

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

“Contaminación acuática por glifosato: efecto sobre especies nativas y eficiencia de procesos de remediación”

Lic. Reno Ulises

Directora de Tesis: Dra. Ana María Gagneten
Co-Directora de Tesis: Dra. Cristina Zalazar

Lugar de realización:

Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Humanidades y Ciencias.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria Paraje “El Pozo”
CP 3000. Santa Fe. Argentina.

Agradecimientos

En esta tesis quiero agradecer a:

- A la Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC-UNL), al Departamento de Ciencias Naturales de la FHUC y en especial al Laboratorio de Ecotoxicología (FHUC), no solo por brindarme el espacio físico, sino también por acompañarme en mi formación de grado y posgrado.

- A la Universidad Nacional del Litoral, quien me acompañó con el otorgamiento de los proyectos CAI+D permitiendo acceder a parte del equipamiento, insumos y servicios para la realización de la presente tesis:

- **Proyecto CAI+D 2011: “Biomarcadores de metales y fitosanitarios en plancton y crustáceos de humedales de la región central de la Provincia de Santa Fe”.** Proyecto 501 201101 00215. Período de ejecución: 2013-2015. Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Litoral. Directora: Dra. Ana María Gagneten.

- Proyecto CAI+D 2009: “Respuestas fisiológicas y ecológicas de crustáceos a la contaminación por metales pesados en el río Paraná Medio”.** Proyecto N° PI 69-351. Res. C.S. N° 100/09. Período de ejecución: 2010-2013. Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Litoral. Directora: Dra. Ana María Gagneten.

- **Proyecto CAI+D Orientado 2011: “Contaminación acuática por glifosato: efecto sobre especies nativas, procesos de remediación y sensibilización social con participación de instituciones gubernamentales, educativas, ONGs y productores de la región”.** Período de ejecución: 2011-2013. Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Litoral. Directora: Dra. Ana María Gagneten.

- Proyecto CAI+D Orientado 2012: “Evaluación integral y procesos de remediación de los efectos de mezclas de herbicidas e insecticidas sobre especies nativas del Litoral fluvial argentino”.** Período de ejecución: 2013-2015. Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Litoral. Director: Dr. Rafael Lajmanovich. Co-directora: Ana María Gagneten.

- A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) por permitirme desarrollar mi carrera de posgrado.

- Al CONICET por acompañarme en el financiamiento de la carrera de doctorado.

- A mi Directora, *Dra. Ana María Gagneten* por enseñarme a transitar este camino, brindándome consejos cálidos que hicieron que cada día de trabajo sean días de crecimiento personal y profesional.

- Mi Co-Directora, *Dra. Cristina Zalazar*, por ayudarme en cada instancia de esta tesis.

- A mi amiga- *Luciana Regaldo*- por permitirme compartir risas, anécdotas, música y aprendizajes y sobre todo brindarme su amistad.

- A todo el Laboratorio de Genética (*Eva, Pato, Guille, Gise, Caro*), a *Ruth, Milagros, Wanda y Viviana*, por brindarme su cariño.

- A Susana Gervasio, por estar siempre predispuesta a cada consulta, análisis y consejo.

- Al personal de mantenimiento -*Fernando, El Rulo, Facu, Omar, Santiago y Lito*- que en cada pedido siempre estuvieron predispuestos a darme ayuda.

- A *Mi Flaca, Vicky*, por estar siempre a mi lado, por ser mi compañera de vida, por soñar juntos estos momentos y los que vendrán.

- Y especialmente a *Mi Familia*, por ser los que incondicionalmente estuvieron, están y van a seguir estando junto a mí y yo con ellos cada momento de nuestras vidas.

ÍNDICE GENERAL

| | Páginas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Agradecimientos | 2 |
| Publicaciones | 6 |
| Índice de Tablas | 7 |
| Índice de Figuras | 10 |
| Abreviaturas y Símbolos | 13 |
| I. RESUMEN | 14 |
| II. SUMMARY | 16 |
| III. INTRODUCCIÓN GENERAL | 20 |
| IV. CAPÍTULO I: Contexto ambiental. Uso de plaguicidas y la Ecotoxicología como herramientas de análisis para el control y monitoreo ambiental. Bioensayos como herramientas para evaluar procesos de remediación ambiental. | 22 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 3. HIPÓTESIS | 31 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 4.1. Organismos de prueba y formulaciones con glifosato | 32 |
| 4.2. Ensayos de inhibición de crecimiento algal con <i>C. vulgaris</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 36 |
| 4.3. Ensayos agudos con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 37 |
| 4.4. Ensayos de recuperación con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 38 |
| 4.4.1. Construcción de modelos poblacionales matriciales | 39 |
| 4.4.2. Estudio de simulación de Monte Carlo | 41 |
| 4.5. Ensayos crónicos con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 42 |
| 4.6. Proceso Avanzado de Oxidación UV/H ₂ O ₂ . Sistema y procedimiento experimental. | 43 |
| 4.7. Ensayos de toxicidad con <i>C. vulgaris</i> , <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> , para evaluar la eficiencia del proceso UV/H ₂ O ₂ | 46 |
| 5. RESULTADOS | 47 |
| 5.1. Ensayos de inhibición de crecimiento algal con <i>C. vulgaris</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 47 |
| 5.2. Ensayos agudos con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 50 |
| 5.3. Ensayos de recuperación con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 51 |
| 5.4. Ensayos crónicos con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato | 54 |
| 5.5. Ensayos de toxicidad con <i>C. vulgaris</i> , <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> , para evaluar la eficiencia del proceso UV/H ₂ O ₂ | 70 |
| 5.5.1. Ensayos de toxicidad con <i>C. vulgaris</i> para evaluar la eficiencia del proceso UV/H ₂ O ₂ | 70 |
| 5.5.2. Ensayos de toxicidad con <i>D. magna</i> y <i>C. dubia</i> , para evaluar la eficiencia del proceso UV/H ₂ O ₂ | 76 |
| 6. DISCUSIÓN | 78 |
| V. CAPÍTULO II: <i>Chlorella vulgaris</i>: Usos y aplicaciones | 87 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 88 |
| 2. OBJETIVOS | 93 |
| 3. HIPÓTESIS | 93 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 94 |
| 4.1. Remediación de glifosato utilizando <i>C. vulgaris</i> | 94 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2. Remediación de efluentes de producción porcina y láctea utilizando <i>C. vulgaris</i> | 95 |
| 4.2.1. Caracterización de los efluentes de producción porcina y láctea | 95 |
| 4.2.2. Ensayos preliminares | 95 |
| 4.2.3. Ensayo definitivo | 96 |
| 4.3. Cultivo de <i>C. vulgaris</i> en fotobio reactor para obtención de biomasa algal | 100 |
| 4.3.1. Caracterización bioquímica de la biomasa de <i>C. vulgaris</i> obtenida en cultivos en fotobio reactor | 102 |
| 5. RESULTADOS | 103 |
| 5.1. Remediación de glifosato utilizando <i>C. vulgaris</i> | 103 |
| 5.2. Remediación de efluentes de producción porcina y láctea utilizando <i>C. vulgaris</i> | 106 |
| 5.2.1. Caracterización de los efluentes de producción porcina y láctea | 106 |
| 5.2.2. Ensayos preliminares | 106 |
| 5.2.3. Ensayo definitivo | 108 |
| 5.3. Cultivo de <i>C. vulgaris</i> en fotobio reactor para obtención de biomasa algal | 109 |
| 5.3.1. Caracterización bioquímica de la biomasa de <i>C. vulgaris</i> obtenida en cultivos en fotobio reactor | 110 |
| 6. DISCUSIÓN | 110 |
| VI. CONCLUSIONES GENERALES | 114 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 118 |

Esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones

1. **Reno, U.**; Regaldo, L.; Gagneten, A.M. (2016). Efectos subletales de cuatro formulaciones de glifosato sobre *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). *Natura Neotropicalis*. Vol. 47 (1): 7-20.
2. **Reno, U.**; Regaldo, L.; Vidal, E.; Mariani, M.; Zalazar, C.; Gagneten, A.M. (2016). Water polluted with Glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using *Chlorella vulgaris* growing as bioindicator. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 28 (4): 2279–2286.
3. **Reno, U.**; Gutierrez, M.F.; Longo, M.; Vidal, E.; Regaldo, L.; Negro, A.; Mariani, M.; Zalazar, C.; Gagneten, A.M. (2015). Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations. *Water Air & Soil Pollution*. Vol. 226: 349 – 349.
4. **Reno, U.**; Gutiérrez, M.F.; Regaldo, L. y Gagneten A.M. (2014). Impact of Eskoba[®], a Glyphosate Formulation, on the Freshwater Plankton Community. *Water Environmental Research*. Vol. 86 (12): 2294-2300.
5. Gagneten, A.M.; Maitre, M.I.; **Reno, U.**; Regaldo, L.; Roldan, S. y Enrique, S. (2014). Efectos del Herbicida Ron-Do[®] sobre *Ceriodaphnia reticulata* (Crustacea, Cladocera) y Degradabilidad del Glifosato (N-Fosfometilglicina) en Condiciones Experimentales. *Natura Neotropicalis*. Vol. 45 (1 y 2): 71-85.
6. **Reno, U.**; Gutiérrez, M.F.; Longo, M.; Vidal, E.; Regaldo, L.; Negro, A.; Mariani, M.; Zalazar, C.; Gagneten, A.M. (2013). Microcrustáceos y Bacterias como modelos biológicos para la evaluación de un proceso de remediación de agua contaminada con Glifosato. San Juan 14-18/10/2013. Anales del XXIV Congreso Nacional del Agua. Tomo I 1° Ed. ISSN N° 1853-7685.

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: Contexto ambiental. Uso de plaguicidas y la Ecotoxicología como herramientas de análisis para el control y monitoreo ambiental. Bioensayos como herramientas para evaluar procesos de remediación ambiental.

Tabla 1: Condiciones experimentales

Tabla 2: 96 h-EC₅₀ e intervalos de confianza (95%) de los formulados a base de glifosato analizados en el presente estudio

Tabla 3: Densidad celular (% N° de cél. mL⁻¹) que superaron al control a diferentes tiempos del ensayo de inhibición algal (24, 48, 72 h) para los cuatro formulados ensayados.

Tabla 4: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población (CL₅₀ mg a.e L⁻¹) obtenida a las 48 h de exposición a cuatro formulaciones de glifosato para dos especies de cladóceros. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Tabla 5: Promedios y desvíos de los valores de oxígeno disuelto (OD, mg L⁻¹) y pH obtenidos al finalizar los ensayos agudos (48 h).

Tabla 6: Media del módulo λ obtenidas luego de la Simulación de Monte Carlo para todas las concentraciones y formulados ensayados en el ensayo de recuperación, tomando como modelo biológico a *D. magna*. *= concentraciones de glifosato cercanas o por debajo de las reportadas para ambientales y niveles guías para la protección de la biota acuática. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Tabla 7: Media del módulo λ obtenidas luego de la Simulación de Monte Carlo para todas las concentraciones y formulados ensayados en el ensayo de recuperación, tomando como modelo biológico a *C. dubia*. * = concentraciones de glifosato cercanas o por debajo de las reportadas para ambientales y niveles guías para la protección de la biota acuática. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Tabla 8: % de neonatos muertos de *D. magna* en ensayo de recuperación.

Tabla 9: % de neonatos muertos de *C. dubia* en ensayo de recuperación.

Tabla 10: Resultados de Análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para sobrevivencia, fecundidad y número de mudas de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuesta a 4 formulaciones de glifosato por un período de 15 días. ns: No

significativo; (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$), (-) si eventos reproductivos (Reno y col., 2016).

Tabla 11: Edad de la primera reproducción (días) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a 3 o 4 concentraciones de formulaciones comerciales de glifosato y el control durante 21 días. (n: número de hembras que alcanzaron la madurez sexual). (*) Diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$); - : sin reproducción.

Tabla 12: Tasa reproductiva neta (R_0) en 21 días de ensayo (test crónico) para cada uno de las concentraciones ensayadas para cada formulado y controles (Reno y col., 2016).

Tabla 13: Diferencias significativas en el número de cél. $m L^{-1}$ entre las diferentes muestras obtenidas en el proceso UV/ H_2O_2 y el control para cada uno de los formulados evaluados. **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: no se observaron diferencias significativas con el control; $^{(+)}$: se observaron diferencias significativas y el número de cél. mL^{-1} de la muestra fue mayor al del control.

Tabla 14: % de inhibición (% I) para cada una de las muestras obtenidas en el proceso UV/ H_2O_2 y los diferentes formulados evaluados. $X^{(+)}$: indica $>$ % de cél. mL^{-1} en la muestra M_x que en el control (Reno y col., 2016).

Tabla 15: Porcentaje de inhibición (I %) en la muestra M_3 y en la concentración más cercana usada en los ensayos de inhibición realizados con los formulados sin tratar (Reno y col., 2016).

Tabla 16: Mortalidad (%) de *C. dubia* y *D. magna* en la muestra M_3 (mayor tiempo de degradación) para los cuatro formulados de glifosato evaluados.

Tabla 17: 48h- CL_{50} para las tres especies en los ensayos de agudos con Eskoba[®] y Mortalidad (%) en M_3 (Reno y col., 2015).

Tabla 18: 48h- CL_{50} para las tres especies en los ensayos de agudos con Sulfosato Touchdown[®] y Mortalidad (%) en M_3 (Reno y col., 2015).

Tabla 19: 48h- CL_{50} para las tres especies en los ensayos de agudos con Roundup Ultramax[®] y Mortalidad (%) en M_3 .

Tabla 20: 48h- CL_{50} para las tres especies en los ensayos de agudos con Panzer Gold[®] y Mortalidad (%) en M_3 .

Tabla 21: Comparación entre la concentración del principio activo de diferentes formulados con glifosato y su toxicidad 96h-EC₅₀ (mg L⁻¹), para distintas especies de *Chlorella* según diversos autores.

Tabla 22: Comparación de la toxicidad del glifosato (N- fosfometil glicina), las formulaciones comerciales y los tensioactivos o coadyuvantes comerciales más comunes.

CAPÍTULO II: *Chlorella vulgaris*: Usos y aplicaciones

Tabla 23: Concentraciones reales de glifosato, % de remoción y absorbancia a 650 nm para cada tiempo de exposición (T1: 120; T2: 240 y T3: 360 min) en el ensayo de remoción de glifosato con *C. vulgaris*.

Tabla 24: Caracterización físico-química de efluentes de producción láctea y porcina.

Tabla 25: Caracterización físico-química del efluente puro y del sobrenadante obtenido al inicio y al final del ensayo, al cultivar *C. vulgaris* en medio con 25% de efluentes de producción láctea (tambo).

Tabla 26: Caracterización bioquímica del liofilizado de *C. vulgaris*.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Contexto ambiental. Uso de plaguicidas y la Ecotoxicología como herramientas de análisis para el control y monitoreo ambiental. Bioensayos como herramientas para evaluar procesos de remediación ambiental.

Figura 1: *Chorella vulgaris* (A: aumento microscopio óptico: 40X; B: aumento microscopio óptico: 100X)

Figura 2: *Ceriodaphnia dubia* (aumento microscopio óptico: 10X)

Figura 3: *Daphnia magna* (aumento microscopio óptico: 4X)

Figura 4: Formulas químicas de las sales de glifosato que componen cada uno de los formulados utilizados en esta tesis. A: sal de isopropilamina. B: sal de dimetilamina. C: sal monoamónica. D: sal potásica.

Figura 5: Esquema en forma de grafio del modelo de matriz poblacional: N: Neonato; J: Juveniles; A: Adultos; σ : desvió estándar. A: matriz optimista; B: matriz pesimista.

Figura 6: Matriz poblacional: A: matriz optimista; B: matriz pesimista.

Figura 7 A: Esquema del dispositivo experimental (extraído de Reno y col., 2015)

Figura 7 B: Fotografía utilizado para realizar el proceso UV/H₂O₂.

Figura 8: Variaciones en la densidad de células (número de cél. mL⁻¹) durante el ensayo de inhibición de crecimiento para evaluar la toxicidad de la formulación de glifosato, Sulfosato Touchdown[®]. Control (sin glifosato): 0,75 (C1), 1,5 (C2), 3,12 (C3), 6.25 (C4), 12,5 (C5), 25 (C6), y 50¹ (C7) mg a.e L⁻¹. * Diferencias significativas entre control y tratamientos (Reno y col., 2016).

Figura 9: Flóculos de *C. vulgaris* a concentraciones de 1,5 mg a.e L⁻¹ de glifosato (formulado Sulfosato Touchdown[®]) a las 48 h.

Figura 10: Flóculos de *C. vulgaris* a concentraciones de 3,12 mg a.e L⁻¹ de glifosato (formulado Sulfosato Touchdown[®]) a las 48 h.

Figura 11: Supervivencia (%) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. (10 réplicas por tratamiento y control).

Figura 12: Fecundidad (Nº de Neonatos) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento y control).

Figura 13: N° de mudas de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento y control).

Figura 14: Huevos de *D. magna* sin eclosionar, registrados en el ensayo con Panzer Gold® (40X).

Figura 15: Huevo de resistencia de *D. magna*, registrado en el ensayo con Panzer Gold® (40X).

Figura 16: Variaciones en la densidad celular (cél. mL⁻¹) a las 96 h con respecto a la evolución de glifosato para los diferentes tiempos de reacción (M₀ a M₃, del proceso UV/H₂O₂). Muestra M₀ correspondiente a 50 mg a.e. L⁻¹ de glifosato sin H₂O₂; M₁, M₂ y M₃: 120, 240 y 360 min, respectivamente, con eliminación del H₂O₂ residual. A) Eskoba®; B) Panzer Gold®; C) Sulfosato Touchdown® y D) Roundup Ultramax®. Columnas: densidad celular (cél. mL⁻¹). Círculos blancos: concentración de glifosato. Las barras de error representan el error estándar (Reno y col., 2016).

CAPÍTULO II: *Chlorella vulgaris*: Usos y aplicaciones

Figura 17: Ensayo de remoción de glifosato por *C. vulgaris*

Figura 18 A: Salida de los galpones donde el ganado vacuno descansan luego de pasar por la rutina de ordeño.

Figura 18 B: Sitio donde se tomó la muestra de purines vacunos para evaluar el potencial de *C. vulgaris* para remover nutrientes.

Figura 19: Primer sitio de disposición de efluentes.

Figura 20: Segundo sitio de disposición de efluentes donde es retenida la fracción líquida que no fue mezclada con la fracción sólida y es esparcida como abono.

Figura 21: Cultivo de *C. vulgaris* en fotobioreactor.

Figura 22: Cultivo de *C. vulgaris* en fotobioreactor, en el interior de una cámara de cultivo.

Figura 23: Pellet húmedo de *C. vulgaris* (A) y liofilizado (B).

Figura 24: Evolución de la concentración real de glifosato (mg e.a L⁻¹) y el % de remoción en diferentes tiempos de exposición: T₀: inicio del ensayo; T₁, T₂ y T₃ = 120, 240, 360 min respectivamente. A) Panzer Gold®; B) Eskoba®; C) Roundup Ultramax® y D) Sulfosato Touchdown®.

Figura 25 A: Crecimiento de cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de efluentes de producción láctea (tambo).

Figura 25 B: Crecimiento de cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de efluentes de producción láctea (tambo)

Figura 26: Cinética de crecimiento de cultivo de *C. vulgaris* al 25% de efluente de la producción láctea (tambo).

Figura 27: Cinética de crecimiento de cultivo de *C. vulgaris* en fotobioreactor de 10 L.

ABREVIATURA Y SIMBOLOS

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (siglas en ingles).

EPSP: enol-piruvil shikimato fosfato.

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes.

CIAFA: Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

PAOs: Procesos Avanzados de Oxidación.

2,4-D: Acido 2,4-diclorofenoxiacético.

CLV2: cepa de *Chorella vulgaris*.

Abs: Absorbancia.

CICESE: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

BBM: Medio Basal (siglas en ingles).

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

UNL: Universidad Nacional del Litoral.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (siglas en ingles).

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (siglas en ingles).

ISO: Organización Internacional de Normalización (siglas en ingles).

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (siglas en ingles).

ANOVA-MR: Análisis de la varianza con medidas repetidas.

OD: Oxígeno Disuelto.

APHA: American Public Health Association.

MMP: Modelo de Matriz Poblacional.

INEDES: Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable.

ANOVA: Analysis of Variance (siglas en ingles).

INTEC: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química.

ED: perjuicios ecosistémicos (siglas en ingles).

DBO: Demanda Biológica de Oxigeno.

DQO: Demanda Química de Oxigeno.

μ : Tasa de Crecimiento.

ITA: Instituto de Tecnología en Alimento

I. RESUMEN

En el Capítulo I de esta tesis se explica el desarrollo de ensayos ecotoxicológicos que se realizaron para: 1) evaluar la posible toxicidad aguda y crónica de cuatro formulaciones con glifosato mediante respuestas en la tasa de crecimiento, el porcentaje de inhibición, la supervivencia y la reproducción de especies de diferente nivel trófico (microalgas: *Chlorella vulgaris* y microcrustáceos: *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*; 2) conocer cómo influyen las diferentes sales utilizadas en las formulaciones en la toxicidad de las muestras tratadas con el proceso UV/H₂O₂; 3) establecer en qué condiciones del tratamiento con el proceso UV/H₂O₂ los efluentes dejan de ser tóxicos mediante la realización de bioensayos con *C. vulgaris* y con dos especies de crustáceos cladóceros: *D. magna* y *C. dubia*; 4) generar información relevante a partir de ensayos de recuperación con cladóceros. Los ensayos de inhibición de crecimiento algal fueron de 96 h, mientras que los agudos con microcrustáceos fueron de 48 h.

Los ensayos de recuperación tuvieron una duración de 15 días, y consistieron en la evaluación de los organismos que sobrevivieron a los ensayos agudos, considerando como puntos finales: supervivencia, crecimiento y fecundidad. Con los datos obtenidos se elaboraron modelos de matrices poblacionales. Estas matrices fueron utilizadas para realizar un estudio de simulación de Monte Carlo. Los ensayos crónicos con cladóceros tuvieron una duración de 21 días, considerando los siguientes puntos finales: supervivencia, fecundidad, madurez sexual, crecimiento y la tasa reproductiva neta (R₀) para cada cohorte.

Para evaluar la toxicidad de las muestras tomadas luego de aplicar el proceso UV/H₂O₂ en diferentes tiempos (120, 240 y 360 min), se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de 96 h con *C. vulgaris*. En el caso de *D. magna* y *C. dubia* los ensayos fueron estáticos de 48 h.

Los resultados obtenidos a partir de estas pruebas mostraron que la toxicidad de las presentaciones comerciales de agroquímicos varía según los componentes que lo conforman y la especie utilizada como organismo de prueba. Además, se destaca la importancia de realizar ensayos crónicos y especialmente de recuperación que permitan una evaluación ambiental donde se incluyen parámetros biológicos integradores con sentido ecológico.

En relación con la evaluación del proceso UV/H₂O₂, en el mayor tiempo de reacción (360 min), no se alcanzó el 50% de inhibición del crecimiento de *C. vulgaris* en ninguno de los formulados. Contrariamente la evaluación del proceso con microcrustáceos mostró

que en el mismo tiempo de reacción, en dos de los formulados evaluados (Eskoba[®] y Roundup Ultramax[®]) la especie más sensible y representativa de la región (*C. dubia*) alcanzó 60 y 80 % de mortalidad respectivamente.

La evaluación del proceso UV/H₂O₂ mostró la importancia de realizar ensayos de toxicidad con especies representativas de la región donde se podrían aplicar este tipo de tecnologías. En este sentido, la información aportada por este trabajo en cuanto a la toxicidad de las presentaciones comerciales de glifosato y la aplicación de nuevas tecnologías que permitan una gestión adecuada de los residuos generados por estos compuestos, podría ser utilizada por organismos nacionales de planificación y control para contribuir a disminuir la brecha existente entre el uso masivo de plaguicidas y la falta de información sobre la toxicidad de las formulaciones en la región centro-este de Argentina.

Los datos generados a partir de la evaluación del proceso UV/H₂O₂ se utilizaron para realizar los ensayos del Capítulo II de la presente tesis. En este Capítulo se expone el uso de *C. vulgaris* como organismo para: 1) remover glifosato utilizando los mismos formulados de empleados en la aplicación del proceso UV/H₂O₂ y desarrollado en el Capítulo I; 2) la remoción de nutrientes presentes en efluentes provenientes de producción láctea y porcina y conocer la concentración de clorofila-a y el porcentaje de proteínas brutas en la biomasa algal obtenida en ambos efluentes; 3) evaluar bioquímicamente la calidad de la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cultivos a escala de fotobioreactores.

Se seleccionaron tres tiempos de exposición para evaluar la eficiencia de remoción de glifosato con *C. vulgaris*: T₀= inicio del ensayo; T₁; T₂ y T₃= 120, 240 y 360 min. respectivamente. Las concentraciones reales iniciales fueron: 9,65; 8,65; 7,35 y 0,78 mg e.a L⁻¹ de Eskoba[®], Panzer Gold[®], Roundup Ultramax[®], Sulfosato Touchdown[®], respectivamente.

Por otro lado, se cultivó a *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de efluentes de la producción láctea (tambo) y porcina (parideras). Para evaluar la capacidad de remediación de *C. vulgaris* cultivada en este tipo de efluentes, al inicio y final del ensayo se determinaron en el sobrenadante obtenido post centrifugación, las siguientes variables: amonio, nitritos, nitratos, fósforo total, DBO, DQO, pH y conductividad. Además en el pellet se cuantificó la cantidad de clorofila-a y el % de proteínas brutas.

La misma cepa de *C. vulgaris* fue cultivada en fotobioreactor, con el objetivo de obtener mayor biomasa que permitiera realizar las siguientes determinaciones: cantidad de

nitrógeno total, proteínas brutas, fibras, carbohidratos y lípidos.

En cuanto a los resultados del Capítulo II, en lo que se refiere al % de remoción de glifosato, *C. vulgaris* removió más glifosato cuando fue expuesta durante 360 min al formulado Eskoba[®] (11,22 %).

Por otro lado, *C. vulgaris* tiene poca capacidad de remover glifosato de soluciones acuosas, por lo que en el caso de considerar complementar el proceso UV/H₂O₂ con un etapa de bioremediación, es recomendable utilizar otros microorganismos, tales como bacterias, cianobacterias o bien extender la aplicación del proceso UV/H₂O₂.

Por otro lado, cuando *C. vulgaris* fue cultivada en medio de cultivo con 25 % de efluente de tambo alcanzó el máximo crecimiento, reduciendo la mayoría de los parámetros analizados y con valores de clorofila-a y proteínas de: 1,68 µg L⁻¹ y 3,75 %, respectivamente en la biomasa obtenida.

Cuando *C. vulgaris* se cultivó en fotobioreactor sin efluentes, la biomasa tuvo la siguiente composición bioquímica: 7,5; 3,28; 7,11; 44,43; 0,20 % de carbohidratos, lípidos, nitrógeno, proteínas brutas, fibra, respectivamente y 1,26 µg L⁻¹ de Clorofila-a.

Los valores de remoción registrados cuando *C. vulgaris* fue cultivada con efluentes de tambo, fueron similares a los relevados en la bibliografía especializada, lo que muestra la capacidad y potencialidad de *C. vulgaris* para este uso. Por otro lado, cuando *C. vulgaris* se cultivó en un fotobioreactor, el % de proteína aumentó a 44,43 %. Este resultado es promisorio dado que la biomasa obtenida de cultivos de *C. vulgaris*, puede ser un producto de interés para diferentes usos, tales como en la industria alimenticia o cosmética.

II. SUMMARY

Chapter I of this thesis explains the development of ecotoxicological tests that were carried out to: 1) evaluate the possible acute and chronic toxicity of four formulations with glyphosate by the responses in growth rate, percent inhibition, survival and (microalgae: *Chlorella vulgaris* and microcrustaceans: *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*; 2) to know how the different sales used in formulations affect the toxicity of the samples treated with the UV/H₂O₂ process; 3) to establish in what conditions of the treatment with the UV/H₂O₂ process the effluents cease to be toxic by conducting bioassays with *C. vulgaris* and with two species of cladoceran crustaceans: *D. magna* and *C. dubia*; 4) generate relevant information from recovery trials with

cladocerans. Algal growth inhibition test lasted 96 h, while microcrustacean's acute bioassays lasted 48 h.

Recovery 15-days tests were performed with the specimens that survived the acute test, considering as endpoints: survival, growth and fertility.

With the population data obtained, models matrices were developed. These matrices were used for a study of Monte Carlo simulation. Chronic bioassays with cladocerans lasted 21 days, considering for each cohort, the following endpoints: survival, fertility, sexual maturity, growth and net reproductive rate (R_0).

To evaluate the toxicity of samples taken at different times (120, 240 y 360 min) of the process UV/H₂O₂, 96 h-algal growth inhibition test with *C. vulgaris* were done and 48 h-static tests with *D. magna* and *C. dubia* as biological models were performed.

The results obtained from these tests showed that the toxicity of the agrochemicals commercial formulations varies in relation with the components that have, and with the species used as test organisms. The importance of performing chronic tests, specially recovery ones considering integrative biological parameters that add information for an environmental assessment is highlighted.

Regarding the evaluation of the process UV/H₂O₂, in the longer reaction time (360 min), in any of the formulations tested was reached the 50% growth inhibition of *C. vulgaris*. By contrast, the evaluation through microcrustaceans showed that in the same reaction time of the process, in two of the formulations evaluated (Eskoba[®] and Roundup Ultramax[®]) *C. dubia* (the local species tested) showed 60 and 80% mortality respectively.

The evaluation of the UV/H₂O₂ process showed the importance of performing toxicity tests with species representative of the region where these technologies are applied. In this sense, the information provided regarding the toxicity of commercial formulations of glyphosate and the application of new technologies to enable proper management of waste generated by these compounds could be used by national planning and control, to help to reduce the gap between the massive use of pesticides and the lack of information on the toxicity of the formulations in the center-east region of Argentina.

The data generated from the evaluation of the UV/ H₂O₂ process were used to carry out the tests of Chapter II of the present thesis. This chapter discusses the use of *C. vulgaris* as an organism to: 1) remove glyphosate using the same formulations used in the application of the UV/H₂O₂ process and developed in Chapter I; 2) the removal of nutrients present in effluents from dairy and pig production and to know the

concentration of chlorophyll-a and the percentage of crude protein in the algal biomass obtained in both effluents; 3) to evaluate biochemically the quality of the biomass of *C. vulgaris* obtained in cultures at the scale of photobioreactors.

Three exposure times were selected to assess the removal efficiency of glyphosate with *C. vulgaris*: T_0 = start of the test; T_1 ; T_2 y T_3 = 120, 240 y 360 min. respectively. The initial measured glyphosate concentrations were: 9.65; 8.65; 7.35 and 0.78 mg a.e L⁻¹ Eskoba[®], Panzer Gold[®], Roundup Ultramax[®], Sulfosato Touchdown[®], respectively.

Furthermore, *C. vulgaris* was grown at different concentrations of effluents of dairy industry (dairy farms) and of pig production. To assess the remediation ability of *C. vulgaris* cultivated in such effluents, at the beginning and the end of the test, the following variables were registered in the supernatant obtained after centrifugation: ammonia, nitrites, nitrates, total phosphorus, BOD; COD; pH and conductivity. Also, chlorophyll-a and % crude protein were measured in the pellet

The same strain was cultured in *C. vulgaris* photobioreactor to obtain higher biomass that would allow the following determinations: amount of total nitrogen, crude protein, fiber, carbohydrates and lipids.

Chapter II results shows that *C. vulgaris* removed more glyphosate when it was exposed for 360 min to Eskoba[®] formulation (11.22%).

Chlorella vulgaris has little ability to remove glyphosate from aqueous solutions, so in the case of considering bioremediation as a complement of the UV/H₂O₂ process, is advisable to use other microorganisms such as bacteria, cyanobacteria or to extend the application of the UV/H₂O₂ process.

On the other hand, when *C. vulgaris* was grown in culture medium with 25% of dairy effluent, it reached maximum growth, reducing the analyzed parameters: chlorophyll-a (1.68 mg L⁻¹) and protein (3.75%) in the biomass obtained.

When *C. vulgaris* was cultures in a photobioreactor without effluent, the biomass obtained had the following biochemical composition: 7.5; 3,28; 7.11; 44.43; 0.20% carbohydrates, lipids, nitrogen, crude protein, fiber, respectively and 1.26 mg L⁻¹ of chlorophyll-a.

The values recorded after culturing *C. vulgaris* in dairy farm effluents, were similar to those surveyed in the literature, which shows the capacity and potential of *C. vulgaris* for this use. On the other hand, when *C. vulgaris* was grown in a photobioreactor, the protein concentration increased to 44.43 %. This result is promising since the biomass obtained

from cultures of *C. vulgaris* may be a product of interest for different uses, such as in the food or cosmetics industry

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

El incremento demográfico de las últimas décadas y la demanda creciente de alimentos a nivel mundial determinaron un importante incremento de la superficie de las aéreas cultivables y llevó a que la agricultura se convierta en una actividad de alta tecnología. Esta transformación trajo aparejada la adopción de cultivos genéticamente modificados resistentes a herbicidas de amplio espectro, tales como el glifosato (Salazar, 2010; Heinemann y col., 2013).

Las propiedades herbicidas del glifosato se descubrieron en el año 1974 y desde entonces se produjo la introducción comercial de formulaciones (Franz, 1974; Franz y col., 1997, Monsanto, 2015). En el año 2000 expiró la patente, lo que determinó la aplicación de volúmenes cada vez mayores y que más de 40 empresas comercialicen distintas formulaciones que tienen al glifosato como principio activo (Duke y Powles, 2008).

La presencia de glifosato en cuerpos de agua dulce superficial de Argentina fue reportada por diferentes autores: Ronco y col., 2008; Peruzzo y col., 2008; Aparicio y col., 2013; Primost 2013; Lupi y col., 2015; Ronco y col., 2016, lo que demuestra que este compuesto puede ingresar a los ecosistemas acuáticos.

En la bibliografía se informan diferentes efectos del glifosato como principio activo sobre especies acuáticas; sin embargo las presentaciones comerciales contienen diversos coadyudantes en distintas concentraciones porcentuales, generando una gran cantidad de formulaciones en uso. Por otro lado, en las hojas de seguridad de los productos son muy escasos los datos ecotoxicológicos, lo que lleva a una falta de información sobre los efectos de las formulaciones comerciales de glifosato en especies no blanco.

Otro de los problemas ambientales que surgió a partir de la transformación de la actividad agrícola, fue la eliminación de los desechos de los herbicidas y de envases vacíos de fitosanitarios sin triple lavado (SENASA, 2010).

Recientemente, Argentina cuenta con la ley 27279/16, *“que establece los presupuestos mínimos de protección ambiental para la gestión de los envases vacíos de fitosanitarios, en virtud de la toxicidad del producto que contuvieron, requiriendo una gestión diferenciada y condicionada”*. Si bien la ley menciona el concepto de responsabilidad extendida y compartida*, la misma no menciona qué procesos se deben implementar con los envases de fitosanitarios que no tengan triple lavado o que contengan remanentes de producto y lleguen a los centros de acopios transitorios.

* Responsabilidad extendida y compartida: Entendida como el deber de cada uno de los registrantes de responsabilizarse objetivamente por la gestión integral y su financiamiento, respecto a los envases contenedores de los productos fitosanitarios puestos por ellos en el mercado nacional y sus consecuentes envases vacíos. En el cumplimiento de dicho deber, se deberán tener en cuenta el ciclo de vida del envase y el respeto por la jerarquía de opciones. Dicha responsabilidad será compartida con los restantes eslabones de la cadena de gestión en la medida de las obligaciones específicas que les impone la presente ley.

Respondiendo a esta necesidad, en la actualidad existen tecnologías como los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) que permiten el tratamiento de agua contaminada. La aplicación de estos procesos lleva a que en muchos casos no se alcance la total mineralización de los compuestos en tiempos y costos eficientes; en este contexto en esta tesis se propusieron a los ensayos ecotoxicológicos con especies bioindicadoras (Holt y Miller, 2010), como herramientas de gestión ambiental para la evaluación de la eficiencia de estos mismos procesos.

Por otro lado, una de las formas de llegar a la total mineralización de los compuestos orgánicos en los procesos químicos y reducir costos, es complementarlos con tratamientos biológicos (Marco y col., 1997; Zhang y col., 2014), como pueden ser los sistemas “bacterianos-algáceos” por ejemplo, con microalgas, también considerados en la presente tesis.

A partir de lo anteriormente expuesto e intentando generar conocimientos que permitan dar respuesta a los problemas socio-ambientales que derivan del uso de agroquímicos en la Argentina y el mundo, esta tesis tiene como objetivos generales: 1) determinar la toxicidad del glifosato o sus formulados en especies de diferente nivel trófico (microalga y microcrustáceos) y evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂ para disminuir la toxicidad de agua contaminada con este herbicida; 2) evaluar a escala de laboratorio el potencial de una matriz biológica constituida por la microalga *Chorella vulgaris* como complemento de tratamiento del proceso UV/H₂O₂; remediar efluentes que pueden causar contaminación orgánica y evaluar bioquímicamente la biomasa obtenida en estos procesos.

Esta tesis posee dos capítulos y cada uno de ellos consta de: introducción, objetivos, hipótesis, materiales, métodos, resultados y discusión. En el Capítulo I se analiza el contexto ambiental, abordando la problemática del uso creciente de plaguicidas en el país y el mundo y se proponen a los ensayos ecotoxicológicos agudos, de recuperación y crónicos como herramientas de análisis para el control, monitoreo y gestión ambiental. El Capítulo II aborda los diferentes usos y aplicaciones de *C. vulgaris*, entre ellos el uso de la microalga para la remediación de glifosato. Finalmente, a partir de lo expuesto en ambos capítulos, se entregan las conclusiones de la presente tesis.

IV. CAPÍTULO I

Contexto ambiental. Uso de plaguicidas y la Ecotoxicología como herramientas de análisis para el control y monitoreo ambiental. Bioensayos como herramientas para evaluar procesos de remediación ambiental.

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **HIPÓTESIS**
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- **RESULTADOS**
- **DISCUSIÓN**

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas generan una variedad de desechos que finalmente son liberados al ambiente, ocasionando desequilibrios en los ecosistemas cuando la cantidad y calidad de los mismos superan su capacidad de recuperación. Estas alteraciones, que fueron registradas a distintas escalas espaciales y temporales han llevado a que la contaminación ambiental se convierta en una de las problemáticas actuales prioritarias a nivel local, regional e incluso global (Malacalza, 2013).

Este trabajo de tesis hará foco en la contaminación del recurso acuático. El agua es elemento vital, esencial e insustituible para la vida de toda especie viva, que junto con el aire y el sol, son indispensables e irremplazables en nuestro planeta. Su carácter imprescindible hace del agua un bien común, de cuyo acceso no debería excluirse a nadie. Por tanto su disponibilidad, acceso y calidad deberían ser no sólo salvaguardados sino promovidos y su conservación responsabilidad colectiva. Así, el agua pertenece al ámbito de los derechos – y, por lo tanto, de los deberes humanos-. El agua en tanto elemento indispensable, cruza todas las labores humanas porque disponer y acceder a agua de buena calidad es necesario para la vida y por ende, para la salud humana (ONU, 2011).

El informe de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) de 2014, estimó que la población mundial aumentará de 7.200 millones a 8.100 millones en 2025, registrándose la mayor parte de ese crecimiento en los países en desarrollo. El aumento de la población mundial genera una necesidad creciente de alimentos que, a su vez, presiona sobre los recursos naturales: más tierras y agua son necesarias para generar alimentos. Según las perspectivas de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), para el año 2030 la cantidad de cereales producidos en el mundo llegará a 2.838 millones de toneladas.

Sobre la base de cifras proporcionadas por la FAO, Argentina tiene 31 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura, que representan el 2,2% de la superficie total mundial de cultivo, ubicándose luego de Estados Unidos, India, Rusia, China, Brasil y Australia (Aparicio y col., 2013).

La producción de granos en Argentina se ha incrementado tanto en superficie cultivada como en rendimientos. Desde que hay registros, en la campaña 1970-1971 la superficie sembrada fue de 19.411.550 ha y en la campaña 2012-2013 alcanzó las 35.965.843 ha, lo que representa un incremento del 185,3% de superficie sembrada. Con respecto a los rendimientos, el incremento fue de un 416,4% pasando de 22.498.308 T a 103.796.664 T

en igual período de tiempo (SIIA, 2014). Si desglosamos la producción de granos en cereales y oleaginosas, el cambio fue significativo, observándose actualmente un predominio de superficie sembrada con oleaginosas. Por ejemplo, si comparamos las campañas 1970-1971 y 2012-2013 se observa que el porcentaje de superficie sembrada con oleaginosas aumentó de un 8,5% a 60,3% mientras que, en el caso de los cereales, disminuyó de 64,8% a 29,1%. Este cambio se debe en gran medida a la adopción de un paquete tecnológico que involucra el sistema de siembra directa y semillas genéticamente modificadas resistente a herbicidas (INTA, 2015).

En este contexto de aumento de la productividad, se generalizó el uso de agroquímicos para el control de malezas y plagas. En Argentina, el barbecho químico aplicado en la siembra directa, el uso masivo de semillas genéticamente modificadas resistentes al herbicida glifosato (N-fosfonometil glicina) y el amplio uso del mismo, produjo un aumento constante de la producción y consumo de formulaciones que tienen como principio activo al glifosato (Pengue, 2001, Santadino y col., 2014). Este herbicida además se utiliza en silvicultura, en huertas familiares y en el ambiente urbano, tales como espacios verdes de uso público.

El glifosato se clasifica como un inhibidor de la EPSP (enol-piruvil shikimato fosfato) sintetasa (Mallory-Smith y Razinger, 2003), enzima que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en vegetales.

Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) y la Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos (CIAFA) (INTA, 2015) el glifosato representa el 65% (182.484.206 L) del total de los agroquímicos comercializados (281.652.245 L).

Si se analiza la variación del mercado del glifosato en los últimos años, puede observarse que tuvo un aumento del 24% en la facturación y que se emplean concentraciones cada vez mayores: las concentraciones al 48 %, aumentaron un 39% en facturación y un 14% en volumen, en comparación con la disminución del 10% y del 33% respectivamente de los formulados de menor concentración (INTA, 2015).

Los ambientes acuáticos son considerados actualmente sistemas que están integrados a las actividades antrópicas que lo modifican y que dependen del mismo para el sostenimiento de la vida. Éstos son impactados debido a la introducción de contaminantes de diferente origen a través de diversas vías, entre ellas podemos mencionar la recepción de efluentes cloacales e industriales y agua de lavado de zonas

expuestas a contaminación, que modifican su composición y en este sentido su calidad para diferentes usos y/o aplicaciones (Lopretto y Tell, 1995).

El glifosato puede ingresar a los cuerpos de agua por el lavado de envases, por pulverizaciones directas sobre ríos, lagunas o arroyos y por escurrimiento posterior a las lluvias (Romero y col., 2011). Es amplia la bibliografía sobre el efecto del glifosato en especies de biota acuática (Vendrell y col., 2009; Demetrio, 2012; Cuhra y col., 2013). Sin embargo, poco se sabe de la toxicidad del principio activo y de los coadyuvantes agregados al mismo.

En las formulaciones comerciales de herbicidas, está generalmente presente la descripción de la sal de glifosato que lo integra, pero estos productos también incluyen sustancias tensioactivas para facilitar la movilización del glifosato a través de la cutícula cerosa del follaje de las plantas, así como otros ingredientes menores (OMS, 1994). Aunque estos ingredientes se clasifican normalmente como "inertes", está ampliamente documentado que algunos pueden ser más tóxicos que los herbicidas con los que se utilizan (Dorn y col., 1993; Tsui y Chu, 2003; Brausch y Smith (2007); Piola y col., 2013).

Si bien el tema ha recibido alguna atención a nivel mundial, la gran mayoría de las investigaciones evaluaron los efectos del Roundup[®] (Tsui y Chu, 2004; Cedergreen y Streibig, 2005; Raipulis y col., 2009; Sáenz y Di Marzio 2009; Papchenkova y col., 2009; Polleta y col., 2009; Vera y col., 2010; Dutra y col., 2011; Lajmanovich y col., 2011; Cuhra y col., 2013; De Souza y col., 2016; Guerrero Schimpf y col., 2016), pero no evaluaron una gran cantidad de nuevas formulaciones que en los últimos años se incorporaron masivamente en la industria agrícola.

La Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) en 2013 y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en su registro de fertilizantes, enmiendas y otras, describen de 32 a 364 formulaciones que tienen al glifosato como principio activo respectivamente, en diferentes concentraciones, tipos de sales (isopropilamina, dimetilamina, monoamónica, potásica y amónica) y clases toxicológicas (II, III y IV, según la resolución N°302/2012 del SENASA)

Por otro lado, el glifosato recientemente fue reclasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (OMS, 2015) en el grupo 2A como probablemente cancerígeno para el ser humano, situación que también intensificó el estudio de sus posibles efectos en distintos organismos no-blanco. En este sentido, en la región se realizaron numerosos estudios que evaluaron el efecto del glifosato o de los plaguicidas

en especies no-blanco. Entre ellos, cabe citar a, Simoniello y col., 2008 y 2010, Poletta y col., 2012. Los mencionados autores realizaron estudios en las poblaciones humanas directa e indirectamente expuestas a pesticidas y mezclas, analizando genotoxicidad y el estrés oxidativo que pueden causar estos compuesto. Por otro lado, Lajmanovich y col., 2003; Poletta y col., 2011; López González y col., 2013; Gagneten y col. 2014; Sanchez y col., 2014; Attademo y col., 2014; Lajmanovich y col., 2015; Varayoud y col., 2016, trabajaron evaluando el efecto del glifosato o sus formulaciones comerciales en diferentes modelos biológicos (microcrustáceos, anfibios, reptiles y ratas).

La presencia de plaguicidas en los sistemas acuáticos puede generar escenarios de contaminación aguda o difusa, con consecuencias negativas sobre organismos no-blanco. Por otro lado, han sido reportado numerosos efectos de toxicidad aguda del glifosato o sus formulaciones (Tsui y Chu, 2003; Cox, 2004; Kitulagodage y col., 2008; Pereira y col., 2009; Piola y col., 2013), pero poco se conoce sobre cómo responden los organismos después de ser expuestos al glifosato en ambientes naturales.

En las hojas de seguridad de los formulados comerciales se reportan pruebas de toxicidad aguda de 48 o de 72 h, resultados que derivan de evaluar sólo la mortalidad. Estas evaluaciones pueden llevar a conclusiones engañosas acerca de los reales efectos de los agroquímicos (Hua y Relyea, 2014). Sin embargo hay un reconocimiento creciente acerca de la importancia de conocer los efectos subletales que tienen los contaminantes sobre las especies no-blanco (Antón y col., 1993; Venkateswara Roa y col., 2003; Spurgeon y col., 2004; Santadino, y col., 2014), que permitiría desarrollar valores guías para estos compuestos más precisos y orientados a la protección de la biota acuática.

En este sentido, los modelos matemáticos poblacionales surgen como una herramienta que permite detectar efectos subletales, sobre todo a nivel poblacional. Éstos son muy útiles sobre todo para aplicar a poblaciones que en su ciclo de vida tienen varios estadios, o en los que es posible reconocer estructura de edades, por lo que se han usado en ensayos toxicológicos en los cuales es posible cuantificar los organismos que se encuentran en cada una de las etapas del ciclo de vida (Chaparro y Canziani, 2010; Santadino y col., 2014). Los modelos poblacionales matriciales son herramientas poderosas y útiles para el estudio de dinámicas poblacionales, con aplicaciones en la ecología, epidemiología y demografía (Caswell, 2001); permiten, entre otras cosas, detectar qué parámetros demográficos son más sensibles a un efecto tóxico y cuáles influyen en mayor medida en la supervivencia futura de la población.

Por otro lado, muy frecuentemente en los sistemas naturales se encuentran concentraciones bajas de plaguicidas que pueden estar por debajo de los niveles guía permitidos o resultar inocuas para los organismos en el corto plazo. Sin embargo es de suma importancia conocer los posibles efectos que causan concentraciones bajas y ambientalmente relevantes en el largo plazo, sobre poblaciones de organismos no-blanco. En el caso de que las mismas hayan estado expuestas durante un período de tiempo lo suficientemente prolongando, pueden registrarse efectos subletales en atributos de historia de vida y parámetros poblacionales tales como la sobrevivencia, el crecimiento, la fecundidad y la madurez sexual, que son indicadores de la estabilidad de una población y de su capacidad potencial para mantenerse en el tiempo en los ecosistemas (Rand y col., 1995).

Si bien el monitoreo químico es valioso porque proporciona información sobre la concentración de uno o más contaminantes en un lugar o tiempo determinados, no puede determinarse el comportamiento de la sustancia en el ambiente, los efectos sobre organismos, comunidades o ecosistemas (Schwarzenbach y col., 2006).

La relevancia ecológica de las pruebas ecotoxicológicas se pone en evidencia a la hora de evaluar los efectos de distintos xenobióticos sobre la complejidad biológica. En tal sentido, Da Silva y Soares (2010) destacan que la falta de comprensión sobre los posibles efectos ecológicos es un vacío que se debe cubrir en el corto plazo, si se desea proteger adecuadamente la salud ambiental.

Una forma de proteger la integridad ambiental al momento de realizar una evaluación de calidad ambiental es la utilización de baterías de ensayos multitróficas, empleando organismos de diferente nivel trófico -productores, consumidores- (Pablos y col., 2009, Castillo y col., 2000, Díaz Báez y Pérez, 2000, Ronco y col., 2000), porque permiten aproximarse al grado de toxicidad de un determinado xenobiótico y comparar el peligro potencial de efluentes cuando los efectos se presentan en diferentes niveles tróficos (Costan y col., 1993).

Además de la evaluación toxicológica que se puede realizar de las formulaciones o presentaciones comerciales de agroquímicos, uno de los problemas de contaminación más extendidos, es la eliminación de los desechos de los herbicidas, junto con los envases vacíos sin el triple lavado indicado por las buenas prácticas agrícolas (SENASA, 2010). La disposición inadecuada de estos residuos puede dar lugar a situaciones de contaminación en el suelo y en el agua (Huston y Pignatello, 1999).

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) son considerados tecnologías limpias para el tratamiento de aguas contaminadas. La acción de los PAOs se basa en la generación de radicales libres, principalmente el radical hidroxilo, que son no selectivos y se caracterizan por su poder altamente oxidante, lo que permite degradar contaminantes de muy variada naturaleza química. Luego del fluoruro, el radical hidroxilo es la especie oxidante más fuerte, y su generación puede ser lograda a través de diferentes mecanismos.

Los PAOs pueden ser clasificados como procesos homogéneos o heterogéneos, algunos ejemplos son: fotocatalisis heterogénea (TiO_2/UV), foto-Fenton homogéneo y heterogéneo, ozono con radiación UV (O_3/UV) y peróxido de hidrógeno en combinación con UV ($\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$).

El método $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ es uno de los más simples y menos costoso considerando la baja inversión inicial de capital. Ha sido usado con éxito en la remoción de contaminantes presentes en agua (Ikehata y Gamal-El Din 2006, Semitsoglou-Tsiapou y col., 2016). El radical hidroxilo se genera en la mezcla de reacción por fotólisis directa del peróxido de hidrógeno bajo la radiación UV a longitudes de onda menores a 300 nm.

Este proceso ha sido eficaz en la remoción de diferentes plaguicidas y de mezclas de plaguicidas de muy variada naturaleza química y de los más utilizados en nuestro país, tales como los herbicidas glifosato, 2,4-D y el insecticida clorpirifós (Manassero y col., 2010; Femia y col., 2013; Mariani y col., 2015).

Sin embargo, cuando se utilizan esta clase de procesos no siempre es posible alcanzar la total mineralización, al menos, dentro de tiempos y costos razonables. De esta manera, los compuestos intermediarios generados durante los procesos de degradación podrían ser igualmente o más tóxicos que el compuesto de origen.

Como alternativa, los bioensayos de laboratorio bajo condiciones controladas utilizando organismos bioindicadores (bioindicadores: especies, poblaciones o comunidades que se utilizan para evaluar la calidad del ambiente y cómo cambia con el tiempo (Holt y Miller, 2010) constituyen no sólo una muy importante primera aproximación para la evaluación de plaguicidas (Scott- Fordsmand y Weeks, 2000; Sánchez- Hernández, 2006) sino también para evaluar procesos de remediación (tales como el $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$). En este último caso, los test permiten reducir los costos de operación de los PAOs ya que permiten determinar cuándo un efluente tratado deja de ser tóxico, dado que no siempre es necesario alcanzar la degradación total de los contaminantes para obtener un efluente inocuo.

Por otro lado, estos organismos llamados “bioindicadores” deben ser abundantes, muy sensibles al estrés ambiental, identificables rápida y fácilmente, y bien estudiados en su ecología y ciclo biológico. En este sentido, diferentes taxa de invertebrados acuáticos pueden presentar respuestas únicas ante estresantes particulares. Dichas respuestas pueden ser consideradas como herramientas para evaluar las condiciones del sistema (Utz y col., 2009). También diferentes componentes de la comunidad fito y zooplanctónica son empleados como indicadores, reflejando situaciones tempranas de estrés ambiental (Gagneten y Paggi, 2009)

En este sentido, las microalgas por su condición de productores primarios permiten la entrada de energía al ecosistema, regulan las concentraciones de gases disueltos y tiene acción depuradora, son el alimento de otros organismos y participan en el mantenimiento del equilibrio en los cuerpos de agua tanto dulceacuícolas como marinos, por su participación en los ciclos biogeoquímicos del carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo y silicio (Knie y Lopes, 2004).

A su vez el zooplancton –la fracción animal del plancton- cumple un papel clave en los ecosistemas acuáticos, pues al alimentarse de microalgas y materia orgánica particulada y ser el principal alimento de larvas y peces zooplanctófagos (Oliveros, 1980; Escalante, 1982; Rossi 1992 y 2001), participa en la transferencia de materia y energía desde los productores hacia los niveles tróficos superiores. Por todo lo anteriormente expuesto, las el fito y el zooplancton están considerados entre los indicadores más importantes de las alteraciones del ambiente acuático medio. Entre los organismos zooplanctónicos, los cladóceros cumplen un importante papel en esta comunidad, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad de carácter universal (Díaz Baez y col., 2004).

Teniendo en cuenta las grandes extensiones rurales con cultivos genéticamente modificados, la enorme producción, el uso de herbicidas con base de glifosato en todo el mundo, es escaso el conocimiento en cuanto a los efectos ecotoxicológicos de las formulaciones comerciales de glifosato en organismos acuáticos. Por lo tanto es necesario generar mayor conocimiento sobre los efectos letales y subletales en especies no-blanco, que permitan realizar evaluaciones de riesgo más certeras y, a su vez, desarrollar tecnologías más limpias que permitan minimizar la contaminación ambiental promoviendo un desarrollo sustentable.

En el capítulo I de esta tesis se propuso, por un lado, trabajar con la evaluación ecotoxicológica a escala de laboratorio de diferentes formulaciones de glifosato, para posteriormente evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂, utilizando en todos los ensayos bioindicadores de sistemas acuáticos: una especie de microalga (*Chlorella vulgaris*) y dos especies de cladóceros (*Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*).

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la toxicidad del glifosato o sus formulados en especies de biota nativa y evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂ para disminuir la toxicidad de agua contaminada con este herbicida.

La información generada podrá ser utilizada para implementar medidas tendientes a la disminución del impacto de la contaminación con plaguicidas en sistemas acuáticos que atraviesan zonas de alta productividad agrícola.

Objetivos Específicos:

- 1- Evaluar la posible toxicidad aguda y crónica de cuatro formulaciones con glifosato mediante respuestas en la tasa de crecimiento, el porcentaje de inhibición, la supervivencia y la reproducción de especies de diferente nivel trófico (microalgas: *Chlorella vulgaris* y microcrustáceos: *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*).
- 2- Conocer cómo influyen las diferentes sales utilizadas en las formulaciones en la toxicidad de las muestras tratadas con el proceso UV/H₂O₂.
- 3- Establecer en qué condiciones del tratamiento con el proceso UV/H₂O₂ los efluentes dejan de ser tóxicos mediante la realización de bioensayos con *Chlorella vulgaris* y con dos especies de crustáceos cladóceros: *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*.
- 4- Generar información relevante a partir de ensayos de recuperación con cladóceros.

3. HIPÓTESIS

1. En los ensayos agudos, de recuperación y crónicos, los cuatro formulados de glifosato afectan negativamente a *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*.
2. Las diferentes sales de glifosato inciden en forma diferente sobre la toxicidad de las muestras tratadas con el proceso UV/H₂O₂.
3. Las muestras obtenidas al final de la aplicación del proceso UV/H₂O₂ en un sistema discontinuo son menos tóxicas para los cladóceros y la microalga, que las muestras obtenidas en tiempos intermedios.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Organismos de prueba y formulaciones con glifosato

Como modelos biológicos se utilizaron la microalga *Chlorella vulgaris* y los cladóceros *Ceriodaphnia dubia* y *Daphnia magna*.

Chlorella vulgaris (Beijerinck Novakova, 1890) (Figura 1, A y B) es una microalga unicelular (3-5 μ) perteneciente al Orden Chlorococcales, Clase Chlorophyta, considerada cosmopolita ya que fue registrada en diferentes partes del mundo, tanto en cuerpos de agua dulce como marinas (Richmond, 2000). La reproducción es exclusivamente asexual, cada célula madura se divide produciendo 4, 8 o rara vez 16 autoesporas esféricas. En los sistemas acuáticos, las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica. Las microalgas son de gran relevancia para los ecosistemas acuáticos, donde contribuyen al balance de oxígeno, y gracias a ellas, se inicia el flujo de energía en estos ecosistemas (Luna, 2007).

La utilización de las microalgas como indicadores ecotoxicológicos tiene sus orígenes en el análisis de la respuesta de microalgas planctónicas en cultivo, en particular especies muy conocidas como *C. vulgaris* (Vera, 2011), especie utilizada en esta tesis. Esta especie crece rápidamente en el laboratorio y es contabilizada fácilmente, por lo tanto es conveniente para los bioensayos. Considerando que su crecimiento puede verse afectado por la luz, la temperatura y el nivel de nutrientes, se requieren condiciones estándar que han sido ampliamente aplicadas (Sabater y col., 2007). Los cultivos de algas han sido utilizados, por ejemplo, para detectar efectos de herbicidas (Vendrell y col., 2009), efectos combinados de herbicidas y surfactantes (Altenburger y col., 1990) o en la evaluación de los riesgos de las mezclas de productos químicos (Faust y col., 2001).

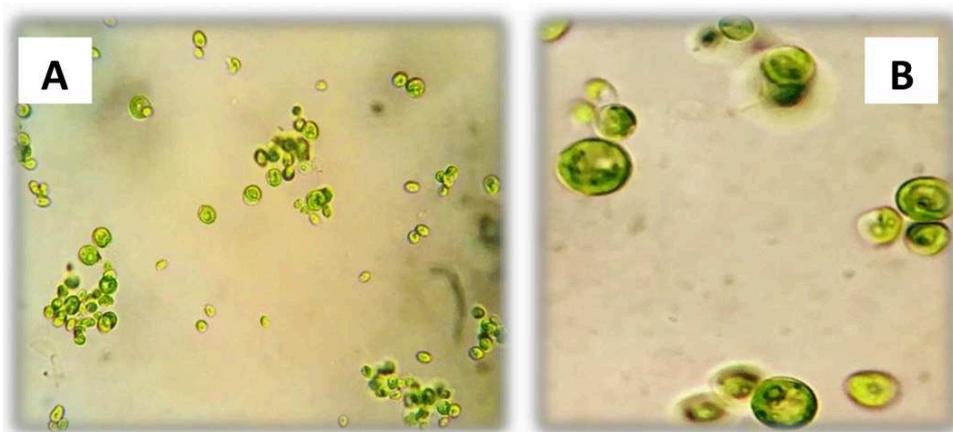


Figura 1: *Chlorella vulgaris* (A: aumento microscopio óptico: 40X; B: aumento microscopio óptico: 100X).

Ceriodaphnia dubia (Richard, 1894), (Figura 2) es un microrustáceo perteneciente a la Familia Daphnidae. Es una especie de distribución cosmopolita y neotropical (Negrea 1983 en Ruiz y Bahamonde, 1989), siendo común en ecosistemas leníticos (DeGraeve y col., 1992, Anderson y Benke, 1994; Ferrari y Ferard, 1996). Posee una alta sensibilidad a diferentes tóxicos en comparación con otros invertebrados de agua dulce, elevada fecundidad, reproducción partenogenética y facilidad para los cultivos, razones por las cuales su uso ha sido estandarizado para ensayos crónicos (Baudo 1987; Kluttgen y col., 1996). Por otra parte, su amplia distribución permite compararla con resultados obtenidos por otros autores en diversas partes del mundo.



Figura 2: *Ceriodaphnia dubia* (aumento microscopio óptico: 10X)

Daphnia magna (Straus, 1820) (Figura 3) pertenece a la Familia Daphnidae, es una especie de distribución holártica, típica de cuerpos de agua someros y efímeros (Brooks, 1959). Comenzó a ser empleada como organismo de prueba en bioensayos durante la década de 1940 por Anderson (Anderson, 1944) y desde entonces ha sido ampliamente utilizada en estudios de toxicidad. Esta especie es adecuada para ensayos en laboratorio debido a su gran tamaño, alta fecundidad, ciclo de vida corto, reproducción partenogenética, amplia distribución y facilidad de manejo en laboratorio (Adema, 1978; Baudo, 1987). Sin embargo, su uso en estudios ecotoxicológicos ha sido cuestionado por diversos autores (Buikema y col., 1982; Baird y col., 1989; Koivisto, 1995) ya que a pesar de su amplia distribución en el hemisferio norte, no habita en lagos y lagunas del hemisferio sur, que muy frecuentemente poseen diversos grados de contaminación ambiental (Koivisto y col., 1992).



Figura 3: *Daphnia magna* (aumento microscopio óptico: 4X)

La cepa de *C. vulgaris* (CLV2) con la que se realizaron los ensayos de esta Tesis fue adquirida en el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México). Se cultivó en erlermeyers de 1000 mL en condiciones estériles, utilizando como medio nutritivo el Medio Basal (BBM) (Bischoff y Bold, 1963), pH y conductividad 6,5 y 1,4 mScm⁻¹, respectivamente. BBM es un medio ampliamente usado para la producción de biomasa y ensayos ecotoxicológicos (Reno y col., 2014; Al-Shatri y col., 2014). El cultivo se mantuvo a temperatura constante (25±1°C), con aireación e iluminación constante y uniforme (aproximadamente 120 μE m⁻² s⁻¹) y agitación continua a 100 rpm con una placa magnética.

Los ejemplares de *D. magna* empleados en este estudio provienen de un cultivo monoclonal propio, iniciado a partir de una hembra adulta, y mantenido en el laboratorio durante varias generaciones bajo condiciones de temperatura y fotoperíodo controlados. Los ejemplares de *C. dubia*, por tratarse de especies frecuentes en cuerpos de agua del litoral fluvial argentino, fueron colectadas con una red de plancton (100 μm) en lagunas leníticas del valle aluvial del Río Paraná (Santa Fe). A continuación los organismos fueron llevados al laboratorio para su aclimatación a medios sintéticos.

Daphnia magna se mantuvo en el medio sintético compuesto por 0,13 g K₂SO₄, 1,12 g CaCl₂, 1 g NaHCO₃ disuelto en 5 L de agua destilada y *C. dubia* en medio propuesto por APHA (1998): 2.4 g SO₄Mg, 3.84 g NaHCO₃, 0.16 g KCl y 2.4 g CaSO₄.2H₂O disuelto en 20 L de agua destilada. Los organismos fueron alimentados periódicamente con *C. vulgaris* (absorbancia (Abs) =1.5 λ a 650 nm) y mantenidos en cámara de cultivo en condiciones controladas y constantes: fotoperíodo 16Luz (L): 8Oscuridad (O) y

Temperatura $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Reno y col., 2015). La manipulación de los cultivos se realizó bajo flujo laminar para evitar su contaminación.

Las formulaciones a base de glifosato seleccionadas para la realización de los ensayos fueron: Eskoba[®] (Red Surcos), Panzer Gold[®] (Dow Agrosiences), Roundup Ultramax[®] (Monsanto) y Sulfosato Touchdown[®] (Syngenta Agro) ya que se encuentran entre las más utilizadas en la región pampeana y en el litoral fluvial de Argentina (CONICET, 2009; UNL, 2010) las dos eco-regiones de mayor productividad sojera del país. Las formulaciones comerciales mencionadas se componen de 48% (p/v) de sal de isopropilamina, 60,8 % (p/v) sal de dimetilamina, 74,7 % (p/p) sal monoamónica y 62 % (p/v) sal potásica, respectivamente (CASAFAE, 2011) (Figura 4; A, B, C y D).

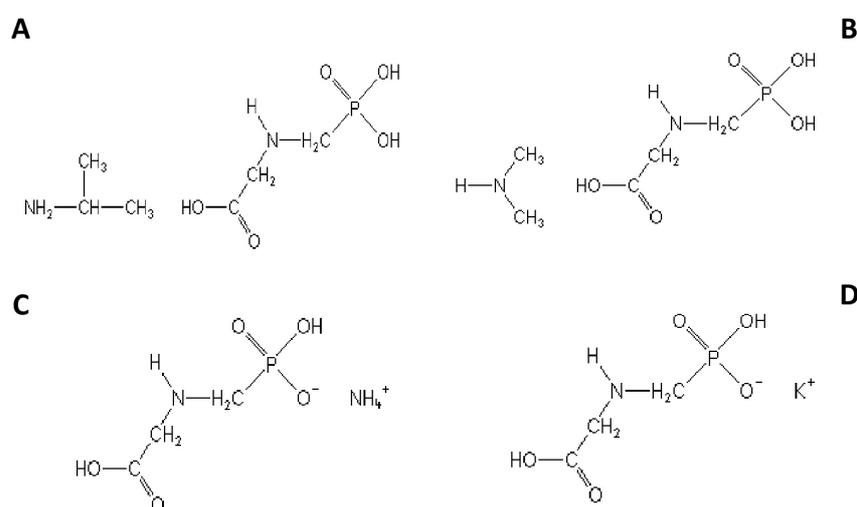


Figura 4: Fórmulas químicas de las sales de glifosato que componen cada uno de los formulados utilizados en esta tesis. A: sal de isopropilamina. B: sal de dimetilamina. C: sal monoamónica. D: sal potásica.

Previamente a los ensayos, se prepararon soluciones madres de $1000 \text{ mg e.a. L}^{-1}$ de los 4 formulados en agua bidestilada estéril, que se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 4°C hasta su determinación analítica.

La determinación analítica se llevó a por cabo Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) cromatógrafo Dionex DX-100 ion, bajo las siguientes condiciones analíticas: Columna cromatográfica: Phenomenex Luna[®] NH_2 , $5 \mu\text{m}$; $250 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$; Fase móvil: Fosfato de potasio monobásico 50 mM (pH 6)/Acetonitrilo (60:40); Solvente de disolución de muestras: Tetraborato de sodio 25 mM ; Caudal: 0.8 mL/min ; Temperatura

de horno: 40° C; Detector: Fluorescencia; Detección: Longitud de onda de excitación: 206 nm- Longitud de onda de emisión: 320 nm; Tiempo de análisis: 25 minutos; Volumen de muestra a inyectar: 25 µl; Tratamiento de las muestras: Derivatización pre-columna con FMOC-Cl (9-fluorenilmetil cloroformiato).

La concentración de glifosato medida en las soluciones madres fue 1067; 1091; 914; 993 mg e.a L⁻¹ para el Eskoba[®], Sulfosato Touchdown[®], Panzer Gold[®] y Roundup Ultramax[®], respectivamente. Estas soluciones se usaron para preparar cada una de las concentraciones posteriormente utilizadas en los ensayos realizados en este trabajo.

Las concentraciones de glifosato en las diferentes formulaciones comerciales se expresan en mg de equivalentes de ácido por litro (mg e.a. L⁻¹). En las mencionadas formulaciones, el ácido de glifosato se convierte en una sal con el fin de aumentar la solubilidad en agua y por esta razón las concentraciones de glifosato en la presente tesis se reportarán como equivalentes ácido (e.a) por litro (Monsanto, 2009; Lanctôt y col., 2014).

4.2. Ensayos de inhibición de crecimiento algal con *C. vulgaris* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

Los tratamientos experimentales de inhibición del crecimiento de *C. vulgaris* por exposición a cuatro formulados con glifosato se realizaron según el protocolo estándar de la USEPA (USEPA, 2002): las microalgas fueron cosechadas en fase de crecimiento exponencial; a continuación se centrifugaron y resuspendieron en agua ultrapura estéril. La densidad del inóculo para los tratamientos y los controles (sin glifosato) fue de 10000 cél. mL⁻¹. La densidad celular se determinó directamente por conteo con cámara de Neubauer (ISO 8692, 1989). Se realizaron 3 réplicas para controles y tratamientos, que se mantuvieron bajo iluminación continua (120 µE m⁻² s⁻¹, aproximadamente) a 25 ±1 °C, durante el ensayo (96 h) (Reno y col., 2015).

Se tomaron 3 muestras de 100 µL a las 24, 48, 72 y 96 h, por cada tratamiento y control, determinado la densidad celular en cámara de Neubauer. En todos los casos se contaron al menos 25 cuadrados, con el objetivo de asegurar errores menores al 10% según lo propuesto por Venrick (1978).

En cada uno de los ensayos se determinó la concentración efectiva a las 96 horas (96 h-CE₅₀), por interpolación lineal (USEPA, 2002) y el porcentaje de inhibición (% I) según la ecuación (1):

$$\% I = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (1)$$

donde μ_c = tasa de crecimiento para el control, μ_i = tasa de crecimiento para la concentración testada (OECD, 2011).

La tasa de crecimiento en la ecuación (1) se determinó a partir de la ecuación (2):

$$\mu_{i-j} = (\ln X_j - \ln X_i) / t_j - t_i \quad (\text{días}^{-1}) \quad (2)$$

donde μ_{i-j} = tasa de crecimiento entre los tiempos i-j; X_i = biomasa en el tiempo i; X_j = biomasa en el tiempo j (OECD, 2011).

Para los ensayos se utilizaron erlermeyers de 250 mL, con 100 mL de medio BBM. Las concentraciones de glifosato ensayadas fueron: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg e.a L⁻¹ para Eskoba[®]; 1,5; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 mg e.a L⁻¹ para Panzer Gold[®] y 0,75; 1,5; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 mg e.a L⁻¹ para Roundup Ultramax[®] y Sulfosato Touchdown[®]. En todos los casos se midió pH al inicio y al final de cada uno de los ensayos.

Las diferencias entre los controles y tratamientos (log₁₀ (x) valores transformados) se analizaron utilizando ANOVA de medidas repetidas (MR) ($\alpha = 0,05$) (Sokal y Rohlf, 1969)

4.3. Ensayos agudos con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

Los ensayos agudos fueron estáticos de 48 h, con fotoperiodo 16L: 8O y T= 20±1°C, utilizando neonatos (<24 h) (USEPA, 2002), de *C. dubia* y *D. magna*. El número de organismos utilizados fue 20, divididos en 4 grupos de neonatos, por cada uno de los tratamientos y controles (ISO 6341, OEDC, 2004).

Para el formulado comercial Eskoba[®] se ensayaron 6 concentraciones de glifosato: 45 (C1), 40 (C2), 35 (C3), 30 (C4), 25 (C5), 20 (C6), mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 5 concentraciones: 40,5 (C1) 27 (C2), 18 (C3), 12 (C4), 8 (C5), mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

Para el Sulfosato Touchdown[®] se ensayaron 5 concentraciones de glifosato para las dos especies estudiadas: 5 (C1) 2,5 (C2), 1,25 (C3), 0,5 (C4), 0,25 (C5) mg e.a. L⁻¹ para *D. magna* y 1 (C1), 0,5 (C2), 0,25 (C3), 0,125 (C4), 0,0625 (C5) mg e.a. L⁻¹ para *C. dubia*.

En el caso del Panzer Gold[®] se utilizaron 5 concentraciones: 10 (C1), 5 (C2), 2,5 (C3), 1,25 (C4), 0,62 (C5) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 6 concentraciones para *C. dubia*: 2,5 (C1), 1,25 (C2), 0,62 (C3), 0,49 (C4), 0,31 (C5), 0,15 (C6) mg e.a L⁻¹.

Para el Roundup Ultramax[®] se evaluaron 5 concentraciones de glifosato para las dos especies: 40 (C1) 20 (C2), 10 (C3), 5 (C4), 2,5 (C5), mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 20 (C1), 10 (C2), 5 (C3), 2,5 (C4), 1,25 (C5) mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

Como indicador de toxicidad se registró la inmovilización de los organismos al acercarse a una varilla de metal. Los resultados fueron considerados aceptables cuando la mortalidad en el control fue $\leq 10\%$. Para cada especie, se determinó la concentración letal 50 a las 48 h (48h-CL₅₀), donde CL₅₀ es la concentración efectiva de una sustancia química que produce un 50% de reducción en la población experimental (Rand y Petrocelli, 1985). Los valores de 48h-CL₅₀, con un 95 % de confianza, se determinaron con el análisis Probit (Finney, 1971). El pH y el oxígeno disuelto (OD) se midieron durante toda la experimentación. Los valores estuvieron entre 7.6-8,1 y 8-6 mg L⁻¹ respectivamente, dentro de los límites establecidos por APHA (APHA, 1998).

4.4. Ensayos de recuperación con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

El lavado de las máquinas aplicadoras y bidones, la aplicación sobre cuerpos de agua lóticos, puede ocasionar acontecimientos de contaminación aguda de pocas horas, producto de las características propias del medio. La información sobre cómo responden las poblaciones de especies no blanco a este tipo de contaminación es poco conocida, por ello la importancia de generar una herramienta, como los ensayos de recuperación, que permita interpretar este tipo de acontecimientos.

Para los ensayos de recuperación se siguió la metodología reportada por Reno y col. (2014): los organismos sobrevivientes de los ensayos agudos fueron trasladados a nuevos recipientes con sus respectivos medios de cultivo sin glifosato durante 15 días en condiciones idénticas a las descritas para el cultivo stock. Los cladóceros fueron alimentados tres veces a la semana con una gota de una suspensión de *C. vulgaris* (Abs= 1,5 λ , 650 nm). Los valores de pH y concentraciones de OD se registraron al inicio y al final de cada ensayo, y estuvieron dentro de los límites establecidos por APHA (1998). Para este ensayo los puntos finales fueron: la supervivencia, el crecimiento (número de mudas) y la fecundidad.

Una vez concluido el ensayo agudo para el formulado comercial Eskoba[®], sólo sobrevivieron organismos de *D. magna* en: 40 (C2), 35 (C3), 30 (C4), 25 (C5), 20 (C6) mg e.a L⁻¹ y en 27 (C2), 18 (C3), 12 (C4), 8 (C5), mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

Para el Sulfosato Touchdown[®] se ensayaron 5 concentraciones de glifosato para las dos especies estudiadas, sobreviviendo organismos sólo en: 5 (1), 2,5 (C2), 1,25 (C3), 0,5 (C4), 0,25 (C5) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 0,5 (C2), 0,25 (C3), 0,125 (C4), 0,0625 (C5) mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

En el caso del Panzer Gold[®] sobrevivieron en: 5 (C2), 2,5 (C3), 1,25 (C4), 0,62 (C5) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y para *C. dubia*: 1,25 (C2), 0,62 (C3), 0,49 (C4), 0,31 (C5), 0,15 (C6), mg e.a L⁻¹.

Para el Roundup Ultramax[®] sobrevivieron en: 40 (C1) 20 (C2), 10 (C3), 5 (C4), 2,5 (C5), mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 10 (C2), 5 (C3), 2,5 (C4), 1,25 (C5), mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

4.4.1. Construcción de modelos poblacionales matriciales

Los datos recolectados con los ensayos de recuperación previamente descriptos se utilizaron para construir un modelo de matriz poblacional (MMP). Cabe destacar que para la construcción de las MMP se consultó y realizó una capacitación con el Dr. Fernando Momo perteneciente al Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES), Universidad Nacional de Luján. Argentina y al Área de Biología y Bioinformática, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento. Argentina.

Los MMP son modelos de dinámica poblacionales, donde las poblaciones tienen un crecimiento discreto y una estructura de etapas o estadios, en consecuencia la población está representada por un vector que contiene la abundancia de cada etapa considerada y es dependiente del tiempo (Santadino y col., 2014).

Los datos obtenidos durante el ensayo de recuperación fueron sintetizados en una matriz de transición cuyos elementos representan los aportes de cada uno al vector en un momento dado (Momo y Capurro, 2006).

Como primera medición para la construcción de las matrices, se contaron la cantidad de veces que debieron mudar los organismos del control, para tener su primera camada (edad de la primera reproducción) y por consiguiente pasar del estadio juvenil (J) al adulto (A). En ambas especies este valor fue el mismo, 5 mudas en promedio, es decir que después de mudar 5 veces, los cladóceros comenzaron a reproducirse. Este parámetro fue tomado como referencia para elaborar las matrices de los tratamientos y controles.

Para cada una de las concentraciones se construyeron dos matrices, una con los valores máximos posibles (Figura 5 y 6, A) llamada matriz optimista y la otra con los valores mínimos (Figura 5 y 6, B) denominada matriz pesimista.

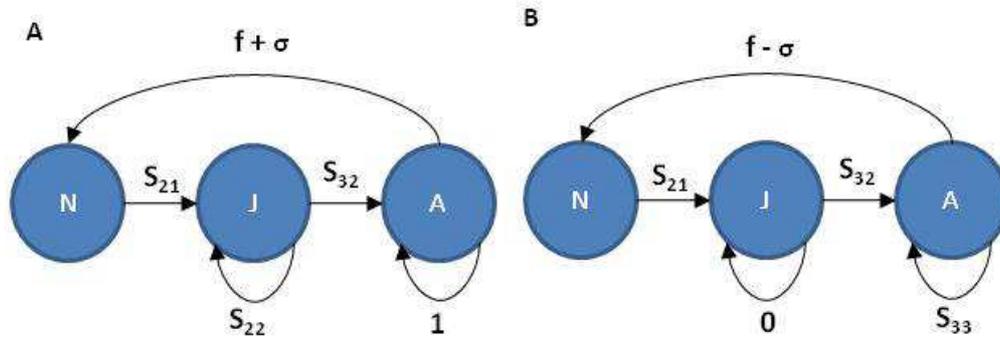


Figura 5: Esquema en forma de grafo del modelo de matriz poblacional: N: Neonato; J: Juveniles; A: Adultos; σ : desvío estándar. A: matriz optimista; B: matriz pesimista.

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| A | B |
| $A = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f \\ S_{21} & S_{22} & 0 \\ 0 & S_{32} & 1 \end{bmatrix}$ | $A = \begin{bmatrix} 0 & 0 & f \\ S_{21} & 0 & 0 \\ 0 & S_{32} & S_{33} \end{bmatrix}$ |

Figura 6: Matriz poblacional: A: matriz optimista; B: matriz pesimista.

Los valores de las matrices se determinaron de la siguiente manera:

f (fecundidad) = se estimó como promedio del número de neonatos (N) de los organismos que vivieron los 15 días del ensayo (suma y resta del desvío estándar al promedio da como resultados f optimista y pesimista, respectivamente)

S₂₁ (supervivencia J-N)= proporción de organismos que sobrevivieron al ensayo agudo

S₂₂ (supervivencia J-J) = promedio juveniles que permanecieron en este estadio y no completaron las 5 mudas necesarias para alcanzar la adultez.

Este valor puede tener un máximo (matriz optimista) que se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = (X_1/t) + (X_2/t) \cdots (X_n/t)$$

donde; X_n = día en el que se registró la última muda; t = duración del ensayo (15 días). Por otro lado, este valor tiene un mínimo que es cero (0), lo que significa que todos los organismos quedaron en el estadio de juvenil (matriz pesimista).

S₃₂ (Supervivencia A-J) = proporción de organismos que llegaron a las 5 mudas durante el ensayo de recuperación.

S₃₃ (Supervivencia A-A) = el valor máximo para este parámetro es uno (1) lo que significa que todos los adultos sobrevivieron en este estadio hasta finalizar el ensayo (matriz optimista).

Por otro lado, el valor mínimo (matriz pesimista) se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$(\bar{x}_{An}) / t_n$$

donde; \bar{x}_{An} es el promedio de la cantidad de días que vivieron después de haber alcanzado las 5 mudas y t_n duración del ensayo (15 días).

En los modelos poblacionales matriciales, el valor propio de mayor módulo (llamado λ) guarda una relación con la dinámica asintótica de la población, y su logaritmo es la tasa de crecimiento intrínseca de la población (r) Pianka (1982). Esto significa que la población crece si el módulo de λ es mayor que 1 (o $r > 0$) (Santadino y col., 2014).

4.4.2. Estudio de simulación de Monte Carlo

Los MMP construidos en base a los datos experimentales poseen parámetros con una variabilidad intrínseca y cuya estimación está sujeta a incertidumbre. Por lo tanto, la estimación de un único valor λ basado en un valor medio de cada parámetro poblacional no permite capturar dicha variabilidad.

Para lograr este valor único de λ se realizó un estudio de simulación Monte Carlo, que fue desarrollado conjuntamente con el Dr. Santiago Doyle perteneciente al Área de Biología y Bioinformática, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento, Argentina. Además, a partir de este tipo de herramienta de análisis se busco proyectar los efectos cuantificados nivel individual en los ensayos de recuperación sobre una población de cladóceros.

Un estudio de simulación Monte Carlo es una forma de análisis numérico donde se lleva a cabo una simulación estocástica por ordenador, de un modelo matemático para estimar las propiedades del modelo que no pueden obtenerse analíticamente o por otros métodos de aproximación (Rubinstein y Kroese, 2007).

Con el fin de hacer una proyección de los efectos sobre la supervivencia y la fecundidad medidos en los ensayos de recuperación, se utilizaron las dos matrices de transición generadas para cada uno de los tratamientos y controles como posibilidades extremas para cada parámetro de la población del MMP.

El tamaño de simulación se determinó mediante la evaluación del efecto del tamaño de la muestra en las estimaciones de error en base a resultados de la simulación, que mostraron que para un tamaño de muestra de 10^6 , la varianza de las estimaciones fue insignificante en comparación con la diferencia entre los tratamientos. Para cada tratamiento, 10^6 matrices de transición de población estocástica se generaron mediante un muestreo aleatorio uniforme de cada uno de los parámetros de la población, entre los límites establecidos por las dos matrices de transición extremas.

Todos los cálculos de Monte Carlo se realizaron utilizando el software libre GNU Octave 3.8.2 (Octave community (2014)). La estimación de la probabilidad de densidades se calculó utilizando el código proporcionado por Botev y col. (2010).

4.5. Ensayos crónicos con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

Se realizaron ensayos de toxicidad crónicos (21 días), con neonatos (< 24 h) de *D. magna* y *C. dubia* expuestos a las 4 formulaciones comerciales de glifosato anteriormente mencionadas.

Las concentraciones de glifosato utilizadas en estos ensayos se establecieron tomando como referencia los valores preliminares obtenidos a partir de los test agudos. Para estimar las concentraciones superiores empleadas en test crónicos, según Kenaga (1982), se calcula el 20 % de la 48h-CL₅₀ obtenida en ensayos agudos. Sin embargo, los valores así estimados resultaron muy bajos, especialmente para *C. dubia*, la especie más sensible, por lo tanto, como criterio de selección se consideraron en este trabajo valores cercanos e inferiores a las 48h-CL₅₀. Para el Eskoba[®], se emplearon las siguientes concentraciones nominales (valor teórico o ideal): 15 (C1), 10 (C2) y 5 (C3) y 2,5 (C4) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 10 (C1), 5 (C2) y 2,5 (C3) y 1,25 mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*. En el caso del Panzer Gold[®]: 0,62 (C1), 0,3 (C2) y 0,15 (C3) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 0,25 (C1), 0,125 (C2) y 0,062 (C3) para *C. dubia*. Para el Sulfosato Touchdown[®]: 0,4 (C1), 0,2 (C2) y 0,1 (C3) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 0,1 (C1), 0,07 (C2) y 0,03 (C3) para *C. dubia*. Para el Roundup Ultramax[®]: 1,45 (C1), 0,725 (C2) y 0,362 (C3) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 1,12 (C1), 0,6 (C2), 0,3 (C3) y 0,15 (C4) para *C. dubia*.

Los neonatos fueron colocados en recipientes de 70 mL que contenían 50 mL de medio sintético con las correspondientes concentraciones de glifosato. Se emplearon 10 réplicas por concentración y un control (sin glifosato) bajo condiciones idénticas al cultivo stock (fotoperiodo y temperatura). Los cladóceros fueron alimentados tres veces por semana con 40 μ L de *C. vulgaris* (Abs = 1.5 λ , 650 nm). Los valores de pH y OD se registraron al comenzar y finalizar cada ensayo con el fin de corroborar que se encuentren dentro de los rangos propuestos por APHA (1998). Los conteos se realizaron tres veces por semana registrando el N° de organismos vivos y muertos, N° de crías, edad de la primera reproducción (días) y N° de mudas (como medida indirecta del crecimiento), para luego evaluar como puntos finales, la supervivencia, la fecundidad, la madurez sexual y crecimiento, respectivamente. Además se determinó la tasa reproductiva neta (R_0) para cada cohorte, según Pianka (1982) ecuación (3):

$$R_0 = \sum (l_x \cdot m_x) \quad (3)$$

donde: R_0 : tasa reproductiva neta, l_x : supervivencia a la edad x , y m_x : fecundidad a la edad x .

Posibles diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles fueron analizadas con ANOVA y post test de Tukey-Kramer con un nivel de confianza del 95 % (Sokal y Rohlf, 1969). Las variables dependientes (número de organismos vivos, número de mudas y el número de neonatos) fueron transformadas en $\log n(x+1)$. Antes de cada análisis, se comprobó la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) de los datos obtenidos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando GraphPad InStat (2004) (Reno y col., 2016).

4.6. Proceso Avanzado de Oxidación UV/H₂O₂. Sistema y procedimiento experimental.

La degradación de las soluciones de los formulados comerciales fueron realizadas en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, INTEC (UNL-CONICET) y se llevaron a cabo en un reactor anular ($V_{\text{reactor}} = 870 \text{ cm}^3$), con el tubo interno de cuarzo que permite el paso de la radiación UV proveniente de una lámpara germicida (Philips TUV 15 W, lámpara de baja presión de vapor de Hg con emisión significativa a $\lambda = 253,7 \text{ nm}$) colocada en forma concéntrica. Este reactor opera en un sistema discontinuo con

recirculación incluyendo una bomba centrífuga y un tanque de alimentación con agitación continua. El sistema tiene un volumen total de 2500 cm^3 y se mantiene a temperatura constante ($T = 20^\circ\text{C}$) por medio de un intercambiador de calor (Figura 7, A y B).

El reactor dispone de una pantalla para bloquear el ingreso de radiación dentro del espacio de reacción hasta que todo el sistema alcance el estado estacionario (concentraciones uniformes, temperatura constante y estabilización de la lámpara).

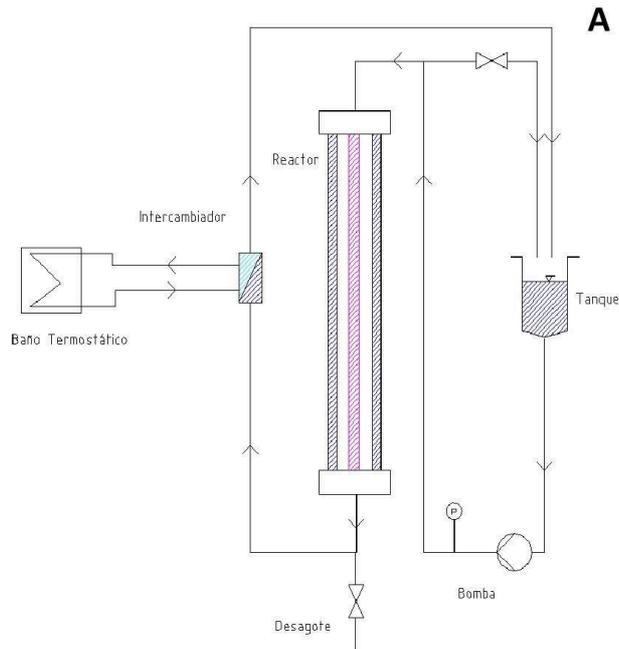


Figura 7 A: Esquema del dispositivo experimental (extraído de Reno y col., 2015).

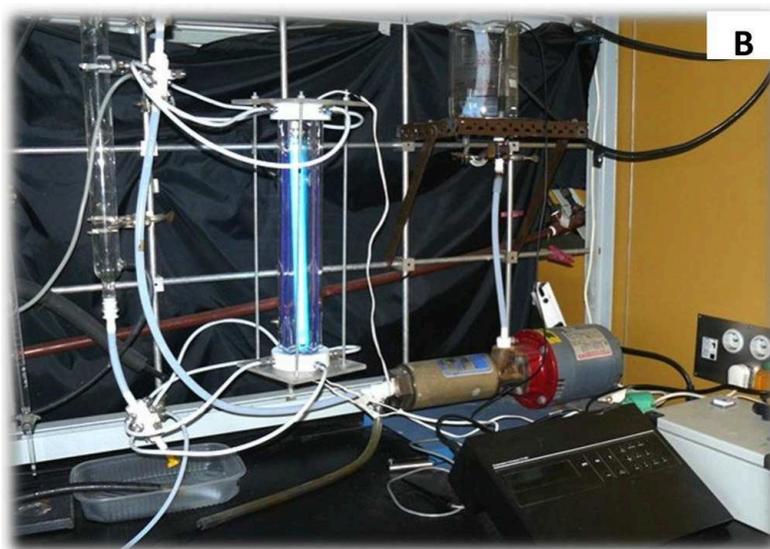


Figura 7 B: Fotografía del fotorreactor.

