

Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay

Determining the presence of glyphosate through the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique in the protected landscape Laguna de Rocha and its surroundings, Uruguay

Nardo, Daniela ⁽¹⁾, Evia, Gerardo ⁽²⁾, Castiglioni, Enrique ⁽³⁾, Egaña, Eduardo ⁽⁴⁾, Galletta, Giovanni ⁽⁵⁾, Laporta, Martín ⁽²⁾, Núñez Chichet, María Eugenia ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica del Uruguay - ⁽²⁾ Programa de Conservación de la Biodiversidad y Desarrollo Sustentable de los Humedales del Este, PROBIDES - ⁽³⁾ Centro Universitario Regional Este, Rocha, Universidad de la República - ⁽⁴⁾ Intendencia de Montevideo - ⁽⁵⁾ Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Contacto: gevia@probides.org.uy

RECIBIDO: 13/8/2015 - APROBADO: 9/12/2015

RESUMEN

En el entorno de la Laguna de Rocha se ha visto incrementada la superficie dedicada a las actividades agrícolas con un mayor uso de plaguicidas, entre ellos el herbicida glifosato, usado en cultivos de soja principalmente. Mediante la utilización de técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA), se investigó la presencia de glifosato en la Laguna y algunos de sus afluentes en dos momentos específicos de tiempo. Se detectó glifosato en 27 de las 28 muestras estudiadas. Muestras positivas por ELISA fueron confirmadas por cromatografía iónica. El método ELISA demostró ser una herramienta de screening adecuada para determinar la presencia de glifosato en agua.

Palabras clave: Contaminantes, agua, monitoreo, plaguicidas.

ABSTRACT

In the surroundings of the Laguna de Rocha, the area dedicated to agricultural activities has increased as well as the use of pesticides. One of these pesticides is the glyphosate herbicide, used mainly for farming soy.

By employing the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique, the presence of glyphosate in the lagoon and some of its tributaries was tested in two specific moments in time. Glyphosate was detected in 27 out of 28 studied samples. Positive results in samples tested with ELISA were further confirmed by Ion Chromatography. The ELISA method proved to be a suitable screening tool for determining the presence of glyphosate in water.

Keywords: Contaminants, water, monitoring, pesticides.

Introducción

La Laguna de Rocha y su entorno fueron incorporados al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) bajo la denominación Paisaje Protegido en el año 2010 (Decreto No. 61/010). Entre los atributos que justificaron su designación como tal, se encuentra la biodiversidad existente, destacándose entre otros aspectos la presencia de especies endémicas y amenazadas de peces, anfibios, reptiles y mamíferos, así como también la importancia del área como hábitat esencial para las aves migratorias (DINAMA, 2010).

Por otra parte, desde hace algunos años el uso del suelo con fines agrícolas se ha incrementado en las tierras en el entorno de la Laguna, dentro y fuera del Área Protegida, con el consecuente incremento en el uso de plaguicidas, como el herbicida glifosato, entre otros. Este herbicida es ampliamente utilizado en Uruguay en cultivos agrícolas, forestación y para la implantación de pasturas para ganadería.

El glifosato es absorbido fuertemente por el suelo, donde es sometido a degradación microbiana, por lo que es considerado un herbicida relativamente inmóvil. A pesar de estos hechos se han encontrado concentraciones elevadas

en aguas de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas luego de episodios de lluvias, tanto en zonas agrícolas como urbanas, dependiendo de las prácticas agrícolas y de las condiciones hidrológicas (Hanke, et al., 2010; Battaglin, et al., 2002; Gregoire, et al., 2010; Maillard, et al., 2011; Aparicio, et al., 2013).

La Laguna de Rocha es un sitio estudiado y monitoreado frecuentemente en lo que refiere a su biota y sus variables ambientales y de la cual existe extensa bibliografía al respecto (Arocena, et al., 1996, 2011; Forni y Scasso, 2001; Aubriot, et al., 2005; Rodríguez-Gallego, et al., 2012; Piccini, et al., 2006, 2009; Meerhoff, et al., 2013). Sin embargo, son escasos los estudios vinculados a la presencia de plaguicidas en la Laguna de Rocha. Recientemente se encontraron residuos del insecticida permetrina en sedimentos de la Laguna (Nardo, 2011).

