “boom” la maquinaria que se utiliza para la aplicación de plaguicidas en el cultivo de la piña, principalmente durante las aplicaciones del diazinon. El boom es un sistema mecanizado de aplicación de plaguicidas compuesto por una bomba de motor, un tanque, y dos “alas” con una serie de boquillas por donde sale el tóxico, todo el sistema es remolcado por un chapulín (Fig. 1).

En las plantaciones de banano y piña en Costa Rica los métodos de aplicación que más se emplean son las bombas de motor, las bombas de espalda y el boom (Fig. 1). La inmersión o brocha solo se utiliza para curar las semillas. Solo en el cultivo de banano y durante la aplicación de los fungicidas se utiliza el método aéreo (Bravo 2008).



**Figura 1.** Maquinaria (boom) utilizada en la aplicación de plaguicidas en el cultivo de la piña

### 1.7 La exposición a los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas (antiChE)

Los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas se utilizan con frecuencia en la agricultura, en las casas de habitación y en la medicina veterinaria. Las intoxicaciones agudas y crónicas de las personas, vida silvestre y animales domésticos con estos plaguicidas dependen del tipo de plaguicida, de la vía de acceso al organismo, la facilidad para atravesar las barreras biológicas y de los factores relacionados con el medio donde se encuentra el organismo. Algunas de las intoxicaciones son causadas por el mal manejo de los productos como, el uso de envases inapropiados, la falta de un etiquetado, el mal almacenamiento y la aplicación de dosis inadecuadas. Otras por el alto grado de toxicidad de los productos, las prácticas agrícolas y la cantidad de agroquímico aplicados (Ballantyne y Marrs 1992, Sánchez-Hernández y Walker 2000, Dierksmeier 2001, de la Cruz y Castillo 2002, Galloway y Handy 2003, Sánchez-Hernández 2003, Cobos *et al.* 2006, Esteve 2006, Programa estado de la Nación 2007). Los síntomas de intoxicaciones con plaguicidas inhibidoras de las colinesterasas son: salivación abundante, hipermotilidad gastrointestinal, diarrea, lagrimeo excesivo, sudoración, disnea, miosis, incontinencia urinaria y de heces, fasciculación en los músculos de la cara, debilidad y parálisis muscular. La muerte sobreviene cuando hay una bronco-constricción, un paro respiratorio y un exceso de acumulación de líquido en los pulmones. La baja en la actividad de las colinesterasas en sangre total no está siempre correlacionada con el descenso de la actividad en el sistema nervioso y otros tejidos. Las esterases sanguíneas actúan como un amortiguador de los efectos de los plaguicidas OP retardando la reacción sobre las esterases del cerebro (Cobos *et al.* 2006). Algunos animales muestran signos de envenenamiento y una ligera baja en la actividad de las colinesterasas en sangre y otros tienen una inhibición completa de la actividad de las colinesterasas en sangre y no manifiestan signos de intoxicación. La inhibición de la actividad de las colinesterasas puede ser prolongada, mientras que los efectos clínicos de toxicidad por antiChE por lo general no lo son. La inhibición causada por OP puede prolongarse por días y generalmente permanece deprimida por semanas, en ocasiones la actividad eritrocitaria permanece deprimida hasta por 3 meses. Las inhibiciones causadas por carbamatos duran algunas horas, una vez completada la absorción (Ballantyne y Marrs 1992, EPA 1999).

La butirilcolinesterasa tiende a caer rápidamente después de la exposición a un insecticida inhibidor de las colinesterasas y vuelve más rápido a su estado normal que la acetilcolinesterasa de las células rojas (Ballantyne y Marrs 1992).

Las lesiones post mortem por intoxicaciones con antiChE no son específicas, los fluidos excesivos en los pulmones, en la boca y en el sistema digestivo son indicadores de intoxicación, pero no son suficiente para establecer las causas de muerte. Un diagnóstico

claro de la muerte por antiChE es la detección de concentraciones significativas de residuos de la sustancia química en el plasma, el cerebro, el hígado o los riñones; en conjunto con una baja actividad de las colinesterasas en el plasma, las células rojas o el cerebro (Ballantyne y Marrs 1992).

### **1.8 Los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas y enzimas colinesterasas**

Los plaguicidas organofosforados y carbamatos son inhibidores de las enzimas colinesterasas. Estos insecticidas reaccionan con la enzima de manera similar a la acetilcolina e inhiben competitivamente la actividad de las colinesterasas. Al estar la enzima inhibida se acumula acetilcolina en el espacio sináptico alterando el funcionamiento normal de los impulsos nerviosos (Trudeau y Sans Cartier 2000, Dierksmeier 2001, Cobos *et al.* 2006).

Las colinesterasas (ChE) son enzimas que hidrolizan a los ésteres de la colina. Se encuentran en organismos unicelulares, plantas, invertebrados y vertebrados; principalmente en la membrana de las neuronas, las células rojas sanguíneas, el plasma y el hígado. Participan en los procesos de desarrollo de las neuronas y en el control de su capacidad de responder a daño celular. La función principal en el sistema nervioso es la hidrólisis y terminación de la actividad biológica de la acetilcolina (Sánchez-Chávez y Salceda 2008). Dependiendo de la localización tisular de las enzimas ChE, la especificidad del sustrato y la susceptibilidad a inhibición por diferentes sustancias, se clasifican en dos: la acetilcolinesterasa (AChE) conocida como colinesterasa eritrocitaria, colinesterasa verdadera o colinesterasa específica y la butirilcolinesterasa (BChE) llamada también colinesterasa inespecífica o pseudocolinesterasa (Tecles y Cerón 2003).

La acetilcolinesterasa se localiza en la membrana de las neuronas y en la membrana de los eritrocitos. Se puede encontrar en altas concentraciones en el cerebro y en las células rojas sanguíneas. La función principal de esta enzima en el sistema nervioso es la hidrólisis y terminación de la actividad biológica acetilcolina, su función en los eritrocitos es aún desconocida. La acetilcolina es un neurotransmisor endógeno que se encuentra en la sinapsis en los sistemas nervioso central y periférico. La función es participar en el cambio de potencial de membrana para la transmisión de los impulsos nerviosos. La enzima acetilcolinesterasa metaboliza este neurotransmisor, como resultado, se interrumpe la transmisión de los impulsos nerviosos (Tecles y Cerón 2003).

La butirilcolinesterasa se encuentra en el plasma sanguíneo, en el hígado, músculo liso, intestino, páncreas, músculo cardíaco y tejido nervioso. Aunque se conoce poco acerca de su función fisiológica, se sabe que degrada la butirilcolina más rápido que la acetilcolina. Según Tecles y Cerón (2003) las enzimas con actividad colinesterasa pueden ser inhibidas

por diferentes agentes químicos como los compuestos organofosforados y carbamatos; ciertos metales pesados y detergentes.

Los niveles de actividad de las colinesterasas se pueden analizar en una variedad de tejidos como el cerebro, el músculo, el hígado y en la sangre. Según, Sánchez *et al.* (1997), Parsons *et al.* (2000), Tecles y Cerón (2003) y Cobos *et al.* (2006) la determinación de la actividad en la sangre tiene las ventajas de que la obtención y el manejo de la muestra es fácil, se requiere de un volumen reducido de muestra y se puede analizar acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la misma muestras sin la necesidad de la separación del plasma y los eritrocitos. Es un método ampliamente utilizado por ser una prueba no destructiva y un indicador de exposición muy sensible. Su utilización ha sido exitosa en el monitoreo de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en una variedad de especies.

### **1.9 La exposición a los agentes químicos, vías de exposición y de eliminación de los plaguicidas**

Según Peñas *et al.* (2001) la exposición es el contacto de un individuo o una población con un agente químico o físico. La magnitud de la exposición se determina midiendo o estimando la concentración del agente que está presente en la superficie de contacto durante un periodo específico. La vía de exposición es el mecanismo por medio del cual un tóxico ingresa al organismo, estas vías son la ingesta, la inhalación y el contacto cutáneo. Cuando el tóxico se encuentra en el agua, el alimento o el suelo la principal vía de entrada es la ingestión; mientras que si se encuentra en forma de gas, vapor y partículas suspendidas en el aire el ingreso es por la vía de la inhalación. Cuando el tóxico se encuentra en el agua o el aire que está en contacto con la piel, el ingreso es por la vía cutánea. La absorción de los plaguicidas depende de la vía de entrada y de las propiedades físicas y químicas de las mismas (naturaleza química, forma y configuración de la molécula, solubilidad en agua, la reacción ácido-base, cargas eléctricas, polaridad, peso molecular o tamaño molecular, el tipo de formulación, la persistencia, presión de vapor y el coeficiente de partición octanol/agua). Dependiendo de las propiedades físicas y químicas, el plaguicida podrá cruzar las barreras del cuerpo hasta alcanzar la sangre y distribuirse en el organismo. Por afinidad, el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos, como el hígado o los riñones. Los plaguicidas lipofílicos se acumularán en los tejidos adiposo y nervioso. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre (Walker *et al.* 2001).

Las principales vías de eliminación de los plaguicidas en mamíferos terrestres son la orina, las heces y el aire exhalado (Peña *et al.* 2001, Ramírez y Lacasaña, 2001, Walker *et al.* 2001).

## **1.10 Características de las familias Bradypodidae y Megalonychidae**

### **1.10.1 Generalidades de los *Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni***

Los perezosos son mamíferos restringidos al nuevo mundo, pertenecen al orden Xenarthra. Este orden está representado por cuatro familias: los Myrmecophagidae (osos hormigueros), los Dasypodidae (armadillos), los Bradypodidae (perezoso de tres dedos) y los Megalonychidae (perezoso de dos dedos), estas familias tienen al menos, un representante en Costa Rica. Los miembros de este orden se caracterizan porque poseen una articulación adicional en la vértebra lumbar (“xenarthra”) y una temperatura corporal variable (Reid 1997).

Para regular la temperatura corporal los miembros de las familias Bradypodidae y Megalonychidae se mueven dentro de la vegetación a lugares donde la incidencia de la luz solar es mayor o menor sobre la superficie del cuerpo. La temperatura corporal de los perezosos baja ligeramente en los días fríos y durante la noche, como un mecanismo para la conservación de la energía. El comportamiento de estos animales cambia de acuerdo con las condiciones climáticas locales, esto provoca que existan diferencias en los patrones de actividades entre los individuos de la misma especie (Montgomery y Sunquist 1978, Reid 1997).

Según, Montgomery y Sunquist (1978), la variación de la temperatura rectal entre 27,7 y 35,5°C en *Bradypus cuculliger* y *B. infuscatus* en cautiverio se debe a los cambios de la temperatura ambiental durante el día, el ejercicio y la exposición del animal a la luz solar.

Los perezosos seleccionan los árboles donde viven y donde se alimentan de acuerdo con atributos relacionados con la vegetación y las características ambientales. Los atributos relacionados con la vegetación son el árbol (especie, forma, edad, tamaño y fenología), especies de epifitas (principalmente lianas), distribución espacial de la vegetación y el espacio entre la vegetación. La principal característica ambiental que influyen para que los perezosos de tres y de dos dedos seleccionen los árboles es la exposición a la luz solar. Los *Bradypus* tienden a escoger los árboles con mayor grado de exposición del dosel a la luz solar y los *Choloepus* los árboles con más cantidad de lianas en el dosel. Estos mamíferos utilizan los árboles para alimentarse, para refugiarse y como soporte cuando descansan. Se estima que el ámbito de hogar de cada perezoso es inferior a dos hectáreas y se trasladan

de un árbol a otro por medio de los bejucos. Normalmente solo descienden del dosel al suelo para defecar a intervalos semanales (Montgomery y Sunquist 1978).

En Costa Rica se encuentran dos especies de perezosos, *Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*. Los machos adultos de la especie de tres dedos se diferencian de las hembras y de los juveniles por la coloración anaranjada con una línea negra en la parte media de la espalda (característica sexual secundaria) (Fig. 2). La especie *C. hoffmanni*, no presenta dimorfismo sexual, esta especie posee dos garras en las patas delanteras y la nariz bulbosa (Fig. 3).



**Figura 2.** Perezoso de tres dedos (*B. variegatus*), hembra con cría y un macho adulto con la mancha anaranjada y la línea central negra en la parte media de la espalda



**Figura 3.** Perezoso de dos dedos (*C. hoffmanni*), hembra con cría en el saco utilizado para trasladarlos durante la captura

### 1.10.2 Perezosos de tres dedos (*B. variegatus*)

La especie *B. variegatus* (Bradypodidae) es de hábito solitario y arborícola, es de tamaño mediano con un peso entre 2,3 y 5,5 kg. Se caracteriza porque posee tres garras en las patas delanteras, el pelaje es grisáceo y áspero, la trompa es pequeña y oscura, los dientes “planos” y tienen una cola corta que usa para cavar pequeñas depresiones en donde deposita las heces y la orina que luego cubren con hojas con sus patas traseras. El macho adulto presenta sobre la parte media de la espalda una mancha pequeña anaranjada con una línea central negra o mancha negra (Fig. 2). Esta característica secundaria probablemente funciona como un estímulo visual que ayuda a las hembras a localizar los machos entre el denso follaje del bosque tropical (Lara-Ruiz & Chiarello 2005).

La especie *B. variegatus* se distribuye desde la parte central de Honduras hasta el este de Perú y el noroeste de Argentina. En Costa Rica se encuentra en los bosques secos, en los húmedos, los ribereños y en los bosques secundarios maduros, desde el nivel del mar en ambas vertientes hasta los 3 000 msnm (Carrillo *et al.* 1999). Los perezosos de tres dedos son activos durante el día y se cambia de un árbol a otro cada un día y medio aproximadamente. Se desplazan entre las copas de los árboles a menudo utilizando los bejucos entrelazados. Los estudios realizados por Montgomery y Sunquist (1978) en la isla Barro Colorado, Panamá, demostraron que *Bradypus* se alimentan de hojas de al menos 25 especies de árboles y una especie de liana. Los autores lo consideran una especie generalista porque usa 98 especies de árboles para alimentarse, sin embargo cada individuo se especializa en pocas especies de árboles. En el estudio realizado en el caribe de Costa Rica por Vaughan *et al.* (2007), se encontró a esta especie en 71 especies de árboles y alimentándose de 15 de ellas.

Las hembras adultas tienen una cría por año, pasan medio año preñadas y el otro medio cuidando y cargando a la cría. El periodo de gestación de estos perezosos es de cuatro a seis meses. A las dos semanas de nacidos empiezan a alimentarse de hojas que laman del hocico de la madre. Son destetados nutricionalmente entre tres y cuatro semanas, aunque siguen dependiendo de la madre para moverse por un periodo de aproximadamente cinco meses más. Después de ese periodo se da el destete social y la madre se aleja del territorio hogareño, probablemente para reducir al mínimo la competencia intraespecífica por los recursos alimenticios. Se estima que alcanzan la madurez sexual a los tres años y viven entre 20 y 30 años en la naturaleza a una densidad de 6 a 8,5 ind/ha y con un territorio de 1,6 ha (Montgomery y Sunquist 1978, Montgomery 1983 y Reid 1997).

### 1.10.3 Perezosos de dos dedos (*C. hoffmanni*)

La especie *C. hoffmanni* (Megalonychidae o Choloepidae) es de hábito solitarios, arborícola y nocturno. Es de tamaño mediano con un peso entre 4 y 8 kg. Se caracteriza por tener dos garras en las patas delanteras y tres en las traseras. El pelaje del cuerpo es de color café cremoso y el de las patas café rojizo, la trompa es bulbosa, las ventanas de la nariz están ampliamente espaciadas, los ojos son grandes de color café y no tienen cola (Fig. 3). Esta especie se distribuye desde el este de Honduras y el norte de Nicaragua hasta Perú y el este de Brasil. En Costa Rica se encuentra desde las tierras bajas de ambas vertientes hasta 3 000 msnm. Habita los bosques húmedos, los ribereños y los bosques secundarios maduros, son raros en los bosques secos (Carrillo *et al.* 1999).

Montgomery y Sunquist (1978), afirman que la especie *Choleopus* es agresiva, tiene los dientes puntiagudos y afilados con función y posición similar a los caninos de los carnívoros. Los perezosos de dos dedos usan los árboles para ocultarse y como soporte mientras duermen o descansan. Son muy activos durante la noche y permanecen poco tiempo en el mismo lugar durante su actividad nocturna. Se presume que se alimenta de aproximadamente 52 especies de árboles durante la noche cuando está activo. *Choleopus* recorre largas distancias cada noche, es más activo y se mueven más rápido que la especie de tres dedos. En el estudio realizado por Vaughan *et al.* (2007) se reporta que esta especie se alimenta de 34 especies de árboles y se encontró en 101 especies.



## 2. Introducción

Costa Rica es un país agrícola que ha experimentado un aumento de las áreas de cultivos intensivos, asociado con una mayor utilización de sustancias químicas como la medida principal para el control de las plagas (de la Cruz *et al.* 2004, Programa Estado de la Nación 2007, Ramírez *et al.* 2009).

Los productos de exportación, como el banano, la piña, el café, el melón y las plantas ornamentales son sistemas agrícolas de monocultivo que aplican fertilizantes y plaguicidas de manera intensiva. Los plaguicidas se destacan por la cantidad, frecuencia y la amplia gama de ingredientes activos que se emplea en la producción intensiva (Chaverri 2002, de la Cruz *et al.* 2004).

La importación de ingrediente activo en Costa Rica ha ido en aumento. En 1996 la importación fue de 8 000 ton y para el año 2006, se acercó a las 12 000 ton. Históricamente los funguicidas (46%) han sido los plaguicidas más importados, seguidos por los herbicidas (29%), los insecticidas-nematicidas (16%) y finalmente los fumigantes (8%). La tendencia en la importación, del uso y la liberación de plaguicidas al ambiente es cada vez mayor. Esto es el resultado de los sistemas agrícolas intensivos y la tendencia a utilizarlos como principal mecanismo para el control de plagas (Chaverri 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Ramírez y Orozco 2007, Ramírez *et al.* 2009).

Costa Rica es el país centroamericano con el mayor índice de uso de plaguicidas, se estima que se usó 2,67 kg ia/habitante, 47,13 kg ia/trabajador agrícola y 25,78 kg ia/área cultivada en el 2006 (Programa Estado de la Nación 2007, Ramírez *et al.* 2009).

La contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos por la deriva y escorrentía de los plaguicidas a otras áreas, el deterioro del suelo, el desarrollo de plagas resistentes, la destrucción de hábitat para la vida silvestre y las intoxicaciones de la fauna silvestre, ponen en peligro el equilibrio de los ecosistemas y su uso se ha constituido en uno de los principales problemas ambientales en el país. Esto hace de las prácticas agrícolas un peligro potencial, para los ecosistemas acuáticos y terrestres; la salud de los trabajadores de las plantaciones y la salud de las poblaciones cercanas (Castillo *et al.* 1997, de la Cruz y Castillo 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Wesseling *et al.* 2006, Programa Estado de la Nación 2007). El impacto ha sido considerable y creciente sobre la salud humana y sobre los ecosistemas en general. Durante el año 2006 se registraron más de 300 casos de personas intoxicadas con plaguicidas (Ramírez y Orozco 2007, Ramírez *et al.* 2009). Las mortalidades masivas de organismos acuáticos se repiten cada año, la mayoría de las mortalidades de peces coinciden con las épocas de aplicaciones de nematicidas en el cultivo de banano. En varios casos se han detectado los plaguicidas responsables, entre los que se encuentran los nematicidas terbufos, fenamifos y etoprofos (Castillo 2000, de la Cruz y Castillo 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Programa Estado de la Nación 2007).

Los animales terrestres que habitan áreas aledañas a los monocultivos con uso intensivo de plaguicidas están expuestos a estas sustancias y podrían estar padeciendo por intoxicación crónica y aguda, por el contacto directo con el plaguicida o de forma indirecta cuando consume alimento contaminado (Smith *et al.* 2007). Es probable que la reproducción y sobrevivencia de algunas poblaciones de vida silvestre estén siendo afectadas por las exposiciones subletales a plaguicidas (Badii *et al.* 2006, Ramírez y Mijangos 2007).

En la prensa escrita nacional aparecen denuncias sobre muertes masivas de animales silvestres, atribuidos al mal uso de los plaguicidas. Sin embargo, es poca la información disponible respecto a la exposición causada por los plaguicidas en la vida silvestre y se conoce poco acerca de los escenarios de exposición de la vida silvestres que viven o forrajean cerca de las áreas agrícolas (La Nación 2003 a y b, La Nación 2004 a y b, La Nación 2005, La Nación 2007, La Nación 2008).

En la Región Tropical hacen falta investigaciones de campo, que permitan comprender más claramente como se expone la fauna silvestre a los productos utilizados en la agricultura, cuáles son las rutas que sigue el contaminante desde su liberación hasta el contacto con las poblaciones, las vías de ingreso al organismo y qué efectos tiene esta exposición sobre estas poblaciones (Parsons *et al.* 2000).

En los países tropicales la mayoría de las investigaciones se limitan a los residuos de plaguicidas en el ambiente, principalmente los organoclorados. La mayoría de los estudios de exposición en la biota han sido con organismos acuáticos. Son prácticamente inexistentes las investigación que evalúen el impacto que está ocasionando a la fauna silvestre la gran variedad de insecticidas organofosforados que se usan en los cultivos tropicales (Cobos *et al.* 2006).

Según el Programa Estado de la Nación (2007) existe un estudio que revela que el 20% de la población de mono congo del Caribe presenta una coloración amarilla por la deficiencia hepática causada por insecticidas que se aplican en el cultivo de banano.

Aunque, es extremadamente difícil predecir con exactitud la tasa de exposición de la vida silvestre a los contaminantes ambientales, porque está en función de las vías de ingreso al organismo (la ingestión, la respiración y el contacto cutáneo), varía con la fisiología y el comportamiento de las especies (Fairbrother *et al.* 1998), se requiere de investigaciones de campo para evaluar el impacto de los efectos subletales sobre esas poblaciones (Parsons *et al.* 2000, Badii *et al.* 2006). Para lograr esto se debe contar con metodologías de campo no destructivas, procedimientos no invasivos, baratos, rápidas, fáciles y en la medida de lo posible que se adecuen a las características de la fauna silvestre (hábitos alimenticios, movilidad y comportamiento).