Las experiencias de degradación se realizaron de acuerdo al siguiente procedimiento experimental: la solución de trabajo se añadió al tanque del dispositivo experimental con la concentración deseada de glifosato y peróxido de hidrógeno. La lámpara germicida se encendió con la pantalla colocada y se procedió a la recirculación del fluido. Una vez alcanzado el estado estacionario, la pantalla se retiró dándose inicio a la reacción; tiempo inicial ($t = 0$). Posteriormente las muestras fueron tomadas cada 120 min para el seguimiento de las concentraciones de glifosato. El caudal de operación fue de $120 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$. Los detalles de las condiciones de operación se describen en la Tabla 1.

Para la realización de los ensayos de toxicidad con *C. vulgaris* y las dos especies de cladóceros (*D. magna* y *C. dubia*), las muestras ensayadas para la realización de la presente tesis, fueron:

- Muestra M_0 o sin tratar correspondiente a 50 mg e.a L^{-1} de glifosato sin agregado de H_2O_2 .
- M_1 , M_2 y M_3 : muestras a diferentes tiempos de reacción del proceso UV/ H_2O_2 : 120, 240 y 360 min, respectivamente.

La concentración de glifosato en las muestras (M_0 a M_3), para cada uno de los formulados fue determinada siguiendo la metodología descrita en el punto 4.1. del presente capítulo.

Tabla 1: Condiciones experimentales

| Variable | Valor |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Concentración inicial de glifosato | 0,30 (mM) (50 a.e. mg L ⁻¹) |
| Concentración inicial de H₂O₂ | 3,6 (mM) (120 mg L ⁻¹) |
| Tiempo total de reacción | 21,600 s ⁻¹ (360 min) |
| Muestras | M ₀ (t = 0 min); M ₁ (t = 120 min); M ₂ (t = 240 min); M ₃ (t = 360 min) |
| Temperatura | 20 (°C) |
| pH inicial | 5,2 |

Además, se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (30 % p/v) y catalasa de origen bovino, 2197 U/mg Fluka (1 unidad descompone 1 mmol H₂O₂/min. a pH 7.0 a 25°C), en el caso de tener que descomponer el H₂O₂ remanente de las muestras. Como patrón cromatográfico para calibración se utilizó glifosato ácido (AccuStandard cat. N° P-015NB-250).

4.7. Ensayos de toxicidad con *C. vulgaris*, *D. magna* y *C. dubia*, para evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂

La toxicidad de las muestras producidas en los diferentes tiempos (M₀, M₁, M₂ y M₃) del proceso (UV/H₂O₂) fue evaluada utilizando como modelos biológicos a las mismas especies de diferente nivel trófico empleadas en los ensayos previos: *C. vulgaris*, *D. magna* y *C. dubia*. Cada una de las muestras obtenidas fue llevada al laboratorio, donde se midió pH y se disolvieron las sales del medio de cultivo anteriormente citado para cada especie.

Como primera instancia se realizó un ensayo para evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno residual en las muestras, sobre la toxicidad en los tres modelos biológicos anteriormente citados. Las muestras (M₁ a M₃) fueron generadas a partir del tratamiento del efluente con el formulado Eskoba[®], a tres muestras se les removió el peróxido de hidrógeno residual con catalasa mientras que las otras tres permanecieron con la concentración de peróxido de hidrógeno original. Este ensayo permitió definir las condiciones (con o sin remoción de H₂O₂) en las que las muestras de los demás formulados deberían ser entregadas para su evaluación ecotoxicológica.

Para la microalga, el ensayo tuvo una duración de 96 h, siguiendo el mismo diseño experimental de los ensayos descritos en el punto 4.2. del Capítulo I (número de réplicas, determinación de la densidad celular, temperatura, iluminación, volumen del

inóculo y volumen de medio de cultivo usado en el ensayo). Para cada una de las muestras (M_0 a M_3) se determinó el porcentaje de inhibición (% I) calculado con la ecuación 1: Las diferencias entre los controles y tratamientos ($\log_{10}(x+1)$ valores transformados) se analizaron utilizando ANOVA de medidas repetidas (MR) ($\alpha = 0,05$), con post-test de Dunnett, para evaluar posibles diferencias entre el control y los tratamientos a las 24, 48, 72 y 96 h. Además, se realizaron correlaciones (Análisis de correlación de Pearson) entre el N° de cél. mL^{-1} y los diferentes tiempos de reacción evaluados a las 96 h (Reno y col., 2015).

En el caso de los microcrustáceos, cada muestra se aireó durante 24 h para luego realizar los ensayos en los que se evaluó la mortalidad porcentual (% M) de los organismos en los diferentes tiempos del proceso. Los ensayos fueron estáticos de 48 h, siguiendo el mismo diseño metodológico de los ensayos descritos en el punto 4.3. del Capítulo I (T° , fotoperiodo, indicador de efecto, cantidad de réplicas y aceptabilidad del ensayo). El pH y OD fueron medidos al comienzo y al final del ensayo.

5. RESULTADOS

5.1. Ensayos de inhibición de crecimiento algal con *C. vulgaris* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

En la Tabla 2 se muestran los valores de 96 h- CE_{50} para los cuatro formulados analizados. Como puede observarse, el Eskoba[®] fue el formulado comercial de glifosato menos tóxico y Roundup Ultramax[®] el más tóxico.

Según la categorización de toxicidad para organismos acuáticos y terrestres proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Schaaf, 2013), las formulaciones evaluadas en este trabajo se encuentran entre moderadamente y ligeramente tóxicas para *C. vulgaris*.

Tabla 2: 96 h- EC_{50} e intervalos de confianza (95%) de los formulados a base de glifosato analizados en el presente estudio.

| Formulación comercial de Glifosato | 96h- CE_{50} (mg e.a L^{-1}) | Intervalo de confianza (95%) |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|
| Eskoba [®] | 29,95 | 25,11-36,06 |
| Panzer Gold [®] | 8,64 | 6,44- 11,05 |
| Sulfosato Touchdown [®] | 7,37 | 6,08-8,87 |
| Roundup Ultramax [®] | 3,85 | 2,82- 5,08 |

En las concentraciones menores, entre las 24 y 72 h de ensayo, la densidad celular superó al control en diferentes porcentajes que oscilaron entre 0,9 y 33,7 % según las concentraciones empleadas, en todos los formulados estudiados (Tabla 3). En los ensayos con Sulfosato Touchdown[®] esta situación se registró en cinco de las siete concentraciones de ensayo, siendo elevado y significativa la diferencia (ANOVA-MR, $p < 0,05$) entre las 24 y 72 h, con un máximo de 33,7 % de aumento en el número de células respecto al control a las 48 h (Figura 8). Esto podría indicar que cuando el tóxico se encuentra en bajas concentraciones, las microalgas utilizarían algún elemento del compuesto a base de glifosato para su crecimiento.

Por otro lado, el Sulfosato Touchdown[®] presentó flóculos de microalgas en dos concentraciones: 1,5 y 3.12 mg e.a L⁻¹ de glifosato a las 48 h (Figura 9 y 10).

Tabla 3: Densidad celular (% N° de cél. mL⁻¹) que superaron al control a diferentes tiempos del ensayo de inhibición algal (24, 48, 72 h) para los cuatro formulados ensayados.

| Formulado | % cél. mL ⁻¹ que superan al control | | | | |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | Concentraciones de glifosato (mg a.e L ⁻¹) | | | | |
| Eskoba[®] | 0,75 | 1,5 | 3,12 | 6,25 | 12,5 |
| 24 h | | | | 17,8 | |
| 48 h | | | | 15,4 | |
| Panzer Gold[®] | | | | | |
| 24 h | | 10,9 | | | |
| 48 h | | 0,9 | | | |
| Sulfosato Touchdown[®] | | | | | |
| 24 h | 31 | 28,4 | 14 | 7,7 | 5,3 |
| 48 h | 33,7 | 23,7 | 7,5 | 5,2 | |
| 72 h | 11 | 6,9 | | | |
| Roundup Ultramax[®] | | | | | |
| 24 h | 11,2 | | | | |
| 48 h | 6,7 | | | | |
| 72 h | 0,9 | | | | |

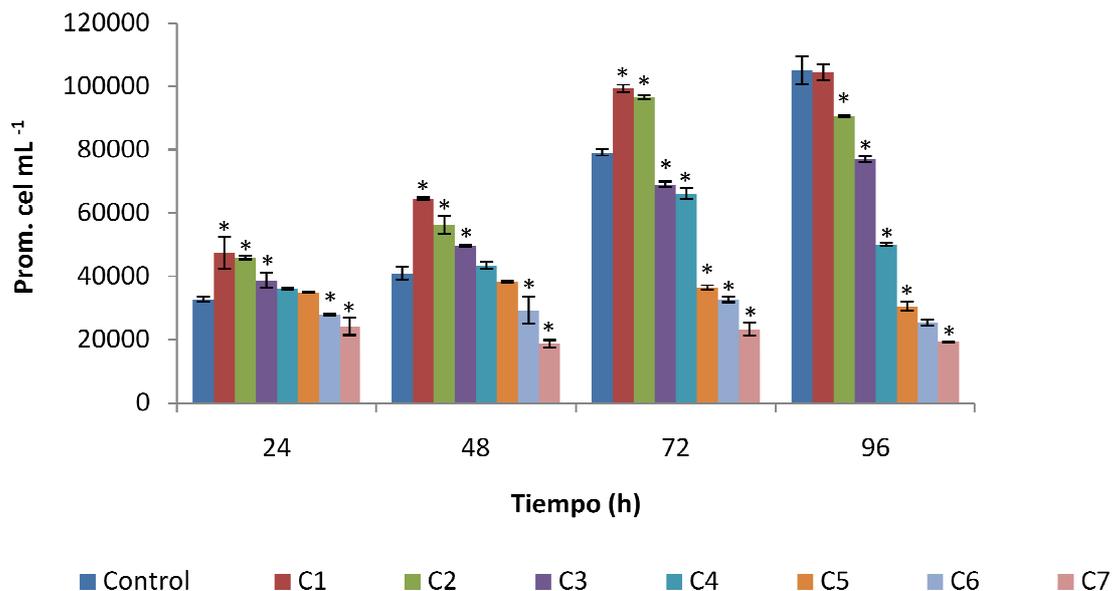


Figura 8: Variaciones en la densidad de células (número de cél. mL⁻¹) durante el ensayo de inhibición de crecimiento para evaluar la toxicidad de la formulación de glifosato, Sulfosato Touchdown[®]. Control (sin glifosato): 0,75 (C1), 1,5 (C2), 3,12 (C3), 6,25 (C4), 12,5 (C5), 25 (C6), y 50 (C7) mg a.e L⁻¹. * Diferencias significativas entre control y tratamientos (extraído de Reno y col., 2016)



Figura 9: Flóculos de *C. vulgaris* a concentraciones de 1,5 mg a.e L⁻¹ de glifosato (formulado Sulfosato Touchdown[®]) a las 48 h.

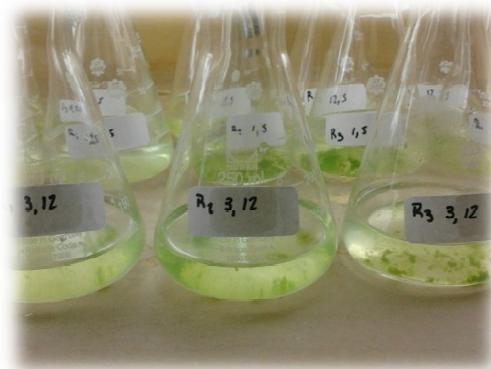


Figura 10: Flóculos de *C. vulgaris* a concentraciones de 3,12 mg a.e L⁻¹ de glifosato (formulado Sulfosato Touchdown[®]) a las 48 h.

5.2. Ensayos agudos con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

En la Tabla 4 se muestran los valores de 48 h-CL₅₀ para las dos especies y los cuatro formulados con glifosato estudiados. Como puede observarse los valores de 48 h-LC₅₀ correspondientes al formulado Sulfosato Touchdown[®] son los más bajos para las dos especies de microcrustáceos, siendo este formulado el de mayor toxicidad para los dos cladóceros utilizados en este trabajo. Además, se puede observar que *C. dubia* fue la especie más sensible.

Según la categorización de toxicidad para organismos acuáticos y terrestres de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Schaaf, 2013), las formulaciones evaluadas en este trabajo se encuentran entre moderadamente y ligeramente tóxicas para *D. magna* y entre altamente a ligeramente tóxicas para *C. dubia*.

Tabla 4: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población (CL₅₀ mg a.e L⁻¹) obtenida a las 48 h de exposición a cuatro formulaciones de glifosato para dos especies de cladóceros.

| Formulado comercial de glifosato | 48 h-CL ₅₀ (mg e.a L ⁻¹) | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|
| | <i>D. magna</i> | <i>C. dubia</i> |
| Eskoba[®] | 29,48 (27,464-31,415) | 14,49 (12,4-16,77) |
| Roundup Ultramax[®] | 11,68 (8,93-15,43) | 4,84 (3,83-6,13) |
| Panzer Gold[®] | 2,12 (1,68-2,67) | 0,54 (0,44-0,65) |
| Sulfosato Touchdown[®] | 1,62 (1,24-2,09) | 0,31 (0,25-0,37) |

Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Durante los ensayos agudos la mortalidad en los controles no excedió el 10 %. Los valores de pH y OD, que se mantuvieron en los rangos requeridos por los protocolos específicos, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores de oxígeno disuelto y pH obtenidos al finalizar los ensayos agudos (48 h).

| Test agudo | Eskoba [®] | | Roundup Ultramax [®] | | Panzer Gold [®] | | Sulfosato Touchdown [®] | |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| Especie | OD (mgL ⁻¹) | pH | OD (mgL ⁻¹) | pH | OD (mgL ⁻¹) | pH | OD (mgL ⁻¹) | pH |
| <i>D. magna</i> | 7,33 (± 0,95) | 7,27 (± 0,19) | 7,88 (± 0,22) | 7,19 (± 0,22) | 7,59 (± 0,04) | 7,58 (± 0,38) | 7,85 (± 0,98) | 7,4 (± 0,15) |
| <i>C. dubia</i> | 7,38 (± 0,14) | 8,04 (± 0,9) | 7,86 (± 0,20) | 7,15 (± 0,11) | 8,18 (± 0,16) | 7,84 (± 0,08) | 7,35 (± 0,9) | 7,61 (± 0,05) |

Promedios y desviación estándar de pH y oxígeno disuelto medido en mg L⁻¹

5.3. Ensayos de recuperación con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

Los organismos que sobrevivieron hasta el final del ensayo estuvieron expuestos previamente a las siguientes concentraciones de glifosato:

Eskoba[®]: 35 (C3), 30 (C4), 25 (C5), 20 (C6) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y en 18 (C3), 12 (C4), 8 (C5), mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

Sulfosato Touchdown[®] 1,25 (C3), 0,5 (C4), 0,25 (C5) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 0,25 (C3), 0,12 (C4), 0,062 (C5) mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

Panzer Gold[®]: 2,5 (C3), 1,25 (C4), 0,62 (C5) mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y para *C. dubia*: 0,62 (C3), 0,49 (C4), 0,31 (C5), 0,15 (C6), mg e.a L⁻¹.

Roundup Ultramax[®]: 10 (C3), 5 (C4), 2,5 (C5), mg e.a L⁻¹ para *D. magna* y 5 (C3), 2,5 (C4), 1,25 (C5), mg e.a L⁻¹ para *C. dubia*.

En cuanto a los resultados de la simulación de Monte Carlo, el valor medio de λ para *D. magna* en todos los formulados y concentraciones evaluadas siempre fue <1, por lo que la población de este cladóceros no podrían mantenerse en el tiempo después de una exposición aguda a las concentraciones ensayadas en este trabajo (Tabla 6).

En el caso de *C. dubia* el valor medio de λ también fue <1 en la mayoría de los casos, a excepción de Roundup Ultramax[®] donde λ fue: 1,30 y 1,20 en las dos concentraciones analizadas, resultados similares fueron obtenidos para 0,15 mg e.a L⁻¹ ($\lambda = 1,05$) en Panzer Gold[®] y para 0,06 mg e.a L⁻¹ ($\lambda = 1,01$) en Sulfosato Touchdown[®] (Tabla 7).

Por otro lado, se puede observar que cuando se emplearon concentraciones similares de diferentes formulaciones los valores medios de λ fueron disímiles. En *D. magna*, para 0,62 e.a mg L⁻¹ de Panzer Gold, λ fue 0,94 y para 0,5 mg e.a L⁻¹ de Sulfosato Touchdown[®] λ fue 0,38. Para el caso de *C. dubia* 0,3125 mg e.a L⁻¹ de Panzer Gold[®], λ fue 0,90 y para 0,25 mg e.a L⁻¹ de Sulfosato Touchdown[®] λ fue 0,83 (Tablas 5 y 6).

Tabla 6: Media del módulo λ obtenidas luego de la Simulación de Monte Carlo para todas las concentraciones y formulados ensayados en el ensayo de recuperación, tomando como modelo biológico a *D. magna*.

| | Concentración (mg e.a L ⁻¹) | Media (λ) |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| Control (sin glifosato) | 0 | 3,07 (3,22-3,37) |
| Eskoba[®] | | |
| | 20 | 0,76 (0,98-1,23) |
| | 25 | 0,44 (0,69-1,04) |
| | 30 | 0,37 (0,64-1,01) |
| | 35 | 0,07 (0,50-0,98) |
| Panzer Gold[®] | | |
| | 0,62* | 0,94 (1,16-1,38) |
| | 1,25* | 0,87 (1,08-1,30) |
| | 2,5* | 0,52 (0,84-1,10) |
| Sulfosato Touchdown[®] | | |
| | 0,25* | 0,38 (0,65-1,01) |
| | 0,5* | 0,38 (0,66-1,01) |
| Roundup Ultramax[®] | | |
| | 2,5* | 0,79 (0,98-1,19) |
| | 5 | 0,75 (0,95-1,19) |
| | 10 | 0,53 (0,97-1,06) |

* = concentraciones de glifosato cercanas o por debajo de las reportadas para las ambientales y niveles guías para la protección de la biota acuática. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Tabla 7: Media del módulo λ obtenidas luego de la Simulación de Monte Carlo para todas las concentraciones y formulados ensayados en el ensayo de recuperación, tomando como modelo biológico a *C. dubia*.

| | Concentración (mg e.a L ⁻¹) | Media(λ) |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
| Control (sin glifosato) | Control | 1,16 (1,30-1,48) |
| Eskoba[®] | | |
| | 8 | 0,92 (1,11-1,33) |
| | 12 | 0,74 (0,94-1,17) |
| | 18 | 0,61 (0,82-1,08) |
| Panzer Gold[®] | | |
| | 0,15 | 1,05 (1,22-1,43) |
| | 0,31* | 0,90 (1,10-1,31) |
| | 0,49* | 0,84 (1,05-1,28) |
| | 0,62* | 0,71 (0,90-1,13) |
| Sulfosato Touchdown[®] | | |
| | 0,06 | 1,01 (1,20-1,41) |
| | 0,12* | 0,57 (0,80-1,08) |
| | 0,25* | 0,83 (1,02-1,27) |
| Roundup Ultramax[®] | | |
| | 1,25 | 1,30 (1,45-1,60) |
| | 2,5 | 1,20 (1,34-1,51) |

* = concentraciones de glifosato cercanas o por debajo de las reportadas para las ambientales y niveles guías para la protección de la biota acuática. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Por otro lado al momento de los conteos, en las dos especies de cladóceros se registraron neonatos muertos (Tablas 8 y 9) llegando a un máximo de 28% de neonatos muertos sobre el total de nacimientos, a concentraciones de 0,31 mg e.a L⁻¹ de Panzer Gold[®] para *C. dubia*.

Tabla 8: % de neonatos muertos de *D. magna* en ensayo de recuperación.

| % de Mortalidad de Neonatos | |
|---------------------------------------------------|------|
| <i>D. magna</i> | |
| Eskoba® | |
| C₅ (25 mg e.a L⁻¹) | 7,4 |
| Panzer Gold® | |
| C₃ (2,5 mg e.a L⁻¹) | 11,1 |
| C₄ (1,25 mg e.a L⁻¹) | 12,5 |
| C₅ (0,62 mg e.a L⁻¹) | 14,8 |

Tabla 9: % de neonatos muertos de *C. dubia* en ensayo de recuperación.

| % de Mortalidad de Neonatos | |
|---------------------------------------------------|-------|
| <i>C. dubia</i> | |
| Eskoba® | |
| C₅ (8 mg e.a L⁻¹) | 17,4 |
| Panzer Gold® | |
| C₅ (0,31 mg e.a L⁻¹) | 28 |
| C₆ (0,15 mg e.a L⁻¹) | 18,8 |
| Sulfosato Touchdown® | |
| C₃ (0,25 mg e.a L⁻¹) | 19,75 |

5.4. Ensayos crónicos con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar toxicidad de 4 formulados con glifosato

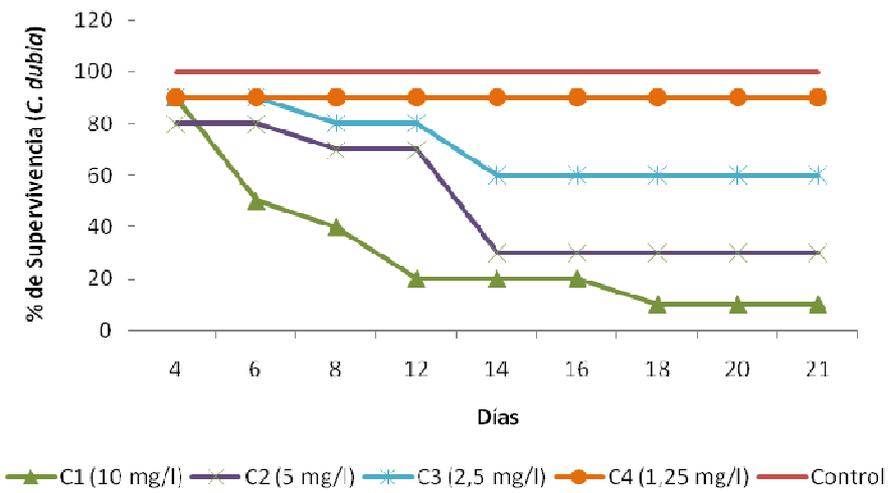
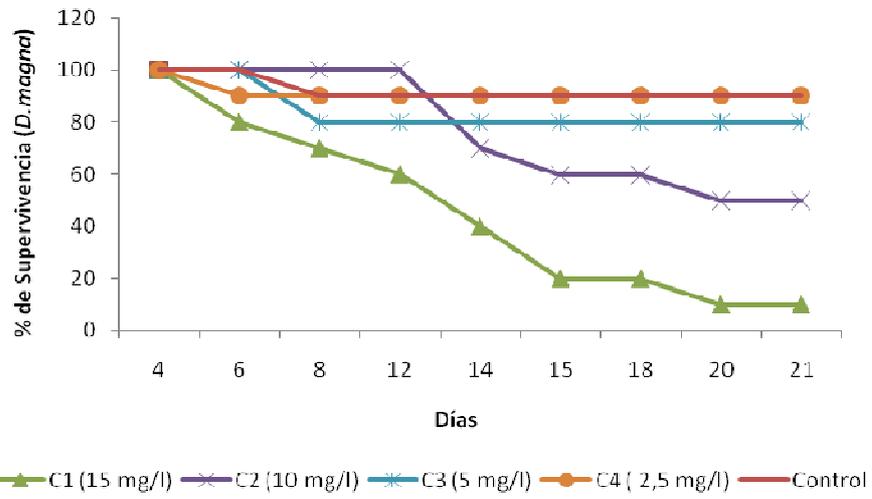
El efecto del Eskoba®, Roundup Ultramax®, Panzer Gold® y Sulfosato Touchdown® sobre atributos de historia de vida de *D. magna* y *C. dubia* expuestas a 3 o 4 concentraciones y el control se muestran en las Figuras 11, 12 y 13 para supervivencia, fecundidad y crecimiento, respectivamente. La Tabla 10 muestra los valores de *p* correspondientes a los análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para los atributos de historia de vida analizados en las dos especies expuestas a los diferentes formulados y el control. Puede observarse que la fecundidad fue el parámetro más afectado por los cuatro plaguicidas analizados en este trabajo.

En cuanto a la edad de la primera reproducción, este parámetro se vio afectado en las dos especies estudiadas, mostrando diferencias significativas con el control (ANOVA, $p < 0.05$) en la mayor concentración ensayada para cada uno de los formulados de glifosato (Tabla 11).

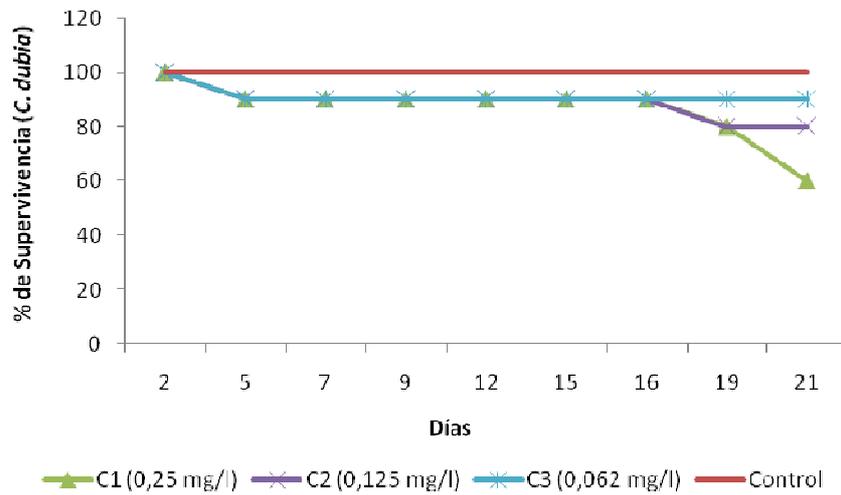
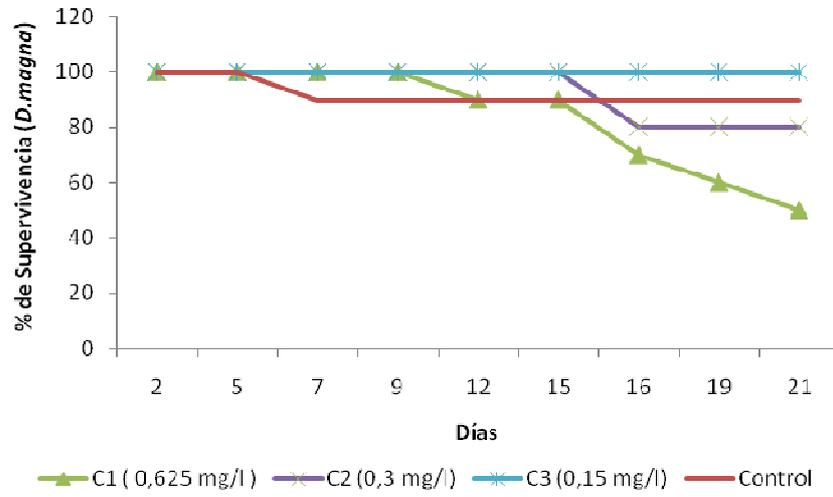
En la Tabla 12, se puede observar que a concentraciones de entre 0,3 a 0,1 mg e.a L⁻¹ para los dos formulados de mayor toxicidad (Panzer Gold[®] y Sulfosato Touchdown[®]) los valores de R₀ para *D. magna* y *C. dubia* fueron <1. Esta condición indicaría una disminución poblacional de las dos especies de microcrustáceos, lo que pondría poner en peligro poblaciones estables en condiciones naturales, como fuera señalado por Ceresoli y Gagneten (2003) al estudiar los efectos de un efluente de curtiembre sobre el zooplancton.

En el caso de Panzer Gold[®], se observó a los 17 días de ensayo en C1 (0,62 mg e.a L⁻¹), la presencia de un huevo sin eclosionar (Figura 14), lo mismo ocurrió en C2 (0,3 mg e.a L⁻¹) a los 14, 17 y 19 días, con un total de 6 huevos, además se registró un huevo de resistencia al día 17 en la concentración antes mencionada (Figura 15). Hay que destacar que en estas dos concentraciones no se evidenciaron eventos reproductivos. Si bien en C3, se registraron neonatos, a los días 12, 15 y 16 se observaron 4 huevos sin eclosionar.

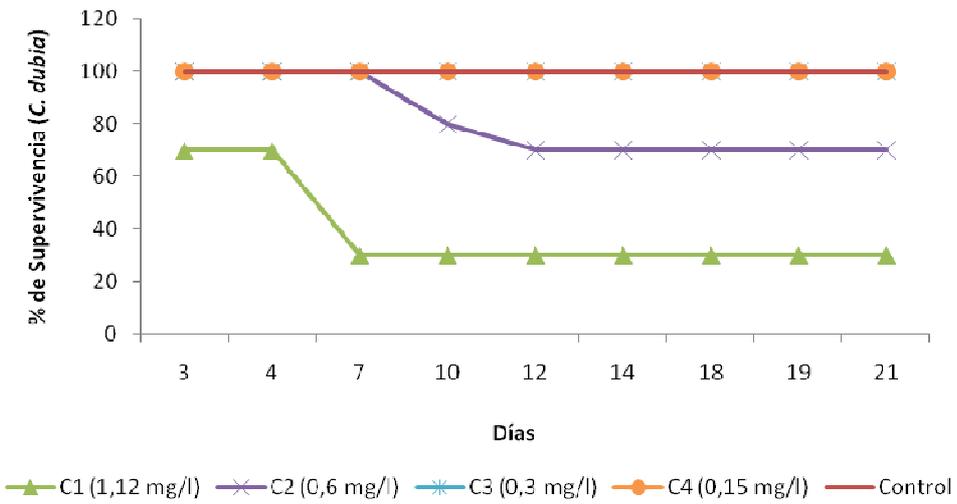
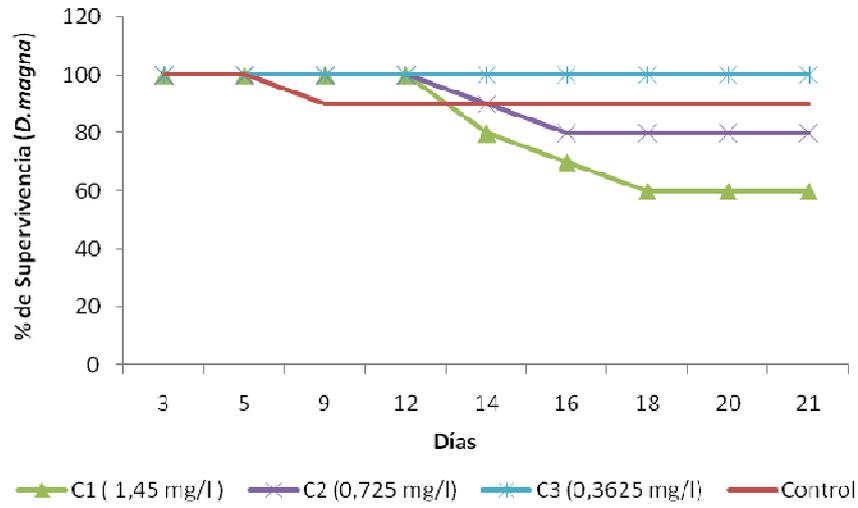
Eskoba®



Panzer Gold®



Roundup Ultramax®



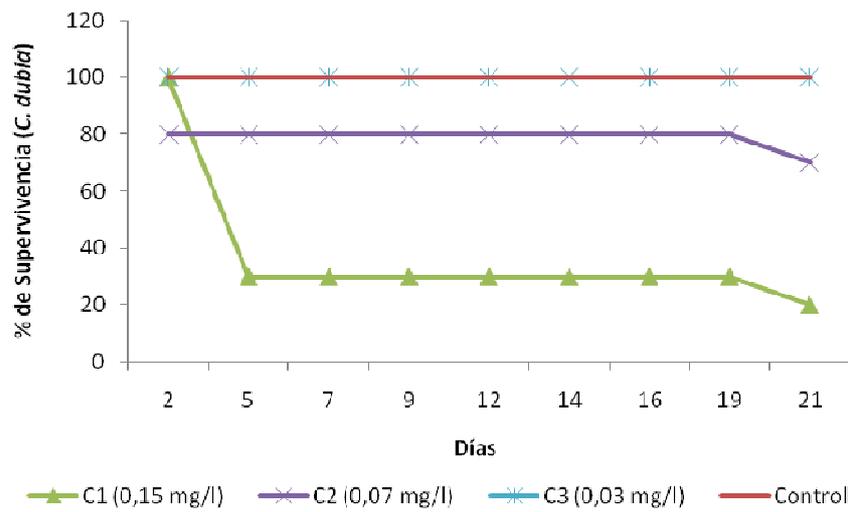
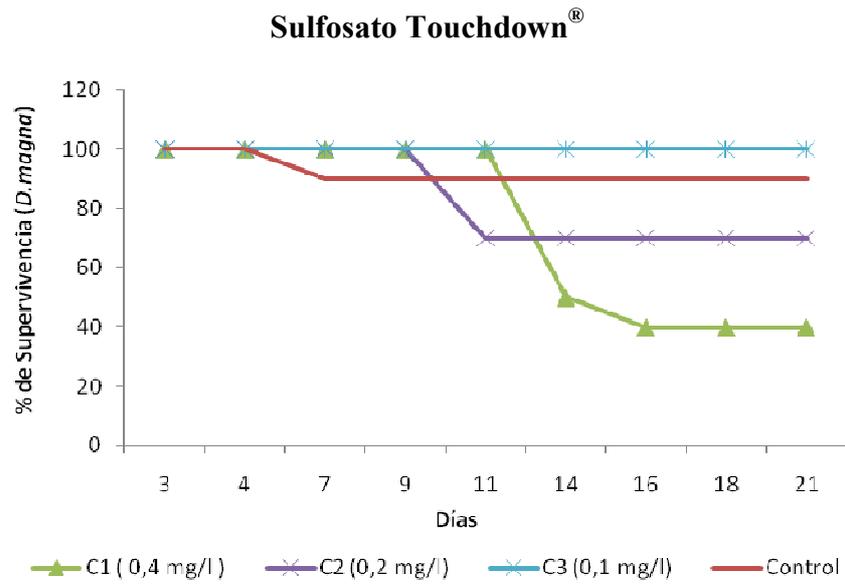
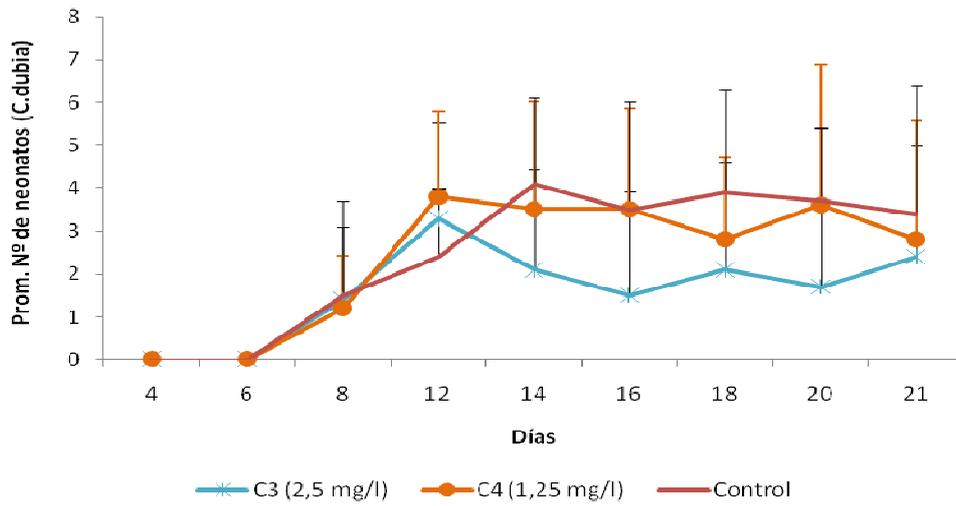
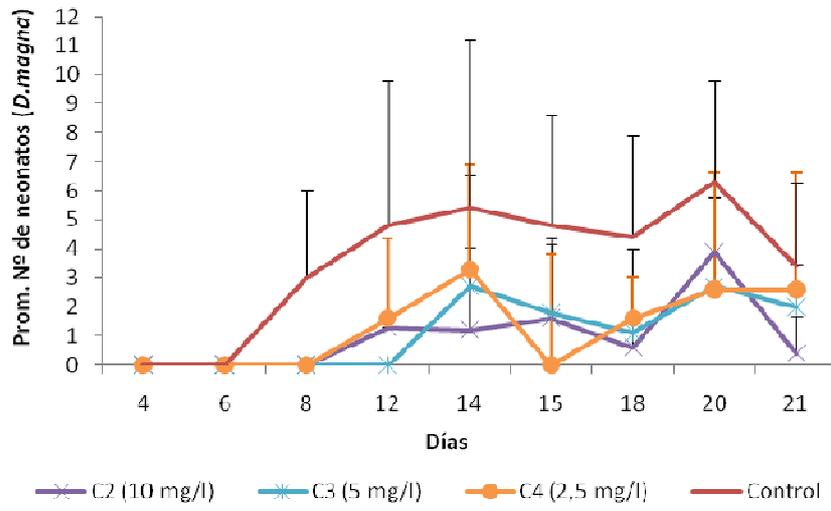
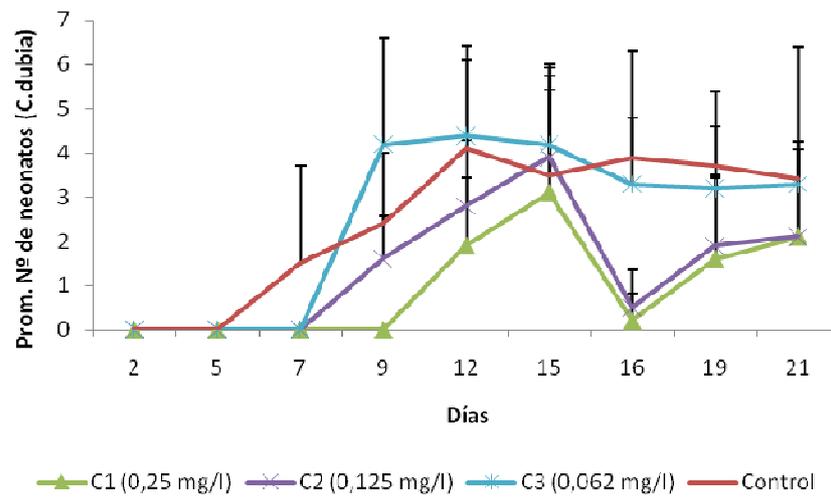
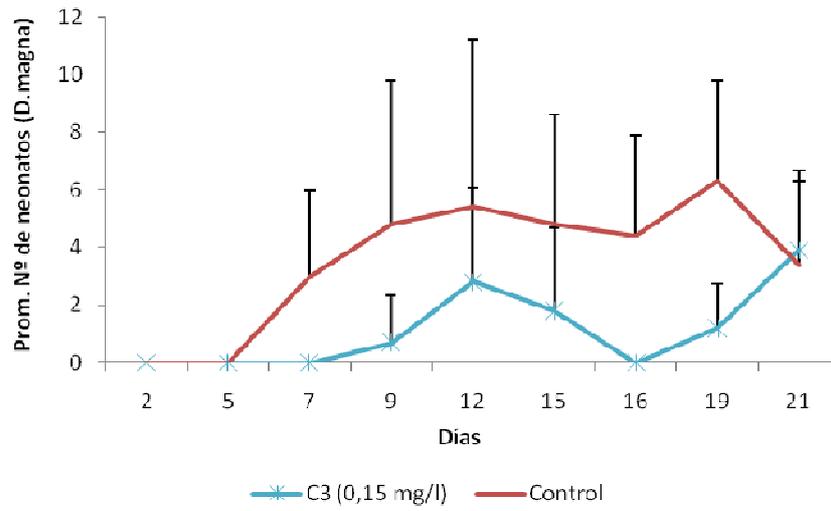


Figura 11: Supervivencia (%) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. (10 réplicas por tratamiento y control).