En el Parque Nacional de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay y su entorno se detectó la presencia de endosulfán, clorpirifos, cipermetrina, glifosato y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA), y coumaphos en peces de consumo local, suelo, sedimento y agua (Ríos, et al., 2010).

Una de las limitantes para programas de monitoreo regulares de niveles de contaminación en el ambiente es el elevado costo de las técnicas analíticas de detección en laboratorio. El método ELISA ha demostrado ser una herramienta de relativo bajo costo para un primer monitoreo de potenciales niveles de contaminación por plaguicidas, requiriendo posteriormente ser confirmadas y cuantificadas las muestras positivas por técnicas analíticas alternativas (Byer, et al., 2008; Sanchís, et al., 2012; Mörtl, et al., 2013).

Un estudio realizado en Uruguay para la determinación de glifosato en agua en los diferentes sistemas de producción de arroz encontró concordancia entre los resultados obtenidos en un primer monitoreo con el kit de ELISA comercial del laboratorio Abraxis y la posterior confirmación de los resultados positivos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hill, et al., 2010).

La International Agency for Research on Cancer (IARC), agencia especializada en cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), recientemente cambió de categoría a este herbicida colocándolo en la categoría 2A como probable carcinógeno para humanos. Esto significa que hay evidencia limitada de carcinogenicidad en humanos y evidencia suficiente en animales de experimentación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación del método de ELISA como herramienta de *screening* para la determinación de glifosato en agua en el Paisaje Protegido Laguna de Rocha y su entorno.

Materiales y Métodos

Diseño de muestreo

Los muestreos de agua fueron realizados en los meses de noviembre de 2013 y marzo-abril de 2014. Para el primer muestreo, el 29 de noviembre de 2013, se seleccionaron 20 sitios y se extrajeron dos muestras de cada punto. Fueron tomadas en distintos sitios del cuerpo de agua de la Laguna de Rocha y en algunos de sus afluentes, como los arroyos La Paloma, Las Conchas, Rocha y una cañada sin nombre (Figura 1).

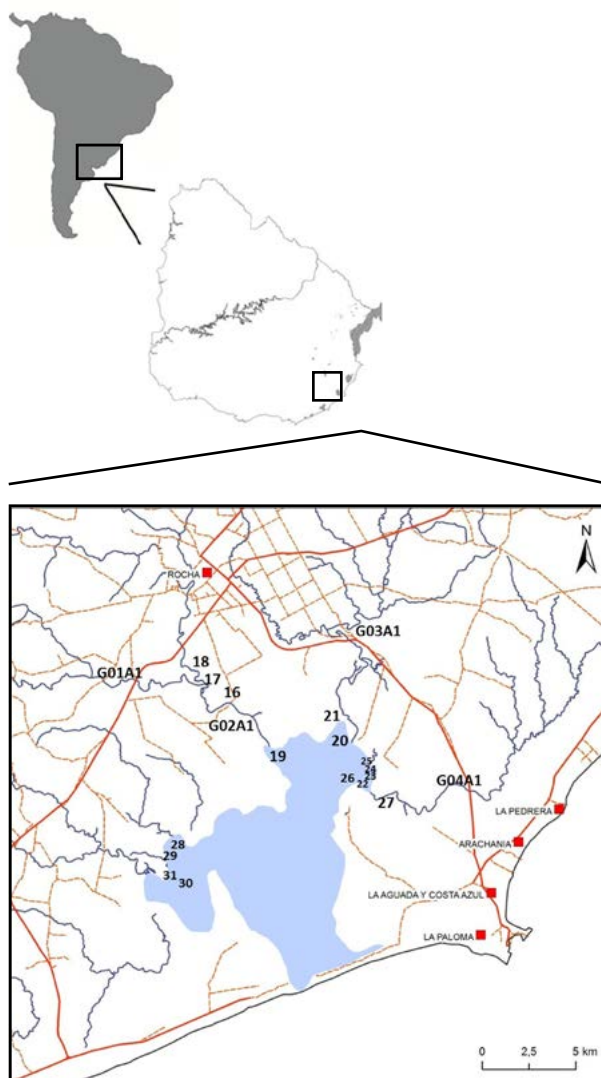


Figura 1. Sitios de muestreo en noviembre de 2013 (primer muestreo).