Por las razones antes mencionadas la meta de esta investigación fue el desarrollo de una metodología para la evaluación de la exposición a plaguicidas en una población de

perezosos *B. variegatus* y *C. hoffmanni* en una finca agrícola y un centro de rescate. Mediante, análisis de residuos de plaguicidas en pelo, lavado de los brazos y limpieza bucal; así como, la determinación de la actividad de las colinesterasas plasmática.

Los perezosos están potencialmente expuestos a los plaguicidas que se aplican en los cultivos agrícolas porque son mamíferos arborícolas que se mueven relativamente poco, viven, se desplazan y se alimentan principalmente de hojas de una gran variedad de árboles que se utilizan como cercas vivas en la finca agrícola.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Probar una metodología no invasivo para evaluar la exposición a plaguicidas en dos poblaciones de perezosos (*B. variegatus* y *C. hoffmanni*) que habitan cerca de monocultivos con uso intensivo de plaguicidas en el Caribe de Costa Rica y utilizar el método de Ellman *et al.* (1961) para evaluar los efectos por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Utilizar un método de muestreo no invasivo que permita determinar la presencia de plaguicidas en muestras biológicas de perezosos.
2. Analizar los residuos de plaguicidas en matrices de pelo, en la mezcla de agua/solvente del lavado de los brazos y la gasa que es utilizada para la limpieza bucal en poblaciones de *B. variegatus* y *C. hoffmanni* en una finca agrícola y un centro de rescate de animales.
3. Determinar la actividad de las colinesterasas en plasma en poblaciones de *B. variegatus* y *C. hoffmanni* en una finca agrícola y un centro de rescate de animales mediante el método de Ellman *et al.* (1961).

### 4. Hipótesis

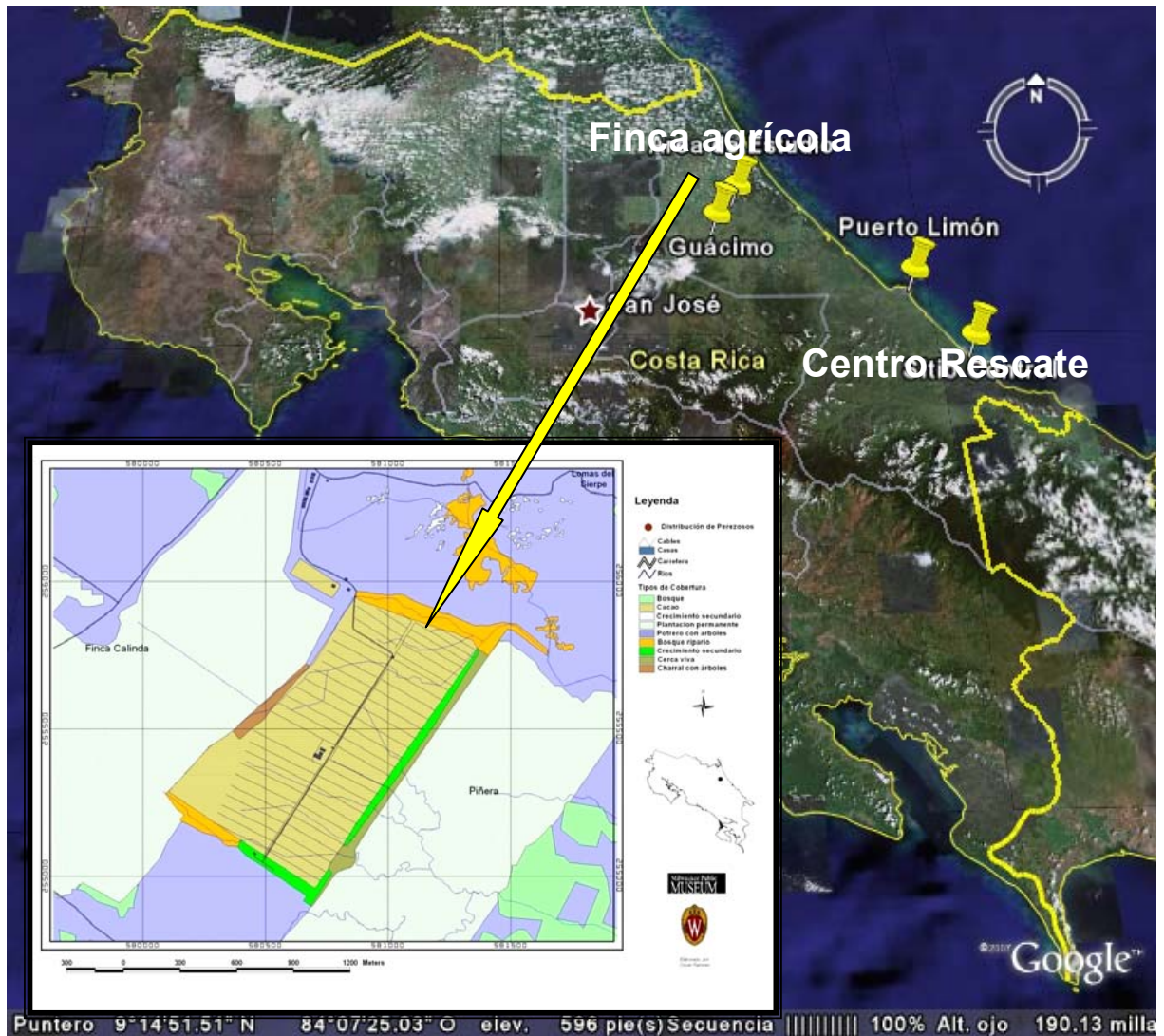
- ❖ Las poblaciones de perezosos *B. variegatus* y *C. hoffmanni* que habitan cerca de los sistemas agrícolas intensivos están expuestos a los plaguicidas utilizados en los monocultivos.

## 5. Metodología

### 5.1 Área de estudio

La finca agrícola está situada a 100 msnm, pertenece a la zona de vida bosque húmedo tropical premontano (Holdridge 1964) e incluye una compleja estructura de paisaje donde es posible encontrar, cultivos intensivos de banano (este) y piña (oeste), potreros con árboles aislados y bosques ribereños (Fig. 4). Está ubicada en Pueblo Nuevo de Guácimo, Limón, Costa Rica (10°20" N, 83° 20" W) y tiene una extensión de 120 ha. En la finca se cultiva cacao orgánico bajo el sistema con sombra y este cultivo se encuentra limitado por las cercas vivas y bosque ribereño. Según Vaughan *et al.* (2007), la cerca viva está compuesta por árboles de *Castilla elastica*, *Eriquina poeppigiana*, *Ficus werckleana*, *Spondias mombin* y *Cordia alliodora*. Este sistema de cacao agroforestal funciona como un corredor que conecta el noroeste del Parque Nacional Tortuguero con los fragmentos de bosque ribereño de Río Jiménez al suroeste (Vaughan *et al.* 2007). Se estimó que la población de perezosos dentro y en los alrededores de esta finca era de al menos 150 individuos cuando se realizó la investigación.

El centro de rescate y cuidado de perezosos *B. variegatus* y *C. hoffmanni*, es una propiedad de 96 ha que está ubicado en Panshert, Limón, Costa Rica. El centro cuenta con tres módulos, para recibir a los visitantes, el que funciona como clínica y lavandería y donde viven los animales. El módulo donde están los perezosos está dividido en jaulas de 2 x 2 m aproximadamente, con paredes de cedazo, piso de cemento y totalmente techado. Dentro de las jaulas hay ramas secas o estructuras de maderas para que los perezosos puedan colgar. Algunos de los animales cuentan con un juguete de peluche que les brinda confianza y calor. La población de perezosos del centro de rescate fue de 90 animales en el 2008 (70 *C. hoffmanni* y 20 *B. variegatus*), la mayoría de ellos eran infantes.



**Figura 4.** Ubicación de la finca agrícola y el centro de rescate donde se realizó el estudio.

Fuentes: Google Earth, 2008 y Óscar Ramírez

## 5.2 Captura de los individuos, toma de muestras y determinación de su utilidad en el análisis de exposición a plaguicidas

El estudio se realizó en tres campañas: la primera durante el 2005 con los siguientes objetivos: 1- conocer el método de captura de los animales en el campo, 2- poner en práctica la metodología de recolección de las muestras en las matrices propuestas (pelo, lavado de los brazos y limpieza bucal). La segunda en el 2006 con los objetivos de tomar los datos morfométricos, las muestras de sangre, de pelo, lavado de brazos y limpieza bucal de la población de perezosos silvestre. La tercera campaña se realizó en el 2008 con el fin de tomar los datos y las muestras de la población de perezosos de un centro de rescate.

Se muestrearon un total de 58 perezosos durante las tres campañas, 46 de la finca agrícola y 12 del centro de rescate. Se analizaron un total de 207 muestras, de los cuales 53 correspondieron a sangre, 40 al lavado de brazo, 57 de pelo y 57 a limpieza bucal.

En el diagrama de flujo se muestra el procedimiento seguido durante la toma de datos de los animales capturados, los diferentes tipos de muestras, la conservación durante el transporte y los análisis realizados a cada una de ellas (Fig. 5).

### 5.2.1 Primera y segunda campaña de muestreo

Los perezosos se ubicaron por telemetría y mediante la búsqueda intensiva dentro del área de estudio, con la colaboración del personal del proyecto marco.

Una vez localizados los perezosos se procedió con la captura manual, cortando la rama del árbol donde se encontraban los animales y atrapándolos con una red sostenida por varias personas que se encontraban situadas debajo del árbol. Los perezosos se sujetaron con guantes de cuero para introducirlos individualmente en un saco de yute limpio. Se tomaron las coordenadas geográficas del punto de captura (Magellan Sport Track GPS) y se trasladaron a la estación de trabajo que se ubicó dentro de la misma finca. Estando en la estación de trabajo los animales se pesaron los animales y se sedaron con atipamezole (0,1 mg/kg) para minimizar el estrés.

Como no existe un método definido para establecer con exactitud la edad de estos animales, se tomó el peso del animal como parámetro para definirla. Se clasificó como individuo adulto de la especie *C. hoffmanni* aquel que pesaba más de 2,7 kg y para la especie *B. variegatus* aquellos que tenían un peso superior a 2,3 kg. Esta relación fue estimada mediante una regresión lineal de individuos de una población anteriormente muestreada en el proyecto marco (Ramírez, 2005).

Para la determinación del sexo en *C. hoffmanni* y en los juveniles de *B. variegatus* se revisaron los genitales para observar la presencia del pene, ya que los perezosos poseen testículos intra-abdominal. En estos animales el tamaño del pene varía según la condición reproductiva, haciendo que la diferencia en los genitales entre los machos y las hembras sea sutil, la identificación del sexo fue realizada por los veterinarios experimentados. En los machos adultos de *B. variegatus* la determinación del sexo fue mediante las características secundarias externas. Los machos adultos de esta especie presentan sobre la parte media de la espalda una mancha pequeña anaranjada con una línea central negra o mancha negra (Fig. 2).

Una vez dormidos se procedió a tomar las muestras de sangre (utilizando guantes), de pelo, lavado de los brazos y limpieza bucal (Fig. 5). Solo se tomaron muestras a los

animales juveniles y adultos. Las hembras capturadas con crías, se les tomaron muestras a la madre, pero no a la cría. No se sedó, ni se muestreó a los infantes.

A cada uno de los perezosos capturados se les colocó subcutáneamente un microchips (Trovan, Electronic Identification System, ID-100 US) para la identificación individual y para evitar muestrear el mismo animal dos veces durante la misma campaña.

Para revertir los efectos del sedante se utilizó diazepam (1,0 mg/kg). Solo en un caso fue necesario administrar el diazepam para despertar a un perezoso de la especie *Bradypus*. Una vez despiertos los perezosos se liberaron en el mismo árbol donde fueron capturados.

### **5.2.2 Tercera campaña de muestreo**

Fueron seleccionados 12 perezosos adultos (10% de la población) con más de dos años de estar en el centro de rescate, seis de los animales del género *Bradypus* y seis del género *Choleopus*. Los criterios de selección fueron, el tiempo de permanencia en el centro y el historial del animal (procedencia, el motivo por el cuál ingresó al centro y los antecedentes de salud). La selección se basó en esos criterios porque los efectos causados por los plaguicidas inhibidores de las colinesterasas pueden prolongarse hasta por 3 meses (Ballantyne y Marrs 1992, EPA 1999). También, porque el comportamiento de los plaguicidas en el ambiente es diferente para cada sustancia, la degradación depende de factores físicos y químicos como temperatura, grado de acidez, radiación solar, hidrólisis, oxidación/reducción, transformaciones enzimáticas y degradación por microorganismos (Dierksmeier 2001).

Los animales fueron sedados por el veterinario del centro, quién procedió a tomar las muestras de sangre, luego se procedió a la toma de las muestras de lavado de brazos, de pelo y de limpieza bucal. A estos animales en cautiverio se les lleva un control rutinario del peso, nutrición y parasitología. Estos perezosos fueron tratados con los desparasitantes ivermectina en el 2005; cenit y ovistop en junio del 2008, según consta en los expedientes clínicos de los animales. El peso, la edad y el sexo de estos perezosos se tomaron de los expedientes clínicos de cada uno de ellos.

### **5.2.3 La toma de las muestras a los perezosos**

Se considera un procedimiento invasivo aquel en el cual el cuerpo es "invadido" o penetrado con una aguja, una sonda, un dispositivo o un endoscopio y un procedimiento no invasivo aquel que no involucra la rotura de la piel o penetración física en el cuerpo (Medline Plus, 2010).

### **5.2.3.1 La muestras de sangre**

Las muestras de sangre fueron tomadas con la ayuda de médicos veterinarios de la Escuela de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica, de la Universidad de Wisconsin-Madison, Estados Unidos y el veterinario del centro de rescate. La toma de la muestra fue mediante una venopunción aséptica con agujas y jeringas desechables estériles de 1 ml, enjuagada previamente con heparina (Baxter, USA). Se tomó como vía la vena safena, yugular o cefálica accesoria para la obtención de 0,5 a 1 ml de sangre de cada uno de los perezosos muestreados. Las muestras de sangre se pasaron a viales endendorff de 5 ml previamente heparinizadas y se centrifugaron durante 10 min a 3 000 rpm, luego se separó el plasma y se refrigeraron para el transporte (Fig. 5).

### **5.2.3.2 La muestra de pelo**

Se tomaron muestras compuestas de pelo (1 a 2 g) de la región dorsal (nuca y patas) y de la región ventral (garganta y brazos) de cada uno de los perezosos utilizando guantes de latex (Fig. 5). El pelo de los animales se cortó con una tijera a 0,5 cm aproximadamente de la base (Uhart y Zaccagnini 1999). Las muestras de pelo se guardaron en bolsas plásticas con cierres herméticos, debidamente etiquetados y conservados en refrigeración durante el traslado al laboratorio.

### **5.2.3.3 El lavado de los brazos de los perezosos**

Se lavaron las patas delanteras (brazos) de los animales hasta los codos en una bolsa plástica con 75 ml de una mezcla de agua Milli-Q/isopropanol (1:1) por aproximadamente un minuto, con movimientos a través de la parte externa de la bolsa (Fig. 5). Después de tomar la muestra se lavaron los brazos con abundante agua potable para eliminar los residuos de solvente. Se utilizaron bolsas limpias para cada uno de los perezosos y los contenidos de las bolsas se pasaron a botellas de vidrio de 250 ml inmediatamente después de los lavados. Las botellas fueron debidamente etiquetados y se guardaron en refrigeración para ser transportados.

### **5.2.3.4 La limpieza bucal**

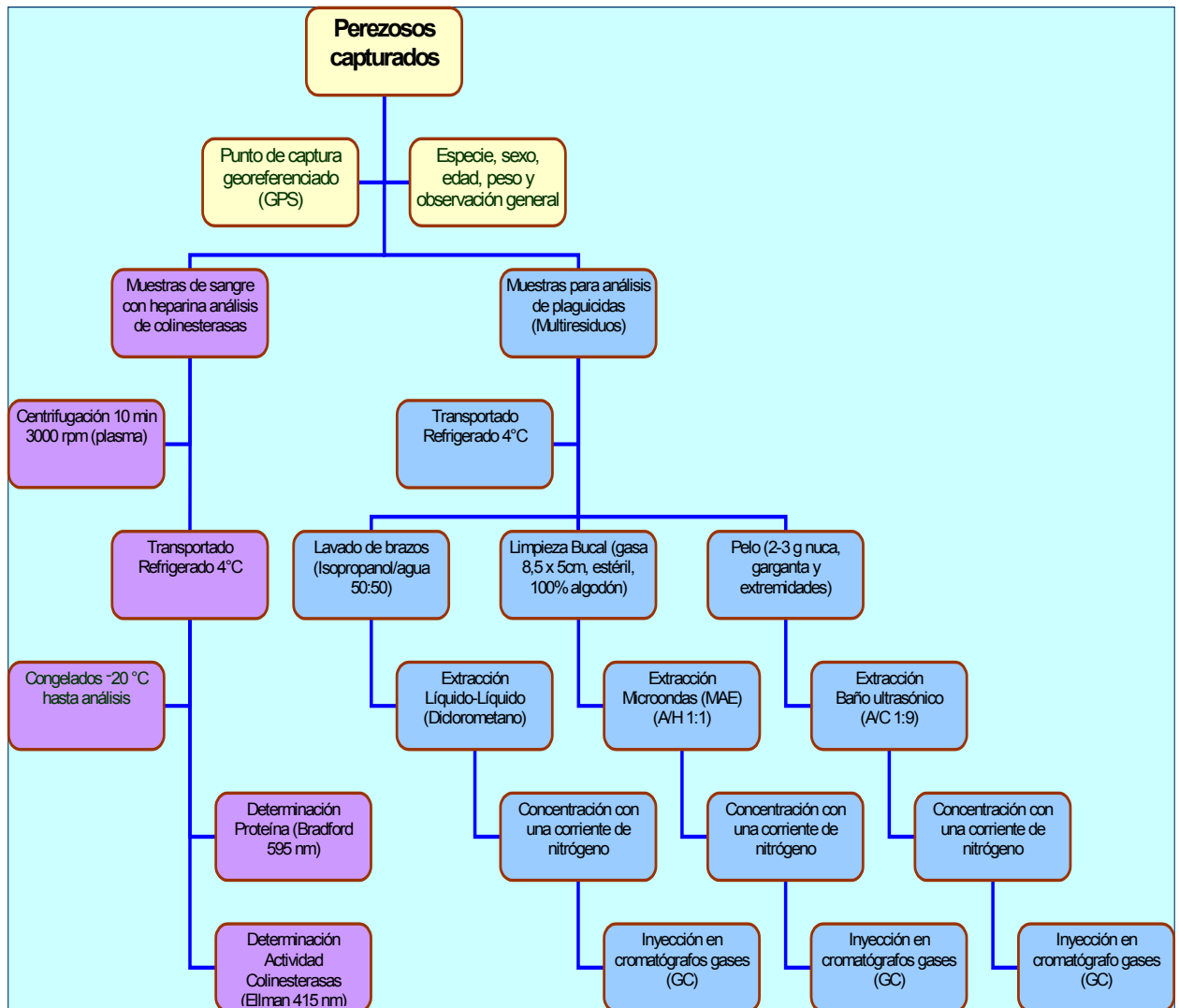
Con una pinza envuelta en una gasa de algodón estéril de 8.5 x 5 cm (Klinion), se limpió la boca de cada uno de los animales capturados. Después de la limpieza se colocó cada una de las gasas en un tubo de vidrio (25 ml) con tapa y se refrigeró para ser transportado.



#### 5.2.4 Transporte y conservación de las muestras

Todas las muestras se mantuvieron y se transportaron a los laboratorios del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional en una hielera con hielo seco (4 °C aprox.). Estando en los laboratorios se codificaron, las muestras del lavado de los brazos de los perezosos fueron refrigeradas a 4 °C y se extrajeron en las siguientes 48 horas. Las de pelo y limpieza bucal fueron congelados a -20 °C (Mondial, Italia) para ser extraídas posteriormente. Todos los concentrados de los extractos se mantuvieron en refrigeración (4 °C) y se analizaron posteriormente con cromatografía de gases (Fig. 5). Las muestras de plasma se mantuvieron congelados a -20 °C y luego se les determinó la actividad de las colinesterasas mediante el método de Ellman (Ellman *et al.* 1961).

Todos los análisis de residuos de plaguicidas se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP) y la determinación de la actividad de las colinesterasas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (Ecotox), ambos laboratorios pertenecen al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional.



**Figura 5.** Diagrama de la toma, preservación y procesamiento de las muestras de perezosos colectadas en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008

### 5.3 Análisis de residuos de plaguicidas

Se probaron las metodologías para el análisis de residuos de plaguicidas en dos matrices sólidas (pelo y gasa) y una matriz líquida (producto del lavado de brazos). Estos métodos se basaron en la extracción de los residuos con solventes orgánicos y la concentración de los extractos con una corriente de nitrógeno. Los extractos se analizaron con cromatógrafos de gases con detector fotométrico de llamas (FPD) y la mayoría con un cromatógrafo de gases con detector de masas (MS) (apartado 5.3.6).

Los disolventes utilizados para la extracción de residuos de plaguicidas de las muestras fueron de calidad para análisis de trazas en cromatografía de gases. Las curvas utilizadas en la cuantificación fueron preparadas en disolventes utilizando materiales de referencia de alta pureza (Dr. Ehrestorfer, Alemania).

Se incluyeron en los análisis algunos de los plaguicidas utilizados en los cultivos de interés y otros plaguicidas que han sido detectados por el LAREP con frecuencia y en mayores concentraciones en los estudios ambientales asociados con los cultivos de piña y banano. Los plaguicidas incluidos en los análisis pertenecen a los siguientes grupos químicos: benzonitrilo-clorados (clorotalonil), conazol (difenoconazol y propiconazol), organofosforados (clorpirifos, diazinon, etporofos, terbufos y paration - metil) y organoclorados (epoxiconazol). Además, se realizó un barrido para los plaguicidas ametrina (triazinas), bromacil (uracilo-bromado), deet (toluamidas), etión, fenamifos (organofosforado), tiabendazol (benzimidazol) y triadimefon (conazol). Los plaguicidas del grupo de los organofosforados son inhibidores de la actividad de las colinesterasas.