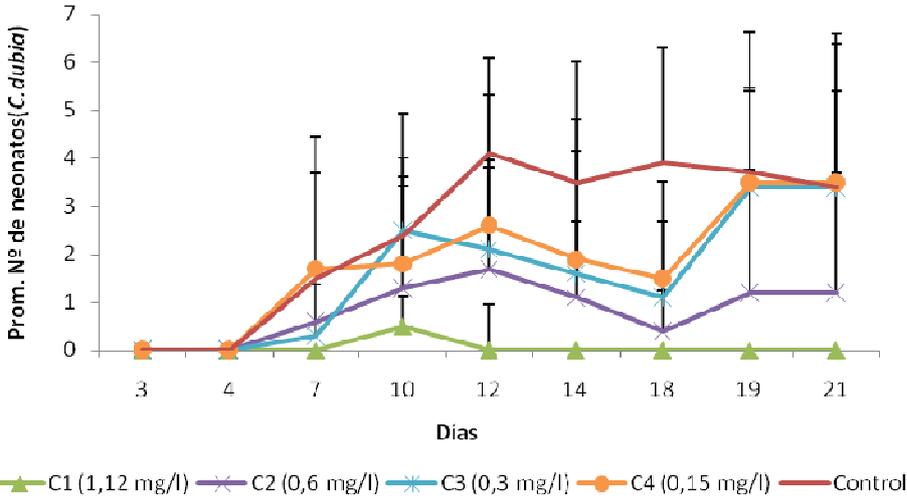
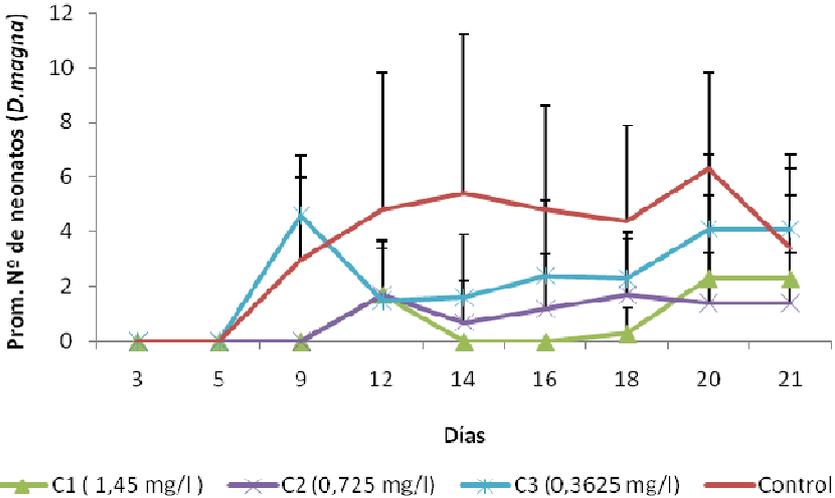
Eskoba®



Panzer Gold®



Roundup Ultramax®



Sulfosato Touchdown®

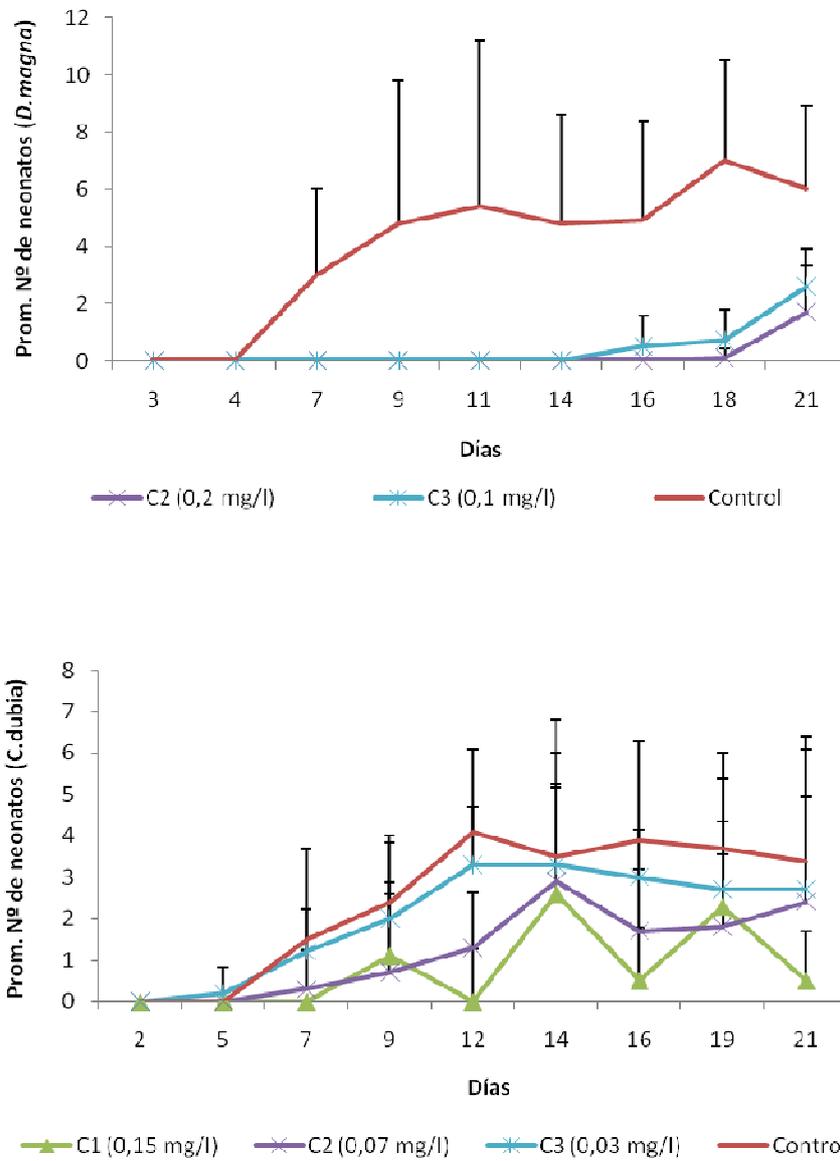
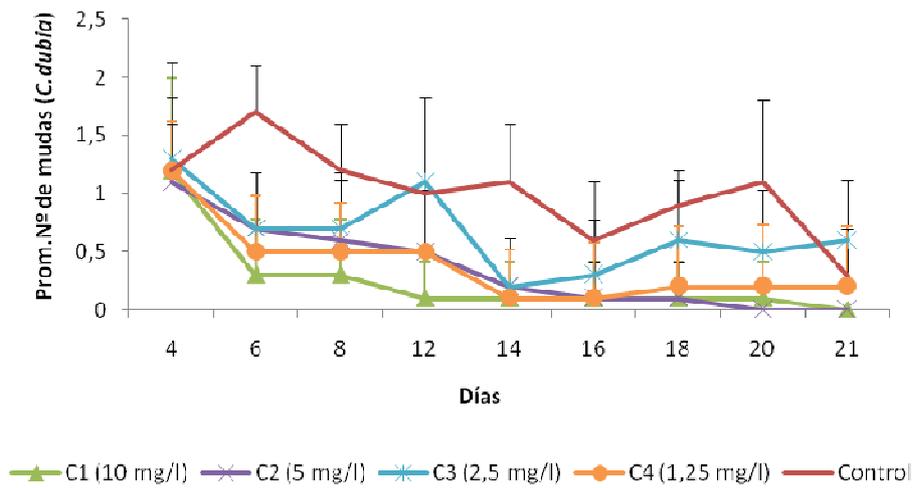
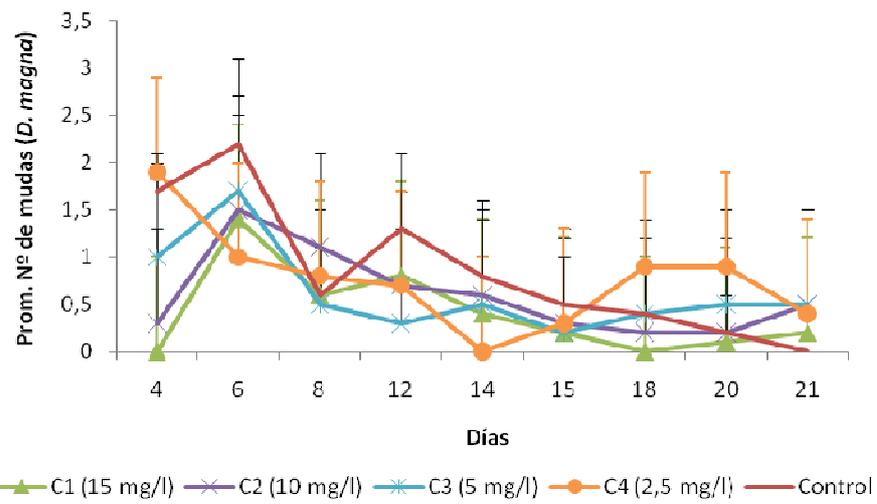
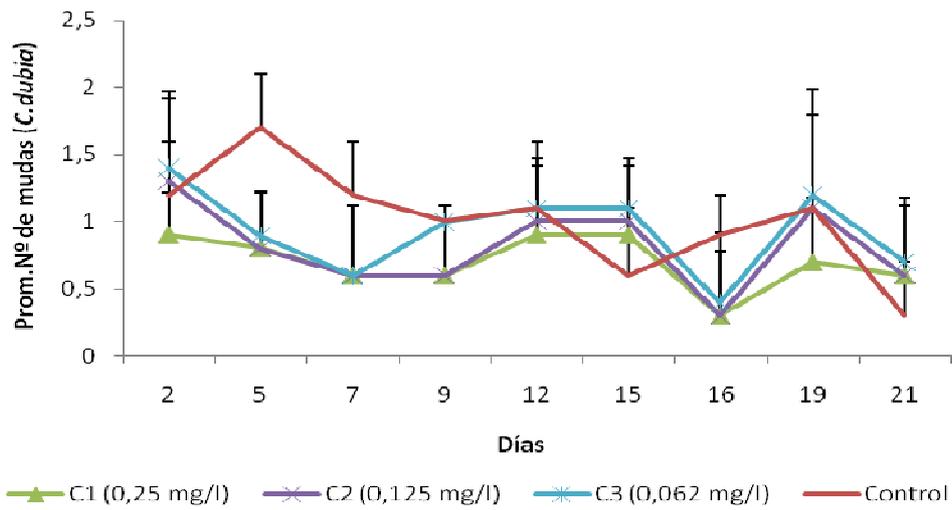
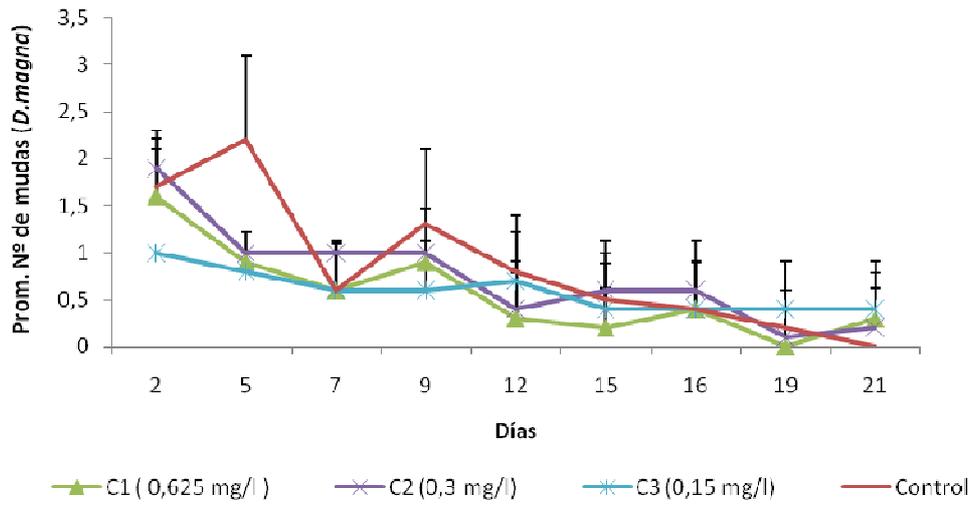


Figura 12: Fecundidad (Nº de Neonatos) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento y control).

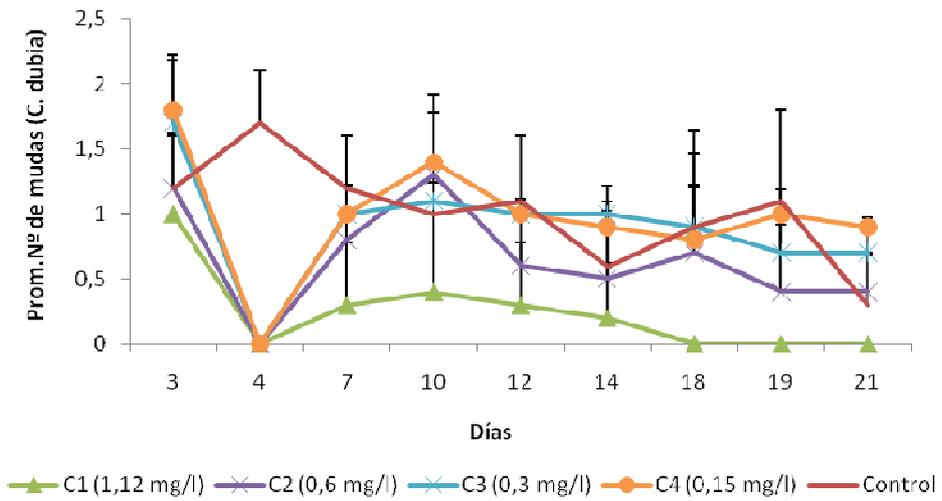
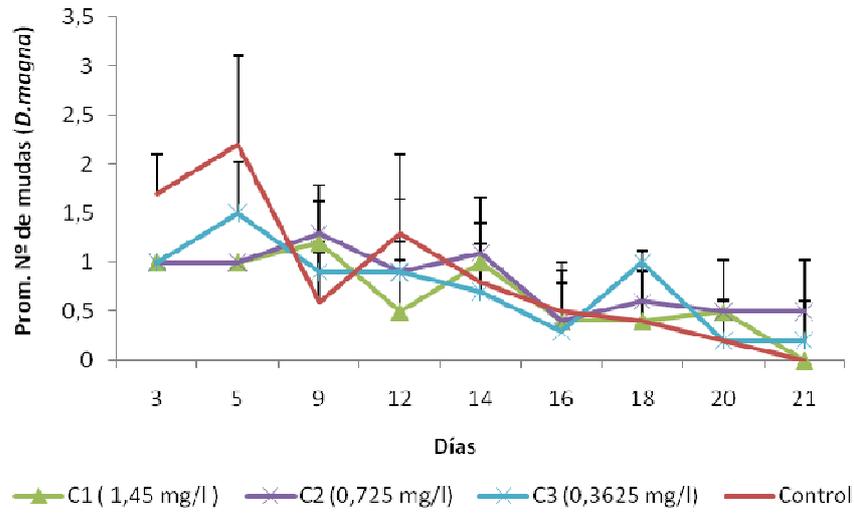
Eskoba®



Panzer Gold®



Roundup Ultramax®



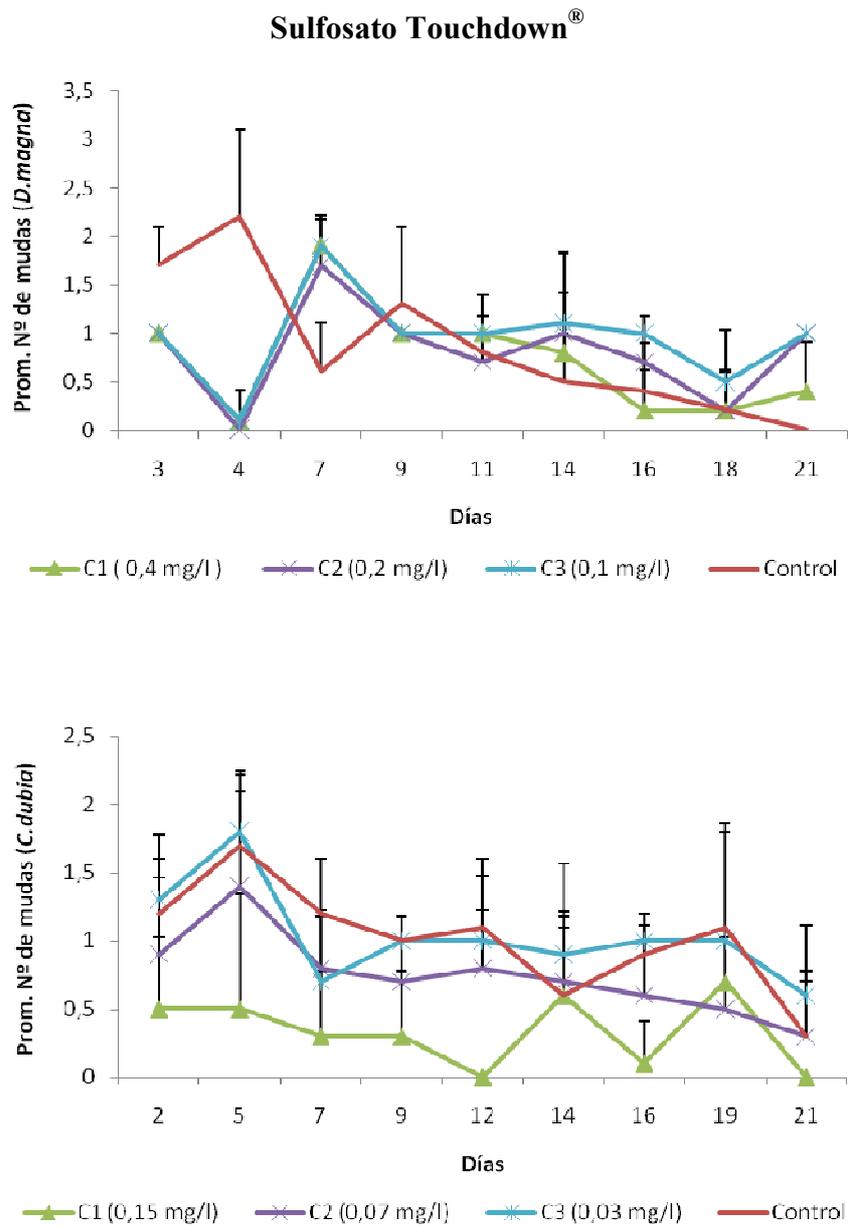


Figura 13: N° de mudas de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a concentraciones de 4 formulaciones de glifosato y el control durante 21 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento y control).

Tabla 10: Resultados de Análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para sobrevivencia, fecundidad y número de mudas de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuesta a 4 formulaciones de glifosato por un período de 15 días (extraído de Reno y col., 2016).

| | Sobrevivencia | | Fecundidad | | N° de Mudass | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | <i>D. magna</i> | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> | <i>C. dubia</i> |
| Eskoba® | | | | | | |
| Control vs C₁ | ** | *** | - | - | * | *** |
| Control vs C₂ | ns | * | *** | - | ns | *** |
| Control vs C₃ | ns | ns | *** | ** | ns | ns |
| Control vs C₄ | ns | ns | ** | ns | ns | ns |
| Panzer Gold® | | | | | | |
| Control vs C₁ | ns | ns | - | *** | ns | * |
| Control vs C₂ | ns | ns | - | *** | ns | ns |
| Control vs C₃ | ns | ns | *** | ns | ns | ns |
| Roundup Ultramax® | | | | | | |
| Control vs C₁ | ns | *** | *** | *** | ns | *** |
| Control vs C₂ | ns | ns | *** | *** | ns | *** |
| Control vs C₃ | ns | ns | * | *** | ns | * |
| Control vs C₄ | | ns | | *** | | ns |
| Sulfosato Touchdown® | | | | | | |
| Control vs C₁ | ns | * | - | *** | ns | ** |
| Control vs C₂ | ns | ns | *** | ** | ns | ns |
| Control vs C₃ | ns | ns | *** | ns | ns | ns |

ns: No significativo; (*) Diferencias significativas (p<0.05); (**) Diferencias altamente significativas (p<0.01); (***) Diferencias extremadamente significativas (p< 0.001), (-) si eventos reproductivos.

Tabla 11: Edad de la primera reproducción (días) de *D. magna* y *C. dubia* luego de ser expuestas a 3 o 4 concentraciones de formulaciones comerciales de glifosato y el control durante 21 días.

| | | Edad de la Primera Reproducción (días) | | | |
|-----------------|----------------|----------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | | Eskoba® | Panzer Gold® | Roundup Ultramax® | Sulfosato Touchdown® |
| <i>D. magna</i> | Control | 8,22 (± 0,66) (n=9) | 8,22 (± 0,66) (n=9) | 8,22 (± 0,66) (n=9) | 8,22 (± 0,66) (n=9) |
| | C ₁ | - | - | 15,4 (± 5,4) (n=9) ** | - |
| | C ₂ | 13,8 (± 1,6) (n=6) ** | - | 12,8 (± 2,8) (n=9) ** | 21 (± 2) (n=4) *** |
| | C ₃ | 13,6 (± 1) (n=6) ** | 14,2(± 4,5) (n=10) ** | 8,9 (± 2,8) (n=10) | 17,2 (± 1,09) (n=5) *** |
| | C ₄ | 13,4(± 1,13)(n=9) ** | | | |
| <i>C. dubia</i> | Control | 9,6 (± 1,5) (n=10) | 9,6(± 1,5) (n=10) | 9,6 (± 1,5) (n=10) | 9,6(± 1,5) (n=10) |
| | C ₁ | - | 13 (± 2,3) (n=10)** | 11 (± 1,4) (n=2)** | 10,3 (± 0,5) (n=3)** |
| | C ₂ | - | 9,6 (± 1,2) (n=10) | 9,6 (± 2,3) (n=8) | 10,1 (± 1,5) (n=8) |
| | C ₃ | 9 (± 1,7) (n=8) | 9,3 (± 0,93) (n=10) | 9,7 (± 2,2) (n=10) | 9,2 (± 1,6) (n=10) |
| | C ₄ | 9,6 (± 2) (n=10) | | 9,3 (± 1,7) (n=10) | |

(n: número de hembras que alcanzaron la madurez sexual). (*) Diferencias significativas con respecto al control (p<0.05); (**) Diferencias altamente significativas (p<0.01); (***) Diferencias extremadamente significativas (p< 0.001); - : sin reproducción.

Tabla 12: Tasa reproductiva neta (R_0) en 21 días de ensayo (test crónico) para cada uno de las concentraciones ensayadas para cada formulado y controles (extraído de Reno y col., 2016).

| | R_0 | |
|----------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | <i>D. magna</i> | <i>C. dubia</i> |
| Control | 3,55 | 2,56 |
| Eskoba[®] | | |
| C1 | 0 | 0 |
| C2 | 0,51 | 0 |
| C3 | 0,77 | 1,45 |
| C4 | 1,23 | 2,12 |
| Roundup Ultramax[®] | | |
| C1 | 0,41 | 0,05 |
| C2 | 0,67 | 0,63 |
| C3 | 1,65 | 1,1 |
| C4 | | 1,3 |
| Panzer Gold[®] | | |
| C1 | 0 | 0,89 |
| C2 | 0 | 1,28 |
| C3 | 1,04 | 2,26 |
| Sulfosato Touchdown[®] | | |
| C1 | 0 | 0,65 |
| C2 | 0,13 | 1,5 |
| C3 | 0,2 | 2,32 |

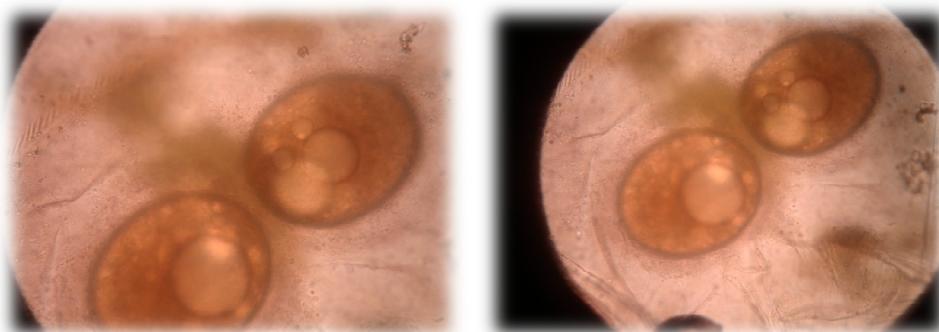


Figura 14: Huevos de *D. magna* sin eclusionar, registrados en el ensayo con Panzer Gold[®] (40X).

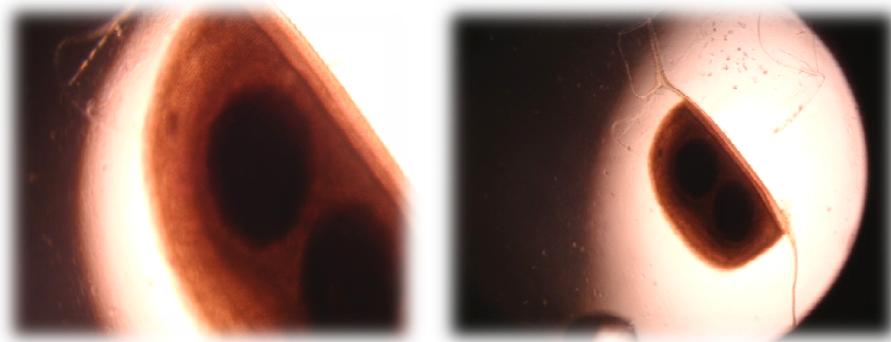


Figura 15: Huevo de resistencia de *D. magna*, registrado en el ensayo con Panzer Gold® (10X y 40X).

5.5. Ensayos de toxicidad con *C. vulgaris*, *D. magna* y *C. dubia* para evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂

En los ensayos con *C. vulgaris*, no hubo diferencias significativas en la densidad celular (número de cél. mL⁻¹) entre las muestras con y sin H₂O₂ (p > 0,05) a las 96 h del ensayo.

Para los dos cladóceros, hubo diferencias significativas entre las muestras con y sin remoción de H₂O₂ (p < 0,05), registrándose mayor mortalidad en las muestras con H₂O₂.

A partir de estos resultados, se determinó que las muestras obtenidas del proceso UV/H₂O₂ no debían contener peróxido de hidrogeno. En consecuencia, previamente a la realización de los ensayos, el H₂O₂ fue removido con catalasa.

5.5.1. Ensayos de toxicidad con *C. vulgaris*, para evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂

Las correlaciones entre el N° de cél. mL⁻¹ y la concentración de glifosato de las muestras a diferentes tiempos de tratamiento (M₀, M₁, M₂, M₃) resultaron altas y significativas para todos los formulados al final del ensayo de 96 h: Eskoba® , r² =0.9173 (p < 0,05); Panzer Gold®, r² =0.9269 (p < 0,05); Sulfosato Touchdown®, r²= 0.8827 (p < 0,05) y Roundup Ultramax®, r² =0.9433 (p < 0,05) (Figura 16 (A B C y D)). La Figura 16 también muestra que la densidad celular aumentó con el transcurso del tiempo de tratamiento y la consecuente disminución de la concentración de glifosato en las diferentes muestras (M₀ a M₃).

Como puede observarse en la Tabla 13, al evaluar las muestras obtenidas con Eskoba®, M₀ mostró diferencias significativas con el control durante todo el ensayo (p < 0,01), M₁ durante las primeras 48 h no mostró diferencias significativas con el control (p > 0,05) pero sí a partir de las 72 h (p < 0,01), en el caso de M₂ y M₃ durante las primeras 48 h de

ensayo no se encontraron diferencias significativas con el control ($p < 0,01$). A las 24 h superaron al control en densidad celular en 25,7 y 34 % respectivamente, y en 15 y 27 % a las 48 h respectivamente. Además, a las 72 y 96 h de ensayo en M_3 se observó 6,7 y 2,25 % I, no registrándose diferencias significativas con el control (ANOVA MR, $p > 0,05$) (Tabla 14).

Para el caso del Panzer Gold[®], a las 24 y 48 h se registraron diferencias significativas con el control en M_0 y M_1 ($p < 0,01$) y en M_3 ($p < 0,05$), sin diferencias entre M_2 y el control. En cuanto al % I, sólo en M_0 y M_1 se inhibió el crecimiento de *C. vulgaris*, mientras que en M_2 y M_3 , la densidad superó al control en 1,12 y 9,9 % a las 24 h y en 1,93 y 20,4 % a las 48 h respectivamente. A las 72 h en M_0 , M_1 y M_2 se observaron diferencias significativas con el control y a las 96 h no hubo diferencias significativas entre M_3 y el control (Tabla 13). Se registró inhibición del crecimiento a las 96 h -entre 88,7 y 5,08- en todas las muestras analizadas (Tabla 14).

En el caso de las muestras expuestas a Sulfosato Touchdown[®] luego del tratamiento con el proceso UV/H₂O₂, a las 24 h se obtuvieron diferencias significativas entre M_0 y M_1 y el control ($p < 0,01$), pero no entre M_2 y M_3 y el control ($p > 0,05$). En M_0 , M_1 y M_2 se inhibió el crecimiento de *C. vulgaris*, mientras que en M_3 el N° de cél. mL⁻¹ superó al control en 3,6 % (Tabla 14).

A las 48 h M_2 se diferenció del control, en tanto que en M_3 la densidad celular superó al control en 19,8 %. A las 72 h las diferencias significativas ($p < 0,01$) se mantuvieron entre las muestras M_0 , M_1 y M_2 versus el control, sin diferencias en M_3 . A las 96 h, se registraron diferencias significativas con el control ($p < 0,01$) en todas las muestras (Tabla 13). El ANOVA MR con post test de Tukey-Kramer mostró que a las 96 h no existieron diferencias significativas entre M_1 y M_2 ($p > 0,05$). Este resultado entre muestras con diferentes concentraciones de glifosato ($M_1 = 25$ mg e.a L⁻¹ y $M_2 = 9$ mg e.a L⁻¹) podría deberse a intermediarios de reacción que estarían aumentado la toxicidad de M_2 (Tabla 14).

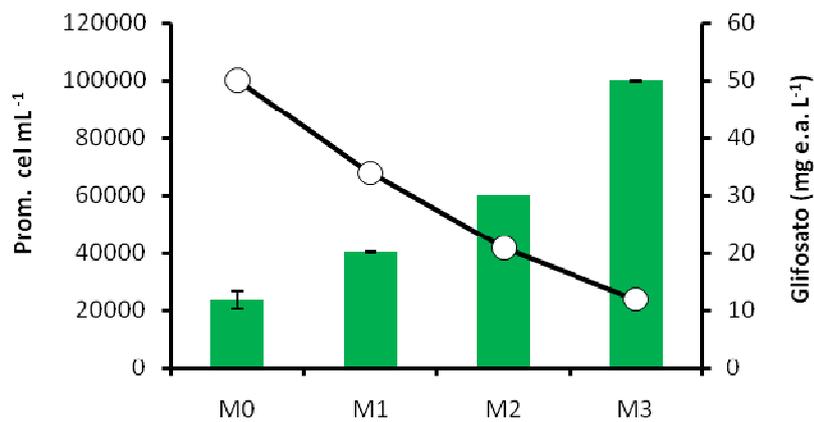
En las muestras provenientes del formulado Roundup Ultramax[®], en M_0 , M_1 y M_2 se observaron diferencias significativas con el control durante todo el ensayo. M_3 no mostró diferencias significativas con el control hasta las 96 h ($p < 0,01$) (Tabla 13). Todas las muestras inhibieron el crecimiento de *C. vulgaris* durante todo el ensayo, excepto a las 48 h donde M_3 superó al control en 6 % (Tabla 14).

Al comparar el % I registrado en M_3 para los cuatro formulados de glifosato que fueron tratados con el proceso UV/H₂O₂, con los % I registrados en las concentraciones más

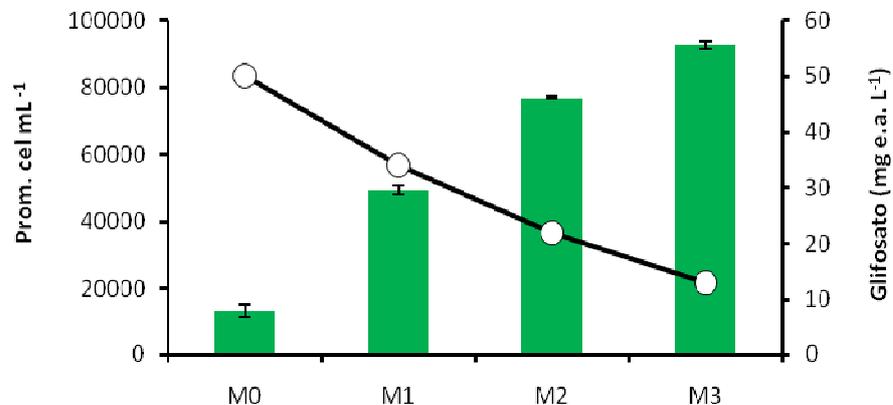
similares utilizadas en el ensayo de inhibición algal -en las que se usó el formulado comercial sin tratar, se observó (Tabla 15) que en tres de las formulaciones (Eskoba[®], Panzer Gold[®] y Roundup Ultramax[®]) el % I fue mayor cuando se usó el formulado sin tratar, lo que estaría indicando que otros ingredientes desconocidos que integran el formulado comercial también aportarían toxicidad a las células y podrían haber sido eliminados durante el tratamiento.

La Tabla 15 muestra que en el caso de Sulfosato Touchdown[®] si se compara el % I en la última muestra del proceso UV/H₂O₂ -que presentó valores de 1 mg e.a L⁻¹ (M₃)- con la concentración más cercana evaluada en el ensayo de inhibición de crecimiento (1,5 mg L⁻¹ de glifosato), el % I (6,2 %) fue aproximadamente tres veces menor al obtenido en M₃ (15,2 %).

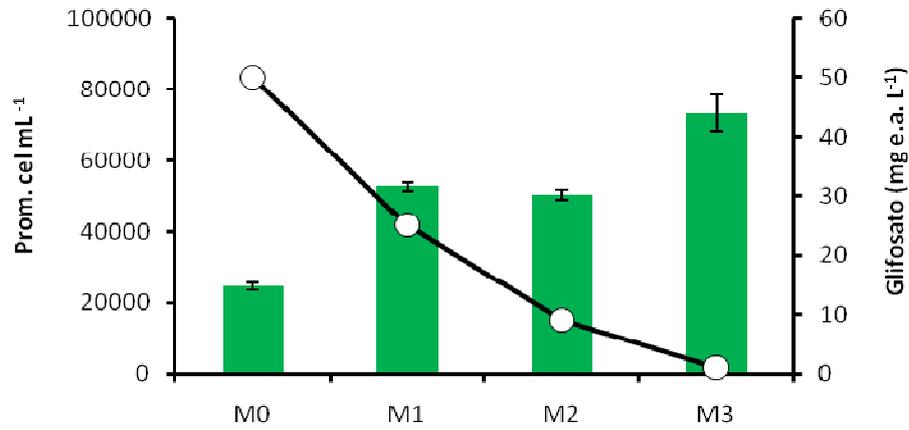
A



B



C



D

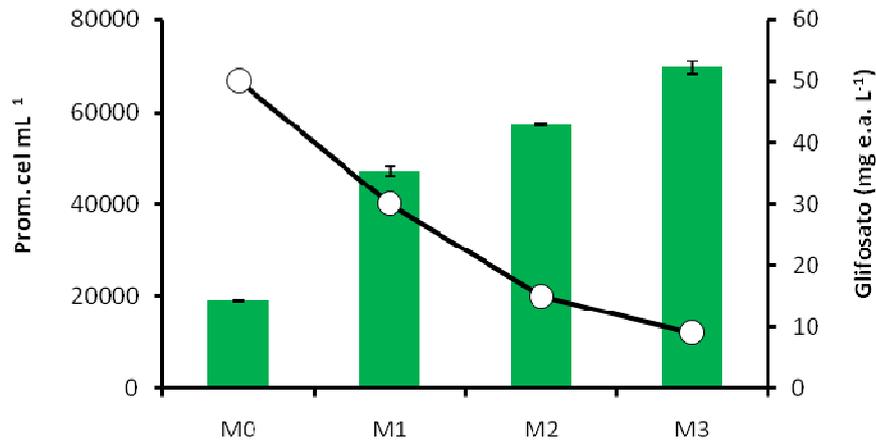


Figura 16: Variaciones en la densidad celular (cél. mL⁻¹) a las 96 h con respecto a la evolución de glifosato para los diferentes tiempos de reacción (M0 a M3, del proceso UV/H₂O₂). Muestra M0 correspondiente a 50 mg a.e. L⁻¹ de glifosato sin H₂O₂; M1, M2 y M3: 120, 240 y 360 min, respectivamente, con eliminación del H₂O₂ residual. A) Eskoba[®]; B) Panzer Gold[®]; C) Sulfosato Touchdown[®] y D) Roundup Ultramax[®]. Columnas: densidad celular (cél. mL⁻¹). Círculos blancos: concentración de glifosato. Las barras de error representan el error estándar (extraído de Reno y col., 2016).

Tabla 13: Diferencias significativas en el número de cél. mL⁻¹ entre las diferentes muestras obtenidas en el proceso UV/H₂O₂ y el control para cada uno de los formulados evaluados.

| Eskoba[®] | M₀ | M₁ | M₂ | M₃ |
|----------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 24 h | ** | ns | **(+) | **(+) |
| 48 h | ** | ns | **(+) | **(+) |
| 72 h | ** | ** | ns | ns |
| 96 h | ** | ** | ** | ns |
| Panzer Gold[®] | | | | |
| 24 h | ** | ** | ns | *(+) |
| 48 h | ** | * | ns | *(+) |
| 72 h | ** | ** | ** | * |
| 96 h | ** | ** | * | ns |
| Sulfosato Touchdown[®] | | | | |
| 24 h | ** | ** | ns | ns |
| 48 h | ** | ** | ** | **(+) |
| 72 h | ** | ** | ** | ns |
| 96 h | ** | ** | ** | ** |
| Roundup Ultramax[®] | | | | |
| 24 h | ** | * | ** | ns |
| 48 h | ** | ** | ** | ns |
| 72 h | ** | ** | ** | ns |
| 96 h | ** | ** | ** | ** |

** : p<0.01; * : p<0.05; ns: no se observaron diferencias significativas con el control; *(+): se observaron diferencias significativas y el número de cél.mL⁻¹ de la muestra fue mayor al del control.

Tabla 14: % de inhibición (% I) para cada una de las muestras obtenidas en el proceso UV/H₂O₂ y los diferentes formulados evaluados (extraído de Reno y col., 2016).

| Eskoba[®] | M₀ | M₁ | M₂ | M₃ |
|----------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 24 h | 39,8 | 4,5 | 25,7 ⁽⁺⁾ | 34 ⁽⁺⁾ |
| 48 h | 47,1 | 1,3 | 15 ⁽⁺⁾ | 27 ⁽⁺⁾ |
| 72 h | 49,2 | 30,6 | 13,6 | 6,8 |
| 96 h | 63,9 | 41,6 | 24,5 | 2,2 |
| Panzer Gold[®] | | | | |
| 24 h | 99,7 | 17,1 | 1,12 ⁽⁺⁾ | 9,9 ⁽⁺⁾ |
| 48 h | 86,5 | 18,4 | 1,93 ⁽⁺⁾ | 20,4 ⁽⁺⁾ |
| 72 h | 71,6 | 20,4 | 19,9 | 15,5 |
| 96 h | 88,7 | 31,9 | 13,6 | 5,08 |
| Sulfosato Touchdown[®] | | | | |
| 24 h | 25,7 | 39,5 | 0,8 | 3,6 ⁽⁺⁾ |
| 48 h | 55,4 | 35,6 | 15,7 | 19,8 ⁽⁺⁾ |
| 72 h | 59,9 | 28,2 | 21,8 | 8,2 |
| 96 h | 60,8 | 28,8 | 30 | 15,3 |
| Roundup Ultramax[®] | | | | |
| 24 h | 90,4 | 23 | 38,3 | 5,4 |
| 48 h | 84,4 | 20,1 | 17,4 | 6 ⁽⁺⁾ |
| 72 h | 80,4 | 34,1 | 28,2 | 13,1 |
| 96 h | 72,3 | 33,4 | 28 | 18,2 |

. X⁽⁺⁾: indica > % de cel.mL⁻¹ en la muestra M_x que en el control

Tabla 15: Porcentaje de inhibición (I %) en la muestra M₃ y en la concentración más cercana usada en los ensayos de inhibición realizados con los formulados sin tratar (extraído de Reno y col., 2016).

| Formulado | Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | % I |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------|
| Eskoba[®] | | |
| M ₃ | 12 | 2,2 |
| Muestra sin tratar | 12,5 | 14,2 |
| Panzer Gold[®] | | |
| M ₃ | 13 | 5,08 |
| Muestra sin tratar | 12,5 | 54,2 |
| Sulfosato Touchdown[®] | | |
| M ₃ | 1 | 15,3 |
| Muestra sin tratar | 1,5 | 6,2 |
| Roundup Ultramax[®] | | |
| M ₃ | 9 | 20 |
| Muestra sin tratar | 6,25 | 50,2 |

5.5.2. Ensayos de toxicidad con *D. magna* y *C. dubia* para evaluar la eficiencia del proceso UV/H₂O₂

El test t del % de mortalidad de las diferentes especies, mostró valores no significativos (>0,05) en todos los casos, lo que indica que las dos especies respondieron de forma similar al tratamiento.

Las correlaciones entre el % de mortalidad y la concentración de glifosato de las muestras a diferentes tiempos de tratamiento (M₀, M₁, M₂, M₃) resultaron altas y significativas para todos los formulados al final del ensayo de 48 h; Eskoba[®], r²= 0.9363 y 0.8526 (p< 0,01), Roundup Ultramax[®], r²= 0.9529 y 0.9657, Panzer Gold[®], r²=0.9675 y 0.9460, Sulfosato Touchdown[®], r²= 0.8937 y 0.6914 (p<0,01) para *D. magna* y *C. dubia*, respectivamente. Estos resultados indican claramente que la mortalidad de los microcrustáceos disminuyó en forma lineal al disminuir la concentración de glifosato durante el proceso.

La Tabla 16 muestra que la especie de cladóceros neotropical, representantes del litoral fluvial argentino (*C. dubia*) fue más sensible al proceso –aunque no significativamente– que la especie holártica *D. magna*.

Tabla 16: Mortalidad (%) de *C. dubia* y *D. magna* en la muestra M3 (mayor tiempo de degradación) para los cuatro formulados de glifosato evaluados.

| % de Mortalidad en la muestra M ₃ | | | | |
|----------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| | Eskoba [®] | Roundup Ultramax [®] | Panzer Gold [®] | Sulfosato Touchdown [®] |
| <i>D. magna</i> | 35 | 50 | 10 | 5 |
| <i>C. dubia</i> | 60 | 80 | 30 | 20 |

Por otro lado, las Tablas 17, 18, 19 y 20 muestran que no se puede encontrar una relación clara entre las concentraciones a las 48 h-CL₅₀, las de M₃ (mayor tiempo de reacción) y el % mortalidad de los cladóceros. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen intermediarios de reacción propios de la degradación del anión glifosato y aquellos provenientes de la degradación del catión isopropilamina (en el caso de la formulación Eskoba[®]) que podrían estar modificando la toxicidad de las muestras obtenidas con el proceso.

Tabla 17: 48h-CL₅₀ para las tres especies en los ensayos agudos con Eskoba[®] y Mortalidad (%) en M₃ (extraído de Reno y col., 2015).

| % de Mortalidad | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> |
| 48h-CL ₅₀ = 14,49 | 50 | |
| 48h-CL ₅₀ = 29,48 | | 50 |
| M ₃ = 12 | 60 | 35 |

Tabla 18: 48h-CL₅₀ para las tres especies en los ensayos agudos con Sulfosato Touchdown[®] y Mortalidad (%) en M₃ (extraído de Reno y col., 2015).

| % de Mortalidad | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> |
| 48h-CL ₅₀ = 0,31 | 50 | |
| CL ₅₀ = 1,62 | | 50 |
| M ₃ = 1 | 20 | 5 |

Tabla 19: 48h-CL₅₀ para las tres especies en los ensayos agudos con Roundup Ultramax[®] y Mortalidad (%) en M₃.

| % de Mortalidad | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> |
| 48h-CL ₅₀ = 4,84 | 50 | |
| 48h-CL ₅₀ = 11,68 | | 50 |
| M ₃ = 9 | 80 | 50 |

Tabla 20: 48h-CL₅₀ para las tres especies en los ensayos agudos con Panzer Gold[®] y Mortalidad (%) en M₃.

| Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | % de Mortalidad | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | <i>C. dubia</i> | <i>D. magna</i> |
| 48h-CL ₅₀ = 0,54 | 50 | |
| 48h-CL ₅₀ = 2,12 | | 50 |
| M ₃ = 13 | 30 | 10 |

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó a través de diferentes ensayos (agudos, de recuperación y crónicos) la toxicidad de cuatro formulaciones de glifosato, tomando como modelo biológico a tres especie no-blanco, la microalga *C. vulgaris* y los cladóceros *D. magna* y *C. dubia*.

Cuando se examina la toxicidad de los herbicidas, es habitual poner el foco en la toxicidad del principio activo, sin otorgar similar atención a la toxicidad de los coadyuvantes que se agregan al formulado para aumentar su eficacia –la adhesividad a la cutícula serosa de las hojas- sobre las especies blanco. Sin embargo, diversos estudios encontraron que las formulaciones de glifosato son más tóxicas que el principio activo (Lajmanovich y col., 2011; Piola y col., 2013; Mesnage y col., 2014; Vincent y Davidson, 2015; Bach y col., 2016; Martini y col., 2016)

Después de exponer la microalga y los dos cladóceros a las formulaciones comerciales de glifosato, los resultados de las 96h-CE₅₀ y 48h-CL₅₀ obtenidos en este trabajo fueron muy variables y dependieron de las especies analizadas (entre 29,95 y 0,31 mg e.a L⁻¹). Esto está de acuerdo con estudios realizados en diferentes países (por ejemplo Cuba, Polonia, Rusia y Argentina) que también registraron variaciones significativas en la toxicidad del glifosato en organismos planctónicos (Raipulis y col, 2009; Vendrell y col, 2009; Lipok y col, 2010; Albarracín y col, 2011; Romero y col, 2011). Notoriamente, tales variaciones tuvieron una diferencia de hasta dos órdenes de magnitud entre ellos, dependiendo si el ingrediente activo se consideró aisladamente o como constituyente de una formulación comercial.

Para la microalga, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la toxicidad de las cuatro formulaciones de glifosato utilizadas en los países productores de grano de soja a gran escala, aumentó junto con la concentración del principio activo, siendo el Roundup Ultramax[®] (74,7 (p/p) sal monoamónica) el formulado más tóxico.

La Tabla 21 resume los valores de toxicidad registrados en este trabajo para *C. vulgaris* y los resultados obtenidos por otros investigadores que estudiaron el efecto de otros formulados a base de glifosato sobre distintas especies del género *Chlorella*. Se observa que no existe correlación entre la toxicidad de las formulaciones y las concentraciones del principio activo ($r^2= 0.017$; $p= 0,715$).

Tabla 21: Comparación entre la concentración del principio activo de diferentes formulados con glifosato y su toxicidad 96h-EC₅₀ (mg L⁻¹), para distintas especies del genero *Chlorella* según diversos autores

| Especie | Formulación de glifosato | 96h-CE ₅₀ (mg L ⁻¹) | Referencia |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Formulación 97.5% | 41,7 | Vendrell y col., 2009 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Formulación 95% | 4,7 | Ma y col., 2002 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | Formulación 95% | 3,5 | Ma y col, 2001 |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> | Roundup 48% | 0,93 | Christy y col., 1981 |
| <i>Chlorella kessleri</i> | ATANOR 48% | 55, 62 | Romero y col., 2011 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Roundup® 360 SL 41,5 % | 118,17 | Lipok y col., 2010 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Eskoba® 48 % | 29,95 | En este trabajo |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Panzer Gold® 60,8 % | 8,64 | En este trabajo |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Sulfosato Touchdown® 62 % | 7,37 | En este trabajo |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Roundup Ultramax® 74,7 % | 3,85 | En este trabajo |

Por otro lado, luego de analizar las hojas de seguridad de los formulados testeados, se observó que en ninguna de éstas se mencionó el valor de 96 hs-EC₅₀ o 72 hs-EC₅₀ para microalgas (Anexo I). Sin embargo, numerosos autores han destacado que el fitoplancton es tal vez el más promisorio de todos los indicadores de alerta temprana de cambios en las características ecológicas de los humedales, causados por productos químicos (Luna y Carmenate, 2004). Por ejemplo, en un trabajo reciente Mensah y col., (2013), luego de exponer a diferentes organismos (*Baetis harrisoni*, *Burnupia stenochorias*, *Caridina nilotica*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana*, *Daphnia pulex*, *Oreochromis mossambicus* y *Tanytarsus flumineus*) al formulado de glifosato -Roundup®-, encontraron que las microalgas *C. protothecoides* y *C. sorokiniana* fueron las especies más sensibles a ese herbicida.

Mediante la comparación de la sensibilidad de *C. vulgaris* con la de otras especies de Chlorophyceae expuestas a formulados comerciales a base de glifosato, se observó que las 96 hs-EC₅₀ obtenidas en este trabajo estuvieron por debajo a las EC₅₀ registrada por otros investigadores: Tsui y Chu (2003) obtuvieron a las 96 h valores de EC₅₀ de 5,81 mg L⁻¹ para *Selenastrum capricornutum* expuestos a Roundup®, en este trabajo se encontró una EC₅₀ menor para el Roundup Ultramax® (3,85 mg e.a L⁻¹), en tanto que Romero y col., (2011) registraron EC₅₀ de 55,62 mg L⁻¹ luego de exponer a *C. kessleri* al formulado Atanor® durante 96 h, este valor es mayor a la EC₅₀ encontrada para el formulado menos tóxico de este trabajo (Eskoba 96 h- EC₅₀: 29,95 mg a.e L⁻¹). Contrariamente, los estudios llevados a cabo por Sáenz y Di Marzio (2009) demostraron valores aún superiores de EC₅₀ en diferentes especies de microalgas expuestas a Roundup® durante 96 h, con rango entre 120 y 154 mg L⁻¹. Los resultados muestran que la sensibilidad de la microalga a glifosato depende de la especie y que es altamente dependiente de la composición química de las formulaciones probadas.