Se procedió a muestrear luego de que se hubieran producido precipitaciones en la zona, a efectos de aumentar la probabilidad de la presencia de glifosato en la matriz agua debido al transporte del herbicida por la escorrentía superficial.

De cada sitio de muestreo se analizó una muestra mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) por duplicado ese mismo día y las otras fueron congeladas a -20°C para inhibir la cinética de degradación del glifosato y ser analizadas en diciembre de 2013.

Para el segundo muestreo se tomaron ocho muestras de agua entre el 29 de marzo y el 12 de abril de 2014, luego de lluvias de entre 20 y 40 mm. Las muestras fueron tomadas en diferentes puntos del departamento de Rocha en desagües de chacras de soja con cultivo madurando y en campos con apariencia de haber sido sometidos a aplicación de herbicidas (Figura 2). De estas ocho muestras, dos de ellas repiten los sitios muestreados en noviembre (muestras 2 y 6 repiten los sitios G04A1 y G02A1 del muestreo de noviembre, respectivamente).

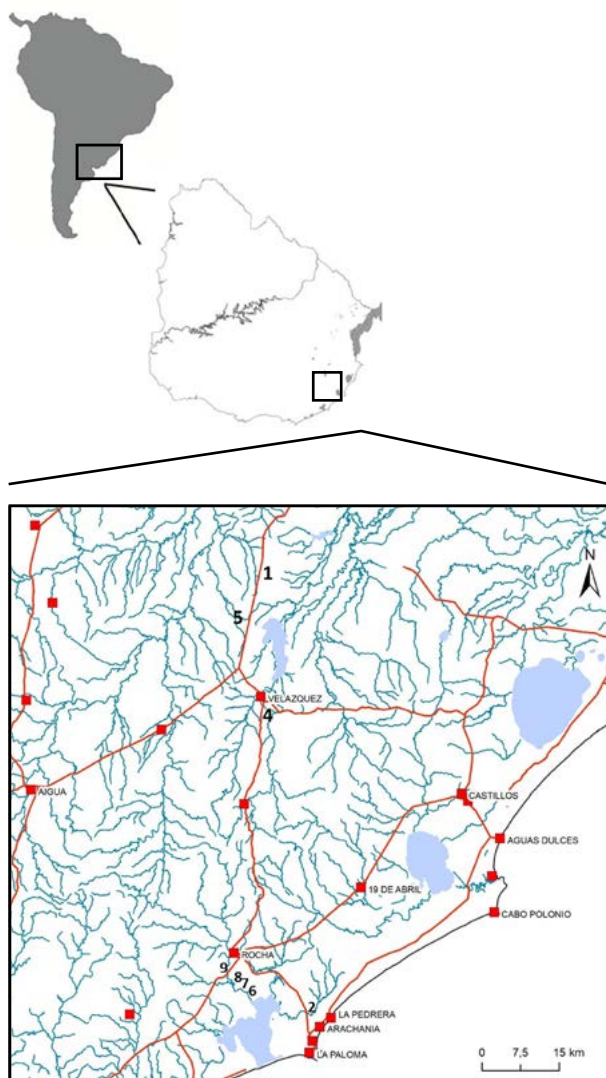


Figura 2. Sitios de muestreo en marzo-abril de 2014 (segundo muestreo).

Precipitaciones previas a los muestreos

En las Tablas 1 y 2 se muestran las precipitaciones previas al primer y segundo muestreo.