Las extracciones y la concentración de las muestras se llevaron a cabo con la ayuda del personal del LAREP. Las cuantificaciones y los análisis cromatográficos fueron realizados por el personal del LAREP. Los límites de detección y de cuantificación fueron reportados por dicho laboratorio.

El proceso de concentración de los extractos de la prueba se realizó con una corriente de nitrógeno con una pureza del 99,99%, se evaporó cada uno de los extractos hasta alcanzar un volumen de 0,1 ml aproximadamente y se les adicionaron 2 ml de acetona/ciclohexano (A/C) 1:9. Se concentró nuevamente bajo una corriente de nitrógeno a 0,1 ml y se aforaron a 1 ml con A/C 1:9. Posteriormente fueron analizados por el personal del LAREP en los cromatógrafos de gases.

### **5.3.1 Pruebas de recuperación realizadas con las tres matrices (pelo, gasa, lavado de brazos)**

Se realizaron pruebas de recuperación para verificar la eficiencia de los métodos de extracción utilizados en las matrices gasa, pelo y lavado de brazos. Se doparon las matrices de pelo, lavado de brazos y gasas limpias con 0,1 ml de la mezcla de plaguicidas: clorpirifos (2,34 µg/ml), clorotalonil (4,77 µg/ml), diazinon (4,82 µg/ml), difenoconazol I y II (58,35 µg/ml), epoxiconazol (6,80 µg/ml), etoprofos (6,78 µg/ml), paration - metil (4,50 µg/ml), terbufos (5,05 µg/ml) y propiconazol I y II (11,06 µg/ml).

### **5.3.2 Extracción de residuos de plaguicidas del pelo mediante el método con baño ultrasonido**

Se extrajeron 1 a 2 g de pelo dos veces con 30 ml de mezcla acetona/ciclohexano (A/C) 1:9 en un baño ultrasónico por 15 min (Branson 5210, EEUU). Las muestras se doparon previamente con 50 µl de estándar interno de etión 6,88 µg/ml en acetona. Las muestras extraídas fueron filtradas con lana de vidrio y con concentrados posteriormente (apartado 5.3.5).

### **5.3.3 Extracción de residuos de plaguicidas de la mezcla producto del lavado de brazos mediante el método de extracción líquido-líquido**

Se adicionaron 50 µl de estándar interno de etión 6,30 µg/ml en acetona a 50 ml de mezcla isopropanol/agua 1:1 del lavado de los brazos. Se agregó 1,5 g de cloruro de sodio por cada 10 ml de muestra (cloruro de sodio previamente calcinado por 5 horas a 550 °C) y se extrajeron con 10 ml de diclorometano PAR en embudos de separación. Después de agitar por 2 min, se dejaron reposar y colectó la fase orgánica. Se realizó una segunda extracción a la fase acuosa con 15 ml de diclorometano PAR. Se juntaron los dos extractos y se extrajeron los residuos de agua con 15 g de sulfato de sodio. Se filtraron los extractos con lana de vidrio y se concentraron posteriormente (apartado 5.3.5).

### **5.3.4 Extracción de residuos de plaguicidas de la gasa utilizada para la limpieza bucal mediante sistema con microondas**

Las gasas con las muestras de la limpieza bucal fueron dopadas con 300 µl del estándar interno etión 582 ng/ml y se extrajeron con 20 ml de acetona/hexano 1:1 con un sistema de microondas de extracción con solvente (CEM, MARS-X™, Canada) a una potencia máxima de 1600 W, un porcentaje de potencia de 100% y una temperatura programada para que en los primeros 10 minutos alcanzara 110 °C y que se mantuviera a esa temperatura por 10 minutos adicionales. Los extractos fueron concentrados posteriormente como se describe a continuación.

### **5.3.5 Concentración de los extractos de pelo, lavado de brazos y limpieza bucal**

Cada uno de los extractos de las muestras de pelo, lavado de los brazos y limpieza bucal se evaporaron a más o menos 2 ml con un evaporador rotatorio (BÜCHI RE III, Suiza) con baño maría a 30°C (BÜCHI 461) y condensador (HAAKEG 000-5744) con el agua a <10°C. Los extractos se trasvasaron cuantitativamente a tubos de concentración previamente pesados. Cada uno de los extractos fueron concentrados con una corriente de nitrógeno hasta 0,05 ml y se les adicionó 2 ml de acetona/ciclohexano (A/C) 1:9. Los extractos del pelo y lavado de brazos se filtraron (0,2 µm GHP Acrodisc Pall, EEUU) con una jeringa Hamilton de 5 ml (#1005) antes de ser transvasados a los viales de inyección. Los extractos fueron guardados a 4 °C hasta su análisis con cromatografía de gases (GC).

### **5.3.6 Análisis cromatográficos de los extractos**

Todos los análisis cromatográficos fueron realizados por el personal del LAREP, Universidad Nacional. Los límites de detección y de cuantificación fueron reportados por dicho laboratorio.

Las muestras de pelo y lavado de brazos de los perezosos tomadas en el año 2005 se analizaron con un cromatógrafo de gases Varian 3500 con detector fotométrico de llama (FPD) y un autoinyector 8100 acoplado al programa Class-VP 4.3/4.2, (Shimadzu, Japón), mediante inyección split/splitless, volumen de inyección 1-2 µl y columnas capilares BPX35 (25 m x 0,250 mm x 0,25 µm) de SGE (Austin, EEUU) y CPsil 19 CB (25 m x 0,250 mm x 0,25 µm) de Chrompack (Holanda). Posteriormente estas muestras se inyectaron en un cromatógrafo Agilent 7890A con detector de masas (MS).

Las muestras de limpieza bucal del 2005 y las muestras de pelo, lavado de brazos y limpieza bucal del 2006 y el 2008 fueron analizados con un cromatógrafo de gases Agilent

7890A con detector de masas 5975C inert XL EI/CI MSD, mediante inyección split/splitless, volumen de inyección 1-2 µl y columnas capilares de alta resolución HP-5MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) y DB-35MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) (T & W Scientific, USA).

### **5.3.7 Análisis cualitativo de las matrices**

Con el fin de determinar cuál de las tres matrices biológicas utilizadas fue mejor para evaluar la exposición de los perezosos a plaguicidas se realizó una comparación cualitativa de: 1- la toma de la muestra, 2- la extracción de los residuos y 3- ingredientes activos encontrados.

En la toma de la muestra se consideraron el grado de invasividad (invasivo, no invasivo), la cantidad de muestra y la facilidad de la colecta, la superficie de contacto con los plaguicidas que se encuentran en el ambiente, la posibilidad de contaminación cruzada durante la toma de la misma, la facilidad de transporte, la conservación por un periodo de tiempo antes de la extracción y la posibilidad de asociar los resultados obtenidos con el tipo de exposición. En el proceso de extracción se tomaron en cuenta la rapidez (número de muestras que se pueden extraer a la vez), el requerimiento de equipo sofisticado, si los extractos requieren de una limpieza antes de ser procesados con los cromatógrafos (extractos “sucios” presencia de interferencias ejemplo grasas) y la eficiencia del proceso de extracción. También se consideró el número de ingredientes activos encontrados y el número de plaguicidas inhibidores de la actividad de las colinesterasas detectados en las muestras analizadas.

## **5.4 Determinación de los efectos**

### **5.4.1 Análisis de las colinesterasas**

La actividad de la colinesterasa plasmática se determinó mediante el método de Ellman (Ellman *et al.* 1961), modificado para micro placas.

#### **5.4.1.1 Determinación del porcentaje de proteínas**

La cuantificación de las proteínas presentes en el plasma se llevó a cabo mediante el método colorimétrico Bradford. Este método se basa en la unión del colorante Coomassie G-250 azul a las proteínas, formando un complejo proteína-colorante azul. La absorbancia del complejo formado se midió a 595 nm después de incubar las muestras por 5 min a temperatura ambiente (Termo Multiskan Ascent; Ascent Software, Finlandia).

#### 5.4.1.2 Determinación de la curva de proteínas

A partir de una disolución patrón de gamma globulina bovina Bio-RAD 2 mg/ml se preparó la curva de proteínas (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; y 0 mg/ml). Se utilizó un tampón de fosfato 0,1M, pH 7,2 como medio de dilución. Se agregaron 250 µl del reactivo de Bradford (BioRad) a 5 µl de cada una de las concentraciones del patrón. El complejo formado se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm (Termo Multiskan Ascent; Ascent Software, Finlandia).

#### 5.4.1.3 Proteína total en las muestras

La determinación de la concentración de proteína total en las muestras se realizó agregando 250 µl del reactivo de Bradford (BioRad) a 5 µl de la muestra. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm (Termo Multiskan Ascent; Ascent Software, Finlandia).

#### 5.4.1.4 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó agregando 250 µl de la mezcla de reacción (acetiltiocolina 75 mM, DTNB 10 mM y NaHCO<sub>3</sub> 56,3 mg/l) a 50 µl de muestra y se midió la absorbancia a 414 nm a 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; y 15 minutos (Termo Multiskan Ascent; Ascent Software, Finlandia). La actividad enzimática se calculó con el cambio de absorbancia a los 5 min. Estos análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

#### 5.4.1.5 Cálculo de la actividad enzimática

F = Volumen total/ volumen de la muestra.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del DTNB = 13 600 M<sup>-1</sup>\*cm.

L = longitud de la celda = 0,9 cm.

t = tiempo de observación = 5 min.

c = concentración de proteína [mg\*ml<sup>-1</sup>].

Actividad =  $\Delta A * 6 / 13\ 600 * 0,9 * 5 * c$  [mol\*ml<sup>-1</sup>\*min\*mg].

|  |
|--|
| <b>Actividad = <math>(\Delta A / c) * 98,04</math> [nmol/min*mg]</b> |
|--|

### **5.5 Encuesta y entrevistas para obtener información sobre la situación ambiental y de los perezosos en relación con el uso de plaguicidas**

Se realizó una encuesta guiada a 24 personas de la comunidad, los criterios utilizados para la selección se basaron en el tiempo de residencia en el lugar y la cercanía de la vivienda con la finca agrícola donde serían capturados los perezosos.

Esta encuesta se realizó con los objetivos de conocer la percepción de las personas encuestadas de la situación ambiental y de la salud de los perezosos en la zona en relación con el uso de plaguicidas y para la obtención de información preliminar de cuáles ingredientes activos de plaguicidas se utilizan en los cultivos de piña y banano (Cuadro 9).

Se entrevistaron a tres especialistas en el tema de los plaguicidas para obtener información sobre los productos químicos que se utilizan en los cultivos de banano y piña de la zona, los métodos de aplicación y las tendencias de las importaciones de esas sustancias químicas. Así, como conocer cuáles son los plaguicidas que se han detectado en muestras ambientales relacionados con dichos cultivos. Los especialistas fueron la Licenciada Viria Bravo, el Licenciado Fernando Ramírez y el Master Clemens Ruepert, coordinadora del Área de Diagnóstico, agrónomo y coordinador del Área de Química del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional respectivamente.

Los resultados de la encuesta realizada a las personas de la comunidad y las entrevistas con los especialistas en el tema de los plaguicidas permitieron establecer la lista de los plaguicidas que se incluyeron en los análisis de residuos.

### **5.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico básico se llevó a cabo con Microsoft Excel (Windows, 2003) y se utilizó el programa estadístico SPSS (V. 15,0) para el análisis de regresión. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para determinar cuál de las variables (peso, sexo, estado de desarrollo, especie y sitio) explica la actividad ChE. La prueba U de Mann-Whitney se empleó para determinar la diferencia entre medias. Los resultados se consideraron significativamente diferentes cuando el valor de  $P$  fue menor que 0,05.

### **5.7 Marco del proyecto y limitaciones**

Este estudio se llevó a cabo dentro del marco del proyecto de investigación que estaba en ejecución: "Ecología comparativa y uso de hábitat del perezoso de tres dedos (*B. variegatus*) y perezoso de dos dedos (*C. hoffmanni*) en una plantación de cacao (*Theobroma cacao*)" coordinado por Christopher Vaughan, PhD Milwaukee Public



Museum/Department of Wildlife Ecology (UWisconsin-Madison), ICOMVIS-UNA. Gracias al Dr. Vaughan y sus colaboradores se integró este estudio al proyecto, lo que permitió el aprovechamiento de los animales capturados para tomarles las muestras para los análisis respectivos. A pesar de que se tuvo la oportunidad de contar con la captura de los animales y con la logística en el campo (costo, tiempo, esfuerzo, sitio de trabajo) y presencia de veterinarios profesionales, hay que mencionar que también fue una limitante ya que no se tuvo control sobre factores que pudieron haber influido en los resultados de los análisis. Estos factores fueron la captura de los animales en horario diferentes, manipulación de los animales por muchas personas antes de que se pudieran tomar las muestras para los análisis de residuos de plaguicidas y poco control sobre el uso de sustancias químicas del personal involucrado en la captura (ej. uso de repelentes contra insectos). La muestra de sangre tuvo una alta demanda para otros análisis y la prioridad fue para aquellos estudios que estaban definidos dentro del proyecto marco desde un inicio.

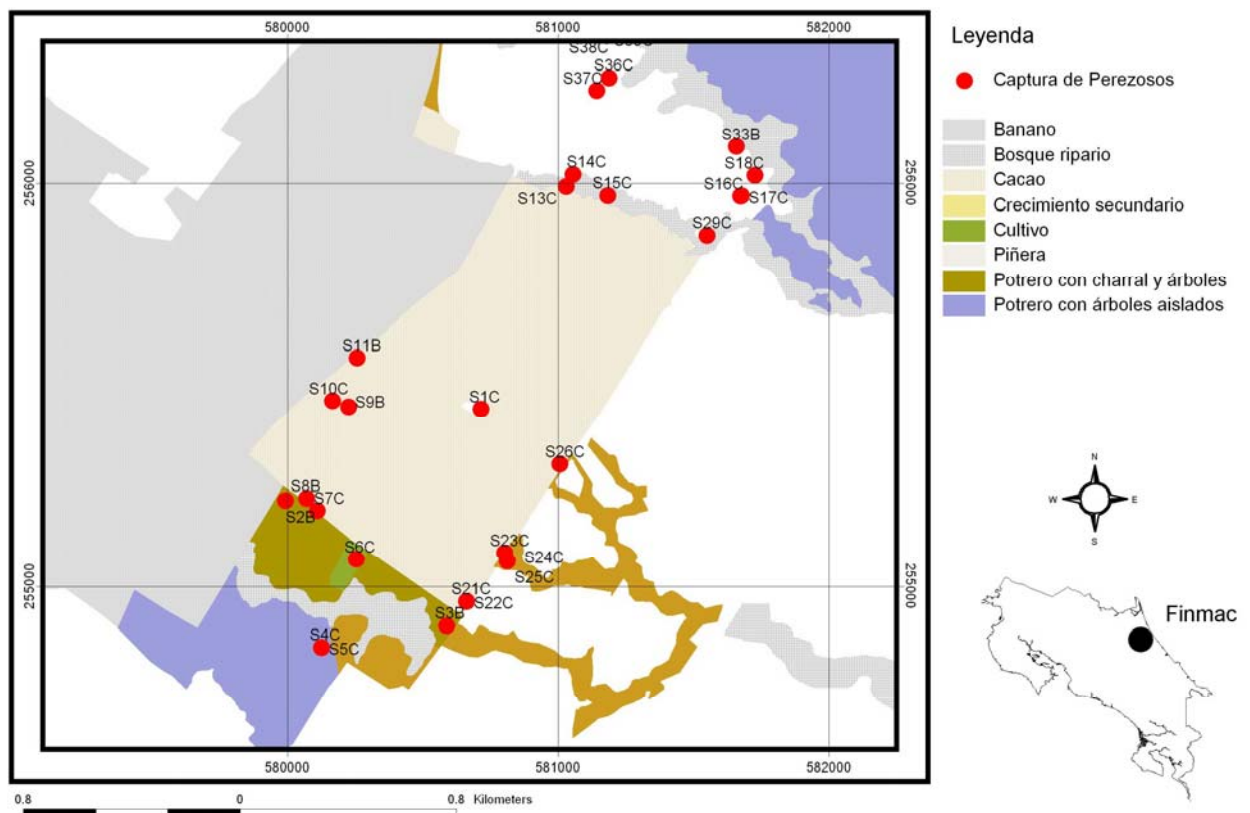
Por lo tanto, no se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de las colinesterasas de todos los animales capturados. Se omitió tomar muestras de pelo y de lavado de los brazos de aquellos animales que se consideró con una manipulación excesiva antes de tener la oportunidad de tomar las muestras para los análisis de residuos de plaguicidas.

Otra limitante del estudio fue encontrar una población de perezosos control, que reunieran las mismas características de hábitat, de tipo de alimentación, de vida libre y que no estuviera expuesto a plaguicidas. Se consideró que la alternativa más viable para ser usado como población control, era una población de perezosos en cautiverio de un centro de rescate de la misma región.

## 6. Resultados

### 6.1 Captura, caracterización de los individuos colectados y actividad de las colinesterasas

La finca agrícola limita al oeste con cultivo intensivo de banano y al este con piña, al suroeste con potreros con árboles aislados y al noreste con bosques ribereños. Los sitios de captura de los perezosos detectados con residuos de plaguicidas, están representados en rojo. Los perezosos fueron capturados en los bordes de la finca de agricultura orgánica, con excepción de un individuo hembra, adulta del género *Choleopus* (SC1) que se capturó en medio de la finca de cacao orgánico. La mayoría de los perezosos se encontraban ubicados en el bosque ribereño y en los potreros con charral y árboles aislados. Los animales capturados al suroeste y al sureste de la finca se hallaban cerca de los cultivos intensivos de banano y piña respectivamente (Fig. 6).



**Figura 6.** Finca agrícola con los sitios de captura de los perezosos detectados con residuos de plaguicidas durante 2005 y 2006. Elaborado por Óscar Ramírez

El 78,3% (36/46) de los animales capturados en la finca agrícola fueron de la especie *Choleopus*, el 50% (18/36) fueron hembras, el 97,2% (35/36) adultos y 2,78% juveniles. Mientras que el 21,7% (10/46) fueron de la especie *Bradypus*, 30% (3/10) hembras y 70% (7/10) adultos. Todos los perezosos muestreados en el centro de rescate fueron adultos, seis de cada especie. De la especie de dos dedos el 66,7% (4/6) fueron hembras y 33,3% (2/6) machos y de la especie de tres dedos el 50% fueron hembras.

El animal con mayor peso fue una hembra de la especie *Choleopus* de 12,80 kg del centro de rescate y el de menor peso fue un macho de la especie *Bradypus* de 3,20 kg capturado en la finca agrícola. Los perezosos de dos dedos fueron significativamente más pesados que los de tres dedos, la probabilidad del valor U de Mann-Whitney calculada correspondió a 0,0001, el cual fue más pequeño que el nivel de significancia 0,05, por lo tanto se rechaza la  $H_0$ . El peso promedio de la población de perezosos de la especie *Bradypus* de la finca agrícola y el centro de rescate fue similar. El peso de los animales de la especie *Choleopus* del centro de rescate fue mayor que el de la finca agrícola. No se encontraron diferencias entre sexo en cuanto al peso de los animales de la misma especie (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Valores promedios del peso (kg) de los perezosos muestreados en la finca agrícola y el centro de rescate durante 2005, 2006 y 2008, según especie, sexo y estado de desarrollo (máximos, mínimos y desviación estándar)

| Especie              | n  | Finca agrícola     | D. E. | n | Centro Rescate       | D. E. |
|----------------------|----|--------------------|-------|---|----------------------|-------|
| <i>B. variegatus</i> | 9  | 3,64 (4,90-1,30)   | 1,18  | 6 | 3,98 (5,00-3,40)     | 0,61  |
| Hembras              | 3  | 4,18 (4,90-3,70)   | 0,63  | 3 | 4,37 (5,00-3,70)     | 0,65  |
| Machos               | 4  | 4,15 (4,60-3,20)   | 0,64  | 3 | 3,60 (3,90-3,40)     | 0,26  |
| Adultos              | 7  | 4,16 (4,90-3,20)   | 0,58  | 6 | 3,98 (5,00-3,40)     | 0,61  |
| Juveniles            | 2  | 1,80 (2,30-1,30)   | 0,71  | * | *                    |       |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 36 | **5,48 (6,75-2,65) | 0,98  | 6 | ***9,35 (12,80-7,00) | 1,91  |
| Hembras              | 18 | 5,68 (6,75-3,80)   | 0,65  | 4 | 9,95 (12,80-8,50)    | 1,94  |
| Machos               | 17 | 5,43 (6,70-3,30)   | 1,05  | 2 | 8,15 (9,30-7,00)     | 1,63  |
| Adultos              | 35 | 5,56 (6,75-3,30)   | 0,86  | 6 | 9,35 (12,80-7,00)    | 1,91  |
| Juveniles            | 1  | 2,65               |       | * | *                    |       |

n = número de perezosos.

D. E. (desviación estándar).

\*No se muestrearon perezosos juveniles.

\*\*Diferencia significativa entre especies.

\*\*\*Diferencia significativa entre sitios.

La actividad enzimática promedio se presenta para cada una de las especies, según el sexo y el estado de desarrollo. La actividad enzimática mayor fue de 2,55 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg prot<sup>-1</sup> y la presentó un individuo macho adulto de la especie *Choleopus* del centro de rescate, mientras que la menor fue de 0,04 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg prot<sup>-1</sup> y le correspondió a una hembra adulta de la misma especie capturada en la finca agrícola (Cuadro 2). La actividad promedio de las ChE plasmática de los perezosos capturados en la finca agrícola fue similar entre sexo, sitios y especies. En la especie de tres dedos se encontró una diferencia significativa de la actividad enzimática promedio entre los sitios, la probabilidad del valor U de Mann-Whitney calculada correspondió a 0,043, el cual fue más pequeño que el nivel de significancia 0,05, por lo tanto se rechaza la H<sub>0</sub>.