En cuanto el estímulo del crecimiento de *C. vulgaris* observado en este trabajo a bajas concentraciones de glifosato en los ensayos de inhibición del crecimiento donde se evaluaron los formulados sin tratamiento, cabe mencionar que resultados similares fueron encontrados por otros autores tales como Calabrese y col., 1999, Sáenz y col. (2012) y Regaldo (2013). Además, Wong (2000) y Zalizniak (2006), trabajaron con una formulación comercial de glifosato con el 35,6% de ingrediente activo y Roundup Biactive®, encontrando que a concentraciones de 0,2 y 16 mg L⁻¹, respectivamente, se estimuló el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* y de *Pseudokirchneriella subcapitata*. La estimulación mencionada anteriormente también podría resultar del uso del glifosato como una fuente de carbono o nitrógeno, según lo propuesto por Maršálek y Rojíčková (1996). En este sentido, Qiu y col. (2013), mostraron que el glifosato es una fuente de fosforo (P) adecuada para el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en la concentración de 1 mg L⁻¹ P Roundup®.

Para el caso de los cladóceros el formulado de mayor toxicidad fue el Sulfosato Touchdown® con una 48 h-LC₅₀ (mg e.a L⁻¹) de 1,62 y 0,31 para *D. magna* y *C. dubia* respectivamente, siendo *C. dubia* la especie más sensible.

En este trabajo se obtuvieron resultados similares a los encontrados en otros estudios, en cuanto a la mayor sensibilidad de *C. dubia* frente a *D. magna*. Regaldo, 2013 encontró que *C. dubia* fue más sensible que *D. magna* y *Moinodaphnia macleayi* cuando expuso estas especies a cromo, plomo y cobre. Wong y Dixon 1995; Rinderhagen y col. 2000;

Olvera-Ramírez y col., 2010, reconocen también que *C. dubia* es un bioindicador más sensible que *D. magna*.

Comparando los valores de 48 h-LC₅₀ encontrados en este trabajo, con los reportados por otros autores que evaluaron diferentes formulados comerciales de glifosato, se puede observar que las 48 h-LC₅₀ difieren según la especie y el formulado, por ejemplo: para *D. magna* se registraron valores de 48 h-LC₅₀ de 7,9 mg L⁻¹ expuesta a Faena[®], 61, 72 mg L⁻¹ expuesta a Ron-do[®], 190 mg L⁻¹ a Roundup[®]. Los rangos de toxicidad registrados para *C. dubia* oscilaron entre 5,39 mg L⁻¹ (Roundup[®]) y 415 mg L⁻¹ (Rodeo[®]) (Alberdiy col., 1996; Domínguez-Cortinas y col., 2008; Raipulis y col., 2009; Tsui y Chu, 2003). Reno y col., 2014, encontró valores de 48 h-LC₅₀ de 21,5 e.a mg L⁻¹ cuando expuso *Simocephalus vetulus* al mismo formulado comercial evaluado en este trabajo (Eskoba[®]).

Las diferencias encontradas entre las toxicidades aguda registradas en este trabajo y otros aquí considerados, podrían ser atribuidos a la composición de las formulaciones comerciales (es decir, a las diferencias respecto a las asociaciones químicas del ingrediente activo y la proporción y naturaleza de los coadyuvantes o aditivos utilizados en la formulación comercial, que podrían ser más tóxico que el ingrediente activo (Tabla 22).

En este sentido, Tsui y Chu (2003) encontraron que para el Roundup[®] el coadyuvante polioxietileno-amina (POEA) siempre fue más tóxico que el ingrediente activo (por ejemplo, 48 h-LC₅₀= 5,39, 1,77 mg L⁻¹, para la formulación comercial, pero 1,15 y 0,57 mg L⁻¹ de *C. dubia* y *Acartia tonsa*, respectivamente, después de haber sido expuestos a POEA. Estos valores pueden ser comparados con 48 h-LC₅₀ para el glifosato ácido = 35,3; 147 mg L⁻¹, para el cladóceros y el copépodo, respectivamente.

Tabla 22: Comparación de la toxicidad del glifosato (N- fosfonometil glicina), las formulaciones comerciales y los tensioactivos o coadyuvantes comerciales más comunes.

| Ingrediente activo | Especies | 48 h-CL₅₀ (mg e.a L⁻¹) | Referencias |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| N-fosfonometilglicina | <i>Daphnia magna</i> | 146 | Domínguez-Cortinas y col., (2008) |
| N-fosfonometilglicina | <i>Daphnia magna</i> | 199,61 | Demetrio (2012) |
| N-fosfonometilglicina | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 35,3 | Tsui y Chu (2003) |
| Formulación Comercial | | | |
| Raundup [®] | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 5,39 | Tsui y Chu (2003) |
| Raundup DuraMax [®] | <i>Daphnia magna</i> | 0,1 | Appendices to Glyphosate (2010) |
| Raundup UltraMax [®] | <i>Daphnia magna</i> | 11 | Appendices to Glyphosate (2010) |
| Faena [®] | <i>Daphnia magna</i> | 7,9 | Domínguez-Cortinas y col., (2008) |
| Eskoba [®] | <i>Daphnia magna</i> | 29,48 | Reno y col., 2015 |
| Roundup Ultramax [®] | <i>Daphnia magna</i> | 11,68 | En este trabajo |
| Panzer Gold [®] | <i>Daphnia magna</i> | 2,12 | En este trabajo |
| Sulfosato Touchdown [®] | <i>Daphnia magna</i> | 1,62 | En este trabajo |
| Eskoba [®] | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 14,49 | En este trabajo |
| Roundup Ultramax [®] | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 4,84 | En este trabajo |
| Panzer Gold [®] | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0,54 | En este trabajo |
| Sulfosato Touchdown [®] | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0,31 | En este trabajo |
| Coadyuvantes | | | |
| POEA | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 1,15 | Tsui y Chu (2003) |
| POEA | <i>Daphnia magna</i> | 0,097 | Brausch y Smith (2007) |
| Ethoxylated alcohols C ₉₋₁₅ EO ₉ | <i>Daphnia magna</i> | 1,13 | Dorn y col. (1993) |

Como en el caso de los 96 h-CE₅₀ determinados para *C. vulgaris*, los resultados obtenidos tomando como modelo biológico a *D. magna* y *C. dubia* y considerando la 48-CL₅₀, muestran que también en este caso, la sensibilidad al glifosato difiere entre especies estudiadas y es altamente dependiente de la composición química de los formulados ensayados.

En el caso de los ensayos de recuperación y crónicos en este trabajo se evaluaron concentraciones de glifosato que están cercanas o por debajo de las encontradas en el ambiente, entre 0,0005 y 0,56 mg Kg⁻¹ en material particulado en suspensión (Aparicio y col., 2013) y las reportadas por la Subsecretaría de Recursos Hídricos, República Argentina, 2003 y la Canadian, Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2012, como valores guías para la protección de la biota acuática (entre 0,2 a 2,7 e.a mg L⁻¹) donde tanto los módulos de λ como los valores de R₀ fueron < 1.

Esta condición indicaría que poblaciones expuestas de forma aguda durante 48 h o durante una exposición crónica a estas concentraciones tienen tendencia a no recuperarse al evento de estrés o desaparecer localmente del ambiente.

Resultados similares a los encontrados en este trabajo, en el caso de los ensayos de recuperación, fueron reportados por Hua y Relyea (2014), quienes demostraron que la abundancia de cladóceros no se recuperó al final del ensayo (18 semanas), después de ser expuesta a clorpirifós, a pesar de la degradación de este compuesto (2,8 % a la tercera semana). Esto indicaría que la población de cladóceros no se pudo recuperar de la toxicidad inicial de clorpirifós. Choung y col., 2013, reportaron que las comunidades en ensayo en microcosmos a concentraciones de 10 µg/l de terbufos (insecticida-nematicida, organofosforado) y en mezcla con atrazina, divergieron significativamente con el control después de la aplicación (<48 h), pudiendo atribuirse a la eliminación de los cladóceros y a la reducción de hydracarina.

En cuanto a la mortalidad de neonatos observada en los ensayos de recuperación, esto podría deberse a efectos genotóxicos que estarían condicionando la viabilidad de la progenie. En este sentido, Thai-Hoang y col., 2010, informaron que el glifosato afecta la expresión de genes fundamentales para el metabolismo de los ácidos grasos y esteroides después de una exposición de 24 h a concentraciones agudas.

En este trabajo como en los realizados por Emlen y Springman 2007, Harper y col., 2008 y Santadino y col., 2014, se demostró que el análisis a partir de MMP es una herramienta útil para determinar efectos ecotoxicológicos actuantes a diferentes edades o estados del

ciclo de vida de la población experimental bajo análisis. Además, es escaso el conocimiento sobre cómo responden demográficamente las especies a situaciones de contaminación puntuales y de corta duración. En este sentido, la realización de un ensayo de recuperación y el análisis a partir de MMP con simulaciones de Monte Carlo permitieron obtener un parámetro que integró variables demográficas relevantes, tales como la supervivencia, el crecimiento y la fecundidad, posibilitando generar información de complejidad intermedia entre los ensayos agudos y crónicos.

En el caso de los ensayos crónicos en este trabajo se mostró que la fecundidad fue el atributo más sensible, mientras que la supervivencia mostró pocas diferencias entre los tratamientos y controles para las dos especies de cladóceros estudiadas. Melnichuk y col., 2007 reportaron una disminución en la fecundidad de *Ceriodaphnia affinis* a concentraciones muy bajas (de hasta 0,01 mg L⁻¹) en ensayos con el formulado comercial Fakel[®] (48% e.a glifosato-IPA). La presencia de huevos sin eclosionar o embriones abortados, también fue reportada por Cuhra y col., (2013) luego de exponer a *D. magna* a 1,35 mg L⁻¹ de Roundup[®] en ensayos crónicos.

Las dos especies estudiadas en este trabajo mostraron retraso en el inicio de la primera reproducción. Resultados similares fueron reportados por Papchenkova y col., (2009) y Gagnetten y col., (2014), luego de exponer a *C. reticulata* y *D. magna* al formulado comercial Roundup[®] y Ron-do[®], respectivamente. Por otro lado, Reno y col., (2014), informaron que en el cladócero *Simocephalus vetulus* se atrasó la edad de la primera reproducción así como en el copépodo *Notodiptomus conifer*, el tiempo para alcanzar el estado adulto (pasando de copepodito 5 a copepodito 6).

La formación de los huevos abortados en los ensayos con *D. magna* expuesta a C1 y C2 de Panzer Gold[®] en ensayos crónicos, así como la formación de un epipio a los 17 días de exposición pueden interpretarse como respuestas adaptativas de evasión ante el efecto prolongado de un tóxico. Cabe destacar además que en las dos concentraciones mencionadas, esta especie tampoco se reprodujo. Como señalan Lass y Spaak (2003), los cambios en la asignación de la energía pueden alterar el *fitness* o adecuación biológica del organismo, el cual es una medida de su capacidad reproductiva. En este contexto, el cladóceros no estaría invirtiendo los recursos energéticos asignados a la reproducción en la formación de neonatos (con escasas probabilidades de supervivencia) sino a la formación de huevos de resistencia, con mayores probabilidades de supervivencia futura (en el caso de cesar la exposición al tóxico). Con respecto a la tasa neta de crecimiento poblacional (R_0), Ceresoli y Gagnetten (2003) demostraron que es un

buen parámetro de adecuación biológica en ensayos crónicos de exposición continua y enfatizan la importancia de considerar parámetros poblacionales integradores y no sólo la mortalidad determinando la LC_{50} , punto final comúnmente utilizado en ensayos de toxicidad aguda.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan a discusiones actuales en el marco de la teoría ecofisiológica, en el sentido de que para muchas especies, la supervivencia es el rasgo de historia de vida más importante de conservar. Para cumplir con este objetivo los organismos pueden adoptar una estrategia de *trade-off*, que implica disminuir otras funciones biológicas, como la movilidad, la madurez sexual, la fecundidad e incluso el crecimiento, para poder sobrevivir a eventos de estrés (Dodson y Hanazato, 1995).

La contaminación ambiental por agroquímicos expone a organismos no blanco a la urgencia de responder rápida y eficientemente a eventos de estrés debiendo efectuar un balance entre las distintas demandas energéticas que entran en conflicto al no poder ser satisfechas todas en forma simultánea. En este sentido, la necesidad de eliminar una sustancia tóxica puede romper el equilibrio entre los diferentes componentes del presupuesto energético, causando modificaciones en la dinámica poblacional. Según Sibly y Calow (1989) puede establecerse un compromiso entre la capacidad de sobrevivir al tóxico, la tasa de crecimiento y la fecundidad. Por otro lado, Calow y Sibly (1990) y Stearns (1993), reportaron que los organismos generalmente no aportan recursos a todas las funciones que pueden estar involucradas en una situación de estrés. En este contexto, este trabajo mostró que las dos especies de cladóceros utilizadas como organismos test asignaron mayores recursos energéticos a la supervivencia, en detrimento de la fecundidad, en todos los formulados de glifosato evaluados. Sin embargo, tales desbalances pueden tener consecuencias ecológicas de relevancia a nivel poblacional, comunitario y ecosistémico.

En cuanto a la evaluación del proceso UV/H₂O₂ con *C. vulgaris*, en todas las muestras obtenidas al final del proceso (360 min., M₃), el % I no superó el 18,2% para las formulaciones ensayadas, lo que indicaría la eficacia del proceso para reducir la toxicidad del glifosato.

Cabe destacar que como en la evaluación de los formulados sin tratamiento, en M₂ y M₃ de Eskoba[®] y M₃ Panzer Gold[®], Sulfosato Touchdown[®] y Roundup Ultramax[®], durante la primera 48 h de la prueba, la densidad de células en las muestras superaron al control. En este sentido, Manassero y col., (2010), en una investigación previa sobre la degradación del glifosato ácido por el proceso UV/H₂O₂, lograron identificar los

siguientes intermedios de reacción: glicina, ácido fórmico, formaldehído, amonio, y como productos terminales, los iones de nitrato y fosfato, que en el caso de *C. vulgaris* podrían utilizarse como nutrientes para el crecimiento.

De acuerdo a estos estudios y a los resultados obtenidos en este trabajo, sería importante tener en cuenta la respuesta de hormesis (estimulación temprana por sustancias tóxicas) que generan este tipo de herbicidas o los efluentes generados de su degradación. En ambientes naturales podría estimular el crecimiento con el posible incremento en la eutrofización del sistema.

En el caso de los cladóceros los resultados indican que sería necesario aumentar el tiempo de aplicación del proceso de UV/H₂O₂ para muestras con Eskoba[®] y Roundup Ultramax[®], ya que el porcentaje de la mortalidad de *D. magna* y *C. dubia*, fue mayor o cercano al 50%.

Por otro lado, es importante mencionar que las formulaciones de agroquímicos están compuestas por diferentes aditivos o coadyudantes que con frecuencia no están especificadas en las etiquetas de las presentaciones comerciales. Estos ingredientes podrían estar generando intermediarios de reacción durante la aplicación del proceso UV/H₂O₂ afectando a la toxicidad de las muestras independientemente de la concentración de glifosato. Piola y col., (2013), después de comparar la toxicidad de dos formulaciones de glifosato en *Eisenia andrei* (Oligochaeta), determinó que los efectos adversos observados a dosis cercanas al CL₅₀ podrían atribuirse a la efectos de algunos de los llamados coadyuvantes o ingredientes inertes debido a una toxicidad intrínseca directa o a una mejora en la biodisponibilidad y/o bioacumulación del ingrediente activo. En síntesis, dados los resultados aquí obtenidos y lo reportado en el mismo sentido por la bibliografía especializada, se muestra la importancia de especificar cada componente de las formulaciones comerciales de fitosanitarios en las etiquetas o marbetes de los productos que se comercializan.

V. CAPÍTULO II:

Chlorella vulgaris: Usos y aplicaciones

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **HIPÓTESIS**
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- **RESULTADOS**
- **DISCUSIÓN**

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han ido desarrollando múltiples aplicaciones de las microalgas, entre las que se destaca la alimentación animal y humana por sus elevados valores proteicos, potenciados por poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos, en comparación con otras fuentes de proteínas unicelulares (Markovits y col., 1989; Tsukada y Kawahara 1997; Hinzpeter y col., 2006; Quevado y col., 2008; Benavides y Rito-Palomares, 2008).

Se ha encontrado que distintas especies del género *Spirulina* tienen diferentes tipos de esteroides como el clionasterol, los cuales presentan la capacidad de incrementar la producción de factores activadores de plasminógeno en células endoteliales vasculares, facilitando la prevención de enfermedades vasculares. Compuestos antioxidantes como β -carotenos y astaxantina aislados de microalgas tienen el potencial de proteger frente al estrés oxidativo causado por un amplio espectro de enfermedades y por el propio envejecimiento. Estudios pre-clínicos sugieren que el consumo de astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis* podría modular funciones como: actividad anti-cancerígena, protección contra los rayos UV, actividades antiinflamatorias, salud cardiovascular, entre otras. La luteína (pigmento amarillo que se encuentra en vegetales y en el grupo de las xantófilas) es usada para la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas (Stringheta y col., 2006).

Otro género muy utilizado con estos fines es *Chlorella*; la sustancia más importante en su composición es el β -1,3-glucano, que es un inmuno-estimulador activo, un captador de radicales libres y un reductor de lípidos de la sangre. Además se han identificado otros efectos beneficiosos para la salud como acción preventiva anti-tumoral y contra la arteriosclerosis (Lourenço, 2006).

Las microalgas también han sido evaluadas con el objetivo de generar recursos económicos de diversa índole, como por ejemplo producción de luteína (Shi y col., 2000, 2002). Entre otros usos se encuentran: la producción de hidrógeno para combustible por bio-fotólisis, la producción de metano en biodigestor, la producción de biodiesel, la eliminación de emisiones de CO₂ residual, la fabricación de cosméticos y también se la emplea como vector para la producción de proteínas recombinantes (Scragg y col., 2003; Miao y Wu 2004; Sanchez y col., 2008; Plata y col., 2009; Palomino y col., 2010).

Otra línea de investigación es la utilización de las microalgas con fines ecotoxicológicos. Este enfoque surgió para dar respuesta a los crecientes problemas de contaminación de

los sistemas acuáticos, que crearon una nueva demanda: eliminar por medio de microalgas, los elementos contaminantes aún presentes en las últimas fases del tratamiento de efluentes, que no pueden ser removidos por métodos químicos.

Las microalgas poseen una capacidad depuradora conocida como ficorremediación (Park y col., 2011, Rawat y col., 2011, Prajapati y col., 2013), definida como el uso de macroalgas y/o microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes, desde aguas residuales y desde un medio gaseoso (Dominic y col., 2009, Doušková y col., 2010, León y Chaves, 2010, González-López y col., 2011, Hongyang y col., 2011, Rawat y col., 2011, Abdel-Raouf y col., 2012, Infante y col., 2012; Prajapati y col., 2013; Maity y col., 2014). Entre los contaminantes más analizados por esta tecnología se encuentran los derivados del petróleo, los metales pesados, los detergentes y efluentes industriales de muy diversa composición -orgánicos y/o inorgánicos- (Rachlin y Grosso, 1991; Iannacone y Gutierrez, 1999; Chong y col., 2000; Mehta y Gaur, 2001; Salomon y col., 2003; Sáenz y col., 2004; Johnstone y col., 2006; Rodriguez y col., 2007; Vera y col., 2009).

Si bien el proceso UV/H₂O₂ evaluado en el capítulo I ha demostrado la eficiencia en el tratamiento de agua contaminada con glifosato, la mineralización total por este medio podría ser costosa, por eso ha comenzado a investigarse la posibilidad de complementar ese proceso químico, con tratamientos biológicos, lo que aportaría la opción de reducir costos para la degradación total de compuestos orgánicos (Marco y col., 1997; Zhang y col., 2014).

En el año 1960 surgió una alternativa a los tratamientos convencionales, que consistió en el empleo de sistemas “bacterianos-algáceos”. El concepto de tratamiento de efluentes integrado por estos dos sistemas fue creado por William Oswald (1919-2005) (Oswald, 1988). En la segunda mitad de los años 80 se fortaleció el interés por investigar el aprovechamiento de la biomasa algal para distintas aplicaciones (Albeliovich, 2004). Por ejemplo, la utilización de microalgas para remoción de nutrientes ha sido estudiada por más de 50 años (Sandbank y Hephher 1978; Lavole y de la Noüe, 1985; Becker, 1994; Olguin, 2003; Larsdotter, 2006; Shi y col., 2007; Andrade y col., 2009; Hanumantharao y col., 2011; Mendez-Suaza y col., 2011; Marchello y col., 2015), comprobando que la biomasa algal obtenida tiene un alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, y otros productos de valor agregado. De esta manera, los esfuerzos para cultivar este tipo de microorganismos en aguas residuales han buscado conseguir un doble beneficio, la

producción de biomasa para diferentes usos y un efluente limpio con una tecnología relativamente simple (Pulz y Gross, 2004; Rawat y col., 2011).

Entre las aplicaciones más recientes de las microalgas se encuentra la remediación de purines de vaca y de cerdo, con aprovechamiento de la biomasa obtenida para otros usos. Kim y col. (2007) cultivaron a *Scenedesmus* sp. en medio de cultivo con 3% de efluentes de cerdos obteniendo una biomasa rica en clorofila y carotenoides, además de reducir la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo 12,9, 87 y 83,2% respectivamente. Morales-Amaral y col., (2015) cultivaron el mismo género de microalga en reactores al aire libre obteniendo un óptimo de efluentes de 30% en el cultivo, y una reducción de nitrógeno y del fósforo proporcional a la productividad de biomasa, $38,0 \text{ mg}_N\text{L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ y $3,9 \text{ mg}_P\text{L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ respectivamente.

En este sentido, en la Argentina surge un escenario para la ficorremediación de efluentes a partir de microalgas debido a cambios que se fueron dando en el sector productivo, como resultado de la expansión de la frontera agrícola, que ha disminuido la superficie destinada a la cría extensiva de ganado. Así, la cría intensiva de ganado bovino y porcino han experimentado cambios que en los últimos años que se manifiestan en un menor número de establecimientos de cría, pero de gran tamaño y con mayor capacidad de producción (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2008). La alta concentración de ganado por unidad de superficie genera problemas ambientales que requieren medidas de remediación. Entre ellos, cabe destacar la alta producción de nutrientes como el amonio y el ortofosfato, que pueden incorporarse por distintas vías a los sistemas acuáticos superficiales o a las napas por infiltración, escorrentía o arrastre de suelos fertilizados con abonos nitrogenados y fosfatados, así como por descargas de aguas residuales sin tratamiento, o por aguas tratadas insuficientemente (De la Noüe y col., 1992; Vargas y col., 2004).

Los efluentes originados en la cría intensiva de ganado bovino (tambos) y porcino, contienen excretas, orina y agua de lavado de las instalaciones, además de restos de leche o alimento, detergentes y otros productos químicos utilizados en el proceso de desinfección del establecimiento. Debido a ello, la composición del efluente tiene alto contenido de sólidos, nutrientes, materia orgánica y microorganismos que son capaces de modificar negativamente al ambiente que recibe esta descarga (cuerpo de agua, napa y/o suelo). Los residuos generados, fundamentalmente excretas, resultan responsables de impactos sobre el aire, el suelo y el agua porque se concentran en áreas reducidas y son una fuente de nutrientes, antibióticos y otras drogas veterinarias y patógenos (Herrero y

Gil, 2008). Sumado a la degradación de los recursos agua y suelo, estos desechos cobran importancia por la proliferación de plagas sinantrópicas (moscas, roedores, entre otras) y la generación de olores indeseables producidos cuando no poseen una correcta disposición. (FAO - INTA, 2012). Es así que además de constituir un foco potencial de infección, los sitios donde son descargados los residuos sólidos representan además una fuente importante de contaminación del aire (Cervantes y col, 2007), derivando en “perjuicios ecosistémicos ED (ecosystem disservice por sus siglas en inglés).

Los perjuicios ecosistémicos incluyen riesgos naturales e impactos negativos de la contaminación del agua, suelo y/o aire, como pueden ser la presencia de plagas, infecciones, alergias, ataques de animales, presencia de organismos venenosos y carnívoros entre otros (Sandifer y col., 2015). Este término es nuevo y poco divulgado ya que no tiene la aplicabilidad de los servicios ecosistémicos, pero derivarían por influencia antrópica (Von Döhrena y Haase, 2015). Estos llamados perjuicios ambientales se consideran principalmente como un peligro para cumplir con la función beneficiosa del ecosistema y como peligros para el bienestar socioeconómico. Se propone en este texto usar el término perjuicio ambiental para ilustrar la pérdida de servicios ecosistémicos en sistemas acuáticos por la movilización de sustancias tóxicas y a la vez a la afectación de servicios ecosistémicos de depuración, provisión de agua para riego y para mantenimiento ecológico (Sandifer y col., 2015).

Si consideramos cada uno de los tipos de producción bovina y porcina en Argentina anteriormente citadas, la producción láctea (tambos) genera 30 a 40 litros de efluente/día/animal. Trabajos realizados en Miguel Riglos, en la provincia de La Pampa, muestran que un tambo con 140 vacas en ordeño y una producción de 2500 L día⁻¹ promedio de leche, genera unos 4000 L de efluentes por día, equivalente a 1,6 L de efluentes por litro de leche producida (Diez, 2012). En el caso de la producción porcina, según Vicari, 2012, si se consideran los cerdos en gestación, en lactancia, lechones destetados y cerdos de 25-100 kg, en Argentina se producen alrededor de 26.910 toneladas de efluentes por día.

La incorporación de nutrientes a los cuerpos de agua dulce determina su alteración química por la carga excesiva con nitratos y fosfatos (eutrofización), que se traduce en cambios de la estructura y función de comunidades de fitoplancton y zooplancton (Wu, 1999). A éste proceso se atribuye un tercio de la disminución de la biodiversidad en ríos, lagos y humedales en el mundo (UN-Water, 2015). En el contexto del sistema productivo argentino aquí presentado, y teniendo en cuenta que gran parte de la producción de purines

se genera en la tradicional cuenca lechera del país, coincidente con el área de influencia de la Universidad Nacional del Litoral, deriva la importancia regional del estudio de remediación que se propone.

En este escenario nacional y local, la aplicación de ficorremediación para tratar efluentes de la producción láctea y porcina surge como una herramienta que permita minimizar los perjuicios ecosistémicos.

Lo anteriormente expuesto demuestra la importancia de generar herramientas de gestión ambiental que contemplen aspectos de sustentabilidad de los sistemas de producción, considerando la salud ambiental y a la sociedad en el cumplimiento de la normativa vigente, a partir de los diferentes usos y aplicaciones que pueden tener los cultivos de microalgas y la biomasa obtenida de los mismos.

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar a escala de laboratorio el potencial de una matriz biológica constituida por la microalga *Chorella vulgaris* como complemento de tratamiento del proceso UV/H₂O₂, remediar efluentes que pueden causar contaminación orgánica y evaluar bioquímicamente la biomasa obtenida en estos procesos.

La información generada aportará conocimientos sobre el uso y aplicaciones de la microalga *C. vulgaris*, tendientes a mejorar la gestión de los residuos orgánicos y obtener biomasa que podría ser transformada en productos comercializables.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar a escala de laboratorio el potencial de *C. vulgaris* para remover glifosato utilizando los mismos formulados de glifosato empleados en la aplicación del proceso UV/H₂O₂ y desarrollado en el Capítulo I.
2. Evaluar el potencial de *C. vulgaris* en la remoción de nutrientes presentes en efluentes provenientes de producción láctea y porcina y conocer la concentración de clorofila-a y el porcentaje de proteínas brutas en la biomasa algal obtenida en ambos efluentes.
3. Evaluar bioquímicamente la calidad de la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cultivos en fotobiorreactores.

3. HIPÓTESIS

1. *Chlorella vulgaris* tiene un alto potencial para remover glifosato de cuatro soluciones de formulaciones comerciales.
2. *Chlorella vulgaris* tiene el potencial para crecer y remover nutrientes de los efluentes de la producción láctea y porcina obteniendo una biomasa con altos valores de clorofila-a y porcentaje de proteínas brutas.
3. La biomasa de *C. vulgaris* obtenida en el fotobiorreactor a escala de laboratorio tiene alta calidad bioquímica para su uso en diferentes aplicaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Remediación de glifosato utilizando *C. vulgaris*

Chlorella vulgaris (Beijerinck Novakova, 1890) (CLV2) fue empleada para realizar todos los ensayos de remoción de las cuatro soluciones de plaguicidas con glifosato (Eskoba[®], Panzer Gold[®], Roundup Ultramax[®], Sulfosato Touchdown[®]), seleccionadas en este trabajo. Las microalgas se cosecharon en fase de crecimiento exponencial, se centrifugaron 2 veces y se resuspendieron en agua bidestilada ultrapura estéril 24 h antes del inicio de cada ensayo de remoción. Su concentración fue estimada con cámara de Neubauer (1.028.000 cél.mL⁻¹) y espectrofotometría (Abs= 1.5 λ a 650 nm).

Se colocaron 50 mL del concentrado algal en cada recipiente (Figura 17) y se agregaron las siguientes concentraciones de los formulados: 9,65; 8,65; 7,35y 0,78 mg e.a L⁻¹ de Eskoba[®], Panzer Gold[®], Roundup Ultramax[®], Sulfosato Touchdown[®], respectivamente. Se decidió trabajar con estas concentraciones de glifosato por ser cercanas a las concentraciones finales de glifosato previamente obtenidas mediante la aplicación del proceso UV/H₂O₂ (muestras (M₃)).

Se seleccionaron tres tiempos de exposición para evaluar la eficiencia de remoción de *C. vulgaris*: T₀= inicio del ensayo; T₁; T₂ y T₃= 120, 240 y 360 min. respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicados.

El ensayo fue realizado en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura (25 \pm 1°C), iluminación continua (3000 lux) y agitación cada 60 min. A los 120, 240 y 360 min.de exposición las microalgas se centrifugaron durante 10 min a 3.500 r.p.m., separando el pellet de algas del sobrenadante. En esta última matriz se determinó la concentración de glifosato, siguiendo la metodología utilizada en el punto 4.1 del Capítulo I.

Además, se registró el pH y la Abs a 650 nm del pellet resuspendido en agua bidestilada ultrapura estéril para cada tiempo de exposición. Se realizaron correlaciones de Pearson entre las concentraciones de glifosato y los diferentes tiempos de exposición. También se realizó un ensayo sin *C. vulgaris*, bajo las mismas condiciones antes mencionadas (tiempo de exposición, temperatura, iluminación, intensidad lumínica -120 μ E m⁻² s⁻¹, aproximadamente- y agua bidestilada ultrapura estéril) utilizando el formulado Panzer Gold[®] y se evaluó la fotodegradación del glifosato.



Figura 17: Ensayo de remoción de glifosato por *C. vulgaris*

4.2. Remediación de efluentes de producción porcina y láctea utilizando *C. vulgaris*

Se cultivó a *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de los efluentes de la producción láctea (tambo) y porcina (parideras a campo) de la empresa Tregar y la Riojana (García Hnos. Agroindustrial S.R.L.) de la ciudad de Gobernador Crespo, provincia de Santa Fe. El objetivo fue determinar si estos efluentes pueden ser utilizados como fuente de nutrientes por la microalga y en qué concentraciones.

4.2.1 Caracterización de los efluentes de producción porcina y láctea

Para caracterizar física y químicamente los efluentes se determinaron las concentraciones de amonio, nitritos, nitratos, fósforo total, demanda biológica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO) y pH. Estas determinaciones fueron realizadas en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, INTEC (UNL-CONICET) por el Laboratorio de Química Fina y Aplicada. Las determinaciones se realizaron siguiendo las técnicas propuestas por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 Ed.

4.2.2 Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de conocer en qué tipo de efluente y en que concentración *C. vulgaris* encontraba mejores condiciones para el crecimiento y la generación de biomasa. Las concentraciones de los efluentes (tanto los provenientes de la producción láctea como de la porcina) ensayadas fueron las siguientes: 10, 20, 30, 50, 80 %. Los cultivos se desarrollaron en erlenmeyers de 1 L y se mantuvieron a temperatura constante ($25\pm 1^\circ\text{C}$), con aireación e iluminación constante y uniforme (aproximadamente $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y agitación continua a 100 rpm mediante placa magnética.

Como variable respuesta se tomó la tasa de crecimiento (μ) expresada en días⁻¹, la que se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu_{i-j} = (\ln X_j - \ln X_i) / (t_j - t_i) \quad (\text{días}^{-1})$$

donde μ_{i-j} = tasa de crecimiento entre los tiempos i-j; X_i = biomasa en el tiempo i; X_j = biomasa en el tiempo j (OECD, 2011).

Los ensayos tuvieron una duración de 10 días, durante los cuales se determinó la variable respuesta día por medio. Con estos datos se realizó la cinética de crecimiento para determinar la fase de crecimiento exponencial del cultivo.

4.2.3 Ensayo definitivo

Chlorella vulgaris fue cultivada en erlenmeyer de 2 L a la concentración y tipo de efluentes determinado en los ensayos preliminares; el ensayo se realizó por cuadruplicado y las condiciones del cultivo (T° , aireación, iluminación y agitación) fueron las descritas en el punto 4.2.2 del presente capítulo. Los efluentes fueron recolectados a la salida de galpón donde el ganado vacuno descansa luego de ser ordeñado (Figura 18, A y B), para la limpieza de los galpones se deja correr 3 veces por día una ola de 30.000 L de agua, que caen en una pileta primaria donde parte de los sólidos quedan en la superficie (Figura 19).

Luego de 30 días la parte sólida y líquida de los piletos son mezcladas nuevamente en una proporción 4:2 y se esparcen en los campos como abono utilizando una estercolera. El resto de la parte líquida es enviado al segundo piletón (Figura 20) para su posterior eliminación en canales que desembocan en el Río Salado.



Figura 18 A: Salida de los galpones donde el ganado vacuno descansan luego de pasar por la rutina de ordeño



Figura 18 B: Sitio donde se tomó la muestra de purines vacunos para evaluar el potencial de *C. vulgaris* para remover nutrientes



Figura 19: Primer sitio de disposición de efluentes



Figura 20: Segundo sitio de disposición de efluentes donde es retenida la fracción líquida que no fue mezclada con la fracción sólida y es esparcida como abono.

Los cultivos fueron cosechados en fase de crecimiento exponencial. Se determinó la cantidad de clorofila-a y la cantidad de proteínas brutas (Método Kjeldhal, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico) en el Laboratorio de Alimentos del INTEC.

Para determinar la cantidad de pigmento fotosintético (clorofila-a), por cada réplica, se filtraron 250 mL del medio con las microalgas (filtros de fibra de vidrio S&S, diámetro 55 mm) y transferidos luego a tubos de ensayo protegidos de la luz, con 10 mL de acetona al 90 %. Posteriormente, el filtro fue macerado y las muestras mantenidas bajo refrigeración (4 °C) durante 24 h. Transcurrido este tiempo se determinó la Abs del sobrenadante a 665, 645 y 630 nm de longitud de onda (espectrofotómetro, modelo T60, con una gama de longitud de onda de 325 -1100 nm), para así calcular el contenido de clorofila-a aplicando la fórmula propuesta por Strickland y Parsons (1972) según la ecuación 3:

$$C = (11,6 \times A(665)) - (1,31 \times A(645)) - (0,14 \times A(630)) \quad (3)$$

Cálculo de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)

$$\text{Cla} = C/V \times 10/L \times S/10 \quad (4)$$

donde: **Cla**: clorofila-a; **C**: resultado de la ecuación de Strickland y Parsons; **V**: volumen de la muestra filtrada (0,25 L); **L**: longitud de la boca de la cubeta (1 cm); **S**: volumen de acetona utilizado (0,01 L).

Para evaluar si *C. vulgaris* puede utilizar el efluente como fuente de nutrientes, al inicio y al final del ensayo se determinaron en el sobrenadante obtenido, luego de centrifugar las microalgas durante 10 min a 3500 r.p.m., las siguientes variables: amonio, nitritos, nitratos, fosforo total, DBO, DQO, pH y conductividad en el mismo laboratorio y siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2.1 del presente capítulo.

4.3. Cultivo de *C. vulgaris* en fotobiorreactor para obtención de biomasa algal

Chlorella vulgaris fue cultivada en medio BBM, en un fotobiorreactor vertical de acrílico transparente de 10 L, de forma cilíndrica y con fondo plano. El fotobiorreactor en la parte superior estuvo cerrado por una tapa transparente, que evita que distintas sustancias (polvo, insectos, etc.) se introduzcan en el mismo, aunque la tapa no cierra herméticamente el recipiente, de modo que pueden salir los gases generados (Figura 21).

La inyección de aire y CO₂ fue realizada por dos aireadores marca Precision (modelo SR-7.500), con una caudal de 7.500 cc/min., esto generó dos columnas de burbujas a ambos lados del fotobiorreactor que sirvieron para evitar la sedimentación de las células y permitir el mezclado, favoreciendo así la homogeneización de las condiciones en el cultivo, la transferencia de nutrientes, el movimientos de algas entre las diferentes zonas del fotobiorreactor y la transferencia de gases y energía; también fue necesario para romper los gradientes de difusión en la superficie de la célula y retirar el oxígeno generado fotosintéticamente (Carvalho y col., 2006)

La iluminación fue continua, aportada por dos lámparas de luz blanca fría de 22 W, introducidas dentro del cultivo en capuchones herméticos de acrílico; la temperatura se mantuvo constante a 25±1 °C, ya que el fotobiorreactor se mantuvo dentro de una cámara de cultivo lo que permitió regular este parámetro de forma eficiente (Figura 22).

Una vez que se logró comprobar el crecimiento de *C. vulgaris* en el fotobiorreactor, se realizó un cultivo con el objetivo de determinar su cinética de crecimiento. Para este

cultivo el reactor, con medio de cultivo, se inoculó con $146.377 \text{ cél. mL}^{-1}$.

La densidad celular se determinó directamente en cámara de Neubauer (ISO 8692, 1989) e indirectamente por espectrofotometría ($Abs = 1.5 \lambda; 600 \text{ nm}$).



Figura 21: Cultivo de *C. vulgaris* en fotobioreactor.



Figura 22: Cultivo de *C. vulgaris* en fotobioreactor, en el interior de una cámara de cultivo.

4.3.1. Caracterización bioquímica de la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cultivos en fotobioreactor

La caracterización bioquímica de la biomasa algal se realizó en la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Las muestras así obtenidas fueron liofilizadas (Figura 23).

Se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: cantidad de nitrógeno total, proteínas brutas (Método Kjeldhal, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico), fibras (Método Weende; equipo Tecator)- estas dos cuantificaciones fueron efectuadas por el Laboratorio de Alimentos del INTEC. Carbohidratos (Método Dubois) y lípidos (Método de Folch)- fueron determinados en el Instituto de Tecnología en Alimentos (ITA), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

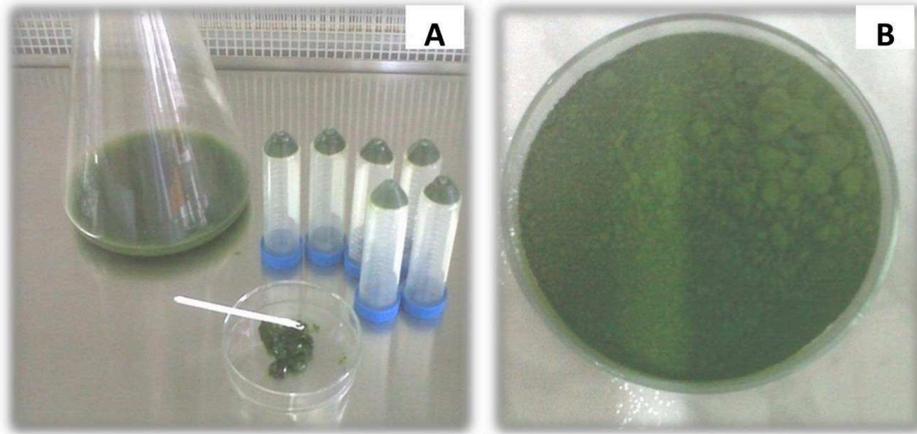


Figura 23: pellet húmedo de *C. vulgaris* (A) y liofilizado (B)

5. RESULTADOS

5.1. Remediación de glifosato utilizando *C. vulgaris*

En el ensayo sin *C. vulgaris* el glifosato tuvo una fotodegradación del 15 % a los 360 min de exposición, pasando de una concentración inicial de 9,8 a 8,37 mg e.a L⁻¹ al final del ensayo.

Con el agregado de las microalgas y manteniendo las condiciones de ensayo, para el mismo formulado (Panzer Gold[®]) la remoción de glifosato fue menor en T₃ (360min.), siendo de 7,6 %.

Se observaron diferencias significativas en los % de remoción entre los diferentes formulados evaluados (ANOVA-MR, p= 0.0458).

La concentración de glifosato disminuyó con el tiempo de exposición, resultando negativas todas las correlaciones: Eskoba[®], $r^2 = 0,7458$ (p>0,05); Panzer Gold[®] $r^2 = 0,8135$ (p>0,05); Roundup Ultramax[®] $r^2 = 0,6$ (p>0,05); Sulfosato Touchdown[®], $r^2 = 0,9542$ (p<0,05) (Figura 24).

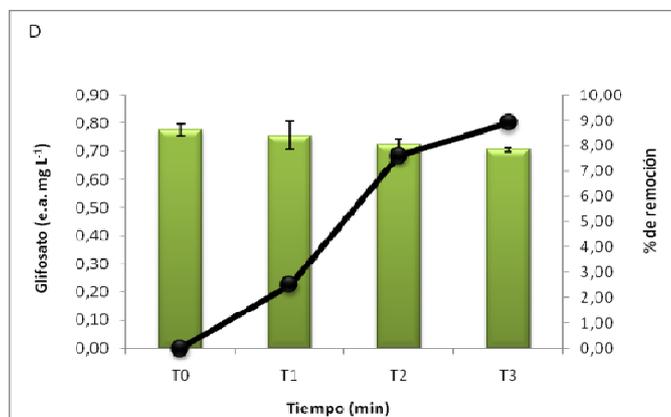
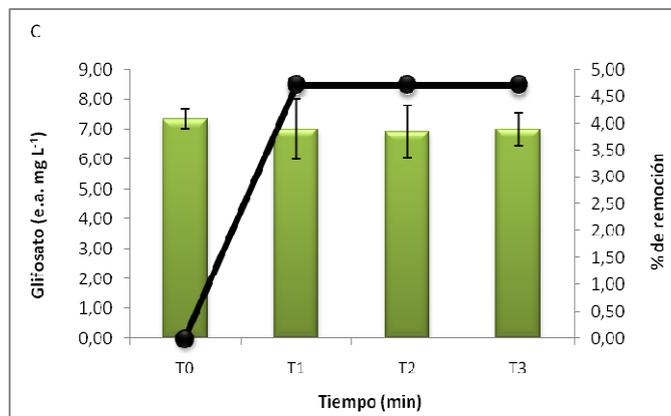
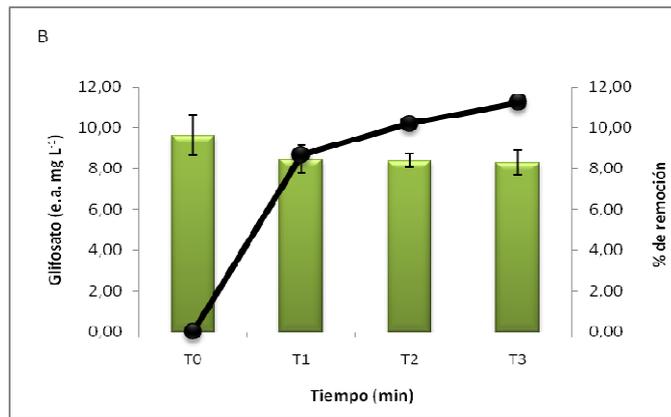
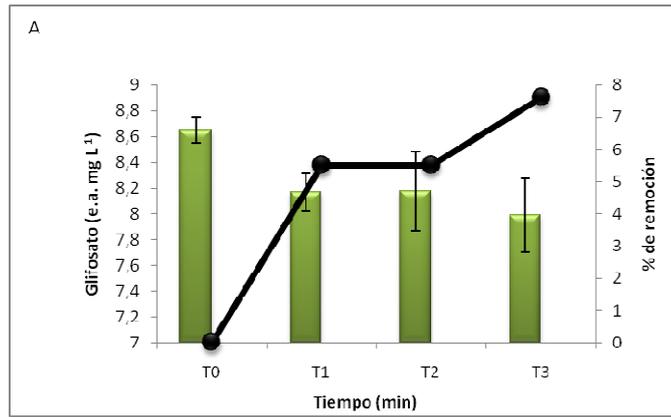


Figura 24: Evolución de la concentración real de glifosato (mg e.a L⁻¹) y el % de remoción en diferentes tiempos de exposición: T₀: inicio del ensayo; T₁, T₂ y T₃ = 120, 240, 360 min respectivamente. A) Panzer Gold[®]; B) Eskoba[®]; C) Roundup Ultramax[®] y D) Sulfosato Touchdown[®].