Fecha	Precipitaciones en mm (*)	Precipitaciones en mm (**)
20/11/2013	14,9	2,0
25/11/2013	5,8	11,0
26/11/2013	37,6	45,0
27/11/2013	17,1	17,0

Tabla 1. Precipitaciones previas al primer muestreo. (*) Estación Meteorológica Rocha. (**) Estación Meteorológica La Paloma. Fuente: Instituto Nacional de Meteorología. Servicio Pluviométrico Nacional.

Fecha	Precipitaciones en mm (*)
22/3/2014	2,0
27/3/2014	1,6
28/3/2014	0,4
30/3/2014	1,6
05/4/2014	13,8
07/4/2014	2,6
08/4/2014	2,0
11/4/2014	61,3
12/4/2014	2,5

Tabla 2. Precipitaciones previas al segundo muestreo. (*) Estación Meteorológica Rocha. Fuente: Instituto Nacional de Meteorología. Servicio Pluviométrico Nacional.

Procedimiento de muestreo, transporte y conservación de las muestras

Las muestras fueron tomadas sumergiendo envases de polietileno con un volumen de 500 mL, por llenado natural y desplazamiento de aire introduciendo los envases a una profundidad de entre 30 y 40 cm en las dos etapas de muestreo. Para el muestreo en la Laguna se operó con un gomón con motor, provisto por la Administración del Área Protegida.

Durante el proceso de extracción y su transporte hasta el laboratorio, las muestras se mantuvieron en condiciones de almacenamiento que las protegían tanto de la radiación solar como de la exposición a altas temperaturas. Las muestras en el laboratorio fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

Reactivos, solventes, estándares analíticos, material de laboratorio y equipo instrumental

- MicroPipeta automática de precisión, rango 20 a 200 y 100 a 1000 μL
- Frascos de polietileno de 500 mL
- Parafilm
- Tubos de ensayo descartables
- Agua desionizada
- Fotómetro con filtro intercambiable para lectura de placas, con posibilidad de lectura a 450 nm
- Puntas descartables para pipeta
- Kit de inmunoensayo para Glifosato Abraxis LLC
- Cromatógrafo de iones Dionex ICS-5000

Tratamiento de las muestras

Tanto para la metodología ELISA como para el método cromatográfico se permitió que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente y se filtraron a través de una membrana con poro de $0,45\ \mu\text{m}$.

Análisis por ELISA

Para la detección y cuantificación mediante inmunoanálisis fue utilizado el kit de detección de glifosato comercializado por la empresa Abraxis LLC (Warminster, Pennsylvania, USA). Las medidas fueron llevadas a cabo en microplacas de pocillos de acuerdo a la cantidad de muestras a analizar y respetando las instrucciones del fabricante.

Las muestras y los estándares analíticos provistos en el kit fueron derivatizados y agregados a los pocillos de la microplaca. Luego del agregado del anticuerpo específico para glifosato, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente.

Una enzima conjugada de glifosato fue agregada a los pocillos, después de lo cual se lavó tres veces con solución buffer la microplaca con los pocillos. Se agregó posteriormente una solución cromófora y se desarrolló el color azul.

El desarrollo de color fue detenido mediante la adición de una solución de ácido sulfúrico 0.5M y la intensidad de color fue medida a 450 nm.

Dado que el glifosato conjugado compite por los sitios con anticuerpos con el glifosato no marcado contenido en las muestras, el color desarrollado decrece con el incremento de la concentración de glifosato en las muestras, siguiendo un patrón sigmoideo.

Análisis por cromatografía iónica

Doce muestras en las cuales se detectó glifosato mediante el ensayo de ELISA fueron analizadas en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) mediante una metodología de referencia (cromatografía iónica) para confirmar la presencia del herbicida.

Condiciones del instrumento:

Columna analítica: Dionex Ion Pac AS19-HC 2x250 mm

Precolumna: Dionex Ion Pac AG19-HC 2x50 mm

Eluyente: Hidróxido de potasio 45 mM generado electro-líticamente

Flujo: 0,25 mL/min

Volumen de inyección: 100 µL

Temperatura: 30 °C

Detector: Detector de conductividad del módulo de conductividad del ICS 5000+ DC

Supresor: Supresor de conductividad autoregenerante ASRS II 300

Corriente del supresor: 28 mA

Tiempo de adquisición de datos: 45 min

Fase móvil: 4mM de KOH isocrático hasta los 10 min y luego gradiente hasta 45mM de KOH.