**Cuadro 2.** Actividad enzimática promedio en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$  de las dos especies de perezosos muestreados en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008, según sexo y estado de desarrollo (máximos, mínimos y desviación estándar)

| Especie              | n  | Finca agrícola   | D. E. | n | Centro Rescate     | D. E |
|----------------------|----|------------------|-------|---|--------------------|------|
| <i>B. variegatus</i> | 8  | 1,12 (1,82-0,22) | 0,53  | 6 | **0,54 (0,86-0,35) | 0,19 |
| Hembras              | 2  | 0,58 (0,95-0,22) | 0,52  | 3 | 0,40 (0,43-0,35)   | 0,04 |
| Machos               | 4  | 1,18 (1,61-0,60) | 0,43  | 3 | 0,68 (0,86-0,50)   | 0,18 |
| Adultos              | 6  | 0,98 (1,61-0,22) | 0,51  | 6 | 0,54 (0,86-0,35)   | 0,19 |
| Juveniles            | 2  | 1,56 (1,82-1,30) | 0,37  | * | *                  |      |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 33 | 1,03 (2,45-0,04) | 0,54  | 6 | 1,34 (2,55-0,63)   | 0,67 |
| Hembras              | 17 | 1,15 (2,45-0,04) | 0,61  | 4 | 1,22 (1,48-0,87)   | 0,27 |
| Machos               | 15 | 0,94 (1,60-0,14) | 0,44  | 2 | 1,59 (2,55-0,63)   | 1,36 |
| Adultos              | 33 | 1,05 (2,45-0,04) | 0,54  | 6 | 1,34 (2,55-0,63)   | 0,67 |
| Juveniles            | 1  | 0,39             |       | * | *                  |      |

n = número de perezosos.

D.E. (desviación estándar).

\*No se muestrearon perezosos juveniles.

\*\*Diferencia significativa entre los sitios.

## 6.2 Presencia de plaguicidas y punto de captura de los perezosos

En el estudio realizado en el periodo del 2005 al 2008 se detectaron ocho plaguicidas diferentes, pertenecientes a los siguientes grupos químicos: los benzonitrilos/clorados (1), benzimidazoles (1), triazinas (1), toluamidas (1), conazoles (1) y organofosforados (3). Se detectaron en las muestras analizadas los siguientes ingredientes activos: ametrina, clorotalonil, clorpirifos, deet, diazinon difenoconazol, etoprofos y tiabendazol, de los cuales tres son inhibidores de la actividad de las colinesterasas. En los animales del centro de rescate se detectaron los plaguicidas ametrina y deet, ninguno de estas dos sustancias actúa inhibiendo la actividad de las colinesterasas.

El difenoconazol, diazinon y etoprofos se detectaron en las muestras del lavado de los brazos; deet y clorotalonil en las gasas utilizadas en la limpieza bucal y ametrina, clorpirifos, clorotalonil, diazinon, deet, difenoconazol, etoprofos y tiabendazol en la matriz de pelo (Cuadro 3, 4 y 5).

Se detectaron tres plaguicidas OP en las muestras analizadas, el insecticida clorpirifos, el insecticida/acaricida diazinon y el insecticida/nematicida etoprofos. Estas sustancias químicas se sitúan entre los primeros 22 de los 404 plaguicidas más importados por toneladas métricas en Costa Rica durante el periodo de 1977 al 2006. El etoprofos ocupa la posición 10, el diazinon 16 y el clorpirifos 22 (Ramírez *et al.* 2009).

En las muestras de lavado de brazos se detectaron residuos de ingrediente activo de plaguicidas en 23 animales, de limpieza bucal en siete de ellos y de pelo en 28 animales. Se encontraron residuos de plaguicidas en las dos especies de perezosos estudiados, 87,5% (14/16) de la especie *B. variegatus* y 73,8 (31/42) de la especie *C. hoffmanni*. El 76,1% (35/46) de los animales capturados en la finca agrícola se les detectó residuos de plaguicidas en una o varias de las matrices analizadas y 83,3% (10/12) de los animales muestreados del centro de rescate se les detectó residuos de plaguicidas en el pelo. En la matriz de pelo fue donde se detectaron las mayores concentraciones de residuos de plaguicidas, el ingrediente activo que se encontró en mayor concentración fue el deet (332 µg). Este plaguicida fue detectado en las tres matrices, estuvo presente en muestras de las dos especies estudiadas y se encontró en muestras tomadas en las campañas del 2005, 2006 y 2008. Los plaguicidas inhibidores de la actividad de las colinesterasas fueron detectados en cuatro muestras de lavado de brazos y 25 muestras de pelo de perezosos capturados en la finca agrícola. En las muestras de limpieza bucal de los perezosos no se detectaron ninguno de estos plaguicidas (Cuadro 4 y 5).

**Cuadro 3.** Residuos de plaguicidas detectados en las muestras analizadas de perezosos de dos y tres dedos capturados en la finca agrícola durante el 2005 y 2006

| Plaguicida             | Acción biocida          | *Cultivos relacionados con la investigación                       | Grupo químico            | **Toxicidad |
|------------------------|-------------------------|---|--------------------------|-------------|
| ametrina               | herbicida               | banano, cacao y piña  | triazinas                | Moderada    |
| clorotalonil           | fungicida               | banano  | benzonitrilo, clorado    | Bajo        |
| clorpirifos            | insecticida             | banano repelente de insecto, especialmente usado contra culicidae | organofosforado, clorado | Alta        |
| dietiltoluamida (deet) | insecticida             |   | toluamidas               | Moderada    |
| diazinon               | acaricida               | cacao, piña   | organofosforado          | Moderada    |
| difenoconazol          | fungicida               | banano  | conazol                  | Moderada    |
| etoprofos              | insecticida, nematocida | banano, piña  | organofosforado          | Alta        |
| tiabendazol            | fungicida               | banano  | benzimidazol             | Bajo        |

\*También se usan en otros cultivos.

\*\*Fuente: Base de datos footprints.

**Cuadro 4.** Valores promedios, máximos y mínimos de los residuos de plaguicidas detectados en las tres matrices analizadas de los perezosos de dos y tres dedos capturados en la finca agrícola y el centro de rescate durante el 2005, 2006 y 2008

| Matriz            | Plaguicida (µg) | <i>B. variegatus</i> | n* | <i>C. hoffmanni</i>  | n* |
|-------------------|-----------------|----------------------|----|----------------------|----|
| Finca agrícola    |                 |                      |    |                      |    |
| Lavado de brazos  | diazinon        | Trazas               | 2  | 0,10                 | 1  |
|                   | difenoconazol   | 0,74 (0,90-0,57)     | 2  | 0,69 (0,71-0,68)     | 2  |
|                   | deet            | 4,35 (12,00-0,45)    | 7  | 10,14 (34,00 -0,80)  | 16 |
|                   | etoprofos       | Trazas               | 1  | -                    | -  |
| Limpieza bucal    | clorotalonil    | -                    | -  | Trazas               | 1  |
|                   | deet            | 1,00                 | 1  | 0,43 (1,00-0,20)     | 4  |
| Pelo              | ametrina        | 0,02                 | 1  | -                    | -  |
|                   | clorotalonil    | -                    | -  | 0,07                 | 1  |
|                   | clorpirifos     | 0,01 (0,01-0,01)     | 2  | 0,41 (0,02-0,01)     | 3  |
|                   | diazinon        | 0,34 (1,03-0,02)     | 4  | 0,41 (1,54-0,01)     | 13 |
|                   | difenoconazol   | 2,20 (2,87-1,54)     | 2  | 0,90 (1,03-0,78)     | 3  |
|                   | deet            | 13,27                | 1  | 77,30 (332,00-12,70) | 6  |
|                   | etoprofos       | 0,05                 | 1  | 0,05 (0,07-0,02)     | 2  |
|                   | tiabendazol     | -                    | -  | 0,34                 | 1  |
| Centro de rescate |                 |                      |    |                      |    |
| Pelo              | deet            | 0,80 (1,00-0,70)     | 4  | 0,88 (1,80-0,60)     | 6  |
|                   | ametrina        | -                    | -  | 0,06                 | 1  |

\* n = número de veces que se detectó el plaguicida en la matriz respectiva.

-=No detectados.

Se analizaron 174 muestras (58 animales).

El único plaguicida detectado en las tres matrices analizadas de los perezosos capturados en la finca agrícola fue el deet. El diazinon, difenoconazol y etoprofos fueron los plaguicidas en común encontrados en las muestras de pelo y lavado de brazos. Cuando se detectaron residuos de plaguicida en las tres matrices de un mismo animal, la concentración fue mayor en pelo, seguido por lavado de brazos y por último en la gasa utilizada para la limpieza bucal. En el centro de rescate solo se encontraron residuos de plaguicidas en las muestras de pelo de los perezosos (Cuadro 4 y 5).



**Cuadro 5.** Perezosos de la finca agrícola y el centro de rescate detectados con residuos de plaguicidas en las diferentes matrices, durante el periodo de estudio

| Act. ChE   | Espe cie | Sexo | Estado desarro llo | Plaguicidas detectados en ug |                |      |                |               |      |           |              |               |           |                |      |            |              |
|--|----------|------|--------------------|------------------------------|----------------|------|----------------|---------------|------|-----------|--------------|---------------|-----------|----------------|------|------------|--------------|
|  |          |      |                    | Lavado de brazos             |                |      | Limpieza bucal |               |      | Pelo      |              |               |           |                |      |            |              |
|  |          |      |                    | diazin on                    | difeno conazol | deet | etoprof os     | cloro talonil | deet | ame trina | clorpir ifos | cloro talonil | diazin on | difeno conazol | deet | etopro fos | tiaben dazol |
| n.a  | Ch       | M    | A                  | n.d                          |                |      | n.d            | n.d           |      | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            |      | n.d        | n.d          |
| n.a  | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       |              | n.d           |           |                |      | n.d        | n.d          |
| n.a  | Bv       | H    | J                  | n.d                          |                |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| n.a  | Ch       | M    | A                  | n.d                          |                |      | n.d            | n.d           |      | n.a       |              | n.d           |           |                | n.a  | n.d        | n.d          |
| n.a  | Bv       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           |      |           |              | n.d           |           |                |      |            | n.d          |
| 0,04   | Ch       | H    | A                  |                              | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.a       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.a  | n.d        | n.d          |
| 1,61   | Bv       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,95   | Bv       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,64   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,77   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,53   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,30   | Bv       | H    | J                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,14   | Bv       | M    | A                  |                              |                |      |                | n.d           | n.d  | n.d       |              | n.d           |           |                | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,39   | Ch       | M    | J                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       |              | n.d           |           |                |      |            | n.d          |
| 1,82   | Bv       | H    | J                  |                              | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,63   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           |      |           | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,03   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           |      | n.a       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.a  | n.d        | n.d          |
| 1,86   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,80   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,09   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,91   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,57   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,69   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,48   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,06   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,31   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,08   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            |               | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 1,36   | Bv       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           |      | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,55   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          |               | n.d       | n.d            |      | n.d        | n.d          |
| 0,51   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.a       | n.d          | n.d           |           | n.d            | n.a  | n.d        | n.d          |
| 1,00   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            |      | n.d        | n.d          |
| 1,60   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            |      | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            |      | n.d        |              |
| 2,45   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           |           | n.d            |      | n.d        | n.d          |
| 0,60   | Bv       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,22   | Bv       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| Plaguicidas detectados en las muestras tomadas a los perezosos del centro de rescate |          |      |                    |                              |                |      |                |               |      |           |              |               |           |                |      |            |              |
| 1,48   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       |                |      | n.d        | n.d          |
| 1,39   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       |                |      | n.d        | n.d          |
| 1,12   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       |                |      | n.d        | n.d          |
| 2,55   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       |                |      | n.d        | n.d          |
| 0,63   | Ch       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  |           | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,87   | Ch       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,42   | Bv       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,86   | Bv       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,35   | Bv       | H    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |
| 0,50   | Bv       | M    | A                  | n.d                          | n.d            | n.d  | n.d            | n.d           | n.d  | n.d       | n.d          | n.d           | n.d       | n.d            | n.d  | n.d        | n.d          |

n.d: no detectados.

n.a: no analizados.

Relleno color gris: presencia de residuos de plaguicidas.

Bv: *B. variegatus*.

Ch: *C. hoffmanni*.

H: hembra.

M: macho.

A: adulto.

J: juvenil.

Los plaguicidas organofosforados se detectaron en 19 perezosos capturados en la finca agrícola; el diazinon en 19 animales, el clorpirifos en 5 y el etoprofos en 4 de ellos. Las mayores concentraciones de diazinon se encontraron en animales capturados cerca del cultivo de piña, mientras que los expuestos a clorpirifos y etoprofos se capturaron en las cercanías del cultivo de banano. Los plaguicidas OP estuvieron presentes en el 41,3% (19/46) de los perezosos capturados. En la especie de perezosos de dos dedos un 38,9% (14/36) y un 50% (5/10) en la especie de tres dedos estuvo presente los plaguicidas OP (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Plaguicidas OP detectados en las muestras de los perezosos capturados en la finca agrícola, cercanía a los monocultivos de piña y banano durante el periodo de estudio

| Especie              | Act. ChE<br>( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ) | Plaguicidas detectados en las matrices analizadas ( $\mu\text{g}$ ) |           |             |          |           | Captura/Cercanía cultivo |
|----------------------|---|---|-----------|-------------|----------|-----------|--------------------------|
|                      |   | Lavado de brazos  |           |             | Pelo     |           |                          |
|                      |   | diazinon  | etoprofos | clorpirifos | diazinon | etoprofos |                          |
| <i>C. hoffmanni</i>  | nd  | nd  | nd        | nd          | 0,07     | nd        | Nd                       |
| <i>C. hoffmanni</i>  | nd  | nd  | nd        | 0,01        | 0,02     | nd        | Nd                       |
| <i>C. hoffmanni</i>  | nd  | nd  | nd        | 0,02        | 0,04     | nd        | Nd                       |
| <i>B. variegatus</i> | nd  | nd  | nd        | 0,01        | 0,02     | 0,05      | Nd                       |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 0,04  | 0,10  | nd        | nd          | nd       | nd        | Cacao                    |
| <i>B. variegatus</i> | 1,14  | trazas  | trazas    | 0,01        | 0,11     | nd        | Cacao/Banano             |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 0,39  | nd  | nd        | 0,01        | 0,16     | 0,07      | Cacao/Banano             |
| <i>B. variegatus</i> | 1,82  | trazas  | nd        | nd          | nd-      | nd        | Cacao/Banano             |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,57  | nd  | nd        | nd          | 1,54     | nd        | Cacao/Piña               |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,69  | nd  | nd        | nd          | 1,30     | nd        | Cacao/Piña               |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,48  | nd  | nd        | nd          | 0,53     | nd        | Cacao/Piña               |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,06  | nd  | nd        | nd          | 0,44     | nd        | Cacao/Piña               |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,31  | nd  | nd        | nd          | 1,14     | nd        | Cacao/Piña               |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 0,55  | nd  | nd        | nd          | 0,02     | 0,02      | B. ripario/Banano        |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 0,51  | nd  | nd        | nd          | 0,02     | nd        | B. ripario/Banano        |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 1,60  | nd  | nd        | nd          | 0,01     | nd        | B. ripario/Banano        |
| <i>C. hoffmanni</i>  | 2,45  | nd  | nd        | nd          | 0,03     | nd        | B. ripario/Banano        |
| <i>B. variegatus</i> | 0,60  | nd  | nd        | nd          | 0,19     | nd        | B. ripario/Banano        |
| <i>B. variegatus</i> | 0,22  | nd  | nd        | nd          | 1,03     | nd        | B. ripario/Banano        |

nd= no detectado.

B.= bosque.

Se analizaron un total de 174 muestras (58 perezosos).

Los porcentajes de recuperación de los plaguicidas analizados en las tres matrices estuvieron dentro de los rangos aceptables (70 y 120%), solo el difenoconazol y el paratión - metil en el caso de la matriz pelo estuvieron por encima de los rangos y el clorpirifos en el caso de la limpieza bucal. Los porcentajes de recuperaciones de la matriz de lavado de brazos estuvieron entre 82 y 96% (Cuadro 7 y 8).

**Cuadro 7.** Porcentaje de recuperación, límites de detección y de cuantificación de los plaguicidas analizados en las matrices de pelo y limpieza bucal realizados en el LAREP

| Sustancias analizadas | Pelo (n=3) |                |           |           | Limpieza bucal (n=3) |                |              |              |
|-----------------------|------------|----------------|-----------|-----------|----------------------|----------------|--------------|--------------|
|                       | Recup. (%) | Desv. estándar | LD (ug/g) | LQ (ug/g) | Recup. (%)           | Desv. estándar | LD (ug/gasa) | LQ (ug/gasa) |
| clorotalonil          | 81         | 18             | 0,03      | 0,09      | 88                   | 6              | 0,03         | 0,09         |
| clorpirifos           | 115        | 13             | 0,01      | 0,03      | 132                  | 3              | 0,01         | 0,03         |
| diazinon              | 83         | 6              | 0,005     | 0,03      | 89                   | 7              | 0,005        | 0,03         |
| difenoconazol         | 146        | 16             | 0,3       | 1,0       | 84                   | 5              | 0,3          | 1,0          |
| epoxiconazol          | 107        | 8              | 0,04      | 0,1       | 90                   | 6              | 0,04         | 0,1          |
| etoprofos             | 92         | 14             | 0,02      | 0,08      | 87                   | 8              | 0,02         | 0,08         |
| paration-metil        | 136        | 15             | 0,1       | 0,3       | 104                  | 3              | 0,1          | 0,3          |
| propiconazol          | 116        | 8              | 0,05      | 0,2       | 115                  | 5              | 0,05         | 0,2          |
| terbufos              | 73         | 1              | 0,01      | 0,03      | 94                   | 4              | 0,01         | 0,03         |

n= número de repeticiones.

Desv. = desviación.

LD= límite de detección.

LQ= límite de cuantificación.

### 6.3 Comparación de las matrices analizadas

Se realizó una comparación entre la toma de las muestras, transporte, conservación, método de extracción de residuos de plaguicidas y el número de ingrediente activos detectados en las matrices de limpieza bucal, lavado de los brazos y pelo. Esta comparación fue hecha de forma cualitativa y se basó en las observaciones realizadas durante el proceso de colecta y procesamiento de las muestras. La comparación se presentó como un insumo adicional que se debe tomar consideración durante la escogencia del tipo de muestra y la metodología de extracción a utilizar en futuros trabajos de investigación con mamíferos silvestres (Cuadro 8).

Las muestras de pelo utilizadas para el análisis de residuos de plaguicidas presentaron las siguientes ventajas: - la toma de la muestra fue un procedimiento no invasivo para el animal, - el pelo representa una amplia superficie de contacto, - las muestras se obtuvieron de diferentes partes del cuerpo, - fueron fáciles de transportar y se pudieron conservar por periodos relativamente largos (> un mes), - el procedimiento de extracción utilizado fue

rápido y - la matriz pelo se puede utilizar para medir exposición externa (contacto). Las muestras de pelo también, presentaron algunas desventajas: - alta probabilidad de contaminación cruzada, - el método de extracción utilizado requirió de un equipo sofisticado (baño ultrasónico) y - los extractos estuvieron "sucio", con impurezas como residuos de ácidos grasos y algas, que debieron ser removidos antes de ser inyectados en los cromatógrafos de gases.

Las ventajas que se percibieron en la toma de las muestras de la boca fueron: - menor probabilidad de contaminación cruzada en relación con las muestras de pelo y lavado de brazos, - las muestras tomadas con la gasa fueron fáciles de transportar y se pudieron conservar por periodos relativamente largos (> un mes), - el método de extracción fue el más rápido de los tres, - los extractos obtenidos no presentaron impurezas y - esta matriz puede ser utilizada para medir exposición interna. Las desventajas percibidas fueron:- la toma de la muestra fue un procedimiento invasivo para el animal, - se obtuvo poca cantidad de muestra, - la superficie de muestreo disponible fue pequeña en comparación con la de pelo y de los brazos y - se requirió de un equipo sofisticado (microondas de extracción con solventes).

El lavado de los brazos presentó las siguientes ventajas:- fue un procedimiento poco invasivo para el animal, - la superficie de contacto fue mayor que la bucal y menor que la de pelo, - el método de extracción requirió de equipo básico de laboratorio y - esta matriz se puede utilizar para medir exposición externa (contacto). Las desventajas percibidas fueron: - alta posibilidad de contaminación cruzada, - pérdida de muestra por absorción en el pelo y por escurrimiento del líquido de lavado por los brazos, - no se recomienda conservar la muestra por más de 48 hrs, - el método de extracción fue más lento que los dos anteriores y - los extractos estuvieron "sucio", con impurezas como residuos de ácidos grasos, que debieron ser eliminados antes de ser inyectados en los cromatógrafos de gases.

Con los tres tipos de muestras utilizadas se detectaron residuos de ingredientes activos de plaguicidas. En el pelo se detectaron 8 plaguicidas diferentes, en la boca dos (clorotalonil y deet) y 4 en el lavado de los brazos (deet, diazinon, difenoconazol y etoprofos) (Cuadro 8). Las concentraciones más altas de residuos detectados fueron en el pelo, seguido por el lavado de los brazos y por último la limpieza bucal.

**Cuadro 8.** Análisis comparativo de las matrices utilizadas para la detección de residuos de plaguicidas en muestras de perezosos *B. variegatus* y *C. hoffmanni*

| Parámetros   | Limpieza bucal | Lavados brazos | Pelo        |
|--|----------------|----------------|-------------|
| Invasividad para el animal                                 | +              | +/-            | -           |
| Posibilidad de contaminación                               | -              | +              | +           |
| Tipo de exposición   | Ingesta        | Contacto       | Contacto    |
| Superficie muestreada                                      | -              | +/-            | +           |
| Superficie de contacto con tóxico                          | -              | +/-            | +           |
| Pérdida de muestra   | -              | +              | -           |
| Periodo de conservación muestra                            | +              | -              | +           |
| Cantidad de muestras que se pueden extraer al mismo tiempo | 40             | 3              | 10          |
| Equipo requerido para extracción                           | Sofisticado    | No sofisticado | Sofisticado |
| Interferencias extracción                                  | -              | +/-            | +           |
| Pruebas de recuperación (%)                                | 84-132         | 82-96          | 73-146      |
| Número de ingredientes activos detectados                  | 2              | 4              | 8           |

+: mayor.