En cuanto al % de remoción, *C. vulgaris* removió más glifosato cuando fue expuesta al formulado Eskoba[®] = 11,22 % a los 360 min. (T₃), mientras que la menor remoción se dio en el Roundup Ultramax[®] = 4,7 %. Cabe destacar que para este formulado la disminución en la concentración de glifosato se registró durante los primeros 120 min. (T₂) de exposición, sin sufrir modificaciones en la continuación del ensayo (Tabla 23). La Abs a 650 nm, disminuyó de 1,5 a 1,4 en tres de los formulados a los 360 min. de exposición (T₃); esto puede atribuirse a efectos tóxicos que causan estos formulados sobre las microalgas.

Los valores promedios de pH al iniciar y finalizar los ensayos estuvieron entre: 5,63 (±0,16) y 8,84 (±0,24) (p<0.001) respectivamente.

Tabla 23: Concentraciones reales de glifosato, % de remoción y absorbancia a 650 nm para cada tiempo de exposición (T1: 120; T2: 240 y T3: 360 min) en el ensayo de remoción de glifosato con *C. vulgaris*.

| | Glifosato (mg e.a L ⁻¹) | % de remoción | Absorbancia (650 nm) |
|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Panzer Gold[®] | | | |
| T ₀ | 8,65 (± 0,09) | 0 | 1,5 (±0,009) |
| T ₁ | 8,17 (± 0,14) | 5,5 | 1,5 (±0,002) |
| T ₂ | 8,17 (± 0,30) | 5,5 | 1,5 (±0,001) |
| T ₃ | 7,99 (± 0,28) | 7,6 | 1,5 (±0,001) |
| Eskoba[®] | | | |
| T ₀ | 9,65 (± 0,97) | 0 | 1,5 (±0,002) |
| T ₁ | 8,45 (± 0,7) | 8,66 | 1,4 (±0,02) |
| T ₂ | 8,39 (± 0,33) | 10,20 | 1,4 (±0,01) |
| T ₃ | 8,30 (± 0,59) | 11,22 | 1,4 (±0,03) |
| Roundup Ultramax[®] | | | |
| T ₀ | 7,35 (± 0,31) | 0 | 1,5 (±0,04) |
| T ₁ | 7 (± 1) | 4,7 | 1,4 (±0,02) |
| T ₂ | 7 (± 0,88) | 4,7 | 1,4 (±0,04) |
| T ₃ | 7 (± 0,55) | 4,7 | 1,4 (±0,002) |
| Sulfosato Touchdown[®] | | | |
| T ₀ | 0,78 (± 0,20) | 0 | 1,5 (±0,01) |
| T ₁ | 0,76 (± 0,4) | 2,5 | 1,5 (±0,01) |
| T ₂ | 0,72 (± 0,2) | 7,6 | 1,5 (±0,03) |
| T ₃ | 0,71 (± 0,7) | 8,9 | 1,4 (±0,01) |

5.2. Remediación de efluentes de producción porcina y láctea utilizando *C. vulgaris*

5.2.1. Caracterización de los efluentes de producción láctea y porcina

Los efluentes presentaron la siguiente caracterización físico-química:

Tabla 24: Caracterización físico-química de efluentes de producción láctea y porcina.

| Efluente | pH (UpH) | Amonio (mg/l) | Nitratos (mg/l) | Nitritos (mg/l) | Fósforo total (mg/l) | DBO (mg/l – O ₂) | DQO (mg/l – O ₂) |
|----------|-------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Lácteo | 7,09 | 294 | 43,6 | 0,064 | 60,1 | 2981 | 6078 |
| Porcino | 8,2 | 1719 | 39 | 0,011 | 8,13 | 624 | 2204 |

5.2.2. Ensayos preliminares

En el efluente de producción láctea (tambo) *C. vulgaris* creció en todas las concentraciones, mostrando diferencias significativas en la tasa de crecimiento con el efluente de la producción porcina (ANOVA, $p < 0,05$).

En la Figura 25 A, se puede ver que a una concentración del 20% del efluente se obtiene la máxima tasa de crecimiento, decayendo a 30%. Con el objetivo de conocer si a concentraciones intermedias *C. vulgaris* seguía creciendo, se ensayó un cultivo con 25% de efluente (Figura 25, B).

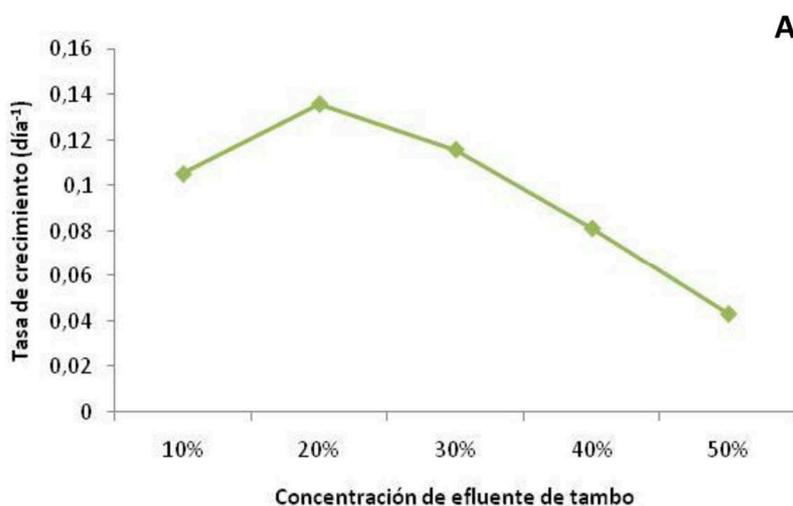


Figura 25 A: Crecimiento de cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de efluentes de producción láctea (tambo)

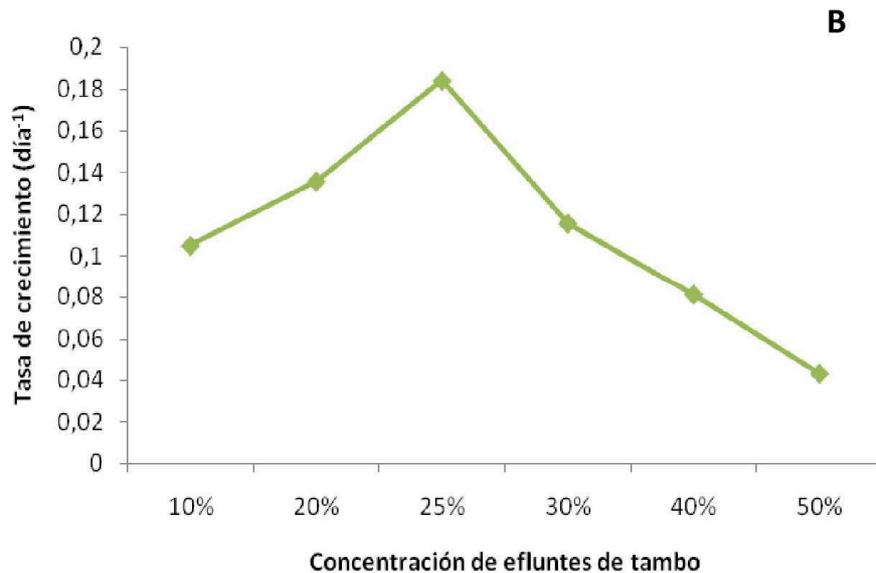


Figura 25 B: Crecimiento de cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de efluentes de producción láctea (tambo)

En la Figura 25 B se puede observar que a 25% de concentración del efluente de tambo la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*, sigue aumentando. El post test de Tukey-Kramer mostró que al 25% del efluente se encontraron diferencias significativas en todos los casos cuando se lo comparó con los demás tratamientos ($p < 0,05$), con μ (día⁻¹) = 0,18.

En el caso de los efluentes de la producción porcina, *C. vulgaris* no pudo crecer durante los 5 días del ensayo.

Estos resultados, nos permitieron determinar que *C. vulgaris* logró crecer hasta en un 25% de efluentes de tambo, permitiendo considerar esta concentración para el ensayo definitivo.

Para conocer el tiempo de cosecha de *C. vulgaris* y que coincida con la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, se determinó la cinética de crecimiento de los cultivos (Figura 26), obteniéndose la máxima densidad celular a los 8 días de cultivo.

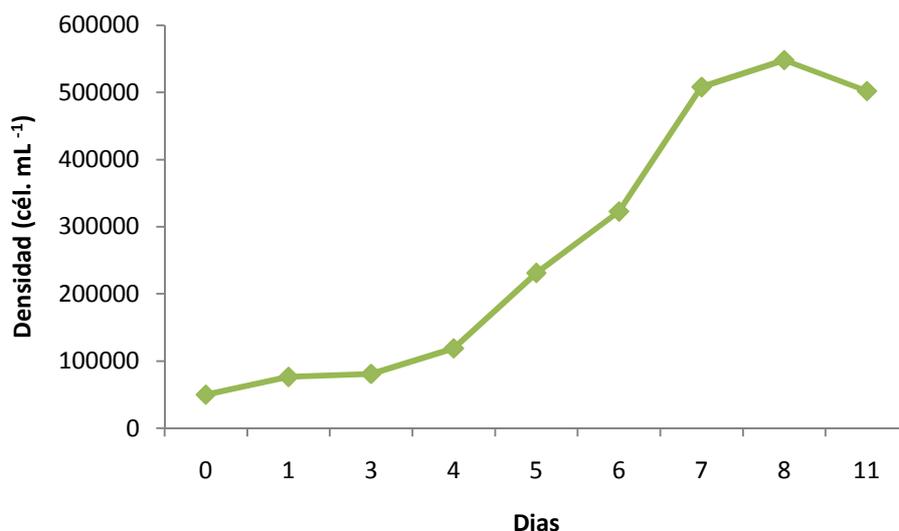


Figura 26: Cinética de crecimiento de cultivo de *C. vulgaris* al 25% de efluente de la producción láctea (tambo).

5.2.3. Ensayo definitivo

En la Tabla 25 se muestran los valores de los parámetros analizados al inicio y al final del ensayo; en la mayoría de los casos hubo una reducción de nutrientes, siendo el amonio el que mostró la reducción más importante = 97,1 %. Podría considerarse que *C. vulgaris* puede tomar para su crecimiento, los nutrientes aportados por el efluente. A los 7 días de cultivo, la clorofila-a y el % de proteínas alcanzaron valores de 1,68 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 3,75 %, respectivamente.

Tabla 25: Caracterización físico-química del efluente puro y del sobrenadante obtenido al inicio y al final del ensayo, al cultivar *C. vulgaris* en medio con 25% de efluentes de producción láctea (tambo).

| | Efluente puro | 25% inicial | 25% final | % de reducción |
|-------------------------------------------|---------------|-------------|-----------|----------------|
| Amonio (mg L⁻¹) | 294 | 67,2 | 1,9 | 97,1 |
| Nitrato (mg L⁻¹) | 43,6 | 31,1 | 15,6 | 49,8 |
| Nitrito (mg L⁻¹) | 0,064 | 0,067 | 0,107 | - |
| Fósforo total (mg L⁻¹) | 60,1 | 48,4 | 19 | 60,7 |
| DQO (mgL⁻¹) | 6078 | 1846 | 353 | 80,8 |
| DBO (mg L⁻¹) | 2981 | 947 | 173 | 81,7 |
| pH (UpH) | 7,09 | 7,58 | 8,79 | - |
| Conductividad (μS cm⁻¹) | 4070 | 1665 | 1192 | 28,4 |

5.3. Cultivo de *C. vulgaris* en fotobio reactor para obtención de biomasa algal

El cultivo de *C. vulgaris* en fotobio reactor de 10 L, mostró la siguiente cinética de crecimiento (Figura 27):

A los 10 días de crecimiento alcanzó la mayor producción de biomasa seca que fue de 0,508 g L⁻¹.

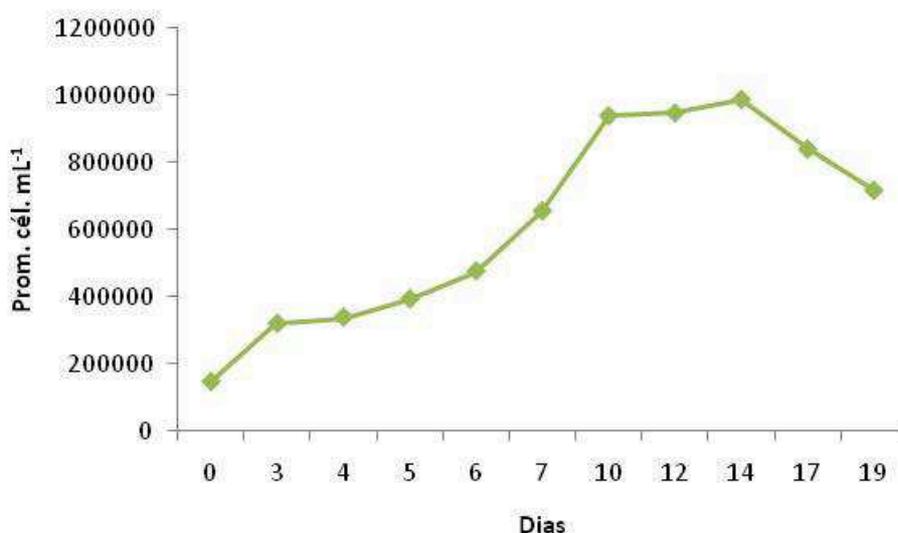


Figura 27: Cinética de crecimiento de cultivo de *C. vulgaris* en fotobio reactor de 10 L.

5.3.1. Caracterización bioquímica de la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cultivos en fotobioreactor

Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas durante la fase de crecimiento antes mencionada y los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Caracterización bioquímica del liofilizado de *C. vulgaris*.

| Componentes | | Metodología utilizada para la determinación |
|--------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------|
| Carbohidratos (%) | 7,5 | Método Dubois |
| Lípidos (%) | 3,28 | Método de Folch |
| Nitrógeno total (%) | 7,11 | Método Kjeldhal |
| Proteínas brutas (%) | 44,43 | Método Kjeldhal |
| Fibra cruda (%) | 0,20 | Método Weende (equipo Tecator) |
| Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 1,26 | Strickland y Parsons (1972); Otero-Paternina y col., (2013) |

A partir de estos datos se realizó una evaluación informal del liofilizado de *C. vulgaris* en cosmetología en el “*Instituto de Estética Ana Fischer*” de la ciudad de Santa Fe. La misma consistió en identificar los beneficios y efectos posibles sobre la piel de un emplasto de la microalga. En este sentido, en el futuro se sugiere realizar pruebas mediante protocolos estandarizados a los fines de precisar los resultados descriptos en esta tesis (Anexo II).

6. DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó el uso de *C. vulgaris* en la ficoremediación de efluentes contaminados con glifosato tomando como punto de partida las concentraciones finales obtenidas a los 360 min. (M3) luego de la aplicación del proceso UV/H₂O₂ que fue evaluado en el capítulo I.

Los resultados mostraron que la remoción del glifosato por *C. vulgaris* alcanzó un máximo de 11,22 % a los 360 min, para el formulado comercial Eskoba[®], en comparación con el 76 % de degradación por el proceso UV/H₂O₂ obtenido para el mismo formulado y tiempo de evaluación. Estos resultados señalan que si se desea reducir aún

más la concentración de glifosato sería más conveniente extender en el tiempo la aplicación del proceso UV/H₂O₂ que utilizarla microalga como proceso complementario. En esta misma línea de trabajo, Lipok y col., (2009) reportaron que en medios con concentraciones superiores a 1 mg e.a L⁻¹, *C. vulgaris* no removió glifosato en cantidades significativas, como consecuencia probablemente de que bajo las condiciones de ensayo, no se rompieron los enlaces C-P, paso previo necesario para que la microalga pudiera tomar al herbicida como fuente de P. El mencionado valor límite (1 mg e.a L⁻¹) informado por estos autores, es muy cercano a la mínima concentración ensayada en esta tesis, que fue de 0,78 (± 0,20) mg e.a L⁻¹ para el formulado Sulfosato Touchdown[®]

Por otro lado, diferentes autores han encontrado porcentajes de remoción de glifosato superiores, en mayores tiempos de exposición, con diferentes especies de cianobacterias, bacterias y hongos. Salman y Abdul-Adel (2015) evaluaron la capacidad de *Oscillatoria limnetica* para remover glifosato, utilizando la presentación comercial Roundup[®], y encontraron diferencias significativas en la velocidad de remoción a partir de los 3, 5, 7, 14 y 35 días de tratamiento. Registraron 97,5% después de 7 días a una concentración inicial de 5 mg L⁻¹ de glifosato, 57,9% y 37,1% después de 14 días a concentraciones iniciales de 10 y 15 mg L⁻¹ respectivamente.

Trabajos de Lipok y col., (2007 y 2009), utilizando el formulado comercial Roundup[®] 360, informaron que especies de *Spirulina* sp. puede remover glifosato, obteniendo entre 0,2 y 1 % de remoción a concentración inicial de 10 mg L⁻¹; 20 y 70% a concentración inicial de 0,4 mg L⁻¹, después de 4 y 10 días respectivamente. Además, reportaron la capacidad de la cianobacteria *Spirulina platensis* y la bacteria *Streptomyces lusitanus* para catalizar la molécula de glifosato y del hongo *Fusarium dimerum* para remover y utilizar este herbicida como la única fuente de fósforo.

Otro de los aspectos considerados en esta Tesis es la capacidad de remoción de nutrientes de efluentes de la producción láctea. En el tratamiento de aguas residuales se busca eliminar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos, nutrientes y coliformes (Dominic y col., 2009, Park col., 2011, Rawat y col., 2011, Abdel-Raouf y col., 2012).

En este trabajo se encontraron valores de reducción de DBO (81,7 %) mayores y menores a los reportados por Colak y Kaya, 1988 quienes, en estudios sobre la utilización de microalgas para descontaminar aguas residuales urbanas, registraron valores de remoción de DBO de 68,4 %. En 2008, Hodaifa y col. registraron similares resultados obteniendo una remoción de 67,4% en cultivos de *Scenedesmus obliquus*, utilizando como sustrato

agua residual procedente de la producción de aceite de oliva. Por otro lado, León y Chaves (2010) lograron una reducción de 91,4 % en tratamientos con lagunas de estabilización y microalgas.

En cuanto a la utilización de la DQO como parámetro indicativo de la eficiencia de los tratamientos, los resultados de remoción obtenidos (80,8 %) están cercanos a los reportados en la bibliografía por Hammouda y col., (1995) quienes registraron para *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, una remoción de DQO de 89 y 91,7 %, respectivamente. Hongyang y col., (2011) trabajaron con *Chlorella pyrenoidosa* para bioremediar aguas residuales del procesamiento de soja, obteniendo una remoción de DQO entre 80 y 84%. Li y col., (2011) registran valores de DQO de 90,3 y 90,8% en sus experimentos con *Chlorella* sp. Estos autores concluyeron que las microalgas utilizaban rápidamente diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono, además del CO₂.

En lo que respecta a la remoción de otros compuestos, Wang y col., (2010), informaron la efectividad del uso de efluentes de la producción láctea digeridos, como suplemento de nutrientes para el cultivo de *Chlorella* sp., reportando valores de eliminación de diversos compuestos similares a los encontrados en este trabajo: amoníaco, nitrógeno total y fósforo total = 100%, 75,7-82,5% y 62,5-74,7%, respectivamente. Además los autores utilizaron diluciones que estuvieron entre 10, 15, 20 y 25 % de efluente, encontrando una relación lineal inversamente proporcional ($r^2= 0.982$) entre la tasa de crecimiento y la turbidez inicial durante los primeros 7 días, lo que podría estar explicando por qué *C. vulgaris* creció poco o no creció con un porcentaje mayor al 25% de efluente.

Por otro lado, Woertz y col. (2009) obtuvieron una remoción de amonio y ortofosfato entre 96 y > 99% respectivamente, cultivando algas verdes en cultivos suplementados con CO₂ y efluentes de la producción láctea. Estos valores de eliminación de amonio se encuentran muy cercanos a los expuestos en la presente Tesis, que fue de 97,1 %.

Otro aspecto considerado en este trabajo se refiere a la calidad de la biomasa algal obtenida. En este sentido, si comparamos los valores de clorofila-a y el % de proteínas brutas obtenidas cuando *C. vulgaris* fue cultivada con y sin efluentes de la producción láctea, registramos que en el caso de la clorofila-a prácticamente los valores no variaron, entre 1,68 y 1,26 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, pero el % de proteínas mostró una disminución de 44,43 % (en cultivos en fotobioreactores sin efluentes) a 3,75 % (en cultivos con efluentes). Estos valores muestran que el agregado de efluentes modifica la composición bioquímica de la biomasa obtenida, independientemente de la tasas de crecimiento del cultivo y de la fase de crecimiento en la que sea cosechado.

Por otra parte, se realizó la caracterización bioquímica de la biomasa obtenida al cultivar *C. vulgaris* en fotobioreactor. Las diferencias encontradas entre el % de proteínas obtenido y los otros elementos cuantificados (carbohidratos, lípidos, fibra cruda) puede deberse a que cultivos de microalgas en fase de crecimiento exponencial contienen más proteínas, mientras que los cultivos en la fase estacionaria tiene más hidratos de carbono, tales como el glucógeno (Mata y col., 2010). Las diferencias encontradas pueden deberse a que en este trabajo los cultivos fueron cosechados en fase de crecimiento exponencial.

Por otro lado, al comparar las concentraciones de los componentes encontrados en este trabajo con los reportados en la bibliografía, se observan algunas variaciones. Por ejemplo, en un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias (Reno, 2011) se determinaron valores = 46% de proteínas brutas para *Chorella* sp. Otros datos reportados son los de Morris Quevedo y col. (1999) (44 %), Sansawa y Endo (2004) que informaron 12 %; Andrade y col. (2006) (44 %), y Zhengyun y Xianming (2006) obtuvieron una producción del 30% de proteínas brutas, en tanto que Sharma y col., (2012) informaron entre 54,2 y 52,6%, con diferentes regímenes lumínicos y Sankar y Ramasubramanian (2012), cultivaron *C. vulgaris* en el mismo medio de cultivo utilizado en esta tesis (BBM), informando 36,16 % de proteínas en 20 días de cultivo, con fotoperíodo 12 L: 12 O. Chia y col., (2013) cultivaron *C. vulgaris* en medio CHU obteniendo un 50% de proteínas. Las proteínas se componen de diferentes aminoácidos y la calidad nutricional de una proteína se determina básicamente por el contenido, la proporción y la disponibilidad de sus aminoácidos. Becker (2007) comparó el perfil de aminoácidos de diversas microalgas con alimentos convencionales básicos y un patrón de referencia bien equilibrado de una proteína, recomendado por la OMS/FAO (1973). El autor observó que el patrón de aminoácidos de casi todas las algas, entre ellas *C. vulgaris*, fue favorable en relación con el patrón de referencia y las otras proteínas de los alimentos (huevo y soja) analizados.

Lo aquí evaluado, considerando la alta calidad de las proteínas obtenidas a partir de la biomasa de microalgas, determina que las mismas se transformen en un producto de alto valor agregado que no sólo podría ser utilizada en la alimentación humana y animal, sino también en la industria cosmética. En tal sentido, Lourenço, 2006; Spolaore y col. (2006) entre otros autores, sostienen que extractos de *C. vulgaris* estimulan la síntesis de colágeno, facilitando la regeneración de tejidos y la reducción de líneas faciales.

En lo que respecta a los demás componentes, Morris Quevedo y col. (1999), informaron para *C. vulgaris* la obtención de 16,0; 8,20 y 0,29 % de carbohidratos, fibras y lípidos

respectivamente. Por otra parte, Nain y col., (2011) encontraron los siguientes valores de lípidos en *C. vulgaris*: 69,5; 57,14 y 56,54% en cultivos a 30 mg N-NH₄ l⁻¹. Bertoldi y col., (2006) informaron la producción de entre 18,21 y 15,02 % de lípidos luego de cultivar a *C. vulgaris* en diferentes medios de cultivo.

Estas diferencias en los valores reportados para la misma especie es posible que ocurran debido a que, tal como sucede en los vegetales superiores, en las microalgas la composición de la biomasa y la bioquímica puede variar de acuerdo a las condiciones del entorno y la edad del cultivo (Lourenço y col., 1997; Renaud y col., 1999; Araújo y Garcia., 2005).

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran la potencialidad de la microalga *C. vulgaris* para los diferentes usos y aplicaciones previamente discutidos, los que pueden ser de diversa índole: desde la reducción de compuestos contaminantes utilizando aguas residuales, con la reducción de la DBO y DQO, la remoción de nitrógeno y fósforo de efluentes de producción pecuaria, así como la comercializan de la biomasa obtenida, como suplementos alimentarios, medicinales y cosméticos.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO I: Contexto ambiental. Uso de plaguicidas. Aportes de la Ecotoxicología para el control y monitoreo ambiental. Bioensayos como herramientas para evaluar procesos de remediación ambiental.

Este trabajo contribuye al debate actual sobre la sostenibilidad del sistema de producción de granos a gran escala, basado en el uso de importantes volúmenes de formulaciones a base de glifosato.

En el desarrollo de la tesis se realizaron pruebas agudas para determinar la 48h-CL₅₀ de cladóceros y la 96 h-CE₅₀ de la microalga *C. vulgaris* para cuatro formulaciones comerciales de glifosato (Eskoba[®], Panzer Gold[®], Roundup Ultramax[®], Sulfosato Touchdown[®]), encontrando diferencias entre los formulados en los valores registrados y con los reportados en la bibliografía, para los distintos modelos biológicos utilizados.

Por otro lado, se realizaron de ensayos de recuperación, analizados a partir de MMP y estudios de simulación de Monte Carlo y crónicos, demostrando la necesidad de llevar adelante pruebas considerando el ciclo de vida completo de las especies y no sólo la mortalidad, sino también otros atributos de historia de vida tales como supervivencia, la fecundidad, la edad de madurez sexual y el crecimiento. En este sentido, estos ensayos se convierten en una herramienta de gestión que contempla los efectos subletales de este

tipo de xenobióticos a partir de parámetros biológicos integradores con sentido ecológico.

Tales parámetros, como λ y R_0 , deberían ser tenidos en cuenta para la elaboración de valores guía, ya que aportarían a una gestión del ambiente más eficiente y orientada a la protección de la biota acuática en su conjunto, y por ende a la conservación de la integridad ecosistémica.

En este capítulo también se realizó la evaluación de la toxicidad de las muestras recogidas en diferentes tiempos luego de aplicar el proceso UV/H₂O₂, trabajando con las mismas formulaciones de glifosato de los ensayos ecotoxicológicos antes mencionados.

En el caso de *C. vulgaris* se demostró que las muestras obtenidas a los 360 min (M₃) del proceso UV/H₂O₂ son adecuadas para obtener efluentes descontaminados, ya que en ninguno de los casos evaluados se llegó al 50 % de inhibición del crecimiento para la microalga.

Por otro lado, los resultados obtenidos al usar *C. dubia* para evaluar el proceso UV/ H₂O₂ sugieren que deberían aumentarse los tiempos de reacción del tratamiento de descontaminación de algunos formulados, tales como Eskoba[®] y Roundup Ultramax[®], ya que en estos compuestos el % de mortalidad para *C. dubia* fue mayor al 50 % a los 360 min (M₃) del proceso.

Al considerar la adecuación de los cladóceros *D. magna* y *C. dubia* como modelos biológicos para la evaluación del proceso UV/H₂O₂, se llegó a los mismos resultados que en los ensayos donde se determinó la toxicidad de diferentes formulaciones de glifosato y donde la especie más sensible fue *C. dubia*. Estos resultados destacan la importancia de realizar estudios ecotoxicológicos con especies de biota nativa y representativa de las regiones donde se aplican estos formulados y procesos de remediación tales como el UV/H₂O₂.

En relación con los coadyudantes presentes en las formulaciones comerciales de agroquímicos, a pesar de que en general se consideran sustancias inertes, nuestros resultados indican que los mismos modifican la toxicidad de los formulados.

En los ensayos con microcrustáceos se demostró que independientemente de que las formulaciones evaluadas tengan el mismo principio activo las toxicidades no son similares y varían según la presentación comercial evaluada y la especie de prueba utilizada. En el caso de la evaluación del proceso, cuando comparamos el % I o el % de mortalidad en muestras tratadas (M₃ (UV/H₂O₂)) y sin tratamiento para *C. vulgaris* y los cladóceros respectivamente, no encontramos una relación clara. Este fenómeno podría

deberse a la presencia de intermediarios de reacción propios del catión isopropilamina, por ejemplo, del anión glifosato y de los coadyudantes que estarían modificando la toxicidad de las muestras obtenidas con el proceso.

Esto demuestra la importancia de tener un mayor y mejor conocimiento de la totalidad de los compuestos que integran las formulaciones comerciales de agroquímicos, ya que en estas presentaciones sólo se informa la cantidad de principio activo, sin mencionar los demás componentes o incluir las correspondientes fórmulas químicas.

Finalmente, concluimos que en este capítulo se realizaron diferentes ensayos y evaluaciones de formulaciones de glifosato y la aplicación de un proceso de remediación, utilizando especies planctónicas no-blanco, obteniendo resultados que permitirán aportar información relevante a entes públicos y privados encargados de la gestión ambiental. En este trabajo se abordó la problemática de los agroquímicos con un enfoque integrador, consciente de que la multidisciplinariedad permite aportar al desarrollo de evaluaciones de riesgos e implementar medidas de control más adecuadas que posibilitan una mejor gestión de agroquímicos de amplio uso en nuestro país.

CAPÍTULO II: *Chlorella vulgaris*: Usos y aplicaciones

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo I, y tomando como punto inicial las concentraciones de glifosato obtenidas a los 360 min (M_3), se evaluó la capacidad de *C. vulgaris* para remover glifosato. En este caso, el objetivo fue comprobar si el proceso físico-químico-UV/ H_2O_2 - podía ser complementado con una etapa de ficoremediación para lograr mayor eficiencia de descontaminación en la última etapa, previo a su descarte en un curso de agua receptor.

Los resultados demostraron que *C. vulgaris* tiene poca capacidad de remover glifosato en soluciones acuosas, por lo que en el caso de considerar complementar el proceso UV/ H_2O_2 con un etapa de bioremediación, es recomendable utilizar otros microorganismos, tales como bacterias, cianobacterias o bien extender la aplicación del proceso UV/ H_2O_2 .

Dado este resultado, pero en conocimiento de la eficiencia de *C. vulgaris* para actuar en diferentes procesos de bioremediación, en esta tesis decidimos evaluar su potencial para absorber nutrientes de efluentes de la producción láctea y determinar la calidad de la biomasa obtenida.

Los valores de remoción registrados fueron similares a los relevados en la bibliografía especializada, reportando en esta tesis % de remoción de 97,1; 80,8; 81,7 para el amonio,

DQO y DBO, lo que muestra la capacidad y potencialidad de *C. vulgaris* para este uso y abre nuevos caminos para aportar al área de la bioremediación de efluentes que se producen en grandes volúmenes en el centro este de Argentina, tradicionalmente considerada, junto con la región pampeana, las principales regiones agrícola-ganaderas del país.

Con respecto a la calidad de la biomasa obtenida al cultivar *C. vulgaris* con efluentes de la producción bovina y porcina, la cantidad de proteínas brutas obtenida fue de 3,75 %. Seguramente, las condiciones extremas de cultivo bajo un estrés importantes limita el posible uso de la biomasa obtenida, para otros fines. Sin embargo, cuando *C. vulgaris* se cultivó en medio de cultivo y en un fotobioreactor, el % de proteína obtenida aumentó a 44,43 %. Este resultado es promisorio dado que la biomasa obtenida de cultivos de *C. vulgaris*, puede ser un producto de interés para diferentes usos, tales como en la industria alimenticia o cosmética, que en este trabajo fue probado en una primera instancia preliminar con resultados positivos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Raouf N.; Al-Homaidan, A.A. y Ibraheem, I.B.M. (2012) *Microalgae and wastewater treatment*. Saudi Journal of Biological Sciences 19: 257-275.
- Adema, M. M. (1978) *Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests*. Hydrobiol. 59:125.
- Albarracín, I.; Pío, G.; Salomón, R. y Cravero, M. (2011) *Inhibición del crecimiento de Chlamydomonas sp. por la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina*. Rev. Cuban. Investig. Pesq. 28 (1): 30-35.
- Albeliovich, A. (2004) *Water Purification: Algae in wastewater oxidation ponds*. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Ed: Richmond, A.) Blackwell Publishing, Oxford, p. 430-438.
- Alberdi, J. L.; Saenz, M. E.; Di Marzio, W. D. y Tortorelli, M. C. (1996) *Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to daphnia magna and daphnia spinulata*. Bull Environ Contam Toxicol. 57(2): 229–235.
- Altenburger, R.; Boedecker, W.; Faust, M. y Grimme, L. H. (1990) *Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: Combination effect studies with pesticides in algal biotests*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 20: 98–114.
- Al-Shatri, A.H.; Ali E.; Al-Shorgani, N.K.N. y Kalil, M.S. (2014) *Growth of Scenedesmus dimorphus in different algal media and pH profile due to secreted metabolites*. Afr J Biotechnol 13:1714–1720.
- American Public Health Association (APHA). (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th Ed. American Public Health Association. Ap. 8010 G, Washington D.C. Estados Unidos.
- Anderson, B. G. (1944) *The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of Daphnia magna*. J. Sewage Works 16 (6): 1156.
- Anderson, D. H. y Benke, A. (1994) *Growth and reproduction of the cladoceran Ceriodaphnia dubia from a forested floodplain swamp*. Limnol. and Oceanograp. 39 (7): 1517-1527.
- Andrade C.E.R.; Vera, A.L.; Cárdenas, C.H. y Morales, E.D. (2009) *Biomass production of microalga Scenedesmus sp. with wastewater from fishery*. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 32 (2): 126 – 134.

- Andrade, R.D.; Torres, R.; Montes, E.J. y Fernández, A.C. (2006) *Obtención de harina a partir del cultivo de Chlorella vulgaris y su análisis proteico*. Temas agrarios 12: 50-57.
- Anton, F.A.; Laborda, E.; Laborda, P. y Ramos, E. (1993) *Carbofuran acute toxicity to Eisenia foetida Savigny. Earth worms*. Bull. of Environ. Contam. and Toxicol. 50: 407-412.
- Aparicio V.C.; De Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P y Costa, J.L. (2013) *Environmental fate of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins*. Chemosphere 93: 1866-1873.
- Araújo, S.C. y Garcia, V.M.T. (2005) *Growth and biochemical composition of the diatom Chaetoceros cf wighamii brightwell under different temperatures, salinity and carbon dioxide levels I Protein, carbohydrates and lipids*. Aquaculture 246: 405-412
- Attademo, A.M.; Peltzer, P.; Lajmanovich, R.; Cabagna-Zenklusen C.; Junges, C. y Basso A. (2014) *Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina*. Environ Monit Assess. 186(1):635-49.
- Bach, N.C.; Natale, G.S.; Somoza, G.M. y Ronco, A. (2016). *Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, Leptodactylus latrans*. Environmental Science and Pollution Research. 23(23):23959-23971.
- Baird, D. J.; Barber, I.; Bradley, M.; Callow, P. y Soares, A. (1989) *The Daphnia bioassay: a critique*. Hydrobiol. 188: 403-406.
- Baudo, R. (1987) *Heavy metal Pollution and ecosystem recovery*. En: *Ecological assessment of environmental degradation, pollution and recovery* (Ed.: Ravera, O.). Elsevier Scientific Publisher BV Amsterdam, The Neatherlands, p 325.
- Becker, E.W. (1994) *Microalgae*. In: Baddiley SJ, Carey NH, Higgins IJ, Potter WG (eds) *Biotechnology-Microbiology*. Cambridge University Press, New York, pp 177-195.
- Becker, E.W. (2007) *Micro-algae as a source of protein*. *Biotechnol. Adv.* 25: 207-210.
- Benavides, J. y Rito-Palomares, M. (2008) *Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas Polientilenglicol – Sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos*. Revista Mexicana de Ingeniería Química 7: 99-111.

- Bertoldi, F.; Sant'Anna, E.; Villela da Costa Braga, M. y Barcelos Oliveira, J.L. (2006) *Lipids, fatty acids composition and carotenoids of Chlorella vulgaris cultivated in hydroponic Wastewater*. *Grasas y Aceites*. 57(3) 270-274.
- Bischoff, H.W. y Bold, H.C. (1963) *Phycological studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species*. *Inst Mar Sci Univ. Texas Publ* 6318:1-95
- Botev, Z.; Grotowski, J. y Kroese, D. (2010) *Kernel density estimation via diffusion*. *The Annals of Statistics*. 38: 2916-2957.
- Brausch, J. M. y Smith, P. N. (2007) *Toxicity of Three Polyethoxylated Tallowamine Surfactant Formulations to Laboratory and Field Collected Fairy Shrimp, Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 52: 217-221.
- Brooks, J. L. (1959) *Cladocera*. En: *Freshwater biology* (Ed.: Edmondson, W. T.), 2nd Ed. Wiley, New York, Estados Unidos. p 587-656.
- Buikema, A. L. Jr.; Niederlehner, B. R. y Cairns J. Jr. (1982) *Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing*. *Water Research* 16: 239 - 262.
- Calabrese, E. J.; Baldwin, L.A. y Holland, C. D. (1999) *Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment*. *Risk Anal assessment*. *Risk Anal* 19: 261-281.
- Calow, P. y Sibly, R.M. (1990) *A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications*. *Functional Ecology*, 4, 283-288.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). (2011) *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*. Buenos Aires, Argentina, p 350.
- Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. (2012) *Canadian Environmental Quality Guidelines Canadian Council of Ministers of the Environment*. Canadian.
- Carvalho, A. P.; Meireles, L. y Malcata, F. (2006) *Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances*. *Biotechnol Progr*. 22: 1490-1506.
- Castillo, L.E.; Vila, I y Neild, E. (2000) *Ecotoxicity assessment of metals and wastewaters using multitrophic assays*. *Environmental Toxicology*. 15 (5): 370-375.
- Caswell, H. (2001) *Matrix population models: Construction, analysis and interpretation*. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- Cedergreen, N. y Streibig, J. C. (2005) *The toxicity of Herbicides to Non-target Aquatic Plants and Algae: Assessment of Predictive Factors and Hazard*. *Pest.Manag. Sci*. 61: 1152-1160.

- Ceresoli, N. y Gagneten, A. M. (2003) *Efectos del efluente de curtiembre sobre Ceriodaphnia dubia (Crustacea, Cladocera) en condiciones experimentales*. Interciencia 28: 469–475.
- Cervantes Francisco J.; Saldívar-Cabrales, J.; y Yescas, J.F. (2007) *Estrategias para el aprovechamiento de desechos porcinos en la agricultura*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 3 (1): 3-12.
- Chaparro, M. y Canziani, G. (2010) *A discrete model for estimating the development time from egg to infecting larva of Ostertagiaostertagi parametrized using a fuzzy rulebased system*. Ecological Modelling. 221: 2582–2589.
- Chia, M.A.; Lombardi, A.T. y Melão, M. (2013) *Growth and biochemical composition of Chlorella vulgaris in different growth media*. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 85 (4): 1427-1438.
- Christy, S. L.; Karlander, E. P. y Parochetti, J. V. (1981) *Effects of Glyphosate on the Growth Rate of Chlorella*. Weed Science. 29 (1): 5-7.
- Chong, A.M.Y.; Wong, Y.S. y Tam, N.F.Y. (2000) *Performance of diferent microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater*. Chemosphere .41: 251-257.
- Choung, C.B.; Hyneb, R.V.; Stevensc, M.M. y Hosea, G.C. (2013) *The ecological effects of a herbicide–insecticide mixture on an experimental freshwater ecosystem*. Environmental Pollution. 172: 264–274.
- Colak, O. y Kaya, Z. (1988) *A study on the possibilities of biological wastewater treatment using algae*. Doga Biyolji Serisi 12 (1): 18–29.
- Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET). (2009)*Informe: Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente*. Buenos Aires, Argentina. p 133.
- Costan, G., Bermingham, N., Blaise, C. y Ferard, J.F. (1993) *Potential ecotoxic effects probe (PEEP): A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents*. Environmental Toxicology. 8 (2): 115–140.
- Cox, C. (2004) Glyphosate. Pestic. Reform. 24: 10–15.
- Cuhra, M., Traavik, T. y Bøhn, T. (2013) *Clone– and age–dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in Daphnia magna*. Ecotoxicology. 22: 251–262.
- Da silva, E.M. y Soares, A. (2010) *Is there a distinct tropical ecotoxicology?*. Integrated Environmental Assessment and Management. 6 (2): 308-317.

- De la Noüe, J.; Laliberté, G. y Proulx, D. (1992). *Algae and wastewater*. J. Appl. Phycol. 4: 247-254.
- De Souza, J.S.; Kizys, M.M.; Da Conceição, R.R.; Glebocki, G.; Romano, R.M.; Ortiga-Carvalho, T.M.; Giannocco, G.; Da Silva, I.D.; Da Silva, M.R.; Romano, M.A. y Chiamolera, M.I. (2016) *Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats*. Toxicology. 377: 25-37.
- Degraeve, G. M.; Cooney, J. D.; Marsh, B. H.; Pollock, T.L. y Reichenbach, N.G. (1992) *Variability in the performance of the 7-d Ceriodaphnia dubia survival and reproduction test: an intra and interlaboratory study*. Environ. Toxicol. Chem. 11: 851-858.
- Demetrio, P. M.; Bulus Rossini, G.; Bonetto, C. y Ronco, A. (2012) *Effects of pesticide formulations and active ingredients on the coelenterate Hydra attenuata (Pallas, 1766)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 88: 15–19.
- Díaz Baez M.C.; Bustos-Lopez M.C. y Espinoza Martinez A.J. (2004) *Pruebas de Toxicidad Acuática*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería civil. Sección de Ingeniería Ambiental. Primera ed. ISBN: 958-701-385-9.
- Diaz Baez, M.C. y Pérez, J. (2000) *Intralaboratory experience with a battery of bioassays: Colombia experience*. Environmental Toxicology and Water Quality. 15 (4): 297-303.
- Diez, M. (2012). *Efluentes de tambo, mucho más que residuos*. Producir XXI, Bs. As., 20 (251): 30-36.
- Dodson, S. y T. Hanazato. (1995) *Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behaviour, and reproduction of daphnia, a key member of aquatic ecosystems*. Environ Health Persp. 103 (41): 7-11.
- Dominguez-Cortinas, G.; Mejía-Saavedra, J.; Santos-Medrano, G. E. y Rico-Martínez, R. (2008). *Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena[®] using the freshwater invertebrates Daphnia magna and Lecane quadridentata*. Toxicol Environ Chem, 90: 377–38
- Dominic, V.J.; Murali, S. y Nisha, M.C. (2009) *Phycoremediation efficiency of three algae Chlorella vulgaris, Synechocystis salina and Gloeocapsa gelatinosa*. Academic Review 16(1-2): 138-146.

- Dorn, P.; Salanitro, J.; Evans, S. y Kravetz, L. (1993) *Assessing the Aquatic Hazard of Some Branchaed and Linear Non-Ionic Surfactants by Biodegradation and Toxicity*. *Toxicol. Environ. Chem.*, 12: 751–1726.
- Doušková I.; Kaštánek, F.; Maléterová, Y.; Kaštánek, P.; Doucha, J. y Zachleder, V. (2010) *Utilization of distillerystillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogascogeneration-microalgae-products*. *Energy Conversion and Management*. 51: 606-611.
- Duke, S. O. y Powles, S. B. (2008). *Glyphosate: a once-in-a-century herbicide*. *Pest Management Science*. 64: 319-325.
- Dutra, B. K.; Fernandes, F. A.; Failace D.M. y Oliveira, G.T. (2011) *Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of Hyalella castroi (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae)*. *Ecotoxicology*. 20 (1): 255–263.
- Emlen, J.M. y Springman, K.R. (2007) *Developing methods to assess and predict the population level effects of environmental contaminants*. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3: 157–165.
- Escalante, A.H. (1982) *Contribution to the knowledge of freshwater fishes thropic relations in the platensis area. I. Astyanax eigenmanniorum (Osteichthyes Tetragonopteridae)*. *Limnobiós* 2 (5): 311-322.
- Faust, M.; Altenburger, R.; Backhaus, T.; Blanck, H.; Boedeker, W.; Gramatica, P.; Hamer, V.; Scholze, M.; Vighi, M. y Grimme L. H. (2001) *Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants*. *Aquatic Toxicology* 56: 13–32.
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*. 3th Ed. Cambridge Univ. Press, Londres, pp. 234.
- Femia, J.; Mariani, M.; Zalazar, C. y Tiscornia, I. (2013) *Photodegradation of chlorpyrifos in water by UV/H₂O₂ treatment. Toxicity evaluation*. *Water Science and Technology*. 68 (10): 2279-2286.
- Ferrari, B. y Ferard, J. F. (1996) *Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:765–770.
- Franz, J. E. (1974). *N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions*. Google Patents.
- Franz, J. E.; Mao, M. K. y Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: a unique global herbicide*.
- Gagneten A. M. y Paggi, J. C. (2009). *Effects of Heavy Metal Contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and Eutrophication on Zooplankton in the Lower Basin of the Salado River (Argentina)*. *Water, Air, and Soil Pollution*. 198 (1): 317-334.