Análisis de datos

Para el tratamiento de datos obtenidos mediante la metodología ELISA se siguieron las recomendaciones de la empresa Abraxis utilizando una planilla de cálculo comercial. La concentración de glifosato se obtuvo interpolando los valores de absorbancia obtenidos en las muestras, en una curva de calibración de % B/B₀ versus concentración de glifosato. B es la media de la absorbancia de los estándares de concentración conocida provistos por la empresa Abraxis LLC (0; 0,075; 0,2; 0,5; 1,0 y 4,0 µg/L) y B₀ la media de la absorbancia del solvente utilizado sin glifosato.

La cromatografía iónica se realizó de acuerdo a ISO10304-2.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos por ELISA en los dos muestreos se presentan en las Tablas 3 y 4.

Muestra 29/11/2013	ELISA 29/11/2013 (ug/L)	ELISA 12/2013 (ug/L)
16		0,13
17	0,31	
18	0,33	0,26
19	0,32	0,45
20	0,32	
21	0,27	0,25
22	1,18	3,3
23		0,57
24	0,36	1,88
25	0,52	0,55
26		1,94
27		0,98
28	0,874	0,16
29	0,24	0,19
30	0,31	0,21
31	0,36	
G01A1	0,19	
G02A1	4,83	8,30
G03A1	0,3	
G04A1	2,01	1,43

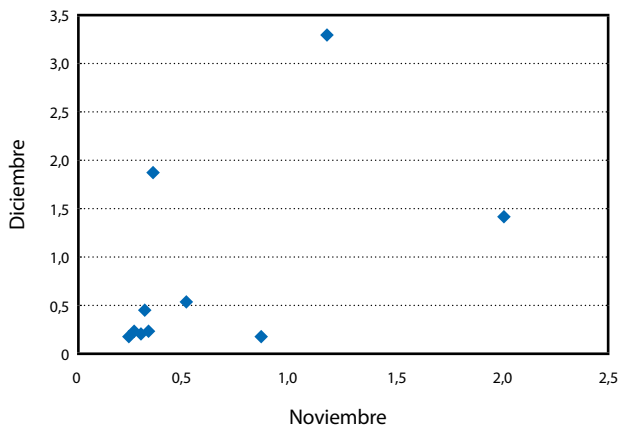
Tabla 3. Concentración de glifosato en muestras de agua de la Laguna de Rocha y sus afluentes en noviembre y diciembre de 2013 (primer muestreo). Límite Observado de Detección (LOD): 0,05 ug/L

En las 20 muestras colectadas en noviembre de 2013 se detectó la presencia de glifosato (Tabla 3). De acuerdo a la bibliografía (Hagner, et al., 2015; Lupi, et al., 2015; Zhao, et al., 2009, 2015; De Miranda, et al., 2011), este herbicida está considerado como poco móvil y de bajo potencial de lixiviación a través de los suelos hacia las aguas subterráneas. Los resultados obtenidos indican que a pesar de ello es capaz de alcanzar los cuerpos de agua por escorrentía, lo que concuerda con los trabajos de Imfeld et al. (2013).

La mayor concentración por ELISA se encontró durante el primer muestreo (noviembre de 2013) en la cañada sin nombre (G02A1 en Figura 1), con 8,30 ug/L. Esta muestra fue tomada en un curso de agua al que drenaba directamente la escorrentía de una chacra con soja de primera. Los otros puntos de muestreo donde se hallaron mayores concentra-

ciones se situaban en uno de los afluentes de la Laguna, en el arroyo La Palma y en el Bolsón de dicho arroyo.