+/-: entre el mayor y el menor.

-: menor.

#### 6.4 Percepción de la comunidad de la situación ambiental y de la salud de los perezosos

Se resume los resultados de la encuesta realizada a las personas que viven en los alrededores de la finca agrícola donde fueron capturados los perezosos. Estos resultados en conjunto con las entrevistas de los especialistas en el tema de los plaguicidas permitieron establecer la lista de los plaguicidas que se incluyeron en los análisis de residuos (Cuadro 9).

El 96% de las personas encuestadas consideró que los plaguicidas los afecta a ellos, a su familia y a la vida silvestre. Se sintieron afectados porque con frecuencia sufren de salpullidos, ronchas, picazón, manchas blancas en la piel, úlceras, asma, rinitis, dolor de cabeza, “enchilazón” y ardor en los ojos, hormigueo y la sensación de alfileres en todo el cuerpo. El 37,5% manifestó presentar problemas por alergias, el 20,8% por intoxicaciones y el 8,3% otros problemas (esterilidad, hormigueo y sensación de alfileres en todo el cuerpo).

En relación con la vida silvestre, el 96% de las personas encuestadas afirmaron haber visto en los últimos cinco años perezosos en la zona, pero no saben a cuál especie pertenecen (75%). El 4% de ellos respondió no haber visto estos animales en la zona. El 37,5% de ellos consideró que el número de individuos de estos mamíferos ha aumentado en la zona y un 29,2% que disminuyó. Los factores que influyeron positivamente en la variación del número

de individuos fueron: una mayor protección, un mayor cuidado por parte de los pobladores y porque las áreas protegidas les brinda protección y alimento. No obstante, afirmaron que existen factores que los afectan negativamente como las infecciones, la falta de alimento, la deforestación, los accidentes eléctricos y la contaminación. El 46% de las personas entrevistadas afirmaron haber observado los perezosos con crías en los meses de enero a julio (73%). El 50% de ellos aseguró haber observado cambios en el comportamiento de estos animales, porque los han visto caminando en el suelo, en tubos, en los cables eléctricos, en las cercas y en plantas como el banano y las amapolas. Los han visto con malformaciones y cambios físicos (13%), como infecciones, pérdida de pelo hasta en un 50% de su cuerpo, ciegos, quemados, con heridas causadas por machetes y otros causados probablemente por las peleas entre ellos. El 67% de la gente consideró que la principal causa de muerte de los perezosos fueron la electrocución, accidentes automovilísticos y la depredación por perros y aves rapaces diurnas. Ellos aseveraron que los perezosos utilizan los árboles para descansar (75%), alimentarse (58%), reproducirse (13%), refugiarse (4%) y desplazarse (13%). El 25% de los encuestados respondió la pregunta sobre cuáles árboles utilizan para alimentarse, el 67% no sabía o no respondió. Consideraron que la principal fuente de alimento para los perezosos son los árboles de guarumo (*Cecropia sp*) 50%, poró (*Erythrina poeppigiana*) 46%, cacao (*Theobroma cacao*), javillo (*Hura crepitans*) y mamón (*Melicocca sp*) 13% de cada uno y 8% ceibo (*Erythrina*), gavián, y yumplón (*Spondias mombin*) (Cuadro 9).

Según la percepción de los encuestados los árboles que utilizan los perezosos se encuentran mayoritariamente en la montaña (21%) y en los potreros (13%) y afirmaron que no hay en los cultivos de banano (33%), piña (38%) y cacao (13%).

El 75% de los encuestados consideró que se utilizan agroquímicos en los cultivos de banano y piña y un 4% en el cacao y otros cultivos como el plátano. El terbufos, naled, paraquat, fenamifos, carbofuran, forato, y clorotalonil fueron los ingredientes activos de plaguicidas utilizados en el cultivo de banano según los resultados de la encuesta.

Según las personas encuestadas, en la zona predominan los cultivos de piña (600-3000 ha), banano (250-500 ha) y cacao (110 ha). Aunque, en el área existen otros cultivos como la yuca, el plátano y las plantas ornamentales. El 67% de las personas afirmaron, que el banano se cultiva de forma intensiva desde hace más de 30 años y la piña empezó a tomar fuerza en la zona hace aproximadamente 10 años. Antes de que los monocultivos se expandieran en la zona, predominaban los potreros y el bosque con charrales. El 100% de las personas encuestadas consideró que en los últimos 10 años se ha notado cambio del clima de la zona (menos lluvias y más calor). Un 71% de ellos consideró que el caudal en los ríos disminuyó, un 62% que el paisaje ha sufrido cambios (deforestación, menos vida

silvestre, cambio de los potreros y los bosques por monocultivos, la ganadería por el cultivo de piña y la urbanización de la zona).

El 54% afirmó haber observado mortalidades de especies terrestres y acuáticas cuando se lavan las bombas, durante las aplicaciones de nematicidas y la preparación de la tierra para la siembra de la piña. Las especies de animales que han observado muertos son: reptiles (iguana y serpiente), aves (gallinas, gallitos, gavilanes, yigüirros sargentos, zanates y piuses), mamíferos (venados cola blanca, cusucos, murciélagos y monos congo), peces y otros como lombriz de tierra (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Percepción y conocimiento de la comunidad de la situación ambiental y de la salud de los perezosos

**1- Descripción de la población encuestada**

| Sexo            |  |            | Ocupación      |              |                      |
|-----------------|--|------------|----------------|--------------|----------------------|
| % mujeres       | % hombres  | % *ns**/nr | % amas de casa | % jornaleros | %* ns/**nr (y otros) |
| 54              | 38   | 8          | 54             | 33           | 12                   |
| Años en la zona | promedio $\pm$ desviación estándar (min-max) 11,5 $\pm$ 5,7 (0,3-22) |            |                |              |                      |
| Niños < 12 años | 58% (14 entrevistados) tienen hijos (25 <12 años y 10 >12 años)      |            |                |              |                      |

**2- Conocimiento y percepción de la población de perezosos por parte de los pobladores**

| Los últimos 5 años:  | % si                                      | % no | % ns/nr | Especie   | %    |
|--|---|------|---------|---|------|
| Su familia y/o la vida silvestre se afectan por los plaguicidas        | 96  | 4    | 0       | contaminación del aire  | 54,2 |
|  |   |      |         | afecta la flora y la fauna  | 25,0 |
|  |   |      |         | contaminación del agua  | 16,7 |
|  |   |      |         | alergias  | 37,5 |
|  |   |      |         | intoxicaciones  | 20,8 |
|  |   |      |         | otros   | 8,3  |
| Vio Ud. perezosos*   | 96  | 4    | 0       | 2 dedos   | 4    |
|  |   |      |         | tres dedos  | 8    |
|  |   |      |         | ambas   | 13   |
|  |   |      |         | ns/nr   | 75   |
|  |   |      |         | El 63% no saben cuando. El 17% dice que de enero-marzo y el 21% todo el año.                    |      |
| La población de perezosos  | Aumentó (37,5%)<br>se mantuvo igual (25%) |      | 0       | protección (cuido, refugio, alimento)   | 29   |
|  | Disminuyó (29,2%)<br>ns/nr (2 8%)         |      |         | infecciones, falta alimento   | 12,5 |
|  |   |      |         | deforestación   | 20,8 |
|  |   |      |         | accidentes eléctricos   | 12,5 |
|  |   |      |         | contaminación   | 8,3  |
| Perezosos muertos  | 67  | 33   | 0       | depredación (aguilucho, perros)   | 12,5 |
|  |   |      |         | accidentes eléctrico  | 37,5 |
|  |   |      |         | atropellos vehículo   | 8,3  |
| Malformaciones y cambios físicos                                       | 13  | 83   | 4       | infección nariz, pelado, desnutridos, quemaduras plantas de las patas, heridas machete y peleas | 13   |
| Cambios de comportamiento  | 50  | 46   | 4       | cercas, amapolas y matas de banano  | 33   |
|  |   |      |         | cables, tubos   | 22   |
|  |   |      |         | suelo   | 22   |
| Para qué utilizan los árboles los perezoso                             |   |      |         | descansar   | 75   |
|  |   |      |         | alimentarse   | 58   |
|  |   |      |         | reproducirse  | 13   |
|  |   |      |         | Desplazarse   | 13   |
|  |   |      |         | refugiarse  | 4    |
| ¿Es fácil para los perezosos conseguir alimento? ¿Cuál es su alimento? | 25  | 8    | 67      | guarumo   | 50   |
|  |   |      |         | poró  | 46   |
|  |   |      |         | javillo   | 13   |
|  |   |      |         | mamón   | 13   |
|  |   |      |         | cacao   | 13   |



|  |                   |         |  |                   |    |
|--|-------------------|---------|--|-------------------|----|
|  |                   |         | gavilán  | 13                |    |
|  |                   |         | ceibo  | 8                 |    |
|  |                   |         | yuplom   | 8                 |    |
|  |                   |         | manzana de agua, jocote, jobo, cedro, limón, capulín | 21                |    |
| ¿En cuál de los siguientes lugares se encuentra más de esa vegetación? | Actividad         | Mucho % | Poco %   | Nada %            |    |
|  | banano            | 0       | 4  | 33                |    |
|  | piña              | 4       | 0  | 38                |    |
|  | cacao             | 4       | 17   | 13                |    |
|  | potrero           | 13      | 83   | 0                 |    |
|  | montaña           | 21      | 13   | 0                 |    |
|  | charrales, cercas | 0       | 4  | 0                 |    |
| Vio Ud. crías de perezoso  | 46                | 38      | 17   | enero a julio     | 73 |
|  |                   |         |  | julio a diciembre | 18 |

### 3- Conocimiento por parte de los encuestados acerca del uso de la tierra y agroquímicos

|  |                                      |                   |                       |                                 |            |
|--|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|------------|
|  |                                      |                   | Cultivo               | % Si                            |            |
|  |                                      |                   | banano                | 75                              |            |
|  |                                      |                   | piña                  | 75                              |            |
|  |                                      |                   | cacao                 | 4                               |            |
|  |                                      |                   | otros (plátano)       | 4                               |            |
| Se utilizan agroquímicos en los siguientes cultivos          |                                      |                   |                       |                                 |            |
|  | Cultivo                              | N. comercial      | I.A.                  | Aplicación                      | Frecuencia |
| Cuáles sustancias químicas utiliza                           | banano                               | Counter           | terbufos 29%          | cada 3 meses                    | suelo      |
|  |                                      | Trompet 4%        | naled 4%              | cada 3 meses                    | ns         |
|  |                                      | Gramoxone         | paraquat 8%           | inicio cultivo y todos los días | bomba      |
|  |                                      | Nemacur           | fenamifos             | ns                              | ns         |
|  |                                      | Furadan           | carbofuran 4%         | cada 3 meses                    | ns         |
|  |                                      | Thimet            | forato 4%             | ns                              | ns         |
|  |                                      | Bravo             | clorotalonil 4%       | ns                              | aéreo      |
|  |                                      | Nemát-fung-insect |                       | c/3 meses, se repite si llueve  | manual     |
|  | piña                                 | Counter           | terbufos 4%           | cada 3 meses                    | chapulin   |
|  |                                      | nemát-fung-insect |                       | cada 3 meses                    | terrestre  |
|  | Cultivo                              | % Si              | Extensión (hectáreas) |                                 |            |
| ¿Actualmente cuáles cultivos predominan en los alrededores?  | Cacao                                | 42                | 110 ha                |                                 |            |
|  | Piña                                 | 63                | 600-3000 ha           |                                 |            |
|  | Banano                               | 58                | 250-500 ha            |                                 |            |
|  | Ornamentales                         | 13                | muy poca              |                                 |            |
|  | otros (plátano, yuca)                | 21                | ns/nr                 |                                 |            |
|  | Hábitat                              | %                 | Tiempo (años)         |                                 |            |
| ¿Qué había antes en las áreas de banano, piña? ¿Hace cuánto? | Bosque                               | 8                 | 5                     |                                 |            |
|  | cultivo (banano, maíz)               | 4                 | 4                     |                                 |            |
|  | Charral                              | 21                | 20-25                 |                                 |            |
|  | bosque (javello y gavilán) + charral | 33                | 20-28                 |                                 |            |
|  | potrero y banano                     | 67                | 2 a 30                |                                 |            |
|  | Piña                                 | ns/nr             | 2-5                   |                                 |            |

**Cuadro 9.** Continuación...**4- Percepción de la calidad ambiental**

| Ha observado:                   | % si | % no | % ns/nr | Observación          | %    |
|---------------------------------|------|------|---------|----------------------|------|
| Cambio de clima                 | 100  | 0    | 0       | menos lluvia         | 92   |
|                                 |      |      |         | más lluvia           | 0    |
|                                 |      |      |         | más calor            | 8    |
|                                 |      |      |         | descontrol           | 4    |
| cambio de caudal en los ríos    | 71   | 12   | 17      | aumentó              | 0,0  |
|                                 |      |      |         | disminuyó            | 62,5 |
|                                 |      |      |         | inestable            | 8,3  |
|                                 |      |      |         | ns                   | 16,7 |
| cambio de paisaje               | 62   | 25   | 12      | deforestación        | 42   |
|                                 |      |      |         | menos vida silvestre | 13   |
|                                 |      |      |         | Ganado por piña      | 4    |
|                                 |      |      |         | monocultivos         | 4    |
|                                 |      |      |         | urbanización         | 4    |
| Mortalidad de otras especies*** | 54   | 41   | 4       | peces                | 17   |
|                                 |      |      |         | aves                 | 29   |
|                                 |      |      |         | mamíferos            | 21   |
|                                 |      |      |         | reptiles             | 8    |
|                                 |      |      |         | otros                | 13   |

\*\*\*Especies que se observa muertas en la zona: Peces: en cultivos de banano y lavado bomba. Reptiles: serpiente, iguana. Aves: gallinas, gallitos, gavilanes, yigüirros sargentos, zanates, piuses. Mamíferos: venados cola blanca, cusucos, murciélagos, monos congo. Otros: lombriz de tierra.

I.A.=ingrediente activo.

\*ns= no sabe.

\*\*nr= no respondió.

## 7. Discusión

### 7.1 Exposición a plaguicidas y actividad de las colinesterasas plasmática

Los perezosos del género *Choleopus* fueron significativamente más pesados que los *Bradypus*, siendo consistente con lo reportado en la literatura (Reid 1997, Carrillo *et al.* 1999, Urbani y Bosque 2007). La especie de dos dedos del centro de rescate fue más pesada que los animales de vida libre, posiblemente por el poco ejercicio que realizan y la dieta que consumen. En el centro de rescate viven encerrados en jaulas y no tienen que hacer ningún esfuerzo físico para obtener el alimento, mientras que en estado silvestre se mantienen activos en promedio 7,6 h/día y recorren grandes distancias para obtener el alimento (Sunquist y Montgomery 1973, Chiarello *et al.* 2004). La dieta de la especie de dos dedos en estado de vida libre se basa en el consumo de material vegetal y pequeños vertebrados (Bermúdez, 2004), mientras que en cautiverio se incluye alimento concentrado para perro como fuente de proteínas (Ávila 2007, Arroyo 2008). La especie de tres dedos de vida libre pasa activa en promedio 10,1 h/día, casi tres horas más que la de dos dedos, en el centro de rescate esta especie se mantuvo bajo las mismas condiciones que la de dos dedos y no se encontró una diferencia entre el peso de los animales de vida libre y los cautivos. La única diferencia observada fue la dieta, ésta especie es estrictamente vegetariana y no se le incluye en la dieta alimento concentrado, por lo tanto, se consideró que la dieta fue la principal causa de la diferencia en el peso encontrado en la especie *C. hoffmanni* del centro de rescate y los capturados en la finca agrícola.

Los perezosos se alimentan de hojas de 25 a 52 especies de árboles (Montgomery y Sunquist 1978), los cuales se encuentran en el bosque ribereño, potreros, charrales y cercas vivas (Vaughan *et al.* 2007). En estudios previos realizados por Vaughan *et al.* (2007) en la zona, sobre la ecología y conservación de las dos especies de perezosos, se determinó que los perezosos utilizan; los potreros con árboles aislados, las cercas vivas y la vegetación ribereña, porque ahí se encuentran la mayor diversidad y densidad de especies de árboles preferidas por ellos, como la *Cecropia*, *Coussapoa*, *Nectandra*, *Ficus*, *Inga* y *Ocotea*. Además, los autores reportaron que las áreas fragmentadas fueron las menos utilizadas por los perezosos por la ausencia de esos árboles.

El ámbito de hogar promedio de estos mamíferos está entre 2 y 6 ha (Sunquist y Montgomery 1973, Vaughan *et al.* 2007), lo que indica que los animales se desplazan en un radio de 2 a 6 ha en los alrededores del punto de captura e ingresan eventualmente a las áreas de cultivo (Vaughan *et al.* 2007). La permanencia de los perezosos en las cercanías de las áreas de cultivo y la deriva de los plaguicidas durante las aplicaciones, aumenta la probabilidad de exposición de estos animales a las sustancias tóxicas. En investigaciones realizados por Shalat *et al.* (2003) en México y Van Wendel (2006) en Costa Rica, se

determinó que los niños que viven en las comunidades agrícolas están expuestos a plaguicidas, por el contacto con objetos contaminados, deposición durante las aplicaciones de plaguicidas, ingesta e inhalación. En estos estudios se encontraron residuos de plaguicidas OP en las manos y orina de los niños.

La proporción de perezosos capturados en esta investigación fue de 3,6 perezosos de dos dedos a 1 perezoso de tres dedos, contrario a lo reportado por Sunquist y Montgomery (1973) en los estudios realizados en la Isla Barro Colorado, Panamá. Estos animales tienen una tasa de crecimiento poblacional baja, son afectados por la destrucción y la fragmentación de los bosques (Chiarello *et al.* 2008, Peres *et al.* 2008). Pareciera que la población de *C. hoffmanni* en el área de estudio está favorecida porque tolera cierto grado de modificación del hábitat, en contraste con *B. variegatus* que es menos tolerante (Meritt *et al.* 2008). En la zona donde se realizó esta investigación, los bosques, los potreros y los charrales están siendo sustituidos por monocultivos. Aunque, el banano se cultiva de forma intensiva hace más de 30 años, la piña se empezó a cultivar hace aproximadamente 10 años. En la última década el cultivo de la piña se ha expandido de forma muy agresiva, solo en el 2006 el cultivo de la piña en Costa Rica mostró un crecimiento en un 208% en relación al 2000 (Programa Estado de la Nación 2007). La consecuencia de esta transformación es la fragmentación y la destrucción del hábitat de muchos animales y la contaminación del alimento, el agua, el suelo y el aire con los productos químicos, principalmente los plaguicidas porque se usan en grandes cantidades y una gran variedad en los cultivos de banano y piña (Chaverri 2002, de la Cruz *et al.* 2004).

Costa Rica es el país centroamericano con el mayor índice de uso de plaguicidas, en el 2006 se estimó que se utilizó 25,78 kg ia/área cultivada (Programa Estado de la Nación 2007, Ramírez *et al.* 2009) y la tendencia en la importación, del uso y la liberación de plaguicidas al ambiente es cada vez mayor (Chaverri 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Ramírez y Orozco 2007, Ramírez *et al.* 2009). Históricamente los funguicidas han sido los plaguicidas más importados, seguidos por los herbicidas, los insecticidas-nematicidas y finalmente los fumigantes.

En los monocultivos de banano y piña se emplean una gran variedad de plaguicidas, los cuales pertenecen a diversos grupos químicos con diferentes modos de acción. Solo en el cultivo de banano se aplican más de 25 ingredientes activos, los funguicidas son los más diversos, seguidos por los nematicidas, herbicidas e insecticidas. Los principales plaguicidas que se aplican en el cultivo de banano son: funguicidas (mancozeb, tridemorf, benomil, clorotalonil, pirimetanil, spiroxamine, difenoconazol, piraclostrobina, azoxistrobina, bitertanol, tebuconazol, imazalil, tiabendazol, trifloxystobina y propiconazol); nematicidas (terbufos, fenamifos, carbofuran, etoprofos, cadusafos y oxamil), herbicidas (glifosato, paraquat, diuron, diquat y glufosinato); e insecticidas (bifentrina y clorpirifos) (Bravo 2007). En el

cultivo de piña se emplean funguicida (fosetil aluminio); nematicidas (carbofuran, etoprofos, terbufos y oxamil); herbicidas (bromacil, diuron, glifosato); e insecticidas (ametrina, diazinon, carbaril, cipermetrina, deltametrina, clorpirifos, foxim, metamidofos y permetrina) (MAG 1991, Chaverri 2002).

Los plaguicidas detectados (ametrina, clorpirifos, clorotalonil, diazinon, difenoconazol, etoprofos y tiabendazol) en las muestras de perezosos analizadas, se aplican en los cultivos de banano y piña. El insecticida dietiltoluamida (deet) fue el único plaguicida detectados que no se ha informado su uso como insecticida agrícola al momento de realizar este estudio (Ramírez 2010). El deet esta registrado para ser utilizado como repelente líquido de insectos, adecuado para aplicarse en la piel humana o las telas (EPA 1999, IRET 1999). La presencia de este insecticida en las muestras de pelo y lavado de brazos, en primera instancia se pensó en una posible contaminación cruzada de las muestras durante la colecta. Sin embargo, éste insecticida se detectó en las muestras de limpieza bucal que fueron colectados con gasas estériles que se manejaron con pinzas y al igual que las otras muestras, con guantes durante todo el proceso. La presencia del deet en las muestras de limpieza bucal, en las muestras tomadas durante la tercera campaña y en otras muestras de agua tomadas para otros proyectos posteriormente en la zona del Caribe (Ruepert 2009), indican que posiblemente se este usando en la agricultura. La fuente de contaminación de las muestras ambientales con este insecticida no está clara, por lo tanto, se requiere de estudios adicionales para determinar con certeza cuál es su procedencia.