- Gagneten, A.M.; Maitre, M.I.; Reno, U.; Regaldo, L.; Roldan, S. y Enrique, S. (2014) *Efectos del herbicida Ron-do[®] sobre Cerodaphnia reticulata (Crustacea, Cladocera) y degradabilidad del glifosato (N-fosfometilglicina) en condiciones experimentales. Natura Neotropicalis. 45: 71-85.*
- Guerrero Schimpf, M.; Milesi, M.M.; Ingaramo, P.I.; Luque, E.H. y Varayoud, J. (2016) *Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus.* Toxicology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.004>.
- González-López, C.V.; Acién, F.G.; Fernández-Sevilla, J.M. y Molina, E. (2011) *Uso de microalgas como alternativa a lastecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂.* Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal. 2(2): 93-106.
- Graph Pad Instat. (2004) *Grupo Infostat, FCA.* Universidad Nacional de Córdoba. 1a eds. Editorial Brujas, Argentina.
- Hammouda, O.; Gaber, A.; Abdel-Raouf, N. (1995) *Microalgae and wastewater treatment.* Ecotoxicol. Environ. Saf. 31 (3): 205–210.
- Hanumantha Rao, P; Ranjith Kumar, R.; Raghavan, B.; Subramanian, V.V. y Sivasubramanian, V. (2011) *Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather processing chemical manufacturing facility.* Water SA. 37:7–14.
- Harper, E.; Rittenhouse, T. y Semlitsch, R. (2008) *Demographic consequences of terrestrial habitat loss for pool-breeding amphibians: predicting extinction risks associated with inadequate size of buffer zones.* Conservation Biology. 22: 1205–1215.
- Heinemann, J. A.; Agapito-Tenfen, S. Z. y Carman, J. A. (2013). *A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments.* Environment International, 55, 43–55.
- Hinzpeter, I.; Shene, C. y Masson, L. (2006) *Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3.* Grasas y aceites. 57 (3): 336-342.
- Herrero M.A. y Gil S. B. (2008) *Consideraciones ambientales de la intensificación en la producción animal.* Ecol. Austral. 18 (3) 273-289.
- Hodaifa, G.; Martínez, M.E. y Sánchez, S. (2008). *Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of Scenedesmus oblique.* Bioresour Technol. 99 (5): 1111-1117.

- Hongyang, S.; Yalei, Z.; Chunmin, Z.; Xuefei, Z y Jinpeng, L. (2011) *Cultivation of Chlorella pyrenoidosa in soybean processing wastewater*. Bioresource Technology 102: 9884-9890.
- Hongyang, S.; Yalei, Z.; Chunmin, Z.; Xuefei Z. y Jinpeng, L. (2011) *Cultivation of Chlorella pyrenoidosa in soybean processing wastewater*. Bioresource Technology 102: 9884-9890.
- Holt, E. A. y Miller, S. W. (2010) *Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts*. Nature Education Knowledge 3(10):8.
- Hua, J. y Relyea, R.A. (2014) *Chemical cocktails in aquatic ecosystems: Pesticide effects on resistance and resilience*. Environ. Poll. 189:18-26.
- Huston, P.L. y Pignatello, J.J.(1999) *Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction*. Water Research. 33(5): 1238–1246.
- Iannacone, J. y Gutierrez A. (1999) *Ecotoxicidad de los Agroquímicos Lindano y Clorpirifos sobre el nematodo Panagrellus, la microalga Chlorella y el ensayo con Allium*. Agricultura Técnica 59: 85-95.
- Ikehata, H. y Gamal El-Din, M. (2006) *Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes*. Rev. J. Environ. Eng. Sci. 5 (2): 81-135.
- Infante C.; Angulo, E.; Zárate, A.; Florez, J.Z.; Barrios, F. y Zapata, C. (2012) *Propagación de la microalga Chlorella sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular*. Avances en Ciencias e Ingeniería 3(2): 159-164.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el Ambiente*. (Ediciones INTA). p73.
- International Organization for Standardization (IOS). IOS 8692. (1989) *Water quality: fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum*. Switzerland. Geneva.
- Johnstone, C.; Day, J.D.; Staines, E. y Benson, E.E. (2006) *An in vitro oxidative stress test for determining pollutant tolerance in algae*. Ecological Indicators 6: 770–779.
- Kenaga, E. (1982) *Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates*. Environ. Toxicol. Chem., 1:347–358.

- Kim, M.K.; Park, J.W.; Park, C.S.; Kim, S.J.; Jeune, K.H.; Chang, M.U. y Acreman, J. (2007) *Enhanced production of Scenedesmus spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater*. *Bioresour Technol.* 98(11):2220-8.
- Kitulagodage, M.; Astheimer, L. B. y Buttemer, W. A. (2008) *Diacetone alcohol, a dispersal solvent, contributes to acute toxicity of a fipronil-based insecticide in a passerine bird*. *Ecotoxicol Environ.* 71: 597–600.
- Kluttgen, B.; Kuntz, N. y Ratte, H. T. (1996) *Combined effects of 3,4-dichloroaniline and food concentration on life-table data of two related cladocerans, Daphnia Magna and Ceriodaphnia Quadrangula*. *Chemosphere*, 32(10): 2015-2028.
- Knie, J. y Lopes, E. (2004). *Teste Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicacoes*. Brasil.
- Koivisto, S. (1995) *Is Daphnia an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?*. *Environmental Pollution.* 90(2): 263-267.
- Koivisto, S.; Ketola, M. y Walls, M. (1992) *Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure*. *Hydrobiol.* 348: 125-136.
- Lajmanovich R.C.; Attademo, A.M.; Simoniello, M.F.; Poletta, G.L. Junges, C.M.; Peltzer, P.M.; Grenón, P. y Cabagna-Zenkus, M.C. (2015) *Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae)*. *Water, Air, Soil Pollution.* 226 (12): 226-427.
- Lajmanovich, R. C.; Lorenzatti, E.; Maitre, M.I.; Enrique, S. y Peltzer, M.P. (2003) *Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to neotropical tadpoles Scinax nasicus (Anura: Hylidae)*. *Fresh. Environ. Bull.* 12: 364–367.
- Lajmanovich, R.; Attademo, A.; Peltzer, P.; Junges, C. y Cabagna, M. (2011) *Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione-S-transferase inhibitors*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 681–689.
- Lanctôt, C.; Navarro-Martina, L.; Robertson, C.; Park, B.; Jackman, P.; Paulid, B.D. y Trudeau, V.L. (2014) *Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (Lithobates sylvaticus) tadpoles. II: agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions*. *Aquat. Toxicol.* 154:291–303
- Larsdotter, K. (2006) *Wastewater treatment with microalgae - a literature review*. *Vatten.* 62:31–38.

- Lass, S. y Spaak, P. (2003) *Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review*. *Hydrobiologia*. 491: 221-239.
- Lavoie A. y De la Noüe J. (1985) *Hyperconcentrated cultures of Scenedesmus obliquus. A new approach for wastewater biological tertiary treatment*. *Water Res.* 19:1437–1442.
- León, C y Chaves, D (2010). *Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua Lemna aequinoctiales y un humedal subsuperficial en Costa Rica*. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 1(2): 155-177.
- Li, Y.; Chen, Y.F.; Chen, P.; Min, M.; Zhou, W.; Martinez, B.; Zhu, J. y Ruan, R. (2011) *Characterization of a microalga Chlorella sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production*. *Bioresource Technology*. 102: 5138-5144.
- Lipok, J.; Owsiak, T.; Młynarz, P.; Forlani, G. y Kafarski, P. (2007) *Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of Spirulinas pp. to degrade Glyphosate*. *Enzyme and Microbial Technology* 41:286–291.
- Lipok, J.; Studnik, H. y Gruyaert, S. (2010) *The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 1681–1688.
- Lipok, J.; Wiczorek, D.; Jewginski, M. y Kafarski, P. (2009) *Prospects of in vivo ³¹P NMR method in glyphosate degradation studies in whole cell system*. *Enzyme and Microbial Technology*. 44. 11–16.
- López González, E.C.; Latorre, M.A.; Larriera, A.; Siroski, P.A. y Poletta, G.L. (2013) *Induction of micronuclei in broad snouted caiman (Caiman latirostris) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105: 131–134.
- Lopretto, E. C. y Tell, G. (1995). *Ecosistemas de aguas continentales. Métodos para su estudio, Tomos I, II y III* (Ediciones Sur) p 1401.
- Lourenço, S. O. (2006) *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos: Brasil. p 606.
- Lourenço, S.O.; Marquez, U.M.L.; Mancini-Filho, J.; Barbarino, E. y Aidar, E. (1997) *Changes in biochemical profile of Tetraselmis gracilis I Comparision of two culture media*. *Aquaculture*. 148: 153-158.
- Luna, L.M. y Carmenate, Z. (2004) *Microalgas como biomonitores de contaminación*. *Revista Cubana de Química*. 16: 34–48

- Luna, L.M. (2007) *Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos*. Revista Cubana de Química. 19 (2): 3-20.
- Lupi, L.; Miglioranza, K. S. B.; Aparicio, V. C.; Marino, D.; Bedmar, F. y Wunderlin, D. A. (2015) *Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina*. Science of the Total Environment. 536: 687–694.
- Ma, J.; Liang, W.; Xu, L.; Wang, S.; Wei, Y y Lu, J. (2001) *Acute Toxicity of 33 Herbicides to the Green Alga Chlorella pyrenoidosa*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 66: 536-541.
- Ma, J.; Ligen, X.; Wang, S.; Zheng, R.; Jin, S.; Huang, S. y Huang, Y. (2002) *Toxicity of 40 herbicides to the green alga Chlorella vulgaris*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 51: 128-132.
- Maity, J.P.; Bundschuh, J.; Chen, C.Y. y Bhattacharya, P. (2014) *Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives: A mini review*. Energy. 78: 104–113
- Malacalza, L. (2013). *Ecología y ambiente*. (Ed. Asociación de Universidades Grupo Montevideo). Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, p 106.
- Manassero, A.; Passalia, C.; Negro, A. C.; Cassano, A.E.; Zalazar, C. S. (2010) *Glyphosate degradation in water employing the H₂O₂/UV process*. Water Research, 44: 3875-3882.
- Marchello, A.E.; Lombardi, A.T.; Dellamano-Oliveira, M.J. y Clovis W.O. (2015) *Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium*. Brazilian Journal of Microbiology 46, 1, 75-84.
- Marco, A.; Esplugas, S. y Saum, G. (1997) *How and why combine chemical biological processes for wastewater treatment*. Wat. Sci.Tech., 35,321-327.
- Mariani, M.L.; Romero, R. y Zalazar, C.S. (2015) *Modeling of degradation kinetic and toxicity evaluation of herbicides mixtures in water using the UV/H₂O₂ process*. Photochem. Photobiol. Sci. 14: 608-617.
- Markovits, A.; Lopez, G.L.; Costa, C.E. y Lutz, R.M. (1989) *Microalgas como alimento humano potencial. Evaluacion quimica y biologica de Phaeodactylum tricornutum*. Alimentos. 14: 29-34.
- Martini, C.N.; Gabrielli, M.; Codesido, M.M.; Del Vila, M.C. (2016) *Glyphosate-based herbicides with different adjuvants are more potent inhibitors of 3T3-L1 fibroblast*

- proliferation and differentiation to adipocytes than glyphosate alone et al. Comp Clin Pathol.* 25 (3): 607-613.
- Maršálek, B. y Rojíčková, R. (1996) *Stress factors enhancing production of algal exudates: a potential self-protective mechanism?* Z. Naturforsch. 51:646-650.
- Mata, T.M.; Martins, A.A. y Caetano, N.S. (2010) *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14: 217-232.
- Mehta, S.K. y Gaur, J.P. (2001). *Concurrent sorption of Ni²⁺ and Cu²⁺ by Chlorella vulgaris from a binary metal solution.* Microbiol Biotechnol 55: 379–382.
- Melnichuk, S.D.; Sherban, E.P. y Lokhanskaya, V.I. (2007) *Effects of Fasel Herbicide on vital activity of Ceriodaphnia affinis in acute and chronic experiments.* J. Hydrobiol. 43 (6): 83–91.
- Mendez-Suaza, L.; Albarracin, I.; Cravero, M. y Salomón, R. 2011. *Crecimiento de Scenedesmus quadricauda en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina.* Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras 28(1):36–41.
- Mensah, P.K.; Palmer, C.G. y Muller, W.J (2013) *Derivation of South African water quality guidelines for roundup using species sensitivity distribution.* Ecotoxicol. Environ. Saf. 96: 24–31
- Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendômois, J.; Séralini, G.E. (2014). *Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles.* BioMed Research International. 91: 1-8.
- Miao, X.L. y Wu, Q.Y. (2004). *High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of Chlorella protothecoides.* J. Biotechnol 110: 85–93.
- Mallory-Smith C.A. y Ratzinger E.J.Jr. (2003) *Revised classification of herbicides by sites of action for weed resistance management Strategies.* Weed Technol. 17 (3): 605-619.
- Momo, F.R. y Capurro, A.F. (2006) *Ecología Matemática Principios y aplicaciones.* 1th Ed. (Ediciones Cooperativas). Buenos Aires, Argentina.
- Monsanto (2009) *Glyphosate—explaining the active ingredient.* Growing Knowledge Bull. Monsanto Can. Inc. 1–2.
- Monsanto (2015). Company History. Vol. 2015.
<http://www.monsanto.com/whoweare/pages/monsantohistory.aspx>.

- Morales-Amaral, M.; Gómez-Serrano, C.; Ación, F.G. (2015) *Outdoor production of Scenedesmus sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source*. Algal Res. 12:99–108.
- Morris Quevedo, Humberto, J.; Quintana Cabrales, M.M., Arceo, A.A. y Hernández Nazario, L. (1999). *Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de Chlorella vulgaris*. Rev. Cubana Aliment. Nutr. 13 (2): 123-8.
- Nain, E.A.; Ruíz Marín, A.; Pérez Reda, L.J.; Reyes García, Z.; López, Y.C.; Campos Garcia, S del C.; Sabido Perez, M.Y.; Cerón Bretón, J.G.; Cordova Quiroz, A.V. y Moreno López. V.J. (2011). *Densidad celular y acumulación de lípidos en cultivos libres de Chlorella vulgaris y Neochloris oleoabundans a diferentes concentraciones de nitrógeno y carbonato de sodio*. U. Tecnociencia 5 (1): 56 - 71.
- Octave community (2014). GNU Octave 3.8.2. Available at www.gnu.org/software/octave/.
- Olguín, E.J. (2003) *Phycoremediation: key issues for costeffective nutrient removal processes*. Biotechnology Advances. 22: 81-91.
- Oliveros, O.B. (1980) *Campaña Limnológica “Keratella I” en el río Paraná medio: aspectos tróficos de los peces de ambientes leníticos*. Ecología. 4: 115-126.
- Olvera-Ramírez, R.; Centeno-Ramos, C. y Martínez-Jerónimo, F. (2010) *Toxic effects of Pseudanabaena tenuis (Cyanobacteria) on the cladocerans Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia*. Hidrobiológica. 20: 203–212.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (1973) *Energy and protein requirement*. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee. 52. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1994) *Glyphosate. Environmental Health Criteria; World Health Organization*. Geneva, Switzerland, p 159–177.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015) *Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and Glyphosate* www.thelancet.com/oncology (consultado 20 marzo 2014). doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2011) *Guidelines for the testing of chemicals 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. Paris. France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2004) *Guideline 202 on “Daphnia sp., Acute Immobilisation Test*. Paris. France.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria (INTA). (2012) *Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar*. Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca de la Nación. Buenos Aires. Argentina. p 277.
- Organización de las Naciones Unidas. (ONU). (2011) *Derecho al agua. Boletín informativo 35*. Alto Comisionado para los Derechos Humanos. p.64.
- Organización de las Naciones Unidas. (ONU). (2014) *La situación demográfica en el mundo, 2014. Informe conciso*. División de Población del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de la Secretaría de las Naciones Unidas. Nueva York, Estados Unidos. p 2.
- Oswald, W.J. (1988) *Microalgae and wastewater treatment*. En: *Micro-Algal Biotechnology* (Eds.: Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J.). Cambridge University Press. Cambridge. Inglaterra. 357-394.
- Otero-Paternina, M.S.C.; Cruz-Casallas, P. y Velasco-Santamaría, Y. (2013) *Evaluación del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de Chlorella vulgaris (chlorellaceae)*. Acta biol. Colomb. 18 (1): 87 – 98.
- Pablos, M.V.; Fernández, C.; Babín, M.M.; Navas, J.M.; Carbonell, G.; Martini, F.; García-Hortigüela, P. y Tarazona, J.V. (2009) *Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72 (5): 1594–1600.
- Palomino, M.A.; Estrada, F.C. y López, G.J. (2010) *IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*, João Pessoa. 149-157.
- Papchenkova, G. A.; Golovanova, I. L. y Ushakova, N.V. (2009) *The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in Daphnia magna Straus of successive generations affected by roundup herbicid*. Inland. Wat. Biol.2: 286–291.
- Park J, R. y Craggs Shilton, A. (2011) *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresource Technology 102: 35-42.
- Park, J.; Craggs, R. y Shilton, A. (2011) *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresource Technology 102: 35-42.
- Pengue, W. A. (2001) *Impacto de la Expansión de la soja en Argentina. Globalización, Desarrollo Agropecuario e Ingeniería Genética: Un modelo para armar*. Biodiversidad, Sustento y Culturas 29: 7–14.
- Pereira, J. L.; Antunes, S. C.; Castro, B. B.; Marques, C. R.; Gonclaves, A. M. M.; Gonclaves, F. y Pereira, R. (2009) *Toxicity evaluation of three pesticides on non-*

- target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient.* Ecotoxicology. 18: 455–463.
- Peruzzo, P. J.; Porta, A. A.; y Ronco, A. E. (2008) *Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in North Pampasic region of Argentina.* Environmental Pollution. 156: 61–66.
- Pianka, E. (1982) *Ecología Evolutiva.* Omega. Barcelona, España. p 365.
- Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M. L.; Basack, S.; Kesten, E. y Casabé, N. (2013) *Comparative toxicity of two Glyphosate based formulations to Eisenia andrei under laboratory conditions.* Chemosphere. 91: 545–551.
- Plata, V.; Kafarov, V. y Nelson, N. (2009) *Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas.* Prospect.7: 35-4.1
- Poletta, G.L.; Kleinsorge, E.; Paonessa, A.; Mudry, M.D.; Larriera, A. y Siroski, P. (2011) *Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in Caiman latirostris exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure.* Ecotoxicol Environ Saf. 74 (4): 852-859.
- Poletta, G.L.; Larriera, A.; Kleinsorge, E. y Mudry M.D. (2009) *Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (Caiman latirostris) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test.* Mutat. Res. 672: 95–102.
- Poletta, GL.; Simoniello M.F.; Porcel de Peralta, M.; Kleinsorge, E.; Siroski, P. y Mudry, M.D. (2012) *Evaluation of pesticide-induced DNA damage and oxidative stress on human and wildlife populations in Santa Fe province (Argentina),* en: Abrego Gomez, A.J. and E.M. Lugo de Ortega (Eds.) “Pesticides: Characteristics, Uses and Health Implications”, Chap. 1, 2012, pp. 1- 23. Nova Science Publishers, New York, USA. Estados Unidos.
- Prajapati, S.K.; Kaushik, P.; Malik, A. y Vijay, V.K. (2013) *Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges.* Biotechnology Advances 31: 1408-1425.
- Primost, J. E. (2013). *Estudio de niveles ambientales de glifosato y AMPA en una zona modelo de intensa actividad agrícola en los alrededores de Urdinarrain.* Entre Ríos. Graduate Thesis: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. (80 pp)

- Pulz, O. y Gross, W. (2004) *Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(6): 635-648.
- Qiu, H.; Geng, J.; Ren, H.; Xia, X.; Wang, X. y Yu, Y. (2013) *Physiological and biochemical responses of Microcystis aeruginosa to glyphosate and its Roundup® formulation*. J. Hazard Mater 248–249:172–176
- Quevado, O.C., Morales, V.S. y Acosta, C.A (2008). *Scenedesmus sp. growth in different culture mediums for microalgal protein production*. Vitae. 15: 25-31.
- Rachlin, J.W. y Grosso, A. (1991). *The Effects of pH on the Growth of Chlorella vulgaris and Its Interactions with Cadmium Toxicity*. Environmental Contamination and Toxicology 20: 505-508.
- Raipulis, J.; Toma M.M. y Balode, M. (2009) *Toxicity and genotoxicity testing of Roundup*. Proc. Latvian.Acad. Sci. 63: 29–32.
- Rand, G. M. y Petrocelli, S. R. (1985) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, Washington, Estados Unidos, p. 1-29.
- Rand, G.M.; Wells, P.G. y McCarthy, L.S. (1995) *Introduction to aquatic toxicology, In: Fundamentals of aquatic toxicology-effects, environmental fates, and risk assessment* (Ed. Taylor and Francis). Washington D.C. Estados Unidos.
- Rawat, I.; Ranjith-Kumar, R.; Mutanda, T. y Bux, F. (2011) *Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production*. Applied Energy. 88: 3411-3424.
- Regaldo, L. (2013) *Efecto de metales pesados y plaguicidas sobre organismos planctónicos de diferente nivel trófico y eficacia de acumulación por microalgas*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.
- Renaud, S.M.; Thinh, L. y Parry, D.L. (1999) *The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture*. Aquaculture. 170 (2): 147–159.
- Reno, U.; Gutiérrez, F.; Regaldo, L. y Gagneten, A.M. (2014) *The impact of Eskoba, a glyphosate formulation, on the freshwater plankton community*. Water Environ Res 86:2294–2300.
- Reno, U. (2011). *Estudio comparativo de la cinética de crecimiento de Chlorella sp. en diferentes medios de cultivo*. Tesina para obtener el título de Licenciatura en Biodiversidad. Facultad de Humanidades y Ciencias. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

- Reno, U.; Regaldo, L.; Vidal, E.; Mariani, M.; Zalazar, C. y Gagneten, A.M. (2016) *Water polluted with glyphosate formulations: effectiveness of a decontamination process using Chlorella vulgaris growing as bioindicator*. J. Appl. Phycol. 27. (6): 1-8.
- Reno, U.; Gutierrez, M.F.; Longo, M.; Vidal, E.; Regaldo, L.; Negro, A.; Mariani, M.; Zalazar, C. y Gagneten, A.M. (2015) *Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations*. Water Air Soil Pollut. 226:349.
- Richmond, A. (2000) *Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view*. J. Appl. Phycol. 12: 441–451.
- Rinderhagen, M., J. Ritterhoff & G. Zauke (2000) *Crustaceans as Bioindicators*. Environmental Research Forum. 9:161-197.
- Rodriguez, M.C.; Barsant, L.; Passareli, V.; Evangelista, V.; Conforti, C. y Gualtieri, P. (2007) *Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Research. 105: 234–239.
- Romero, D. M.; Ríos de Molina, M. C. y Juárez, A. B. (2011) *Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of Chlorella kessleri*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74: 741–747.
- Ronco, A.; Sobrero, C.; Grassi, V.; Kaminski, L.; Massolo, L. y Leonardo, M (2000) *Water Tox bioassay intercalibration network: results from Argentina*. Environmental Toxicology. 15 (3): 287 – 297.
- Ronco, A.; Carriquiriborde, P.; Natale, G. S.; Martin, M.; Mugni, H. y Bonetto, C. (2008) *Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region*. In Ecosystem ecology research (209–239). New York: Nova Science.
- Ronco, A. E.; Marino, D. J. G.; Abelando, M.; Almada, P. y Apartin, C. D. (2016) *Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments*. Environ Monit Assess. 188:458. DOI: 10.1007/s10661-016-5467-0.
- Rossi, L.M. (1992) *Evolución morfológica del aparato digestivo de post larvas y pre juveniles de Prochilodus lineatus (Val., 1847) (Pisces, Curimatidae) y su relación con la dieta*. Revista Hydrobiologia Tropical. 25:159–167.
- Rossi, L.M. (2001) *Ontogenetic diet shifts in a neotropical catfish, Sorubim lima (Schneider) from the River Paraná system*. Fish Management Ecology. 8:141–152.

- Rubinstein, R.Y. y Kroese, D.P. (2007) *Simulation and the Monte Carlo method*. John Wiley y Sons, Inc., Hoboken.
- Ruíz, R. y Bahamonde, N. (1989) *Cladóceros y copépodos límnicos en Chile y su distribución geográfica. Lista sistemática*. Publicación N° 45. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago, Chile. p 48
- Sabater, S.; Guasch, H., Ricart, M.; Romaní, A.; Vidal, G.; Klünder, C. y Schmitt-Janse, M. (2007) *Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilms an interface*. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 387: 1425–1434.
- Sáenz, M. E. y Di Marzio, W. (2009) *Ecotoxicity of Glyphosate Herbicide on Four Freshwater Algae Chlorophytic*. Limnetica. 28 (1): 149–158.
- Sáenz, M. E.; Di Marzio, W. y Alberdi, J.L. (2012) *Assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae*. Pest. Biochem. Physiol. 114: 50-57
- Sáenz, M.E.; Alberdi, J.L. y Di Marzio, W. (2004) *Evaluación de la ecotoxicidad de efluentes industriales y plaguicidas*. Ecotoxicology research program. Basic Sciences Departamento Nacional University of Lujan. 10° Edicion.
- Salazar, L.G. (2010) *Analisis sobre el impacto ambiental del uso de glifosato y sus mezclas (coadyudantes) derivada de las actividades productivas (agrícolas) en Colombia, alternativa de producción mediante la optimización (BPA) y el desarrollo sostenible*. Monografía para obtener el título de Especialista en Ingeniería Ambiental. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química. Especialización en Ingeniería Ambiental. Bucaramanca. España.
- Salman, J.M, y Abdul-Adel, A. (2015) *Potential use of cyanophyta species Oscillatoria limnetica in bioremediation of organophosphorus herbicide Glyphosate*. Mesop. environ. j. 1 (4):15-26.
- Salomon, A.; Abarracion, I. y Pio, G. (2003) *Sensibilidad de Chlorella vulgaris y Scenedesmus quadricauda a la Cipermetrina. Fase preliminar*. Revista Toxicológica en línea. 1-15.
- Sanchez, L.; Garza González, T.; Almaguer Cantú, V.; Sáenz Tavera, I. y Liñan Monte, A. (2008). *Estudio cinético e isotermas de absorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa de alga Chlorella sp. inmovilizada*. Ciencia UANL. 2: 198-177.
- Sanchez, L.C.; Lajmanovich, R.; Peltzer1, P.; Manzano, A.; Junges, C. y Attademo, A.M. (2014) *First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and*

- function in Rhinella fernandezae and Dendropsophus sanborni*(Amphibia: Anura) from Entre Ríos Province, Argentina. *Acta Herpetologica*. 9 (1): 75-88.
- Sanchez-Hernandez, J.C. (2006) *Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 188: 85-126.
- Sandbank, E. y Hopher, B. (1978) *The utilization of microalgae as a feed for fish*. Arch Hydrobiol. 11:86-97.
- Sandifer, P.; Sutton-Grier, A. y Ward, B. (2015) *Exploring connections among nature, biodiversity, ecosystem services, and human health and well-being: Opportunities to enhance health and biodiversity conservation*. Ecosystem Services. 1: 1–15
- Sankar, M. y Ramasubramanian, V. (2012) *Biomass production of commercial algae Chlorella vulgaris on different culture media*. E-Journal of Life Sciences. 1 (1): 56-60.
- Sansawa, H. y Endo, H. (2004) *Production of Intracellular Phytochemicals in Chlorella under Heterotrophic Conditions*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 98, 437-444.
- Santadino, M.; Coviella, C y Momo, F. (2014) *Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm Eisenia fetida (Savigny, 1826)*. Water Air Soil Pollut. 225:2207.
- Santadino, M.; Coviella, C. y Momo, F. (2014) *Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm Eisenia fetida (Savigny, 1826)*. Water Air Soil Pollut. 225:2207.
- Schaaf, A.A. (2013) *Uso de pesticidas y toxicidad: relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina*. Rev Mexicana Cienc. Agrícola. 4:323–331.
- Schwarzenbach, R.; Escher, B.I.; Fenner, K.; Hofstetter, T.B.; Johnson, C.A.; von Gunten, U. y Wehrli, B. (2006). *The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems*. Science. 313 (5790): 1072-1077.
- Scott-Fordsmand, J.J. y Weeks, J.M. (2000). *Biomarkers in Earthworms*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Environmental Contamination and Toxicology. 165: 117-159.
- Scragg, A.H.; Morrison, J. y Shales, S.W. (2003) *The use of a fuel containing Chlorella vulgaris in a diesel engine*. Enzyme Microb Technol 33: 884–889.
- Self Insurance Institute of America (SIIA) (2014). www.siiia.org/national/ Consulta Diciembre 2015.
- Semitsoglou-Tsiapou, S.; Templeton, M.R.; Nigel J.D.; Graham, L.; Hernandez Leal, B.J.; Martijn, A.R. y Kruithof, J.C. (2016) *Low pressure UV/H₂O₂ treatment for the*

- degradation of the pesticides metaldehyde, clopyralid and mecoprop e kinetics and reaction product formation.* Water Research, 91: 285-294.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (2010) *Manual de buenas prácticas agrícolas. Programa Buenas Prácticas Agrícolas.* Buenos Aires. Argentina. p 74.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (2012) *Resolución 302/2012.* Publicado en SENASA (<http://www.senasa.gov.ar>).
- Sharma, R.; Pal Singh, G. y Vijendra, K. (2012) *Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of Chlorella Vulgaris.* J Plant Pathol Microb 3:131.doi: 10.4172/2157-7471.1000131
- Shi, J.; Podola, B. y Melkonian, M. (2007) *Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study.* J. Appl. Phycol. 19 (5): 417–423.
- Shi, X.M.; Zhang, X.W. y Chen, F. (2000) *Heterotrophic production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides on various nitrogen sources.* Enzyme Microb Technol. 27: 312–318.
- Shi, X.M.; Jiang, Y. y Chen, F. (2002) *High-yield production of lutein by the green microalga Chlorella protothecoides in heterotrophic fed-batch culture.* Biotechnol Proc. 18: 723–727.
- Sibly, R.M. y Calow, P. (1989) *A life-cycle theory of responses to stress.* Biol. J. Linn. Soc.37: 101-116.
- Simoniello M.F.; Kleinsorge E.C.; Scagnetti, J.A.; Grigolato, R.A.; Poletta, G.L.y Carballo, M.A. (2008). *DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides mixtures.* J. Appl. Toxicol. 28 (8): 957-965.
- Simoniello M.F.; Kleinsorge E.C.; Scagnetti, J.A.; Mastandrea, C.; Grigolato, A.R.; Paonessa, A.M. y Carballo, M.A. (2010) *Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population.* Biomarkers. 15(1): 52-60.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1969) *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica,* Madrid, España, p. 852.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E. y Isambert, A. (2006) *Commercial Applications of Microalgae.* Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2): 87-96.
- Spurgeon, D.; Svendsen, C.; Kille, P.; Morgan, A. y Weeks, J. (2004) *Responses of earthworms (Lumbricus rubellus) to copper and cadmium as determined by*

- measurement of juvenile traits in a specially designed test system. Ecotoxicology and Environmental Safety. 57: 54–64.*
- Stearns, S. C. (1993) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press. England. pp 249.
- Strickland J.H.D. y Parsons, T.R. (1972) *A practical handbook of seawater analysis*. Bull Fish Res.167:189-190.
- Stringheta, P.C.; Nachtigall, A.M.; Oliveira, T.T.; Ramos, A.M.; Santána, H.M.P. y Goncalves, M.P. (2006) *Luteína: propiedades antioxidantes e beneficios à saúde*. Alim. Nutr. 17: 229-238.
- Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación. República Argentina. (2003) *Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a glifosato*. Buenos Aires, Argentina.
- Thai-Hoang, L.; Eun-Suk, L.; Sung Kyu, L.; Young-Woo, C.; Yang-Hoon, K. y Jiho, M. (2010) *Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in Daphnia magna*. Chemosphere 79 (1): 67–71.
- Tsui, M. T. K. y Chu, L.M. (2003) *Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors*. Chemosphere.52: 1189–1197.
- Tsui, M. T. K. y Chu, L.M. (2004) *Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment pore water exposures*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46: 316–323.
- Tsukada, O. y Kawahara, T. (1997). *Mass culture of Chlorella in Asian countries. Biological Solar Energy Conversion* (Ed. New York: Academic Press). New York, Estados Unidos. p 363–366.
- UN-Water (2015) *United Nation Environmental Programme, Wastewater Management A UN-Water Analytical Brief*. <http://www.unwater.org/> (consultado 30 abril 2015)
- Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (2008). *Evaluación, diagnóstico y propuestas de acción para la mejora de las problemáticas ambientales y mitigación de gases de efecto invernadero vinculados a la producción porcina, avícola y bovina (feedlots y tambos)*. Facultad de Ingeniería. Buenos Aires. Argentina. p 15.
- Universidad Nacional del Litoral (UNL). 2010. *Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato*. Santa Fe, Capital, Argentina. p 78.

- US EPA, 2002. EPA-821-R-02-013. *Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organism*, 4th Ed. Washington, DC, Estados Unidos.
- Utz, R. M.; Hilderbrand, R. H. y Boward, D. M. (2009). *Identifying regional differences in threshold responses of aquatic invertebrates to land cover gradients*. *Ecological Indicators*. 9(3): 556-567.
- Vargas, L.; Cárdenas, F.C.H.; Hernández, M.; Araujo, I.; Yabroudi, S. y López, F. (2004) *Efecto de las microalgas en la remoción de los compuestos nitrogenados presentes en la laguna facultativa de una planta de tratamiento de aguas residuales*. En: Hernández-Reyes, B.M.; Rodríguez-Palacio, M.C.; Lozano-Ramírez, C. y Castilla-Hernández, P.1 (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(1):80-94.
- Varayoud, J.; Durando, M.; Ramos, J.G.; Milesi, M.M.; Ingaramo, P.I.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2016) *Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats*. *Environmental Toxicology*. DOI: 10.1002/tox.22316.
- Vendrell, E.; Ferraz, D.; Gómez de Barreda, D.; Sabater, C y Carrasco, J. M. (2009). *Effect of Glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 538–542.
- Venkateswara Roa, J.; Sutya Pavan, Y. y Madhavendra, S. (2003) *Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 296–301.
- Venrick, E. L., (1978) *How many cells to count?*. En Sournia, A. (ed.), *Phytoplankton manual*. 167–180. UNESCO. Paris.
- Vera, G.; Tam, G. y Pinto, E. (2009) *Ecotoxicological effects of crude oil, diesel 2 and kerosene on the population growth of the microalgae Chaetoceros gracilis Schutt*. *Ecología Aplicada*. 8: 1-7.
- Vera, M. S.; Lagomarsino, L.; Sylvester, M.; Pérez, G.; Rodríguez, P.; Mugni, H.; Sinistro R.; Ferraro, M.; Bonetto, C.; Zagarese, H. y Pizarro, H. (2010) *New Evidences of Roundup (Glyphosate Formulation) Impact on the Periphyton and the Water Quality of Freshwater Ecosystems*. *Ecotoxicology*, 19: 710–721.
- Vera, M. S. (2011) *Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

- Vicari, María P. (2012) *Efluentes en producción porcina en Argentina: generación, impacto ambiental y posibles tratamientos*. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efluentesproduccion-porcina-argentina.pdf> [Fecha de consulta: 15 de junio de 2013]
- Vincent, K. y Davidson, C. (2015) *The toxicity of glyphosate alone and glyphosate-surfactant mixtures to western toad (*Anaxyrus boreas*) tadpoles*. *Environ Toxicol Chem.* 34 (12): 2791-2795.
- Von Döhrena, P. y Haase, D. (2015). *Review Ecosystem disservices research: A review of the state of the art with a focus on cities*. *Ecological Indicators.* 52: 490–497.
- Wang, L.; Li, Y.; Chen, P.; Min, M.; Chen, Y.; Zhu, J. y Ruan, R. (2010). *Anaerobic digested dairy manure as a nutrientsupplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp.* *Bioresource Technology.* 101: 2623-2628.
- Woertz, I.C.; Lundquist, T.J.; Feffer, A.S. y Nelson, Y.M. (2009) *Lipid productivity of algae grown during treatment of dairy and municipal wastewaters*. *J. Environ. Eng.* 135 (11): 1115–1122.
- Wong, P. (2000) *Effect of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614*. *Chemosphere* 41:177–182.
- Wong, P.T.S., y Dixon, D.G. (1995) *Bioassessment of water quality*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10:9-17.
- Wu, R. S. S. (1999). *Eutrophication, Water Borne Pathogens and Xenobiotic Compounds: Environmental Risks and Challenges*. *Marine Pollution Bulletin.* 39: 11-22.
- Zalizniak, L. (2006) *The effects of selected agricultural chemicals on freshwater microalgae and cladocerans in laboratory studies, with particular emphasis on hormesis*. PhD Thesis, RMIT University.
- Zhang, C.; Su, H.; Baeyens, J. y Tan, T. (2014) *Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* 38: 383-392.
- Zhengyun, W. y Xianming, S. (2006) *Optimization for hig-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* base don a hybrid neural network model*. *Letters in applied Microbiology.* 44: 1-13.

Anexo I

Hojas de seguridad de las formulaciones empleadas en esta tesis

HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD: ESKOBA 48% SL

1. Identificación del Producto y del Fabricante.
 - 1.1. Producto. **ESKOBA 48% SL**
 - 1.2. Fabricante. **RED SURCOS S.A.** – Formulador. **PROCHEM BIO S.A.**
 - 1.3. Nombre químico. GLIFOSATO al 48 % p/v
 - 1.4. CAS No.1071-83-6
 - 1.5. Peso molecular.166,07
 - 1.6. Uso. HERBICIDA
2. Clasificación de riesgos.
 - 2.1. Inflamabilidad. NO INFLAMABLE
 - 2.2. Clasificación toxicológica. Producto ligeramente peligroso (clase III)
3. Propiedades físicas y químicas.
 - 3.1. Aspecto físico
 - 3.1.1. Color. AMARILLO.
 - 3.1.2. Olor. No presenta olor característico.
 - 3.2. Presión de vapor. 2.1×10^{-3} mPa.
 - 3.3. Punto de fusión. NO DISPONIBLE.
 - 3.4. Punto de ebullición. > 98 °C
 - 3.5. Solubilidad en agua a 20°C. 1050 g/L (25°C, pH 4.3)
 - 3.6. Temperatura de descomposición. 98 °C
4. Primeros auxilios.
 - 4.1. Inhalación. Si una persona fue expuesta en forma excesiva a este producto, trasladarla a un área no contaminada y con aire fresco. Aplicar respiración artificial si es necesario. DAR ATENCION MEDICA INMEDIATAMENTE.
 - 4.2. Piel. Lavar las partes del cuerpo en contacto con abundante agua limpia y jabón.
 - 4.3. Ojos. Mantener los párpados abiertos y enjuagar con abundante agua limpia por 15 minutos. No aplicar medicamento excepto que sea recetado por un médico oftalmólogo.
 - 4.4. Ingestión. Llevar al paciente inmediatamente al médico, para su atención para que sea éste el que indique el tratamiento a seguir o el suministro del antídoto correspondiente. Nunca suministrar nada por la boca a una persona que se encuentre inconsciente.
5. Medidas contra el fuego.
 - 5.1. Medios de extinción.

Polvo químico, espuma, CO₂ o cualquier agente extinguidor clase B.
 - 5.2. Procedimientos de lucha específicos.

Procedimientos especiales para combatir incendios: las personas encargadas de la extinción del fuego deberán protegerse de los gases del producto en combustión con un aparato respirador. El equipo deberá ser meticulosamente lavado después de su uso.

Peligro inusual de fuego o explosión: ninguno.
6. Manipuleo y almacenamiento.
 - 6.1. Medidas de precaución personal.

- No permitir el ingreso del producto en ojos o contaminar ropa.
Evitar aspirar vapores del producto.
Lavar manos antes de comer, beber, mascar chicle, fumar o usar el baño.
Quitar ropa inmediatamente si es contaminada con el pesticida. Luego lavarla cuidadosamente antes de volver a usar.
No aplicar directamente con agua, en áreas donde halla alcantarillas o pueda ingresar en redes de agua.
No contaminar agua, cuando proceda a desechar o lavar equipos.
- 6.2. Almacenamiento. No contaminar agua, alimentos, forraje o semillas por almacenamiento o desecho.
7. Estabilidad y reactividad.
7.1. Estabilidad. PRODUCTO ESTABLE, mantenido en CNPT
7.2. Reactividad. CORROE HIERRO Y COBRE.
8. Información toxicológica.
8.1. Inhalación. Clase III (CUIDADO)
8.2. Ojos. Leve irritante ocular. Categoría IV (CUIDADO)
8.3. Piel. No irrita la piel.
8.4. Ingestión. Producto ligeramente peligroso (clase III)
8.5. Toxicidad aguda.
8.5.1. Oral DL 50. > 3.000 mg/kg.
8.5.2. Dermal DL 50. > 4.000 mg/kg.
8.5.3. Inhalación CL 50. > 17,8 mg/L de aire.
8.5.4. Irritación de la piel. NO IRRITANTE DERMAL
8.5.5. Sensibilización de la piel. NO PROVOCA SENSIBILIZACION CUTÁNEA.
8.5.6. Irritación para los ojos. LEVE IRRITANTE..
- 8.6. Toxicidad subaguda. NO CORRESPONDE.
8.7. Toxicidad crónica. NO CORRESPONDE.
8.8. Mutagénesis. NO MUTAGENICO.
9. Información ecotoxicológica.
9.1. Efectos agudos sobre organismos de agua y peces.
CL₅₀ (96 hrs.): > 100 mg / L. - PRÁCTICAMENTE NO TÓXICO para PECES.
9.2. Toxicidad para aves. > 2.000 mg/kg. - PRÁCTICAMENTE NO TOXICO para AVES.
9.3. Toxicidad para abejas. >100 mgr./abeja-VIRTUALMENTE NO TOXICO PARA ABEJAS.
9.4. Persistencia en suelo. NO DISPONIBLE.
9.5. Efecto de control. NO CORRESPONDE.
10. Acciones de emergencia.
10.1. Derrames.
La descontaminación por derramamientos abarca los siguientes procedimientos y tratamientos:
Derrames en suelos: extraiga el material derramado por absorción con suelo seco, arenas, o barreras de polvos absorbentes como poliuretanos o cemento.
Derrames grandes: aislar el área y rodear la superficie usando un material absorbente o impermeable tal como arena o arcilla. Recubrir y contener todo el líquido que sea posible. Levantar el producto cuidadosamente. Recubrir el material remanente derramado y luego barrer cuidadosamente el producto absorbente con el líquido contaminante.

Derrames pequeños: absorber con arena o vermiculita. Lavar el área en cuestión con abundante agua y algún material de limpieza, preferentemente detergente concentrado. No dejar el ingreso de producto en alcantarillas. Vestir ropa apropiada para manipular el material durante el proceso de limpieza. Descontaminar los elementos de limpieza.

10.2. Fuego. NO CORRESPONDE, es formulado a base de agua.

10.3. Disposición final.

DISPONER EN UN BASURAL, HABILITADO AL EFECTO POR LAS AUTORIDADES COMPETENTES, ENTERRARLOS PROFUNDAMENTE EN UN LUGAR SEGURO DE LOS SUMINISTROS DE AGUA.

11. Información para el transporte.

Transportar solamente el producto en su envase herméticamente cerrado y debidamente etiquetado, lejos de la luz, de agentes oxidantes y ácidos y de la humedad. No transportar con alimentos u otros productos destinados al consumo humano o animal.

11.1. Transporte Terrestre (Mercosur/Argentina Res ST 195/97):

Plaguicidas, líquidos, tóxicos, n.e.p. (GLIFOSATO)

N° ONU/NU: 2902

Clase de riesgo principal: 6.1.

Grupo de embalaje: III

Etiqueta de riesgo: Sustancias Tóxicas

Número de riesgo: 60



Etiquetado adicional: Líquido. Veneno. No explosivo.