Se realizó la correlación de Pearson entre los resultados de ambos análisis de ELISA que se repitieron en noviembre y diciembre sobre duplicados de la misma muestra, resultando una relación moderada positiva. Esto indica que hay poca relación entre los resultados de ambos análisis. La correlación de Pearson dio un resultado de 0,510. Este resultado probablemente se deba a que si bien el método se realizó siguiendo el instructivo del fabricante, fue realizado por personal técnico no habituado a realizarlo.



Muestra	Glifosato (ug/L) Noviembre	Glifosato (ug/L) Diciembre
18	0,33	0,26
19	0,32	0,45
21	0,27	0,25
22	1,18	3,3
24	0,36	1,88
25	0,52	0,55
28	0,874	0,16
29	0,24	0,19
30	0,31	0,21
G04A1	2,01	1,43

Correlación 0,510105763

Figura 3. Correlación de Pearson entre duplicados de muestras analizadas en noviembre y diciembre de 2013.

En el muestreo realizado en marzo-abril de 2014 se detectó glifosato en siete de las ocho muestras analizadas. La mayor concentración encontrada por ELISA se halló en la cañada sin nombre (muestra 1) con una concentración de 0,92 ug/L.

Todas las muestras analizadas por cromatografía iónica confirmaron la presencia de glifosato. El kit de ELISA no produjo ningún falso positivo (Tabla 5). No se pudo establecer una correlación entre los resultados de ELISA y los de cromatografía iónica debido a los diferentes límites de detección de las técnicas analíticas. De todos modos la mayoría de los valores no presentaron concordancia. El máximo

valor hallado fue de 11,3 ug/L que corresponde a la muestra 22 tomada en el Bolsón del Arroyo La Palma.

Fecha de muestreo	Muestra	ELISA (ug/L)
29/3/2014	1	0,92
29/3/2014	2	0,32
12/4/2014	4	0,27
12/4/2014	5	0,29
12/4/2014	6	0,27
12/4/2014	7	0,27
12/4/2014	8	N.D*
12/4/2014	9	0,28

Tabla 4. Concentración de glifosato en muestras de agua en marzo-abril 2014 (segundo muestreo). * N.D.: No Detectado. Límite Observado de Detección (LOD): 0,05 ug/L

Muestra	Cromatografía iónica
1	<3,5
2	<3,5
5	3,9
6	3,9
7	<3,5
20	<3,5
22	11,3
25	<3,5
28	<3,5
30	<3,5
G02A1	<3,5
G04A1	<3,5

Tabla 5. Resultados de las 12 muestras analizadas mediante cromatografía iónica. Límite Observado de Detección (LOD): 0,7 µg/L; Límite de Cuantificación 3,5 µg/L

Todos los niveles de concentración de glifosato hallados se encuentran por debajo de los límites establecidos para la protección de la vida acuática en Canadá, los cuales son de 800 ug/L para exposición a largo plazo y de 27.000 ug/L para exposición a corto plazo (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012), así como de los establecidos para el agua potable de 900 ug/L en Uruguay (Administración de las Obras Sanitarias del Estado, 2006). Debe tenerse en cuenta que la consideración únicamente de los niveles de glifosato puede subestimar el riesgo para organismos acuáticos, ya que el surfactante utilizado en algunas formulaciones, polioxietilenoamina (POEA), ha demostrado ser responsable de mayores efectos tóxicos para la vida acuática.

El método de ELISA utilizado demuestra ser una alternativa eficiente, rápida y económica para el monitoreo de la calidad del agua de forma constante.

Este primer estudio realizado en aguas de la Laguna de Rocha y sus afluentes en cuanto a la presencia de glifosato indica que la Laguna está recibiendo aportes de glifosato procedente de las actividades agrícolas que se desarrollan en su cuenca, dado que se confirmó la presencia de glifosato en agua del cuerpo de la Laguna y afluentes. Por tratarse de un Área Protegida, este hallazgo permite sugerir que debería monitorearse y dar seguimiento a la evolución de los niveles de este herbicida y otros potenciales contaminantes.