Los tres plaguicidas OP detectados en las muestras analizadas; el clorpirifos, diazinon y etoprofos se situaron entre los primeros 22 de los 404 plaguicidas más importados por toneladas métricas en Costa Rica durante el periodo de 1977 al 2006 (Ramírez *et al.* 2009). El plaguicida diazinon se aplica principalmente en el cultivo de la piña, mediante un sistema mecanizado que se conoce como el "boom". El "boom" está constituido por un depósito y una bomba que impulsa la mezcla del tóxico a salir a través de las boquillas, la mezcla se fragmenta en gotas de diámetro variable, las cuales son dispersadas sobre las plantas, una porción es arrastrada y dispersada por el viento. El insecticida/acaricida diazinon tiene una toxicidad extrema para peces y crustáceos y una toxicidad aguda por inhalación para ratas de 3,5 mg/l (4h). Este fue el plaguicida OP más detectado en las muestras y en la concentración más alta, probablemente porque se aplica frecuentemente en el cultivo de la piña (6-13 veces/año) y se emplean en promedio 0,18 kg ia/ha/aplicación (Ramírez, 2010). Las muestras que salieron positivos con este plaguicida corresponden a animales capturados en los bordes de la finca de cacao y en el bosque ribereño, cercano a los cultivos de banano y de piña. Las concentraciones más altas se encontraron en los animales capturados en el límite de la finca de cacao con el cultivo de piña. La acción inhibitoria del diazinon se incrementa cuando se metaboliza a diazoxon por el citocromo

P450 presente en los animales y los seres humanos. La toxicidad aguda de éste plaguicida OP no es muy alta, pero la exposición crónica a bajas concentraciones puede causar efectos adversos en el desarrollo de los animales (Tutudaki *et al.* 2003).

El insecticida clorpirifos detectado en el pelo de los perezosos, se utiliza principalmente en el cultivo de banano. Este plaguicida está catalogado como extremadamente tóxica para peces y crustáceos y la toxicidad aguda por inhalación para las ratas es  $< 0,2$  mg/l (4h). Aunque, la concentración máxima detectada está por debajo de la toxicidad aguda reportada para ratas, es importante tenerlo en consideración porque la exposición a éste plaguicida inhibidor de la actividad de las colinesterasas es constante, porque la producción de banano es intensiva durante todo el año y la sustancia se aplica en las bolsas azules que se utilizan para proteger la fruta. La concentración del clorpirifos en las bolsas es del 1% (Ramírez, 2010).

El insecticida/nematicida etoprofos es extremadamente tóxico para los crustáceos y moderadamente tóxico para los peces, se reporta una toxicidad aguda por inhalación de  $123$  mg/m<sup>3</sup> (4h) para ratas. Éste plaguicida empleado principalmente en el cultivo de banano, fue detectado en las muestras de pelo de perezosos capturados cerca de este cultivo. Este plaguicida OP se aplica al suelo de manera granulada, de 1 a 2 veces por año y se emplean en promedio 9 kg ia/ha/aplicación (Ramírez, 2010). Probablemente el contacto de los perezosos con esta plaguicida se da cuando los animales descienden de los árboles semanalmente a defecar, sin embargo, se requieren de estudios que permitan determinar la ruta que sigue este plaguicida desde su liberación al medio hasta entrar en contacto con los perezosos.

Aunque, los residuos de plaguicidas detectados en las muestras de perezosos analizadas estuvieron por debajo de las concentraciones que causan una toxicidad aguda para ratas, los resultados deben ser considerados como una alerta temprana de que los perezosos están siendo expuestos a los plaguicidas utilizados en la agricultura. Se debe de realizar estudios que permitan determinar los efectos crónicos de estas sustancias sobre los animales, así como estudios para conocer cuáles son las principales rutas de exposición. Al momento de esta investigación no se encontró en la literatura estudios de exposición a plaguicidas con perezosos.

Los plaguicidas OP fueron detectados en mayor concentración en las muestras de pelo. Según, Smith *et al.* (2007) el denso pelaje de los perezosos funciona como una barrera de protección que impide el contacto de los tóxicos con la piel de los animales, sin embargo, los plaguicidas podrían estar ingresando al organismo a través de las áreas desnudas de las extremidades y de la cara. El mecanismo por medio del cuál estas sustancias están ingresando al organismo podría estar relacionado con el contacto cutáneo y la inhalación de los vapores del tóxico, además de la ingesta de alimento contaminado. Algunos plaguicidas

ingeridos se expresan en el pelo, como se demostró en los estudios realizados con conejos. En estas investigaciones se determinó la relación entre la dosis de diazinon administrado por la vía oral y la concentración detectado en el pelo de los conejos (Tutudaki *et al.* 2003). En las muestras de limpieza bucal no se detectaron plaguicidas OP y fue en esta matriz donde se encontraron menos ingredientes activos de plaguicidas. Sin embargo, el hallazgo fue importante, porque los perezosos son animales que consumen una amplia gama de material vegetal, según Smith *et al.* (2007) la ingesta es la vía de ingreso predominante en los vertebradas terrestres. Los plaguicidas detectados en la boca de los perezosos indican una posible transferencia de estas sustancias de la madre a la cría a través del alimento. Porque, las crías se alimentan de hojas que lamen del hocico de la madre a partir de las dos semanas de edad (Montgomery y Sunquist 1978, Montgomery 1983 y Reid 1997). La exposición constante a los plaguicidas encontrados en los perezosos en dosis bajas podría estar afectando a los perezosos y otros mamíferos terrestres de la zona, por lo que se requiere darles seguimiento a los animales marcados para determinar los efectos crónicos que podrían comprometer la salud de estos animales. Hay estudios que indican que la exposición crónica al diazinon causa efectos adversos como la reducción en la formación de los huesos y reducción en la calidad de los espermatozoides. Probablemente el diazinon es un agente mutagénico (Villalobos 1998, Tutudaki *et al.* 2003). La actividad de las colinesterasas plasmática de los perezosos de la especie *C. hoffmanni* fue similar para los animales de la finca agrícola y los del centro de rescate, la probabilidad del valor U de Mann-Whitney calculada correspondió a 0,274, el cual fue más grande que el nivel de significancia 0,05, por lo tanto no se pudo rechazar la  $H_0$ . En la especie *B. variegatus* la actividad fue significativamente menor en los animales del centro de rescate. La baja en la actividad de las colinesterasas plasmática en los perezosos de tres dedos no se puede atribuir a una exposición a plaguicidas OP porque en las muestras tomadas a los animales del centro de rescate no se detectaron plaguicidas inhibidores de la actividad de las colinesterasas. Probablemente, la menor actividad enzimática se deba a otros factores como el estado reproductivo, el estado patológico u otros agentes químicos como ciertos metales pesados y detergentes, los cuales no fueron analizados en esta investigación (Tecles y Cerón 2003).

## **7.2 Metodologías probadas**

Para los análisis de residuos de plaguicidas se emplearon métodos de colecta de muestras no invasivos utilizados en la evaluación de exposición a plaguicidas en el ser humano y en animales de laboratorio (Shalat *et al.* 2003, Tutudaki *et al.* 2003, van Hemmen *et al.* 2005, EPA 2006, Chensheng *et al.* 2006, Van Wendel 2006, Tsatsakis *et al.* 2008) con el fin de

probar su utilidad en una población de perezosos que habita cerca de monocultivos de banano y piña con uso intensivo de plaguicidas. Los métodos de análisis químicos utilizados se basaron en la extracción y cuantificación de residuos de plaguicidas en tres matrices biológicas (lavado de brazos, limpieza bucal y pelo) como indicadores de la presencia de plaguicidas.

La extracción consistió en poner en contacto las muestras con un solvente o un sistema de solventes para que el plaguicida pasara a la fase extractora. Aunque, existen una gran cantidad de técnicas y una gran variedad de solventes que se pueden utilizar en la extracción de los plaguicidas en este estudio se utilizaron tres técnicas de extracción diferentes y tres solventes diferentes (Dierksmeier 2001). Para la extracción de los residuos de la gasa (limpieza bucal) se utilizó la técnica del microondas y un sistema binario de solventes acetona/hexano 1:1. La extracción de residuos del pelo se realizó con baño ultrasónico y los solventes acetona/ciclohexano 1:9 y para el lavado de brazos la extracción fue por partición líquido-líquido en embudo separador con el diclorometano.

En el desarrollo de los métodos analíticos de residuos se requirió garantizar la eficiencia de todas las etapas. Aunque el muestreo, el traslado y la conservación de las muestras no fueron etapas en las determinaciones analíticas, se consideraron porque estuvieron estrechamente relacionados con la determinación y los resultados de los análisis dependieron de los cuidados que se tuvieron durante esos procesos.

Se compararon la toma de las muestras, el transporte, la conservación, el método de extracción de residuos de plaguicidas y el número de ingrediente activos detectados en la gasa, pelo y lavado de los brazos, como un insumo adicional que ayudará durante la escogencia del tipo de muestra y el método de extracción a utilizar en futuros trabajos de investigación con mamíferos silvestres. Esta comparación fue hecha de forma cualitativa y se basó en las observaciones realizadas durante el proceso de colecta y procesamiento de las muestras.

El uso del pelo en el análisis de residuos de plaguicidas fue ventajoso porque la colecta de la muestra fue un procedimiento no invasivo para el animal, sencillo de aplicar, fácil de transportar y de conservar y representa una amplia superficie de contacto. El cuerpo de los perezosos está totalmente cubierto de pelo con excepción de las pequeñas áreas en las extremidades y la cara. Esto facilita la obtención de muestras de diferentes partes del cuerpo y aumenta la posibilidad de que se impregnen las partículas de plaguicidas por deposición y contacto con superficies contaminadas. Como resultado se incrementa la probabilidad de encontrar plaguicidas en las muestras. El procedimiento de extracción utilizado fue rápido, se pueden extraer más de 10 muestras al mismo tiempo.

La alta probabilidad de contaminación cruzada de las muestras de pelo durante la toma, el requerimiento de un equipo especial para la extracción y los extractos con impurezas como



residuos de ácidos grasos y algas fueron las desventajas percibidas durante este procedimiento de extracción.

Aunque, se utilizaron sacos limpios para el traslado de cada animal, la probabilidad de contaminación de las muestras de pelo y de lavado de brazos fue mayor que las muestras tomadas de la boca, por la manipulación de los animales durante la captura y el examen físico. Se requiere sujetar a los perezosos para introducirlos dentro de los sacos y hubo que sujetar fuertemente la cabeza y las extremidades para evitar cualquier accidente por mordeduras o heridas con las garras durante la aplicación del sedante. Es posible que el comportamiento de los perezosos dentro de los sacos causara una pérdida de los residuos de plaguicidas impregnados en el pelo por la fricción con los sacos al tratar de liberarse, por lo que se consideró que se debe tomar muestras de los sacos y realizar análisis de residuos de plaguicidas antes y después de usarlos.

La probabilidad de contaminación cruzada en la toma de las muestras de la boca fue menor en relación con las muestras de pelo y lavado de brazos, porque la cavidad bucal no se manipula antes de la toma de las muestras. Al igual que las muestras de pelo, las gasas utilizadas para la toma de las muestras fueron fáciles de transportar y conservar. El método de extracción utilizado en este caso fue el más rápido de los tres porque se pudo extraer hasta 40 muestras a la vez y los extractos obtenidos no presentaron impurezas que causaran interferencias con los análisis cromatográficos. El procedimiento invasivo de colecta de la muestra (comparado con la toma de pelo y lavado), la obtención de poca cantidad de muestra, porque la boca de estos mamíferos estaba casi seca, la superficie pequeña de muestreo disponible en comparación con las otras dos y el requerimiento de equipo de extracción sofisticado se consideró como las desventajas en este procedimiento.

El lavado de los brazos como procedimiento no invasivo para el animal, la superficie de contacto intermedia entre la bucal y la de pelo y el uso de material básico de laboratorio para la extracción fueron las principales ventajas que se percibieron con el uso de esta matriz. La alta probabilidad de contaminación cruzada, pérdida de muestra por absorción en el pelo y escurrimiento del líquido de lavado por los brazos, el método de extracción más lento que los dos anteriores (solo se puede extraer una muestra a la vez), los extractos con impurezas y el menor tiempo que se puede conservar las muestras, fueron las desventajas percibidas. Los residuos de plaguicidas en muestras acuosas se degradan por hidrólisis, no se deben guardar por más de cinco días, aún cuando se acidifique para preservarlos (Lyytikäinen *et al.* 2003).

En cuanto a la toma de las muestras del lavado de los brazos la técnica utilizada presentó el inconveniente de que se perdió una porción de las muestras por la absorción en el pelo y por el escurrimiento de líquido de lavado por los brazos. Esta porción fue diferente para cada animal y estuvo asociado con la densidad de pelo de cada individuo. Para evitar estas

pérdidas se consideró conveniente implementar en futuras investigaciones la limpieza de las áreas desnudas de las extremidades con gasas humedecidas con la mezcla de solventes, de esta manera también se podría determinar la superficie muestreada.

La detección de más tipos de ingredientes activos de plaguicidas y en concentraciones mayores en el pelo y los brazos pudo deberse a la mayor probabilidad de contaminación por contacto y deposición de los contaminantes en estas matrices por la amplia superficie de exposición. Según Tsatsakis *et al.* (2008) el pelo actúa como un muestreador pasivo de los contaminantes que se encuentran en el aire. Posiblemente los plaguicidas ingeridos en el alimento contaminado se estén expresando en el pelo, como el caso del diazinon en el estudio realizado por Tutudaki *et al.* (2003).

La eficiencia de los procesos de extracción se midió con las pruebas de recuperación. Las recuperaciones de las muestras-testigo dopadas deben estar entre 70 y 120%, con coeficientes de variación  $\leq 20\%$  (Dierksmeier 2001, SANCO 2009). Las recuperaciones de los plaguicidas en las tres matrices analizadas estuvieron dentro de los rangos aceptables. Solo el difenoconazol y el paration-metil en el caso de la matriz pelo y el clorpirifos en el caso de la gasa (limpieza bucal) estuvieron por encima de los rangos aceptables, probablemente porque algunas sustancias desconocidas salieron con los mismos tiempos de retención que los plaguicidas de interés y podría haber causado un efecto sumatoria (Dierksmeier 2001, Lyytikäinen *et al.* 2003). Además, de los ingredientes activos de plaguicidas incluidos en las pruebas de recuperación se rastrearon los plaguicidas ametrina, bromacil, deet, etion, fenamifos, tiabendazol y triadimefon. El deet no se incluyó dentro de las pruebas de recuperación porque no es un plaguicida de uso agrícola, el hecho de haber salido en varias muestras permitió que incluyera en los métodos utilizados en el LAREP.

Los tres tipos de muestras se obtuvieron por procedimientos no invasivos para los animales. Se obtuvieron altos porcentajes de recuperación con las tres matrices, logrando confirmar la exposición de los perezosos a plaguicidas empleados en los monocultivos. Los tres plaguicidas inhibidores de la actividad de las colinesterasas se detectaron con los métodos de análisis de residuos en el pelo y el lavado de los brazos. Por lo tanto, la elección de uno o dos de los métodos dependerá primordialmente de los objetivos planteados. Si el objetivo fuera determinar la exposición con el fin de establecer medidas para proteger al animal se sugiere utilizar la matriz pelo con el método de extracción asistido por el baño ultrasónico, ya que fue donde se encontraron más plaguicidas y en concentraciones más altas. Por otro lado, si el objetivo fuera determinar la exposición interna o la transferencia de los plaguicidas de la madre a la cría, la matriz indicada sería la saliva obtenida mediante la limpieza bucal con gasa de algodón estéril y el método de extracción asistida por microondas. La saliva y el pelo han sido recomendados por algunos autores en la determinación de la exposición a plaguicidas OP. Chensheng *et al.* (2006)

aconsejan el uso de la saliva como método alternativo al uso de sangre, ya que determinaron que los plaguicidas OP como el diazinon se excretan por la saliva mediante difusión intracelular pasiva. Tutudaki *et al.* 2003 y Tsatsakis *et al.* 2008 indican que el pelo es un marcador de exposición que ha sido exitoso en las evaluaciones de la exposición crónica a plaguicidas (DDT y diazinon), sustancias de uso farmacéutico, sustancias prohibidas (drogas), metales pesados (mercurio) y contaminantes ambientales como los PCBs.

### **7.3 Situación ambiental y de la salud de los perezosos**

Los resultados de la encuesta realizada a las personas que viven en los alrededores del área de estudio indican que las prácticas agrícolas representan un peligro potencial, para ellos, su familia, y los ecosistemas acuáticos y terrestres. La salud de las poblaciones cercanas y la vida silvestre están siendo amenazadas por la deriva y escorrentía de los plaguicidas fuera de las fincas agrícolas (de la Cruz y Castillo 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Wesseling *et al.* 2006, Programa Estado de la Nación 2007). Los resultados de la encuesta ponen de manifiesto algunos síntomas de exposición a plaguicidas como dolor de cabeza, mareos, salpullidos, asma, rinitis, ardor en los ojos, hormigueo y la sensación de alfileres en todo el cuerpo (EPA 1999). Esto deberá ser tomado en cuenta por las autoridades de salud para que realicen los exámenes clínicos pertinentes (Ej. actividad de las colinesterasas y análisis de la orina para buscar metabolitos de plaguicidas) para establecer con certeza las causas de estos síntomas.

Otros problemas asociados con la actividad agrícola que comprometen el equilibrio de los ecosistemas y que se reflejaron en los resultados de la encuesta son la destrucción de hábitat durante la sustitución de los bosques y potreros por monocultivos. Las mortalidades de especies terrestres y acuáticas durante la aplicación de nematicidas y los lavados de las bombas que afirmaron haber observado las personas encuestadas, coinciden con los informes de mortalidades masivas de organismos acuáticos principalmente peces, las cuales se dan principalmente durante la época de aplicación de nematicidas. En algunos casos se ha logrado asociar la mortalidad con los nematicidas terbufos, fenamifos y etoprofos (Castillo 2000, de la Cruz y Castillo 2002, de la Cruz *et al.* 2004, Programa Estado de la Nación 2007).

Los plaguicidas reportados por estas personas pertenecen a diversos grupos químicos y coinciden con los plaguicidas utilizados en los cultivos intensivos de banano y piña (MAG 1991, Chaverri 2002 y Bravo 2007).

## 8. Conclusiones

La población de perezosos estudiados estuvieron expuestos a los plaguicidas ametrina, clorpirifos, clorotalonil, diazinon, dietiltoluamida, difenoconazol, etoprofos y tiabendazol.

Los tres matrices utilizados permitieron la detección de residuos de plaguicidas en muestras biológicas. Poseen las ventajas de que son procedimientos no invasivos para los animales, no se requiere sacrificar al animal y permiten realizar estudios a largo plazo con múltiples repeticiones de muestreos de un mismo individuo durante el ciclo de vida. La escogencia de uno de ellos dependerá de los objetivos que se deseen alcanzar, principalmente el tipo de exposición que se desea medir (dermal, ingesta, inhalación). Las matrices utilizadas y los métodos de extracción probadas son un aporte que podrán ser utilizados en el seguimiento de la exposición y posibles intoxicaciones en mamíferos causadas por plaguicidas, una vez optimizados y validados los métodos. La información que se obtenga en futuras investigaciones podrá ayudar a establecer la base científica para la toma de decisiones respecto al manejo y la conservación de la fauna silvestre.

Los métodos de análisis de residuos de plaguicidas son laboriosos y muy caros. Con ellos se identifican y cuantifican los plaguicidas presentes en una muestra determinada, pero estos análisis no permiten medir los efectos que causan en los organismos. Por eso, los estudios de exposición deben ser complementados con métodos biológicos adecuados que permitan medir los efectos de las sustancias encontradas en los animales y viceversa.

No se observó una relación entre la concentración de organofosforados detectados y la actividad de las colinesterasas en plasma. Se requieren analizar más muestras de las poblaciones estudiadas y de otras poblaciones para determinar si hay una correlación entre los plaguicidas OP detectados y la actividad de las colinesterasas.

La metodología utilizada en esta investigación fue novedosa y puede ser utilizada en futuros estudios relacionados con vida silvestre, como una herramienta de exposición temprana para la evaluación a plaguicidas. Es importante continuar los estudios de campo de exposición a plaguicidas, utilizando como base la información que se presenta en esta investigación.

## 9. Recomendaciones

A partir de la experiencia adquirida con este estudio se recomienda:

- ❖ Dar seguimiento a la población marcada para determinar los efectos que causa la exposición crónica a plaguicidas.
- ❖ Determinar la actividad de las colinesterasas en otras poblaciones de perezosos silvestres para conocer cuáles son los niveles basales de las colinesterasas en sangre y en plasma; bajo qué condiciones cambian los niveles; y cómo afectan las variaciones a la población de estos mamíferos.
- ❖ Hacer análisis de residuos de plaguicidas para determinar metabolitos en saliva y orina que confirmen la presencia de los plaguicidas dentro del organismo.
- ❖ Realizar análisis de residuos de plaguicidas en las principales fuentes de alimento de los perezosos (Ej. Hojas, frutos) para determinar la adsorción de plaguicidas a la superficie y por ende la exposición por la vía de la ingesta.
- ❖ Determinar si hay una transferencia de plaguicidas del animal a los sacos que se usan para trasladarlos y mantenerlos durante la captura.
- ❖ Realizar una evaluación de los efectos de los solventes en la piel de los animales antes de implementar el método de lavado de las patas.
- ❖ Establecer el tamaño apropiado de la gasa para la limpieza bucal según la especie de interés.

## 10. Referencias Bibliográficas

- ANACAFE (Asociación Nacional del Café). 2004. Cultivo de cacao. Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera. ANACAFE, Costa Rica.
- Ávila, D. 2007. Ni osos, ni perezosos. INBio, Heredia, Costa Rica.
- Badii M., V. Garza & J. Leanderos. 2006. Efectos de los plaguicidas en la fauna silvestre. CULCYT, año 3, N° 14-15, 22-44.
- Ballantyne, B. & T. Marrs. 1992. Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates: Agricultural and veterinary toxicology of anticholinesterases. The Bath, Great Britain.
- Bermúdez L. 2004. Crianza en cautiverio de perezoso de dos dedos (*Choloepus didactylus*). Edentata, N°6, 30-36.
- Bravo, V. 2007. Diagnóstico de uso de plaguicidas en banano: zona atlántica (Costa Rica). IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.
- Carrillo, E., G. Wong & J. Sáenz. 1999. Mamíferos de Costa Rica. INBio, Heredia, Costa Rica.
- Castillo L., E. Martínez, C. Ruepert, C. Savage, M. Gilek, M. Pinnock & E. Solis. 2006. Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica. Science of the Total Environment. 367:418-432.
- Castillo, L. 2000. Pesticide impact of intensive banana production on aquatic ecosystems in Costa Rica. Ph.D. Thesis. Stockholm University, Stockholm, Sweden.
- Castillo L., E. de la Cruz & C. Ruepert. 1997. Ecotoxicology and Pesticides in Tropical Aquatic Ecosystems of Central America. Environmental Toxicology and Chemistry. 16:41-51.
- Castillo, L. y C. Ruepert. 1993. Impacto del uso de plaguicidas. En Evaluación del Impacto Ambiental de la fase II del Proyecto de Riego Arenal-Tempisque sobre el Parque Nacional Palo Verde, Guanacaste, Costa Rica. PPUNA, Heredia, Costa Rica.

- Chaverri, F. 2002. Importaciones y uso de plaguicidas en Costa Rica: Análisis del período 1994-1996. EUNA, Heredia, Costa Rica.
- Chaverri, F., L. Soto, F. Ramírez & V. Bravo. 2000. Diagnóstico preliminar del uso de plaguicidas en los cultivos de arroz, banano, caña de azúcar, café, cebolla, melón, naranja, papa, piña, tomate flores y plantas ornamentales. IRET, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Chensheng L., T. Rodríguez, A. Funez, R.S. Irish & R.A. Fenske. 2006. The assessment of occupational exposure to diazinon in Nicaraguan plantation workers using saliva biomonitoring. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1076: 355-365.
- Chiarello A., D. Chivers, C. Bassi, M. Maciel, L. Moreira y M. Bazzalo. 2004. A translocation experiment for the conservation of maned sloths, *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). *Biological Conservation*. 118: 421-430.
- Cobos V., M. Mora & G. Escalona. 2006. Inhibición de colinesterasa plasmática en el zorzal pardo (*Turdus grayi*), expuestos a diazinon en cultivos de papaya maradol en Yucatán, México. *Rev. Toxicol.* 23: 17-21.
- Corson M., M. Mora & W. Grant. 1998. Simulating cholinesterase inhibition in birds caused by dietary insecticide exposure. *Ecological Modelling*. 105: 299-323.
- de la Cruz, E. & L. Castillo 2002. The use of pesticides in Costa Rica and their impact on coastal ecosystems, p. 339-373. *In* M. Taylor, S. Kleine, F. Carvalho, D. Barcelo & J. Everarts (eds.). *Pesticides Residues in Coastal Tropical Ecosystems: Distribution, fate and effects*. CPL, UK.
- de la Cruz, E., C. Ruepert, C. Wesseling, P. Monge, F. Chavarri, L. Castillo & V. Bravo. 2004. Los plaguicidas de uso agropecuario en Costa Rica: Impacto en la salud y el ambiente. Informe de consultoría para área servicio agropecuario y medio ambiente de la Contraloría General de la República. IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.
- Dierksmeier, G. 2001. Plaguicidas: residuos, efectos y presencia en el medio. Científico-Técnico, La Habana, Cuba.

- Ellman G., K. Courtney, V. Andres & R. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- EPA. 2006. Feasibility of Estimating Pesticide Exposure and Dose in Children Using Biological Measurements. Synthesis Report of Research from EPA's Science to Achieve Results. EPA/600/S-06/006. U.S. EPA. Office of Research and Development, National Center for Environmental Research. Washington DC, USA.
- EPA. 1999. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas. 5<sup>th</sup> edición, USA (también disponible en línea: [www.epa.gov/oppfead/safety/spanish/healthcare/](http://www.epa.gov/oppfead/safety/spanish/healthcare/)).
- Esteve F.A. 2006. Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. Ph. D. Tesis. Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Fairbrother A., W. Landis, S. Dominguez, T. Shiroyama, P. Buchholz, M. Roze & G. Matthews. 1998. A novel nonmetric multivariate approach to the evaluation of biomarkers in terrestrial field studies. *Ecotoxicology.* 7: 1-10.
- Galloway T. & R. Handy. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology.* 12: 345-363.
- García, J. 1997. Introducción a los plaguicidas. EUNED, San José, Costa Rica.
- Goldstein M., T. Jr. Lacher, B. Woodbridge, M. Bechard, S. Canavelli, M. Zaccagnini, G. Cobb, E. Scollon, R. Tribolet & M. Hooper. 1999. Monocrotophos-Induced Mass Mortality of Swainsons Hawks in Argentina, 1995-96. *Ecotoxicology.* 8:3, 201-214.
- Granados, L. & C. Álvarez. 2006. Situación actual y desafíos de la agricultura orgánica en Costa Rica. Presentación 1<sup>er</sup> Congreso de agro ecología y agricultura. Galicia, España.
- Holdridge, L. 1964. Life zone ecology. Tropical Science Center, San José, Costa Rica.
- Hooper, M. 1998. Pesticides and swainson's hawk: cooperative approaches to managing chemical impacts in wildlife. International Conference on Pesticide Use in Developing Countries: Impact on Health and Environment. San José, Costa Rica.



- Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxica (IRET). 1999. Manual de Plaguicidas: Guía para América Central. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- La Nación. 2008. Ola de contaminación afecta el río Tempisque. 23.03.2008. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2007. Golpes de botes y químicos matan a manatíes (*Trichechus manatus*) en Tortuguero. 01.10.2007. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2005. Denuncian matanza de peces en Tortuguero. 20.02.2005. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2004a. Peces muertos, no pescados. 11.03.2004. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2004b. Masivo envenenamiento de peces en Matina. 09.06.2004. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2003a. Apparente contaminación mata peces en río costarricense. 15.01.2003. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- La Nación. 2003b. Difícil aclarar matanza de peces. 28.05.2003. San José, Costa Rica (también disponible en línea: [www.nacion.com](http://www.nacion.com)).
- Lara-Ruiz P. & A. Chiarello. 2005. Life-history traits and sexual dimorphism of the Atlantic forest maned sloth *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). J. Zool. 267: 63-73.
- Lyytikäinen M., J.V.K. Kukkonen & M.J. Lydy. 2003. Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44: 437-444.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería): Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. 1991. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, Costa Rica.

- Montgomery, G. 1983. *Bradypus variegatus* (Perezoso de tres dedos, Three-toed Sloths), p. 467-469. In D. H. Jansen. (eds.). Historia Natural de Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Montgomery, G. & M. Sunquist. 1978. Habitat selection and use by two-toed and three-toed sloths, p. 329-359. In The Ecology of Arboreal Folivores (eds.). Smithsonian Institution, Washington, D. C., USA.
- Parsons K., A. Matz, M. Hooper & M. Pokras. 2000. Monitoring wading bird exposure to agricultural chemical using serum cholinesterase activity. Environmental Toxicology and Chemistry. 19 (5).1317-1323.
- Peñas, C.E., D.E. Carter & F. Ayala-Fierro. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgo y Restauración Ambiental, Universidad de Arizona, USA (también disponible en línea: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>).
- Peres M.A., E.J. Benetti, M.P. Milazzotto, J.A. Visintin, M.A. Miglino, & M.E.O.A. Assumpção. 2008. Collection and evaluation of semen from the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). Tissue and Cell. 40:325-331.
- Programa Estado de la Nación (Costa Rica). 2007. Resumen decimotercero informe Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible/Programa Estado de la Nación. San José, Costa Rica.
- Ramírez, F., F. Chaverri, E. de la Cruz, C. Wesseling, L. Castillo & V. Bravo. 2009. Importación de plaguicidas en Costa Rica, periodo 1977-2006 (Serie informes técnicos IRET; no. 6), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ramírez, F. & M. Orozco. 2007. Los plaguicidas IA y IB en Costa Rica. IRET-UNA., Heredia, Costa Rica.
- Ramírez, J. A. & Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch. Prev. Riesgos Labor. 4 (2):67-75 (también disponible en línea: [http://www.scsmt.cat/scsmt/text\\_complert/2001\\_n.2.revision.pdf](http://www.scsmt.cat/scsmt/text_complert/2001_n.2.revision.pdf)).
- Reid, F. 1997. A Field Guide to the Mammals of Central America and Southeast México. Oxford University, New York, USA.

- Ruepert, C., E. de la Cruz, K. Solano & S. Argüello. 2008. DDT y sus metabolitos en muestras ambientales y sangre de niños en viviendas de Estrada y Olivia-Paraíso, Costa Rica. Programa regional de acción y demostración de alternativas sostenibles para el control de vectores de la malaria sin uso del DDT en México y América Central: El caso de Costa Rica (Series informes técnicos IRET; 5), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- SANCO. 2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/10684/2009 (también disponible en línea <http://ec.europa.eu/>).
- Sánchez-Chávez G. & R. Salceda. 2008. Enzimas poli-funcionales: El caso de la acetilcolinesterasa. REB. 27 (2): 44-51.
- Sánchez-Hernández J. 2003. Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2 (22), 296-301.
- Sánchez J., M. Fossi & S. Focardi. 1997. Serum "B" esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 37: 45-52.
- Sánchez-Hernández J. & C. Walker. 2000. In vitro and in vivo cholinesterase inhibition in lacertides by phosphonate and phosphorothioate-type organophosphates. *Pesticide Biochemistry and physiology*. 67: 1-12.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). 2007. Boletín Estadístico Agropecuario 17. Ministerio de Agricultura, San José, Costa Rica.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). 2009. Boletín Estadístico Agropecuario 19. Ministerio de Agricultura, San José, Costa Rica.
- Smith P.N., G.P. Cobb, C. Godard-Codding, D. Hoff, S.T. McMurry, T. R. Rainwater & K. D. Reynolds. 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates: Review. *Environmental Pollution*. 150: 41-64.

- Shalat, S.L., K.C. Donnelly, N.C.G. Freeman J.A. Calvin, S. Ramesh, M. Jiménez, K. Black, C. Coutinho, L.L. Needham, D.B. Barr & J. Ramírez. 2003. Nondietary ingestion of pesticides by children in an agricultural community on the US/Mexico border: Preliminary results. *Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 13: 42-50.
- Sunquist M.E. & G.G. Montgomery. 1973. Activity patterns and rates of movement of two-toed and three-toed sloths (*Choloepus hoffmanni* and *Bradypus infuscatus*). *Journal of Mammalogy*, N° 4, 54: 946-954.
- Tecles F. & J. Cerón. 2003. Determinación espectrofotométrica de colinesterasa en sangre entera de animales domésticos: Factores pre y analíticos. *An. Vet. (Murcia)*. 19: 61-76.
- Trudeau, S. & G. Sans Cartier. 2000. Biochemical methods to determine cholinesterase activity in wildlife exposed to pesticides. (Technical report series n° 338), Canadian Wildlife Service, Headquarters, Hull, Québec, Canada.
- Tsatsakis A.M, M.N. Tzatzarakis, M. Tutudaki, F. Babatsikou, A.K. Alegakis & C. Koutis. 2008. Assessment of levels of organochlorine pesticides and their metabolites in the hair of a Greek rural human population. *Human & Experimental Toxicology*, N° 12, 27:933-940.
- Tutudaki M., A.K. Tsakalof & A.M. Tsatsakis. 2003. Hair analysis used to assess chronic exposure to the organophosphate diazinon: a model study with rabbits. *Human & Experimental Toxicology*. No. 3, 22:159-164.
- Uhart, M. & M. Zaccagnini. 1999. Manual de procedimientos operativos estandarizados de campo para documentar incidentes de mortalidad de fauna silvestre en agroecosistemas. INTA-DICOM, República Argentina.
- Urbani B. & C. Bosque. 2007. Feeding ecology and postural behaviour of the three-toed sloth (*Bradypus variegates flaccidus*) in northern Venezuela. *Mamm. biol.* 6:321-329.
- Van Hemmen J., K.E. van der Jagt & D.H. Brouwer. 2005. Assessment of Postapplication Exposure to Pesticides in Agriculture. Series: Methods in Biotechnology. 19:149-164.

- Van Wendel B. 2006. Exposición a plaguicidas y salud de niños en comunidades cercanas a plantaciones de banano y plátano: un enfoque ecosistémico. IRET, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Vaughan C., O. Ramírez, G. Herrera & R. Guries. 2007. Spatial ecology and conservation of two sloth species in a cacao landscape in Limon, Costa Rica. *Biodivers. Conserv.* 16:2293-2310.
- Villalobos F. 1998. Toxicidad embrionaria en ratones pretratados con el pesticida organofosforado "Diazinon". M. Sc. Tesis. Universidad Costa Rica. San José, Costa Rica. (también disponible en línea: [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/34695438.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/34695438.html)).
- Walker C. 2003. Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology*. 12, 307-316.
- Walker, C., S. Hopkin, R. Sibly & D. Peakall. 2001. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, New York, USA.
- Walker, C., S. Hopkin, R. Sibly & D. Peakall. 1997. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, Bristol, USA.
- Wesseling, C., A. Aragón, M. Rojas, L. Blanco, L. López, A. Soto, A. Fúnez, C. Ruedert, J. Miranda & I. López. 2006. Efectos de clorpirifos sobre la salud de trabajadores bananeros de la Lima, Honduras. SALTRA, IRET-UNA, CISTA, UNAM-León. Heredia, Costa Rica.

#### **Referencias tomadas de Internet**

- Chiarello A. & Members of the IUCN SSC Edentate Specialist Group 2008. *Bradypus variegatus*. In: IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species. (15 de diciembre de 2008 [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).
- Infoagro. 2008. Manual de aplicación de plaguicidas. (7 de julio de 2008, [http://www.infoagro.com/abonos/aplicacion\\_plaguicidas.htm](http://www.infoagro.com/abonos/aplicacion_plaguicidas.htm)).

- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007. Lista de productos prohibidos o restringidos. Servicio Fitosanitario del Estado, San José, Costa Rica. (24 de octubre de 2007, [http://www.protecnet.go.cr/SFE/INSUMOS/Registro\\_prodprohibidos.htm](http://www.protecnet.go.cr/SFE/INSUMOS/Registro_prodprohibidos.htm)).
- Medline Plus información de salud para usted. 2010. Biblioteca nacional de medicina de EEUU y los institutos nacionales de la salud. (8 de abril de 2010, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>).
- Meritt, M. & Members of the IUCN SSC Edentate Specialist Group 2008. *Choloepus hoffmanni*. In: IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species. (7 de Julio de 2008, [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).
- Ramírez A. & Mijangos A. 2007. Efectos nocivos provocados por el uso de plaguicidas en la fauna silvestre de México y sus consecuencias ecológicas. Cátedra de Fauna y Flora silvestre, UNAM Cuautitlán, México. (24 de octubre de 2007, <http://www.ambiente-ecologico.com/revist54/ramire54.htm>).
- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD). 2002a. Cultivo de cacao. Ginebra, Suiza. (9 de octubre de 2007, <http://www.unctad.org/infocomm/espagnol/cacao/cultivo.htm>).
- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD). 2002b. Cultivo de banano. Ginebra, Suiza. (9 de octubre de 2007, <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/banana/ecopolicies.htm>).

### **Comunicaciones Personales**

- Arroyo F. Veterinario Regente del Centro de Rescate Aviarios del Caribe. 18 de setiembre 2008. Limon, Costa Rica.
- Bravo V. Coordinadora Área de Diagnóstico del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxica (IRET). 24 de Junio de 2008. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ramírez O. Investigador del Proyecto “Ecología comparativa y uso de hábitat del perezoso de tres dedos (*B. variegatus*) y perezoso de dos dedos (*C. hoffmanni*) en una plantación de cacao (*Theobroma cacao*)”. 15 de agosto de 2005. ICOMVIS-UNA, Heredia, Costa Rica.

Ramírez F. Agrónomo del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxica (IRET). 25 de enero 2010. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Ruepert C. Coordinador Área de Química del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxica (IRET). 24 de noviembre de 2009. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

**ANEXO 1. Actividad de las colinesterasas plasmática en nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg prot<sup>-1</sup>, especie, peso, sexo, estado de desarrollo y plaguicidas detectados en las muestras analizadas**

| Plaguicidas detectados en las matrices analizadas (ug)   |         |           |      |                   |                  |               |       |                |              |        |          |             |              |          |               |        |           |             |
|--|---------|-----------|------|-------------------|------------------|---------------|-------|----------------|--------------|--------|----------|-------------|--------------|----------|---------------|--------|-----------|-------------|
| Act. ChE   | Especie | Peso (Kg) | Sexo | Estado desarrollo | Lavado de brazos |               |       | Limpieza bucal |              |        | Pelo     |             |              |          |               |        |           |             |
|  |         |           |      |                   | diazinon         | difenoconazol | deet  | etoprofos      | clorotalonil | deet   | ametrina | clorpirifos | clorotalonil | diazinon | difenoconazol | deet   | etoprofos | tiabendazol |
| Plaguicidas detectados en las muestras tomadas a los perezosos capturados en la Finca agrícola |         |           |      |                   |                  |               |       |                |              |        |          |             |              |          |               |        |           |             |
| n.a  | Ch      | 5,70      | M    | A                 | n.d              | 0,71          | 34,00 | n.d            | n.d          | 0,21   | n.d      | n.d         | n.d          | 0,07     | n.d           | 21,51  | n.d       | n.d         |
| n.a  | Ch      | 5,00      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 13,00 | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | 0,01        | n.d          | 0,02     | 1,03          | 12,70  | n.d       | n.d         |
| n.a  | Bv      | n.d       | H    | J                 | n.d              | 0,90          | 8,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| n.a  | Ch      | 6,30      | M    | A                 | n.d              | 0,68          | 25,00 | n.d            | n.d          | 0,20   | n.a      | 0,02        | n.d          | 0,04     | 0,78          | n.a    | n.d       | n.d         |
| n.a  | Bv      | 4,90      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | 1,00   | 0,02     | 0,01        | n.d          | 0,02     | 2,87          | 13,27  | 0,05      | n.d         |
| 0,04   | Ch      | 5,60      | H    | A                 | 0,10             | n.d           | 11,00 | n.d            | n.d          | n.d    | n.a      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.a    | n.d       | n.d         |
| 1,61   | Bv      | 3,20      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 0,45  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,95   | Bv      | 3,95      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 4,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,64   | Ch      | 6,20      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 1,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,77   | Ch      | 6,07      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 1,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,53   | Ch      | 6,30      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 13,90 | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,30   | Bv      | 1,30      | H    | J                 | n.d              | n.d           | 2,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,14   | Bv      | 4,40      | M    | A                 | trazas           | 0,57          | 12,00 | trazas         | n.d          | n.d    | n.d      | 0,01        | n.d          | 0,11     | 1,54          | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,39   | Ch      | 2,65      | M    | J                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | 0,01        | n.d          | 0,16     | 0,90          | 14,60  | 0,07      | n.d         |
| 1,82   | Bv      | 2,30      | H    | J                 | trazas           | n.d           | 3,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,92   | Ch      | 5,30      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,63   | Ch      | 3,80      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 9,00  | n.d            | n.d          | 0,30   | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,03   | Ch      | 3,30      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 2,00  | n.d            | n.d          | 1,00   | n.a      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.a    | n.d       | n.d         |
| 1,86   | Ch      | 5,80      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 14,00 | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,80   | Ch      | 6,60      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 1,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,09   | Ch      | 5,20      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 7,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,91   | Ch      | 4,90      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 1,00  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,55   | Ch      | 4,70      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,57   | Ch      | 5,80      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 1,54     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,69   | Ch      | 5,70      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 1,30     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,48   | Ch      | 5,80      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 0,53     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,06   | Ch      | 4,10      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 0,44     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,31   | Ch      | 5,50      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 1,14     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,68   | Ch      | 6,00      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,37   | Ch      | 5,60      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,08   | Ch      | 5,20      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | trazas | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,70   | Ch      | 6,30      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,08   | Ch      | 5,20      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,14   | Ch      | 6,60      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 1,36   | Bv      | 4,60      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 1,00  | n.d            | n.d          | 1,00   | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,55   | Ch      | 3,55      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 0,80  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | 0,07         | 0,02     | n.d           | n.d    | 0,02      | n.d         |
| 0,51   | Ch      | 6,70      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.a      | n.d         | n.d          | 0,02     | n.d           | n.a    | n.d       | n.d         |
| 1,00   | Ch      | 6,75      | H    | A                 | n.d              | n.d           | 25,10 | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 48,70  | n.d       | n.d         |
| 1,60   | Ch      | 5,90      | M    | A                 | n.d              | n.d           | 3,50  | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 0,01     | n.d           | 34,30  | n.d       | 0,34        |
| 0,57   | Ch      | 5,80      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,71   | Ch      | 6,30      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,87   | Ch      | 5,00      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 2,45   | Ch      | 5,80      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 0,03     | n.d           | 332,00 | n.d       | n.d         |
| 0,60   | Bv      | 4,40      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 0,19     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,22   | Bv      | 3,70      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | 1,03     | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,46   | Ch      | 6,20      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| Plaguicidas detectados en las muestras tomadas a los perezosos del centro de rescate           |         |           |      |                   |                  |               |       |                |              |        |          |             |              |          |               |        |           |             |
| 1,48   | Ch      | 9,50      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,90   | n.d       | n.d         |
| 1,39   | Ch      | 9,00      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,60   | n.d       | n.d         |
| 1,12   | Ch      | 12,80     | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 1,80   | n.d       | n.d         |
| 2,55   | Ch      | 7,00      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,60   | n.d       | n.d         |
| 0,63   | Ch      | 9,30      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | 0,06     | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,80   | n.d       | n.d         |
| 0,87   | Ch      | 8,50      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,60   | n.d       | n.d         |
| 0,42   | Bv      | 4,40      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,70   | n.d       | n.d         |
| 0,86   | Bv      | 3,90      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,80   | n.d       | n.d         |
| 0,35   | Bv      | 3,70      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 0,70   | n.d       | n.d         |
| 0,50   | Bv      | 3,50      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | 1,00   | n.d       | n.d         |
| 0,43   | Bv      | 5,00      | H    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |
| 0,68   | Bv      | 3,40      | M    | A                 | n.d              | n.d           | n.d   | n.d            | n.d          | n.d    | n.d      | n.d         | n.d          | n.d      | n.d           | n.d    | n.d       | n.d         |

n.d: no detectado, n.a: no analizado, Bv: *Bradypus variegatus*, Ch: *Choleopus hoffmanni*, A: adulto, J: juvenil, H: hembra, M: macho.