Reconocimientos

A Javier Vitancurt, Héctor Caymaris y Andrés Sosa del Sistema Nacional de Áreas Protegidas por la colaboración, conducción y ejecución de los muestreos.

Al Prof. Raúl Ramírez de la Universidad Católica del Uruguay.

A la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA) por los kits para detección de glifosato de Abraxis y el lector.

A Camila Gianotti por la colaboración en la elaboración de las Figuras 1 y 2.

Referencias

- Abraxis, [s.d.]. *Glyphosate plate* [En línea]. [s.l.]: Abraxis. [Consulta: 25 de noviembre de 2013]. Disponible en: http://www.abraxiskits.com/uploads/products/docfiles/184_PN500086USER.pdf
- Administración de las Obras Sanitarias del Estado (OSE), 2006. *Norma interna de calidad de agua potable*. Montevideo: OSE.
- Aparicio, Virginia, De Gerónimo, Eduardo, Marino, Damián, Primost, Jezabel, Carriquirborde, Pedro y Costa, José, 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. En: *Chemosphere* 93, pp.1866-1873
- Arocena, Rafael, Conde, Daniel, Fabián, Daniel, Gorga, Javier y Clemente, Juan, 1996. *Calidad del agua en la Laguna de Rocha: rol de sus principales afluentes*. Rocha: PROBIDES. (Documentos de trabajo, 13).
- Arocena, Rafael y Rodríguez, Lorena, 2011. Small-scale structure of macrophytes and macrobenthos in coastal "Laguna de Rocha". En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 6(2), pp.148-160.
- Aubriot, Luis, Conde, Daniel, Bonilla, Sylvia, Hein, Valeria y Britos, Anamar, 2005. Vulnerabilidad de una laguna costera en una reserva biósfera: indicios recientes de eutrofización. En: CYTED. *Taller Internacional de eutrofización de Lagos y Embalses*. Santiago: Patagonia Impresores. pp.65-85.
- Battaglin, William A., Kolpin, Dana W., Scribner, Elisabeth A., Kuivila, Kathryn M. y Sandstrom, Mark, 2002. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. En: *Journal of the American Water Resources Association*, 41, pp.323-332.
- Byer, Jonathan, Struger, John, Klawunn, Paul, Todd, Aaron y Sverko, 2008. Low cost Monitoring of Glyphosate in surfacewaters using the ELISA method: an Evaluation. En: *Environmental Science & Technology*, 42, pp.6052-6057.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012. *Canadian environmental quality guidelines. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. Glyphosate*. Winnipeg: CCME.
- De Miranda Colombo, Sandro y Masini, Jorge, 2011. Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/ desorption of glyphosate on soil and sediment samples. En: *Microchemical Journal*, 98(2), pp.260-266.
- DIEA, 2005. *Anuario estadístico 2005* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 4 de abril de 2015]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2005,O,es,0,-->
- DIEA, 2014. *Anuario estadístico 2014* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 4 de abril de 2015]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014,O,es,0>
- DINAMA, 2010. *Proyecto de ingreso del área Laguna de Rocha al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP)*. Montevideo: DINAMA.
- Forni, Florencia y Scasso, Flavio, 2001. *Calidad del agua en el Departamento de Rocha*. Rocha: PROBIDES. (Documento de trabajo, 39).
- Grégoire, Caroline, Payraudeau, Sylvain y Domange, Nicolas, 2010. Use and fate of 17 pesticides applied on a vineyard catchment. En: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90, pp.406-420.
- Hagner, Marlenaa, Hallman, Sanna, Jauhiaiinen, Lauri, Kemppainen, Riitta, Ramo, Sari, Tiilikka Kari y Setälä Heikki, 2015. Birch (*Betula spp.*) wood biochar is a potential soil amendment to reduce glyphosate leaching in agricultural soils. En: *Journal of Environmental Management*, 164, pp.46-52.
- Hanke, Irene, Wittmer, Irene, Bischofberger, Simone, Stamm, Christian y Singer, Heinz, 2010. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. En: *Chemosphere*, 81(3), pp.422-429.
- Hill, Mariana y Clerici, Carlos, 2010. *Determinación de residuos de agroquímicos en grano, agua y suelo en diferentes sistemas de producción de arroz*. Montevideo: Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía. (Informe final de Proyecto INIA-FPTA 171).
- Imfeld, Gwenaél, Lefrancq, Marie, Maillard, Elodie y Payraudeau, Sylvain, 2013. Transport and attenuation of dissolved glyphosate and AMPA in a stormwater wetland. En: *Chemosphere*, 90(4), pp.1333-1339.
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2015. *IARC monographs volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides*. Lyon : IARC, WHO.
- Lupi, Leonardo, Miglioranza, Karina, Aparicio, Virginia, Marino, Damián, Bedmar, Francisco, Wunderlin, Daniel, 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. En: *Science of the Total Environment*, 536, pp.687-694.
- Maillard, Elodie, Payraudeau, Sylvain, Faivre, Etienne, Grégoire, Caroline, Gangloff, Sophie y Imfeld, Gwenaél, 2011. Removal of pesticide mixtures in a stormwater wetland collecting runoff from a vineyard catchment. En: *Science of the Total Environment*, 409(11), pp.2317-2324.