**ANEXO 2.** Acción biocida, cultivos donde se usan y toxicidad de los plaguicidas detectados en las muestras analizadas

| Plaguicida             | Acción biocida          | Cultivos   | Grupo químico            | Toxicidad aguda mamíferos   | Toxicidad extrema otros organismos   |
|------------------------|-------------------------|--|--------------------------|---|--|
| Ametrina               | Herbicida               | Banano, cacao, café, caña azúcar, cítricos, maíz, palma de aceite y piña               | triazinas                | Ratas inhalación >5170 mg/m <sup>3</sup> aire. Conejos dérmico >88160 mg/kg   | Peces alta CL50 (96h) trucha 8,8 mg/l. Crust. moderado CE50 (96h) 28 mg/L. Aves ligera   |
| Clorotalonil           | Fungicida               | Arroz, banano, café, frijol, frutales, hortaliza y maíz                                | Benzonitrilo, clorado    | Ratas inhalación 4,7 mg/L. Conejos dérmico >10000 mg/hg                       | Peces extrema CL50 (96h) trucha arco iris 0,049 mg/l. Crustáceos extrema CE50 (48h) dañidos 0,070 mg/L. Aves ligera  |
| Clorpirifos            | Insecticida             | Arroz, banano, cítricos, forestales, maíz, ornamentales, papa, sorgo, tomate           | Organofosforado, clorado | Ratas inhalación >0,2 mg/L (4h) Conejos dérmico 2000 mg/kg                    | Peces extrema CL50 (96h) trucha arco iris 3 µg/l. Crustáceos extrema CE50 (48h) dañidos 1,7 µg/L. Aves de mediana a alta   |
| Dietiltoluamida (Deet) | Insecticida             | Repelente de insecto, especialmente usado contra culicidae                             | Toluamidas               | Ratas inhalación >4100 mg/m <sup>3</sup> (4h) Conejos dérmico 2000-4000 mg/kg | Peces ND. Crustáceos ND. Aves ND. Peces extrema CL50 (96h) trucha arco iris 90µg/l. Crustáceos extrema CE50 (24h) dañidos 0,96-1,1µg/L.                                |
| Diazinon               | Insecticida, acaricida  | Cacao, café, caña de azúcar, cereales, frutales, tabaco, vegetales                     | organofosforado          | Conejos dérmico 540-650 mg/kg   | Aves extrema Peces extrema CL50 (96h) trucha arco iris 0,8 mg/l. Crustáceos extrema CE50 (48h) dañidos 0,8 mg/L. Aves extrema  |
| Difenoconazol          | Fungicida               | Maní, papa, trigo, vegetales   | Conazol                  | Ratas inhalación 3300 mg/m <sup>3</sup> (4h) Conejos dérmico ND               | Peces moderada CL50 (96h) trucha arco iris 13,8 mg/l. Crustáceos extrema CE50 (48h) invertebrados acuáticos 23 µg/L. Aves moderada Peces extrema CL50 (96h) 0,55 mg/l. |
| Etoprofos              | Insecticida, nematicida | Banano, café, caña de azúcar, cítricos, maíz, ornamentales, papa, piña, tabaco, tomate | Organofosforado          | Ratas inhalación 123 mg/m <sup>3</sup> (4h) Conejos dérmico 25,7 mg/kg        | Crustáceos extrema CE50 (48h) dañidos 0,8 mg/L. Aves extrema   |
| Tiabendazol            | Fungicida               | Arroz, papa, algodón, banano, cebolla, cítricos, frijoles, ornamentales, tomate        | Benzimidazol             | Ratas inhalación ND. Conejos dérmico ND                                       | Peces extrema CL50 (96h) 0,55 mg/l. Crustáceos extrema CE50 (48h) dañidos 0,45 mg/L. Aves ligera   |

Fuente: Manual de plaguicidas IRET, 1999.

**ANEXO 3.** Formularios de la encuesta

Margaret Pinnock Branford  
 Elba de La Cruz Malavassi, PhD.  
 Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, IRET  
 Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Encuesta #: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ GPS: LAT: \_\_\_\_\_ LONG: \_\_\_\_\_

Sexo: F  M   
 Ama de casa  Jornalero

**Evaluación de la exposición de perezosos a plaguicidas en los alrededores de la finca de cacao orgánico (FINMAC), Guápiles, Limón.**

**Objetivo:** Evaluar la exposición de los perezoso de dos y tres dedos a los plaguicidas usados en los diferentes cultivos que se encuentran alrededor de la finca de cacao orgánico.

1. ¿Cree que usted, su familia y/o la vida silvestre están siendo afectado por los plaguicidas?

Si, ¿cómo?

No

2. Hay niños en la casa?  Si  No

Cuántos niños?  Edad:  0- 3  4-7  8-11  mayores de 12 años

3. ¿En los últimos 5 años ha visto perezosos en la zona?

Si, cuál especie  2dedos  3dedos  Ambos  No sabe  No

4. ¿En los últimos 5 años la cantidad de perezosos en la zona?

Aumentó  Disminuyó  Está igual  No sabe  Otros

5. ¿A que cree usted que se debe?:

Muerte natural  Contaminación  Accidentes eléctricos

Casería  Depredación (perros, coyotes, felinos)  Otros

- Deforestación     Buscan alimento en otro lugar
6. ¿Ha notado alguna diferencia en los perezosos en cuanto a:

| Malformaciones/cambios físicos |                     |                |           |       | Comportamiento           |                |
|--------------------------------|---------------------|----------------|-----------|-------|--------------------------|----------------|
|                                |                     |                |           |       | Andan en el suelo/cables | Otros animales |
| Especie                        | Enferm. infecciosas | Perdida pelaje | Uñas/ojos | Otros |                          |                |
|                                |                     |                |           |       |                          |                |

NS: No sabe

7. ¿Ha encontrado individuos muertos?

Si, cuál especie     2 dedos     3 dedos     Ambas     No

|                  |         |       | Posibles Causas |         |        |           |         |       |
|------------------|---------|-------|-----------------|---------|--------|-----------|---------|-------|
| Cuándo / especie | Cuántos | Dónde | Muerte natural  | Contam. | Depred | Electroc. | Casería | Otros |
|                  |         |       |                 |         |        |           |         |       |
|                  |         |       |                 |         |        |           |         |       |
|                  |         |       |                 |         |        |           |         |       |

8. ¿Cuál es el principal alimento de los perezosos? ¿Es fácil de obtener?

Si     No

Cacao     Ceibo     Gavilán     Guarumo     Poró

Javillo     Mamón     Yuplom     Otros

9. ¿Para qué lo usan los perezosos?

- Alimentarse       Descansar       Reproducirse       Otros

10. ¿En cuál de los siguientes lugares se encuentra más de esa vegetación?

- Banano:       Mucho       Poco       Nada
- Piña:       Mucho       Poco       Nada
- Cacao:       Mucho       Poco       Nada
- Potreros       Mucho       Poco       Nada
- Montaña       Mucho       Poco       Nada
- Otros       Mucho       Poco       Nada

11. ¿En que época del año se observan más perezosos adultos?

- E    F    M    A    M    J    J    A    S    O    N    D
- Todo el año       No se observan       No sabe

12. ¿A observado crías? ¿Durante cuáles meses?

- E    F    M    A    M    J    J    A    S    O    N    D
- No sabe    No ha prestado atención

13. ¿Qué había antes en las áreas de banano, piña? ¿Hace cuánto?

- Bosque ¿Qué tipo (primario, secundario)? ¿Cuáles árboles dominaban?
- Cultivo      ¿Cuáles?
- Charrales       Bosque con charrales

14. ¿Actualmente cuáles cultivos predominan en los alrededores?

| Cultivo          | Cacao | Piña | Banano | Plantas ornamentales | Otros |
|------------------|-------|------|--------|----------------------|-------|
| Hectáreas aprox. |       |      |        |                      |       |
| Cosechas/ año    |       |      |        |                      |       |

15. ¿En cuales cultivos usan sustancias químicas?

- Banano       Piña       Cacao       Otros

16. ¿Cuáles sustancias químicas utilizan?

| Cultivo | Producto químico | Con./formulación | Tipo de aplicación | Hora del día | Frec. | Época del año | En que año inició el cultivo |
|---------|------------------|------------------|--------------------|--------------|-------|---------------|------------------------------|
|         |                  |                  |                    |              |       |               |                              |
|         |                  |                  |                    |              |       |               |                              |
|         |                  |                  |                    |              |       |               |                              |
|         |                  |                  |                    |              |       |               |                              |
|         |                  |                  |                    |              |       |               |                              |

NS: No saben

17. ¿Ha observado algún cambio en el clima (hace 10 años y ahora)?

- Más lluvia       Menos lluvia       Otros

18 ¿Ha variado los caudales en los ríos?  Aumentó       Disminuyó

19 ¿Ha observado cambio en el paisaje? ¿Cuáles?  Si       No

20 ¿Han observado mortalidades en otras especies? ¿Cuáles, cuándo y dónde?

21 ¿Han sentido presión (contaminación, vender), para cambiar de residencia?

Alguna sugerencia para mejorar las condiciones para ustedes y la vida silvestre

## ANEXO 4. Hoja de campo

## MUESTRAS PARA DETERMINAR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS

Área de muestreo: \_\_\_\_\_ Muestreo N°: \_\_\_\_\_ Número de muestra: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Hora toma de muestra: \_\_\_\_\_ Muestreador \_\_\_\_\_

Hora captura: \_\_\_\_\_ Chip N°: \_\_\_\_\_ Long.: \_\_\_\_\_ Lat. \_\_\_\_\_

## DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO

| Parámetros                                       |  | Observaciones |
|--|--|---------------|
| <b>Choloepus hoffmanni</b> (dos dedos)           |  |               |
| <b>Bradypus variegatus</b> (tres dedos)          |  |               |
| Peso (Kg)  |  |               |
| Sexo: <b>Hembra /Macho</b>                       |  |               |
| Edad ( <b>Adulto/Juvenil/Bebe</b> )              |  |               |
| Longitud total (cm) <b>A</b>                     |  |               |
| Largo brazo derecho (cm) <b>E</b>                |  |               |
| Largo pata derecha (cm) <b>B+C+D</b>             |  |               |
| Longitud uña central pata derecha (cm.) <b>F</b> |  |               |
| Lesiones ( <b>Cara, Ojos, Palmas</b> )           |  |               |
| Pupilas ( <b>Dilatadas, Contraídas</b> )         |  |               |

## MUESTRAS BIOLÓGICAS

| Muestras                       | Cantidad | Observaciones |
|--------------------------------|----------|---------------|
| Sangre ( <b>SG</b> )           |          |               |
| Saliva ( <b>SL</b> )           |          |               |
| Pelo ( <b>PL</b> )             |          |               |
| Lavado de brazos ( <b>LB</b> ) |          |               |

## MUESTRAS AMBIENTALES

| Muestras                       | Código | Observaciones |
|--------------------------------|--------|---------------|
| <b>Aire</b>                    |        |               |
| <b>Agua Análisis Residuos</b>  |        |               |
| <b>Alimento (Hojas/Frutos)</b> |        |               |
| Otros                          |        |               |

## CONDICIONES AMBIENTALES

Temperatura: \_\_\_\_\_ Humedad: \_\_\_\_\_ Sol: \_\_\_\_\_ Nublado: \_\_\_\_\_ Viento: \_\_\_\_\_ Lluvia: \_\_\_\_\_

## ANEXO 5. Como presentar manuscritos Revista Biología Tropical

# REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL

INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION

## CÓMO PRESENTAR MANUSCRITOS

### LA REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL OFRECE A SUS AUTORES Y LECTORES

**Arbitraje real:** La tasa de aceptación de los trabajos se acerca al 30%, lo cual permite una cuidadosa selección por pertinencia e importancia. Sus dos cuerpos de evaluación y apoyo, el Consejo Editorial y el Comité Científico Internacional (véase parte interna de la cubierta) cuentan con autoridades de primera línea a nivel mundial.

**Auténtica circulación internacional:** la versión impresa de la revista se encuentra en bibliotecas de los 64 países del mundo donde existe una actividad científica significativa. La revista está disponible también para millones de usuarios de Internet mediante el World Wide Web.

**Alto impacto:** Si se consulta desde artículos específicos hasta libros serios sobre el Neotrópico, se encontrará frecuentemente a la revista citada como fuente de información, y disfruta de una amplia cobertura en fuentes clave como *Biological Abstracts*, *Zoological Record*, *Current Contents*, *Google scholar*, *Scielo* y *Latindex*.

**Mainstream:** La *Revista de Biología Tropical* pertenece a la corriente principal ("mainstream") de la ciencia según el Institute for Scientific Information y mantiene un alto nivel de calidad, evaluando los manuscritos únicamente por sus méritos científicos. Preferimos que los autores sugieran posibles revisores y

que incluyan copias de las cartas con comentarios de colegas que revisaron el manuscrito antes de su presentación a la revista.

### POLÍTICAS GENERALES

No recomendamos la presentación de un estudio innecesariamente subdividido en varios manuscritos. De igual manera, se espera que el número de coautores se relacione con la cantidad de trabajo requerida por el estudio.

De nuestra oficina se le enviará aviso de que el manuscrito ha sido recibido. Los manuscritos aceptados para ser revisados por el Consejo Editorial también son enviados a tres especialistas internacionales.

El primer autor de cada artículo recibirá una copia impresa de la revista y una separata electrónica (PDF) para su distribución. El exceso de páginas está sujeto a pago de una tarifa. La publicación de extensas monografías y suplementos requiere consulta previa al editor. La documentación se guarda tres meses después de la publicación, luego no podemos hacernos responsables.

### CÓMO EVITAR RETRASOS

Muchos manuscritos requieren tiempo adicional porque no siguen el formato correcto. La forma más sencilla de seguir nuestro formato consiste en estudiar el tipo de letra, orden de las citas, formato de las referencias, cuadros y pies de figura, etc. en un fascículo reciente. Si su manuscrito tiene la apariencia de un artículo ya publicado (excepto en el uso de dos columnas por página: todo su manuscrito debe venir a

# REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL

## INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION

una columna) el formato probablemente estará bien. Nunca subraye: use letra cursiva (“*itálica*” o “*bastardilla*”).

Puede imprimir esta lista de revisión para corroborar que su manuscrito está listo para ser presentado a *Biología Tropical*.

Debido a que los artículos en inglés son más leídos y citados, recomendamos escribirlos en ese idioma. Si se preparan en español, presente bilingües los pies de figura y encabezados de cuadro.

El manuscrito cumple con las siguientes características:

- ❑ Es original y trata fundamentalmente de la biología o conservación de organismos tropicales.
- ❑ Es un estudio profundo de campo (preferiblemente de más de un año de duración), o un estudio profundo de laboratorio (ámbito: 8 001-20 000 palabras).

### Instrucciones generales

Siga la estructura estándar de un artículo científico (no mezcle resultados con discusión).

Aplique el corrector automático de ortografía al manuscrito y haga revisar el inglés por una persona capacitada. En la primera página anote al pie el total de palabras del manuscrito. Envíe las figuras en calidad profesional, resolución de 300 dpi, ancho de 14 cm e imagen nítida. Los rotulados en letra Times New Roman 16 puntos.

**Presente el manuscrito en formato .doc a la dirección [biologia.tropical@ucr.ac.cr](mailto:biologia.tropical@ucr.ac.cr) junto con un mensaje indicando que el manuscrito es original y todos los coautores están de acuerdo con su publicación.**

### Parte introductoria

- ❑ El título lleva en mayúscula únicamente los nombres propios, es corto, e incluye orden y familia (artículos botánicos: solo familia).
- ❑ El autor y el año de cada taxon solo aparecen una vez: en el cuerpo del manuscrito, la primera vez que se menciona. Los géneros de los binomios únicamente se escriben completos la primera vez que se usan en el *Abstract*, texto principal, resumen y claves.
- ❑ La dirección para correspondencia es breve pero completa; si hay varias, van numeradas. Incluya correo electrónico de todos los coautores.
- ❑ El *Abstract* (350-450 palabras) y el Resumen (200 palabras) deben describir el problema estudiado, tamaño de muestra, tiempo de muestra, procedimiento, los resultados sobresalientes y lo que concluyen los autores, y no lleva punto y aparte.
- ❑ Unas 5-7 palabras clave en inglés (Key words), separadas por coma, deben ser más generales que las palabras de título y resúmenes.
- ❑ En Material y Métodos se presenta únicamente la información necesaria para que el trabajo sea repetible. Si la metodología ha sido publicada, se explica brevemente y se cita la publicación original.
- ❑ No incluya un mapa de la ubicación del lugar de estudio; dé las coordenadas geográficas.



# REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL

## INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION

- ❑ Hay especímenes de referencia depositados en un museo (incluya los números de catálogo en Material y Métodos). Normalmente los trabajos sin especímenes testigo no son aceptados.

### Parte central

- ❑ Se hicieron las pruebas estadísticas correspondientes y aparecen citadas únicamente junto a cada resultado, en paréntesis. Ejemplo: Altura y velocidad se correlacionan (Spearman,  $p < 0.05$ ).
- ❑ Las abreviaturas se explican la primera vez que son usadas.
- ❑ Las unidades siguen la siguiente simbología: litros l, gramos g, kilogramos kg, segundos s, minutos min, horas hr, milímetros mm, centímetros cm, metros m, kilómetros km (las unidades no llevan punto y se escriben con minúscula). Los decimales se indican con punto, y los miles y millones con un espacio, eg. 12 523 235.15
- ❑ Cuando no van seguidos de unidades, los números enteros del cero al diez se escriben con palabra (uno, dos, etc. y no 1, 2 etc.).
- ❑ Las citas -en el texto- están ordenadas cronológicamente y siguen estrictamente el formato del siguiente ejemplo: (Segura 1978, Campos 1982, 1985, Pérez y García 1992, Benavides *et al.* 2007). Note el uso de las comas. Para más de dos autores, se usa el *et al.*
- ❑ Solo los trabajos citados aparecen en la sección Referencias y viceversa. En Referencias no aparecen trabajos que aún no han sido aceptados para publicación. Mencíelos únicamente en el texto y como en este ejemplo: (J. Pérez, en prep.).

### Figuras y cuadros

- ❑ Se han evitado las figuras aisladas, agrupando fotografías y dibujos relacionados. La simbología y la escala aparecen en la figura (nunca en el pie). Cualquier rotulado está a más de 5 mm del borde de la fotografía.
- ❑ Se han evitado los cuadros muy extensos o muy pequeños (un buen tamaño es una página) y en ellos no se han usado líneas verticales u horizontales. Toda la simbología aparece al pie. No se usa negrita dentro del cuadro, ni palabras escritas totalmente en mayúscula.

### Parte final

- ❑ En los Agradecimientos solamente se incluye por nombre a quienes dieron una ayuda muy importante, y títulos como Lic., Dr., Sr., Prof., Srta., etc. no aparecen.
- ❑ Las referencias están ordenadas alfabéticamente y siguen estrictamente el siguiente formato, incluyendo detalles como el uso de espacios, comas, subrayados, mayúsculas y traducción de nombres de ciudades.

### Artículo

Domínguez R., L.F., F. Zamora & G. Fuentes. 2005. Demography of the parasite *Gnathostoma bimucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae) during a ten year period. *Rev. Biol. Trop.* 53: 1235-1246.

### Libro, informe o memoria de congreso

Robinson, J.S. 2005. *Ichthyology*. Winsley, Nueva York, Nueva York, EEUU.

# REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL

## INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION

### Capítulo de libro colegiado

Peters, W.H. 2005. Sediments, p. 7-41. *In* R. Smith & J.A. Mead (eds.). Tropical ecosystems. Van der Meet, La Haya, Holanda.

### Tesis

Stern, G. 2005. Evolution of DNA sequences in Neotropical cambarids (Crustacea: Decapoda). Ph.D. Thesis. Uppsala University, Uppsala, Sweden.

- ☐ **Referencias de Internet:** En lo posible, evite las referencias de Internet pues se consideran de un valor inferior a las referencias impresas, debido a que desaparecen con facilidad. Si debe usarlas, dentro del texto las citas de Internet se incluyen de forma idéntica a las demás citas, eg.: (Anónimo 2002). Por ello, las referencias que son exclusivamente de internet se designan al final de las referencias, en una sección propia y en este formato:

*Autor. Año de creación de la página (si no lo indica, usar el año en que usted la consultó). Título. Institución, Ciudad, Estado o Provincia, País. (Fecha en que la página fue consultada, dirección http).*

Anonymous. 2004. Population genetics in tropical birds. Institute for Avian Research, Perth, Western Territory, Australia. (Consultado 23 diciembre 2006, [www.iar.net.autropical.htm](http://www.iar.net.autropical.htm)).

**NOTA:** Los trabajos que tienen a la vez una versión impresa y electrónica se incluyen dentro de las referencias normales, con el respectivo formato. A esto se agrega: (también disponible en línea y la dirección *http*). Ejemplo:

Perez, J. & K. Smith. 2005. Ultrastructural correlations in tropical cambrian epifauna. *Rev. Biol. Trop.* 53: 907-932 (también disponible en línea: [www.tropiweb/53/2/perez.htm](http://www.tropiweb/53/2/perez.htm)).

**NOTA:** Si su artículo es en español, use los nombres oficiales de las ciudades en este idioma, que aparecen en cualquier buen atlas (eg. Nueva York, Londres, La Haya, Maguncia, Filadelfia, Misuri, etc. en lugar de "New York", "London", "The Hague", "Meinz", "Philadelphia", "Missouri", etc. ).

Abrevie la editorial, eg. en lugar de Wiley and Sons Publications, Inc., escriba solo Wiley. No incluya las palabras Editorial, Press, Verlag y equivalentes. No indique número de edición.