- Meerhoff, Erika, Rodríguez-Gallego, Lorena, Giménez, Luis, Muniz, Pablo y Conde, Daniel, 2013. Spatial patterns of macrofaunal community structure in coastal lagoons of Uruguay. En: *Marine Ecology Progress Series*, 492, pp.97-110.
- Mörtl, Mária, Németh, Gyöngyi, Juracek Judit, Darvas, Béla, Kamp, Lisa, Rubio, Fernando y Székács, András, 2013. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. En: *Microchemical Journal*, 107, pp.143-151.
- Nardo, Daniela, 2011. *Estudio del impacto de plaguicidas utilizados en el cultivo de soja y en otras actividades agrícolas sobre las especies acuáticas de consumo humano en el Área Protegida Laguna de Rocha*. Montevideo: UCUDAL. (Tesis de Maestría).
- Piccini, Claudia, Conde, Daniel, Alonso, Ceciclia, Sommaruga, Ruben y Perntaler, Jakob, 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), pp.6560-6568.
- Piccini, Claudia, Conde, Daniel, Perntaler, Jakob y Sommaruga, Ruben, 2009. Alteration of chromophoric dissolved organic matter by solar UV radiation causes rapid changes in bacterial community composition. En: *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8, pp.1321-1328.
- Ríos, Mariana, Zaldúa, Natalia y Cupeiro, Sabrina, 2010. Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay [En línea]. En: *Vida Silvestre*. [Consulta: 11 de marzo de 2015]. Disponible en: http://vidasilvestre.org.uy/wpcontent/uploads/2010/10/libro_resultados_sc.pdf
- Rodríguez-Gallego, Lorena, Nin, Mariana, Suárez-Pirez, Carlos y Conde, Daniel, 2012. Paisaje protegido Laguna de Rocha, propuesta de plan de manejo. Rocha: Futuro Sustentable, S.A. (Inédito).
- Sanchís, Josep, Kantiani, Lina, Llorca, Marta, Rubio, Fernando, Ginebreda, Antoni, Fraile, Josep, Garrido, Teresa y Farré, Marinella, 2012. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(7), pp.2335-2345. DOI 10.1007/00216-011-5541.
- Uruguay. Decreto 61/010, de 18 de febrero de 2010. *Diario Oficial*, 10 de marzo de 2010, p.309.
- Zhao, Bingzi, Thang, Jiabao, Gong, Jiandong, Thang, Hui, Thang, Gongzhi. 2009. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments. En: *Geoderma*, 149, pp.290-297.
- Zhao, Yuan Yuan, Wendling, Laura, Wang, Changhui y Pei, Yuansheng. 2015. Use of Fe/Al drinking water treatment residuals amendments for enhancing the retention capacity of glyphosate in agricultural soils. En: *Journal of Environmental Sciences*, 34, pp.133-142.