11.2. Aéreo (OACI/IATA-DGR):

Denominación apropiada para el Transporte:

Plaguicidas, líquidos, tóxicos, n.e.p. (GLIFOSATO)

N° ONU/NU: 2902

Clase de riesgo principal: 6.1.

Grupo de embalaje: III

Etiqueta de Riesgo: Sustancias Tóxicas



Etiqueta adicional: Líquido. Veneno. No explosivo.

11.3. Marítimo (OMI-IMDG):

Plaguicidas, líquidos, tóxicos, n.e.p. (GLIFOSATO)

N° ONU/NU: 2902

Clase de riesgo principal: 6.1.

Grupo de embalaje: III

Etiqueta de Riesgo: Sustancias Tóxicas

Etiqueta adicional: Líquido. Veneno. No explosivo.

Contaminante marino: Si.



Hoja de Seguridad de Producto



Panzer* Gold herbicida

Dow AgroSciences Argentina S.A.

Av. E. Madero 900, 5º Piso
(C1106ACV) Buenos Aires, Argentina
Tel: (011) 4319-0100 Emergencias: (03476) 43-8600

Categoría toxicológica: Clase IV

1. IDENTIFICACION DEL PRODUCTO:

NOMBRE DEL PRODUCTO: Panzer* Gold

DIRECCIONES / Teléfonos de las empresas:

Dow AgroSciences Argentina S.A.
Oficina Comercial:
Av. L. N. Alem 855, 12º
(C1001AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Tel : (011) 4510-8600 / Fax: (011) 4510-8652

Dow AgroSciences Bolivia S.A.

Calle 7 Oeste N° 11 – Equipetrol
Santa Cruz de la Sierra, Bolivia
(03) 333-2024 / 2034 - Fax: (03) 335-1985

Dow AgroSciences Chile S.A.

Av. A. Vespuccio 100, Piso 6º, Santiago, Chile
(02) 440-4800

Dow AgroSciences Paraguay S.A.

Av. San Martín 1451 – Asunción, Paraguay
(021) 60-4140 / 3733 / 8583 / 61-3412 / 3413

Dow AgroSciences Uruguay S.A.

Distribuido por **Rutilan S.A.**
Gral. Fariás 2781 – Montevideo, Uruguay
(02) 200-5899 / 5103

2. COMPOSICION E INFORMACION SOBRE INGREDIENTES:

glifosato:
sal dimetilamina de N-fosfonometil glicina 60,8 g
N° CAS: 34494-04-7
Inertes y coadyuvantes c.s.p..... 100 cm³

equivalente ácido glifosato 48,0 g

3. IDENTIFICACION DE RIESGOS

INFORMACION GENERAL DE EMERGENCIA

APARIENCIA FISICA: Líquido amarillo.

INFORMACION QUIMICA RELACIONADA CON RIESGOS PARA LA SALUD Y EL AMBIENTE:

Salud: Puede tener acción por contacto, ingestión e inhalación.

Inflamabilidad: No inflamable.

Reactividad: Evitar el contacto con ácidos, bases y materiales oxidantes fuertes. (ver el punto 10).

TELEFONOS DE EMERGENCIA

Argentina: (03476) 438-600 - (011) 4510-8600

Bolivia: (03) 333-2024 / 2034

Chile: (02) 440-4800

Paraguay: (021) 60-4140 / 3733

Uruguay: (02) 200-5899

EFECTOS POTENCIALES PARA LA SALUD: Esta sección describe posibles efectos adversos en caso de que el producto no sea utilizado correctamente.

- ⇒ **OJOS:** Puede causar irritación moderada.
- ⇒ **PIEL: Contacto:** Levemente irritante. Moderado sensibilizante dermal en animales de laboratorio. Contactos prolongados o repetidos pueden causar irritación. **Absorción:** Es poco probable que el material sea absorbido en cantidades nocivas a partir de un solo contacto prolongado con la piel.
- ⇒ **INGESTION:** Baja toxicidad. Pequeñas cantidades ingeridas accidentalmente durante el manipuleo, no es probable que causen daño.
- ⇒ **INHALACION:** No se esperan efectos adversos por esta vía durante el uso normal. Sin embargo, es conveniente evitar la exposición a los vapores del producto durante la preparación.

4. PRIMEROS AUXILIOS

En cualquier caso conseguir ayuda médica.

En caso de intoxicación, llevar a la persona afectada a un lugar ventilado y llamar a un médico, o trasladarla a un servicio de emergencia llevando el envase o la etiqueta del producto. Quien realice los primeros auxilios debe evitar tomar contacto directo con el producto.

- ⇒ **OJOS:** Lavar con abundante agua corriente inmediata y continuamente durante 15 minutos. Consultar al médico.
- ⇒ **PIEL:** Quitar las ropas y el calzado contaminado. Lavar inmediatamente la piel con abundante agua corriente y jabón, durante 15 minutos como mínimo. Si la irritación persiste, llamar al médico. Lavar las ropas contaminadas antes de reutilizarlas.

Hoja de Seguridad de Producto

Dow AgroSciences Argentina S.A.

Av. E. Madero 900, 5° Piso

(C1106ACV) Buenos Aires, Argentina

Tel: (011) 4319-0100

Emergencias: (03476) 43-8600

herbicida Panzer* Gold

Categoría toxicológica: Clase IV

- ⇒ **INGESTION:** No inducir al vómito. Si la persona está lúcida, personal entrenado debe realizar lavaje gástrico y catarsis. Llamar al médico y/o transportar a la persona afectada a un servicio de emergencias. Llevar el envase o la etiqueta del producto.
- ⇒ **INHALACION:** Retirar del área a la persona accidentada y exponer al aire fresco. Si la respiración es dificultosa, dar oxígeno. Si no respira, realizar respiración artificial. Mantener a la persona afectada en reposo y abrigada. Consultar al médico y/o transportar al accidentado a un servicio de emergencias. Llevar el envase o la etiqueta del producto.

NOTA PARA EL MEDICO:

- ⇒ La decisión de inducir al vómito, o no, debe ser tomada por el médico. Nunca suministrar nada por boca a una persona inconsciente.
- ⇒ **ANTIDOTO / tratamiento:**
No hay antídoto específico. Proveer tratamiento de soporte basado en el criterio del médico en respuesta a las reacciones del paciente.

Servicios de atención toxicológica en caso de intoxicación con el producto:

Argentina

TAS (Servicio de emergencias toxicológicas, atención las 24 hs): (0341) 448-0077 / 424-2727

Bolivia

Hospital Japonés - Av. Japón e/ Paragua y Conavi, 3° anillo externo Sta. Cruz (03) 348-9996

Chile

CITUC (Centro de intoxicaciones toxicológicas, Universidad Católica) (02) 635-3800

Paraguay

Emergencias médicas Dr. Luis María Argaña
Av. Gral Santos y Azara Asunción (021) 22-0418

Uruguay

C.I.A.T. Htal de Clínicas, 7°, Montevideo (02) 1722.

5. DATOS PARA EXTINCION DE INCENDIOS

- ⇒ **PROPIEDADES DE INFLAMABILIDAD:** Producto no inflamable
- ⇒ **EXPLOSIVIDAD:** No explosivo.
- ⇒ **RIESGO DE FUEGO Y EXPLOSION:** En condiciones de incendio, se generan humos que pueden contener el material original junto a compuestos tóxicos e irritantes no identificados.

⇒ **MEDIOS DE EXTINCION:** Espuma química, polvos químicos secos, dióxido de carbono y neblina de agua para enfriar los envases involucrados. Los sistemas de espuma son los preferidos, ya que el agua en grandes cantidades puede aumentar el área afectada.

⇒ **EQUIPO CONTRA INCENDIOS:** Utilizar ropa protectora adecuada y equipos de aire autónomos, con presión positiva.

6. DATOS PARA CASOS DE ACCIDENTES:

En caso de accidentes que lleven asociado un derrame del producto, proceder según se indica en: **DERRAMES Y/O PERDIDAS.** Si el accidente se produjera en la vía pública, mantenerse contra el viento, aislar el área y no permitir el ingreso de público al sector. Dar aviso al fabricante. Los envases que pierden, deben ser separados de los que no pierden y su contenido transferido a un tambor u otro tipo de envase o contenedor. Utilizar equipo de protección personal (anteojos, guantes, botas de goma).

⇒ **PROTECCION DE LAS PERSONAS:** EVITAR EL CONTACTO CON LOS OJOS, PIEL O ROPAS. LAVAR LAS PARTES DEL CUERPO EXPUESTAS.

⇒ **PROTECCION DEL MEDIO AMBIENTE:**
Evitar la llegada de producto a cursos de agua.

⇒ **DERRAMES Y/O PERDIDAS:**
Pequeños derrames: Contener el derrame por medio de diques para evitar la dispersión de producto y el ingreso a pozos de agua, acequias, canales o canaletas. Absorber con material inerte (arena, aserrín o tierra) y recoger en tambores o bolsas plásticas. Grandes derrames: Contener el derrame por medio de diques. Mantenerse contra el viento, aislar el área y mantener al público alejado. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropas. Prevenir la contaminación de cursos de agua o desagües. Hacer diques en el área afectada y bombear a recipientes adecuados (tambores). Utilizar material absorbente (arena o tierra) para recoger la pérdida y colocarlo en recipientes adecuados. Si fuera necesario, contactar al fabricante. Descontaminar el piso como se indica a continuación.

⇒ **PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA:** Lavar con solución de agua lavandina al 5 % y enjuagar con agua.

7. MANIPULEO Y ALMACENAJE:

Hoja de Seguridad de Producto

Dow AgroSciences Argentina S.A.

Av. E. Madero 900, 5° Piso

(C1106ACV) Buenos Aires, Argentina

Tel: (011) 4319-0100

Emergencias: (03476) 43-8600

herbicida Panzer* Gold

Categoría toxicológica: Clase IV

- ⇒ **MANIPULEO:** Leer la etiqueta. No almacenar ni transportar con alimentos, medicamentos o vestimenta. Mantener alejado del alcance de los niños y de los animales. Prever la provisión de agua en el área de trabajo. No comer, beber o fumar durante el manipuleo y/o uso del producto. Manipular el producto en áreas bien ventiladas. Utilizar los elementos de protección personal (guantes, barbijo, máscara, delantal). Cuando se manipulen tambores usar zapatos de seguridad. Evitar el contacto con ojos, piel y ropas. Evitar aspirar vapores o nieblas. Adoptar las buenas prácticas de higiene personal. Lavarse cuidadosamente con agua y jabón después del manipuleo del producto. Lavar la ropa después de usada separadamente de otras vestimentas.
- ⇒ **ALMACENAJE:** Almacenar en lugar fresco, seco, con buena ventilación y cerrado con candado. Mantener lejos del alcance de los niños y personas inexpertas. No almacenar junto con alimentos, medicamentos, vestimentas, insecticidas o fungicidas. Evitar el contacto directo con la luz solar, fuentes de calor y agentes oxidantes. Emplear envases claramente identificados y cerrados. No reutilizar los recipientes vacíos.

8. PROTECCION PERSONAL Y LIMITES DE EXPOSICION

Estas precauciones se sugieren para situaciones con un alto potencial de exposición. Si los procedimientos de manipuleo son tales que el potencial de exposición es bajo, se puede requerir menor protección. Las condiciones de emergencia pueden requerir precauciones adicionales.

- ⇒ **GUIAS DE EXPOSICION:**
No establecidas
- ⇒ **TÉCNICA DE CONTROL**
Proveer condiciones de ventilación adecuada. Para algunas operaciones puede ser necesario un sistema de extracción localizada.
- ⇒ **RECOMENDACIONES PARA FABRICANTES, OPERARIOS DE EMPAQUE Y DISTRIBUIDORES COMERCIALES:**
- PROTECCION FACIAL Y/O DE LOS OJOS:**
Utilizar antiparras para productos químicos. Cuando la exposición a los vapores cause molestias, utilizar un respirador / máscara de cara completa.
- PROTECCION DE LA PIEL:** Para exposiciones breves, no hay otras precauciones que el uso de ropa limpia. Cuando la exposición sea prolongada

o repetida frecuentemente, al manipular este producto, utilizar ropa impermeable. El uso de otros elementos específicos como guantes, botas u overoles, dependerá de la operación a ejecutar. Siempre lavar las ropas de trabajo y los elementos de protección personal por separado de las ropas de uso en el hogar. Ver la etiqueta del producto para instrucciones adicionales.

PROTECCION RESPIRATORIA: Cuando los límites de exposición y/o el nivel de confort lo requieran, utilizar máscara (semi o de cara completa).

- ⇒ **AVISO A APLICADORES Y OPERARIOS INVOLUCRADOS:** Leer en la etiqueta del producto las instrucciones sobre ropa protectora y equipos a utilizar.

9. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

- ⇒ **APARIENCIA Y COLOR:** Líquido amarillo.
- ⇒ **ESTADO FISICO:** Líquido concentrado soluble.
- ⇒ **OLOR:** a cera.
- ⇒ **DENSIDAD RELATIVA:** 1,2114 g/cm³ (a 20°C)
- ⇒ **ACIDEZ / ALCALINIDAD – pH =** 4.59 (a 23.4°C)
- ⇒ **PRESION DE VAPOR:** No aplicable para el uso final del producto.
- ⇒ **SOLUBILIDAD EN AGUA:** Total.
- ⇒ **PUNTO DE EBULLICION:** > a 100°C.
- ⇒ **CORROSIVIDAD:**
Acero inoxidable 304: no corrosivo.
Aluminio 1100: no corrosivo.
Hierro 1020: levemente corrosivo (0.014 mm/año).
Latón 465: levemente corrosivo (0.016 mm/año).
Plástico (HDPE): Leve absorción (0.08 mm/año).
- ⇒ **VISCOSIDAD:** 62.3 mPa's (a 20°C).
32.5 mPa's (a 20°C).

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD QUIMICA:

- ⇒ **ESTABILIDAD QUIMICA:** Estable bajo condiciones normales de almacenamiento. Evitar temperaturas extremas..
- ⇒ **INCOMPATIBILIDAD CON OTROS PRODUCTOS:** Evitar el contacto con ácidos, bases y materiales oxidantes. Consultar con el fabricante para casos específicos.
- ⇒ **PRODUCTOS PELIGROSOS POR DESCOMPOSICION:** Durante un incendio el humo puede contener el producto u otros compuestos tóxicos o irritantes no identificados.

Hoja de Seguridad de Producto

Dow AgroSciences Argentina S.A.

Av. E. Madero 900, 5° Piso
(C1106ACV) Buenos Aires, Argentina

Tel: (011) 4319-0100 Emergencias: (03476) 43-8600

herbicida Panzer* Gold

Categoría toxicológica: Clase IV

⇒ **PELIGRO DE POLIMERIZACION:** No se espera que ocurra.

11. INFORMACION TOXICOLOGICA

⇒ **OJOS:** Puede causar irritación moderada con enrojecimiento de la conjuntiva.

⇒ **PIEL:** **Contacto:** Levemente irritante. Moderado sensibilizante dermal en animales de laboratorio. Contactos prolongados o repetidos pueden causar irritación. **Absorción:** Es poco probable que el material sea absorbido en cantidades nocivas a partir de un solo contacto prolongado con la piel. **Toxicidad dermal aguda para mamíferos:** DL50 dermal aguda (rata) > 5000 mg/kg.

⇒ **INGESTION:** Baja toxicidad. Pequeñas cantidades ingeridas accidentalmente durante el manipuleo, no es probable que causen daño. **Toxicidad oral aguda para mamíferos:** DL50 oral aguda (rata) > 5000 mg/kg

⇒ **INHALACION:** No se esperan efectos adversos por esta vía durante el uso normal. Sin embargo, es conveniente evitar la exposición a los vapores del producto. **Toxicidad inhalatoria** CL50 (rata) > 5.63 mg/lt

12. INFORMACION RELACIONADA AL MEDIO AMBIENTE

⇒ **ECOTOXICOLOGÍA:** Organismos de agua y peces. Moderadamente tóxico. CL 50 (Zebra fish) 96 horas = 8.84 mg/l.

Aves: Ligeramente tóxico.
DL50 oral aguda (codorniz) > 1853 mg/kg

Abejas: Ligeramente tóxico.
DL50 oral (48 horas) No disponibles.
DL50 contacto (48 horas) > 78.8 µg/abeja

Persistencia en el suelo: adhiere a las partículas del suelo, extremadamente resistente a la lixiviación. La principal vía de degradación es microbiana. La vida media, dependiendo del tipo de suelo y condiciones, es de aproximadamente 60 días.

13. CONSIDERACIONES PARA DESCARTE

⇒ **METODO DE DESCARTE:** Para destruir restos de producto, seguir las regulaciones vigentes para

disposición final de residuos. Se recomienda la incineración controlada en sitios autorizados (2.5 segundos a 1000 °C).

⇒ **MANEJO Y ELIMINACIÓN DE ENVASES:** Durante las operaciones de limpieza y descarte de envases (incluida la limpieza de equipos), no contaminar alimentos, forraje o agua.

Los envases vacíos deben enjuagarse tres veces con agua para extraer y utilizar todo el producto contenido en los mismos. Esta operación, conocida como TRIPLE LAVADO, se debe realizar en el momento en que se está preparando la mezcla, al terminar el contenido del envase. El agua de lavado debe ser volcada en el tanque de la pulverizadora para su aplicación en el lote objeto del tratamiento. Luego, inutilizar los envases para evitar su uso con otro destino, y enviar a sitios autorizados para su incineración.

14. INFORMACION PARA TRANSPORTE

⇒ **TRANSPORTE:** NO TRANSPORTAR ESTE PRODUCTO CON ALIMENTOS, MEDICAMENTOS O VESTIMENTA.

⇒ **CODIGO DE TRANSPORTE POR CARRETERA PARA ARGENTINA:**
Clase: 9
N° N.U.: 3082
Grupo de embalaje: III
Ficha N°: 171

⇒ **CODIGO DE TRANSPORTE POR MAR (IMO):**
Clase: 9
N° N.U.: 3082
Grupo de embalaje: III

⇒ **CODIGO DE TRANSPORTE POR AIRE (IATA):**
Clase: 9
N° N.U.: 3082
Grupo de embalaje: III

Nombre apropiado del embarque:
SUSTANCIAS PELIGROSAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, LIQUIDAS, N.E.O.M/ 9 /UN3082/III

15. INFORMACION SOBRE LEGISLACION

No aplicable

16. INFORMACION ADICIONAL

NOTA: La información aquí contenida es meramente orientadora, presentada de buena fe, sin incurrir en responsabilidades explícitas o

Hoja de Seguridad de Producto

Dow AgroSciences Argentina S.A.

Av. E. Madero 900, 5° Piso

(C1106ACV) Buenos Aires, Argentina

Tel: (011) 4319-0100 Emergencias: (03476) 43-8600

herbicida Panzer* Gold

Categoría toxicológica: Clase IV

implícitas. En caso de necesidad de aclaraciones o
informaciones adicionales, consultar al fabricante.

17. REVISIONES DE ESTE DOCUMENTO

- ⇒ **FECHA:** Dic 06 (S. Krick)
- ⇒ **RESPONSABLES:** M. von Proschek/ R. Gueli
- ⇒ **DOCUMENTO BASE:**
 - Información presentada a SENASA para Registro
- ⇒ **FECHA EFECTIVA:** 01/12/2006
- ⇒ **Se agregó información países.**
Fecha: 10 de abril de 2007.
- ⇒ **Se actualiza Info de sección 14.**
David Romanello / M. von Proschek. 20/06/07

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DEL FABRICANTE.

EN CASO DE EMERGENCIAS
CENTRO TOXICOLÓGICO TAS (24hs)
+54 341-448-0077/424-2727
Y/O 0800-888-TOXI(8694)
SYNGENTA (24hs) +54 11 4561-6000
/+54 11 4561-7000

| | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 Nombre de Producto | SULFOSATO TOUCHDOWN® |
| 1.2 Fabricante | Syngenta Chemicals B.V., Belgica. Rue de Tyberchamps 37, Seneffe (B-71800). / Syngenta Protecao de Cultivos Ltda., Brasil. Rodovia 332, km 130 (13140-000); Paulinia / Chemotécnica S.A. / Síntesis Qca SAIC, Argentina. González y Aragón N° 207 (esquina Marconi) Ruta 205, Km 43,5. B1812EIE, Carlos Spegazzini Pcia. de Buenos Aires / Altura Km 268 - Ruta Provincial N°21 - zona Rural (CP 2126) - Fighiera - Pcia. de Santa Fe |
| 1.3 Nombres Químicos | glifosato: 62%p/v sal potásica del ácido-[N-(fosfonometil) glicina] |
| 1.4 CAS N° | glifosato: 81591-81-3 |
| 1.5 Peso Molecular | No disponible |
| 1.6 Uso | Herbicida |

2. CLASIFICACIÓN DE RIESGOS.

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 2.1 Inflamabilidad | No inflamable |
| 2.2 Clasificación toxicológica | Producto que normalmente no ofrece peligro. Clase IV |

3. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

| | |
|------------------------------------------|-----------------------------------|
| 3.1 Aspecto Físico | Líquido. Concentrado soluble (SL) |
| 3.1.1. Color | Amarillo transparente |
| 3.1.2. Olor | No característico |
| 3.2 Presión de Vapor | No disponible |
| 3.4 Punto de fusión | No disponible |
| 3.5 Punto de Ebullición | No disponible |
| 3.6 Solubilidad en agua | No disponible |
| 3.7 Temperatura de descomposición | No disponible |
| 3.8 pH | No disponible |
| 3.9 Densidad | No disponible |

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

4. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Recomendación General | Tener a mano el envase del producto, etiqueta u Hoja de Información de Seguridad del material cuando llame al número de teléfono de emergencias de Syngenta, o al centro de control de intoxicación o al médico, o cuando esté yendo a un tratamiento. |
| 4.1 Inhalación | Trasladar al paciente al aire libre. Dar atención médica inmediata si hay actividad respiratoria anormal. Mantener al paciente abrigado y en reposo. |
| 4.2 Contacto con la piel | Quitar inmediatamente la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona expuesta con abundante agua y jabón. |
| 4.3 Contacto con los ojos | Lavar los ojos separando los párpados con los dedos con abundante agua durante 15 minutos como mínimo. Dar atención médica inmediata. |
| 4.4 Ingestión | No provocar el vomito y dar a beber abundante agua limpia. Proporcionar atención medica de inmediato. Solamente el médico determinara la conveniencia de inducir el vomito o realizar un lavaje estomacal. |
| Instrucciones para el médico | No se conoce antídoto específico. Aplicar terapia sintomática. Los síntomas de una ingestión pueden ser salivación abundante y vómitos. Si la cantidad ingerida ha sido considerable, realizar lavaje estomacal. |

5. MEDIDAS PARA COMBATIR INCENDIOS

| | |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.1 Medios de extinción | En caso de incendio, utilizar agente extinguidor: polvo, espuma resistente al alcohol, dióxido de carbono o agua en forma de spray. No utilizar un chorro compacto de agua ya que podría esparcirse y extender el fuego. Utilizar ropa protectora adecuada y máscara de oxígeno. Evacuar el área afectada. Durante el incendio pueden generarse gases tóxicos e irritantes por la descomposición térmica o combustión. Puede provocarse humo negro debido a que el producto contiene componentes combustibles orgánicos. Evitar el ingreso al área afectada hasta que la misma sea descontaminada. No permitir que el fuego se propague y entre a los desagües o conductos de agua. Contener y recoger el derrame con un material absorbente no combustible, (por ejemplo, arena, tierra, tierra de diatomea, vermiculita) y almacenar en un envase para disposición de acuerdo con las normativas locales / nacionales. |
| 5.2 Procedimientos de lucha específicos | Los productos de combustión son tóxicos y/o irritantes. Deben tomarse medidas para evitar la filtración al suelo o la dispersión incontrolada del agente extintor contaminado. En un incendio debe usarse un equipo de respiración autónomo y vestimenta protectora adecuada. Aislar el área afectada. No habilitar hasta la descontaminación del lugar. |

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

6. MANIPULEO Y ALMACENAMIENTO

- 6.1 Medidas de Precaución Personal** Leer atentamente la etiqueta antes de utilizar el producto. No almacenar ni transportar con alimentos, medicamentos o vestimenta. Mantener alejado del alcance de los niños, personas inexpertas y animales. Prever la provisión de agua en el área de trabajo. No comer, beber o fumar durante el manipuleo y/o uso del producto. Usar guantes y protección para el cuerpo.
- 6.2 Almacenamiento** Almacenar en su envase original, bien cerrado, claramente identificado y lejos de alimentos humanos y forrajes. Mantener fuera del alcance de niños, personas inexpertas y animales domésticos. Guardar en un lugar cerrado con llave. Evitar el contacto directo con la luz solar, fuentes de calor y agentes oxidantes. Evitar temperaturas bajo 0°C y sobre 35° C.

7. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- 7.1 Estabilidad** Estable en condiciones normales de manipuleo y almacenamiento.
- 7.2 Reactividad** Este producto puede formar gas inflamable y explosivo en caso de entrar en contacto con acero. Durante un incendio se pueden producir vapores tóxicos e irritantes.

8. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- 8.1 Inhalación** Trasladar al paciente al aire libre. Realizar respiración artificial en caso de necesidad. Dar atención médica inmediata si hay actividad respiratoria anormal.
- 8.2 Ojos** Lavar los ojos separando los párpados con los dedos con abundante agua durante 15 minutos como mínimo. No intentar neutralizar la contaminación con productos químicos. Dar atención médica inmediata.
- 8.3 Piel** Quitar inmediatamente la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona expuesta, y la ropa que hubiese tomado contacto con el producto, con abundante agua y jabón. Dar atención médica si la piel está irritada.
- 8.4 Ingestión** No inducir el vómito. Beber y enjuagar la boca con abundante agua limpia. No administrar nada por vía oral a una persona inconsciente. Dar atención médica de inmediato.
- 8.5 Toxicidad aguda**
- 8.5.1 Oral DL 50** LD₅₀ >5000 mg/kg peso corporal (ratas)
 - 8.5.1 Dermal DL 50** LD₅₀ >5000 mg/kg peso corporal (conejos)
 - 8.5.3 Inhalación CL 50** LC₅₀ >5,08 mg/l
 - 8.5.4 Irritación de la piel** No irritante
 - 8.5.5 Sensibilización de la piel** Ligero sensibilizante

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

6. MANIPULEO Y ALMACENAMIENTO

6.1 Medidas de Precaución Personal Leer atentamente la etiqueta antes de utilizar el producto. No almacenar ni transportar con alimentos, medicamentos o vestimenta. Mantener alejado del alcance de los niños, personas inexpertas y animales. Prever la provisión de agua en el área de trabajo. No comer, beber o fumar durante el manipuleo y/o uso del producto. Usar guantes y protección para el cuerpo.

6.2 Almacenamiento Almacenar en su envase original, bien cerrado, claramente identificado y lejos de alimentos humanos y forrajes. Mantener fuera del alcance de niños, personas inexpertas y animales domésticos. Guardar en un lugar cerrado con llave. Evitar el contacto directo con la luz solar, fuentes de calor y agentes oxidantes. Evitar temperaturas bajo 0°C y sobre 35° C.

7. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

7.1 Estabilidad Estable en condiciones normales de manipuleo y almacenamiento.

7.2 Reactividad Este producto puede formar gas inflamable y explosivo en caso de entrar en contacto con acero. Durante un incendio se pueden producir vapores tóxicos e irritantes.

8. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

8.1 Inhalación Trasladar al paciente al aire libre. Realizar respiración artificial en caso de necesidad. Dar atención médica inmediata si hay actividad respiratoria anormal.

8.2 Ojos Lavar los ojos separando los párpados con los dedos con abundante agua durante 15 minutos como mínimo. No intentar neutralizar la contaminación con productos químicos. Dar atención médica inmediata.

8.3 Piel Quitar inmediatamente la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona expuesta, y la ropa que hubiese tomado contacto con el producto, con abundante agua y jabón. Dar atención médica si la piel está irritada.

8.4 Ingestión No inducir el vómito. Beber y enjuagar la boca con abundante agua limpia. No administrar nada por vía oral a una persona inconsciente. Dar atención médica de inmediato.

8.5 Toxicidad aguda

8.5.1 Oral DL 50 LD₅₀ >5000 mg/kg peso corporal (ratas)

8.5.1 Dermal DL 50 LD₅₀ >5000 mg/kg peso corporal (conejos)

8.5.3 Inhalación CL 50 LC₅₀ >5,08 mg/l

8.5.4 Irritación de la piel No irritante

8.5.5 Sensibilización de la piel Ligero sensibilizante

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

| | |
|---------------------------------------|---------------|
| 8.5.6 Irritación para los ojos | No irritante |
| 8.6 Toxicidad sub-aguda | No disponible |
| 8.7 Toxicidad crónica | No disponible |
| 8.8 Mutagénesis | No disponible |

9. INFORMACIÓN ECOTOXICOLÓGICA

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9.1 Efectos agudos sobre peces | Ligeramente tóxico para peces. No se acumula en organismos acuáticos. No obstante, debe evitarse la contaminación de aguas quietas o en movimiento. Dejar una zona o franja de seguridad entre el área a tratar y el agua libre en superficie cercana. No contaminar agua de riego y uso doméstico, ni tampoco receptáculos como lagos, lagunas y diques. No contaminar fuentes de agua cuando se elimine el líquido de limpieza de los equipos de pulverización y asperjar el caldo remanente sobre campo arado o camino de tierra. |
| 9.2 Toxicidad para aves | Prácticamente no tóxico. |
| 9.3 Toxicidad para abejas | Virtualmente no tóxico. |
| 9.4 Persistencia en suelo | No disponible |
| 9.5 Efecto de control | No disponible |

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

10. ACCIONES DE EMERGENCIA

10.1 Derrames

Cubrir los derrames con material absorbente (tierra o arena). Barrer el producto absorbido y recoger en bolsas o recipientes bien identificados, para su posterior destrucción por empresas autorizadas. Lavar las superficies contaminadas con agua carbonatada o jabonosa y envasar luego el agua de lavado. Evitar la contaminación de aguas quietas o en movimiento. En caso de ocurrencia de derrames en fuentes de agua, interrumpir inmediatamente el consumo humano y animal y contactar al centro de emergencia de la empresa.

10.2 Fuego

En caso de incendio, pueden generarse gases irritantes y posiblemente tóxicos por descomposición térmica y combustión. Utilizar agente extinguidor: polvo, espuma resistente al alcohol, dióxido de carbono o agua en forma de spray. No usar chorro directo de agua. Usar indumentaria de protección completa y máscaras de oxígeno autónomas. Evacuar al personal no esencial del área, a fin de impedir la exposición al fuego, humo y productos de combustión. Restringir el uso de edificios, equipos y área contaminada, hasta su descontaminación. Deben tomarse medidas para evitar la filtración al suelo o la dispersión incontrolada del agente extintor contaminado. Contener y recoger el derrame con un material absorbente no combustible, (por ejemplo, arena, tierra, tierra de diatomea, vermiculita) y almacenar en un envase para disposición de acuerdo con las normativas locales / nacionales.

10.3 Disposición final

Los envases vacíos no pueden volverse a utilizar. Respetar las siguientes instrucciones: Agregar agua hasta cubrir un cuarto de la capacidad del envase, cerrar y agitar durante 30 segundos. Luego verter el agua del envase en el recipiente dosificador (considerar este volumen de agua dentro del volumen recomendado de la mezcla). Realizar este procedimiento 3 veces. Finalmente, destruir el envase perforándolo e intentando no dañar la etiqueta al efectuar esta operación. Los envases perforados deben colocarse en contenedores para ser enviados a una planta especializada para su destrucción final. No enterrar ni quemar a cielo abierto los envases y demás desechos.

11. INFORMACIÓN PARA EL TRANSPORTE

11.1 Transporte terrestre

ADR/RID:

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| N° UN: | 3082 |
| Clase: | 9 |
| Número de Etiqueta por Riesgo: | 9 |
| Grupo de Envase | III |
| Nombre Adecuado del Embarque: | Sustancia peligrosa para el medio ambiente, líquida, N.O.S. (Glifosato) |

11.2 Transporte aéreo

IATA-DGR:

| | |
|--------|------|
| N° UN: | 3082 |
| Clase: | 9 |

SULFOSATO TOUCHDOWN®

N° Registro SENASA: 33.566

Junio 2009

Número de Etiqueta por Riesgo : 9
Grupo de Envase III
Nombre Adecuado del Embarque: Sustancia peligrosa para el medio ambiente, líquida, N.O.S. (Glifosato)

11.3 Transporte marítimo

IMDG:

N° UN: 3082
Clase: 9
Número de Etiqueta por Riesgo : 9
Grupo de Envase III
Nombre Adecuado del Embarque: Sustancia peligrosa para el medio ambiente, líquida, N.O.S. (Glifosato)

Contaminante marino: No

HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD DE MATERIALES

01

Identificación del Producto

Nombre del Producto: Roundup ULTRAMAX
Nombre Químico: No aplicable
Sinónimos: No aplicable

Revisión: 07

Fecha: 09 | 11 | 05

02

Composición Química del Producto

Fórmula química: No aplicable (Producto Formulado)
Ingrediente activo : Glifosato; N-(fosfometil) glicina en forma de sal monoamónica 74,70% (base seca)
Ingredientes Inertes: 25,30%
CAS Reg. No. para ingrediente activo: 1071-83-6



ADVERTENCIAS La identidad química queda resguardada porque es información comercial secreta de Monsanto.

03

Identificación de los Peligros

Vías posibles de exposición: Contacto con la piel, contacto con los ojos, inhalación e ingestión.
Contacto con los ojos (corto plazo): Puede causar irritación ocular temporaria.
Contacto con la piel (corto plazo): No se estima que produzca efectos nocivos importantes si se siguen las instrucciones de uso recomendadas.
Inhalación (corto plazo): No se estima que produzca efectos nocivos importantes si se siguen las instrucciones de uso recomendadas.
Ingestión: Suministre grandes cantidades de agua a la víctima. Consiga atención médica.



PRODUCTO IRRITANTE OCULAR GRAVE.

04

Primeros Auxilios

Contacto con los ojos: Lave con abundante agua durante por lo menos 15 minutos. Busque atención médica.
ingestión: Beba grandes cantidades de agua. Busque atención médica.
Aviso para los médicos: Probables daños en la mucosa contraíndican el uso del lavado gástrico.
Nota: En caso de necesitar más información para una guía sobre primeros auxilios o tratamiento en caso de emergencia con seres humanos, realice una llamada al Centro de Atención al Cliente 0810-MONSANTO (6667268)

05

Protección Personal

Ojos: Cuando existe riesgo potencial de contacto con los ojos, se debe utilizar antiparras para productos químicos y disponer de un lavavojos de emergencias.
Piel: Aunque el Roundup Ultramax no presenta un riesgo de importancia para

la piel, minimice su contaminación siguiendo las prácticas seguras de manipulación detalladas en esta MSDS. Lave con abundante agua las manos y la piel contaminada luego de haber manipulado el producto.

Respiratorio:

Evite respirar su polvo. En circunstancias anormales en las que el producto pueda convertirse en polvo, se aconseja utilizar protección respiratoria adecuada para minimizar el riesgo de exposición.

Límites de exposición para el personal:

Roundup Ultramax: No se ha establecido límite de exposición ocupacional específico.

Notas: Sin embargo, si han establecido límites para partículas no reguladas ni clasificadas que constituyen el mínimo límite de exposición aplicable a polvos. Consulte los valores de dichos límites en la legislación nacional o internacional que aplique en cada caso.

06

Protección contra Incendios

Flash point: No Aplicable.

Medio de extinción: Rociado con agua, espuma, productos químicos, CO₂ u otro agente de extinción Clase B.

Procedimientos especiales de lucha contra el fuego: Los bomberos que puedan estar expuestos a vapores, nieblas o productos de combustión deben utilizar equipos autónomos de respiración autónoma.

Fuegos inusuales y riesgos de explosión: Ninguno.

07

Datos de Reactividad

Estabilidad: Estable en condiciones normales de almacenamiento en depósito

Incompatibilidad: Las soluciones en spray de este producto deberán mezclarse, almacenarse, o aplicarse solamente en contenedores de acero inoxidable, aluminio, fibra de vidrio o revestidos en plástico. No mezcle, almacene, o aplique este producto o sus soluciones en spray en contenedores o tanques galvanizados o de acero sin revestimiento (excepto en los casos de contenedores de acero inoxidable). Este producto o sus soluciones en spray reaccionan en este tipo de contenedores y tanques y producen gas de hidrógeno.

Productos de descomposición Peligrosos: El gas hidrógeno puede formar una mezcla de gas de alta combustibilidad. La mezcla de gas puede inflamarse o explotar, originando serias lesiones personales, si se encienden con una llama abierta, chispa, soplete de soldadura, cigarrillo encendido o cualquier otra fuente de ignición.

Polimerizaciones peligrosas: No se producen.

08

Datos Físicos / Químicos

Apariencia / olor : Gránulos amarillo palido.

Olor : mohoso

Solubilidad: Muy soluble en agua, insoluble en solventes orgánicos

pH: 4.3 (1% solución acuosa)

Densidad a granel : 35 libras por pie cubico.

NOTA: Estos datos físicos son valores típicos basados en ensayos materiales pero pueden variar según la muestra. No se debe interpretar a los valores típicos como un análisis garantizado de un grupo específico o como ítems de especificación.

09 Derrames y Pérdidas

Recoja el material derramado, colóquelo en una bolsa plástica y luego en un tambor de metal, y finalmente proceda a la disposición de acuerdo con las instrucciones que se encuentran en la sección 13. Asegúrese de mantener el derrame alejado de drenajes, cloacas, canales y cursos de agua.

10 Datos Toxicológicos

Esta sección es para uso exclusivo de toxicólogos y demás profesionales de la salud. La información obtenida producto de estudios de laboratorio realizados por Monsanto acerca de productos similares y componentes se resume a continuación.

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Toxicidad oral aguda | Rata, LD50: 2.814 mg/kg peso corporal. Clase IV - Producto que normalmente no ofrece peligro. |
| Toxicidad dérmica aguda | Conejo, LD50: >5.000 mg/kg peso corporal. Clase IV - Producto que normalmente no ofrece peligro. |
| Toxicidad aguda por inhalación | CL50 4h ratas: No detectado a la máxima concentración probada; no peligroso para el transporte. |
| Irritación dérmica Conejo, 6 animales, Ensayo EPA PR 86-5: | Todos los animales expuestos se vieron libres de la irritación cutánea provocada luego de tres días. Producto no irritante dermal. |
| Irritación ocular Conejo, 6 animales, Ensayo EPA PR 86-5: | Dos de los seis animales expuestos presentaron irritación de la córnea y de las membranas conjuntivas cuando finalizó el estudio (21 días). Otro animal presentó irritación corrosiva y grave destrucción del iris. Producto irritante ocular grave. |
| Sensibilización dérmica | Conejillo de indias, 26 animales de ambos sexos, EPA PR 86-5: Producto no sensibilizante dermal. |

Componentes

A continuación se resume la información proveniente de los estudios realizados por Monsanto y de la bibliografía científica sobre los componentes del Roundup Ultramax

Sal Monoamónica de Glifosato

Las Pruebas de Emplasto realizadas en cobayos con la sal monoamónica de glifosato no produjeron irritación después de la aplicación inicial o durante las exposiciones repetidas subsiguientes a la fase de inducción. Durante la excitación, ninguno de los animales exhibió una respuesta cutánea positiva. La sal monoamónica de glifosato no demostró tener el potencial como para producir sensibilización cutánea en los cobayos. A continuación se suministra información adicional sobre el glifosato, el ingrediente activo del herbicida Roundup Ultramax. Luego de exposiciones repetidas (90 días) al glifosato en su alimentación, no se notó ninguna disminución en el peso de los ratones durante el nivel más alto de las pruebas, a la vez que no se comprobaron efectos relacionados con el tratamiento en ratas. Luego de exposiciones repetidas al glifosato en la piel (3 semanas), una leve irritación fue el efecto primario que se observó en conejos. No se observaron alergias en los cobayos con posterioridad a las exposiciones repetidas en la piel. No se encontró evidencia de efectos en el sistema nervioso, incluyendo efectos retardados en pollos (dosis repetidas orales) o inhibición de la colinesterasa en ratas (dosis orales simples). Se observó una disminución del peso corporal y efectos en el tejido del hígado al alimentar a ratones con altas concentraciones de glifosato durante un período prolongado (2 años). En un estudio prolongado en ratas (2 años), se observó una reducción del peso corporal y cambios en los ojos al proporcionarles altas concentraciones de glifosato en su alimentación. Sin embargo, no se evidenciaron efectos relacionados con el tratamiento en un segundo estudio. No se observaron efectos adversos en estudios realizados con perros a los que se les administró glifosato en su alimentación. El glifosato no produjo tumores en ninguno de estos estudios. Basándose en los resultados de los estudios crónicos, la EPA ha clasificado al glifosato como categoría E (ninguna evidencia de cancerígeno en humanos). No se observaron defectos de nacimiento en ratas y ratones a los que se les administró glifosato oralmente durante la etapa de preñez, aún en cantidades que produjeron efectos adversos en las madres. Se administró glifosato a ratas en forma continua y en dosis muy altas durante dos generaciones consecutivas.



Roundup ULTRAMAX

Monsanto Argentina S.A.I.C.
Maipú 1210, Piso 10 - Cap.Fed.
Centro de Atención al Cliente
0810-MONSANTO (6667268)
callcenter@la2.monsanto.com

Se informó sobre la toxicidad en las crías que habían sido expuestas a altas dosis, nivel que también produjo efectos adversos en las madres. En un estudio realizado en 3 generaciones con dosis bajas, no se observaron efectos en la capacidad de los machos o hembras para reproducirse. El glifosato no produjo cambios genéticos en una variedad de ensayos corrientes utilizando células animales o bacterianas.

Surfactante

Se informa que los componentes surfactantes del Roundup Ultramax causan irritación ocular y cutánea y pueden contribuir a la irritación causada por este herbicida. Su ingestión puede producir irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.

11

Manipulación y Almacenamiento

Deben seguirse las prácticas industriales adecuadas en materia de seguridad e higiene personal.

Manipulación.

Evite contacto con los ojos, la piel y la ropa. Lávese las manos cuidadosamente luego de manipular o estar en contacto con este producto. Limpie cuidadosamente el equipo de protección personal luego de utilizarlo. No contamine drenajes, cloacas y cursos de agua cuando elimine el remanente de enjuague de los equipos. Los contenedores vacíos retienen vapor y residuos del producto. **Signa las advertencias incluidas en la etiqueta aun luego de haber vaciado el contenedor.**

Almacenamiento.

Sustancias que pueden almacenarse con este producto:

Acero inoxidable, aluminio, fibra de vidrio, plástico, revestimientos de vidrio.

Sustancias que no pueden almacenarse con este producto:

Acero galvanizado, acero blando sin revestimiento.
Consideraciones especiales: Mantenga fuera del alcance de los niños. Mantenga lejos de comidas, bebidas y alimentos para animales. Mantenga únicamente en el envase original.

12

Información Ecológica

Moderadamente tóxico para peces y organismos acuáticos.
No tóxico para abejas

13

Disposición de Residuos

El producto excedente debe disponerse de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta. Respete todas las regulaciones locales, regionales, nacionales e internacionales para la segregación, disposición y tratamiento de los residuos generados en la manipulación del producto o eventuales derrames del mismo.

14

Transporte

Material no peligroso para el transporte bajo:

DOT, ICAO/IATA, IMO, TDG y leyes mexicanas.

NOTA: En caso de accidentes ocurridos en el transporte, Centros de Distribución y Centros de Servicio, comunicar de inmediato lo ocurrido al 0-810-666-7268 (Call Center 24hs) o al 0-800-666-5644 (MonLog de 7 a 20hs)



La información contenida en el presente no es necesariamente exhaustiva pero representa datos confiables y relevantes. Respete todas las regulaciones locales, regionales, nacionales e internacionales. Por favor, consulte con su proveedor si necesita mayor información.

Denominación completa de los acrónimos más frecuentemente empleados. BCF (Coeficiente de Bioconcentración), BOD (Demanda Bioquímica de Oxígeno), COD (Demanda Química de Oxígeno), EC50 (Concentración Efectiva media), ED50 (dosis efectiva media), I.M. (intramuscular), I.P. (intraperitoneal), I.V. (intravenosa), Koc (Coeficiente de absorción del suelo), LC50 (Concentración letal media), LD50 (dosis letal media), LDLo (Dosis letal mínima), LEL (Límite inferior de inflamabilidad), LOAEC (Concentración con mínimo efecto adverso observado), LOAEL (Nivel con mínimo efecto adverso observado), LOEC (Concentración con mínimo efecto observado), LOEL (Nivel con mínimo efecto observado), MEL (Límite Máximo de Exposición), MTD (Dosis Máxima Tolerada), NOAEC (Concentración sin efecto adverso observado), NOAEL (Nivel sin efecto adverso observado), NOEC (Concentración sin efecto observado), NOEL (Nivel sin efecto observado), OEL (Límite de exposición ocupacional), PEL (Límite de exposición permisible), PII (Índice de irritación primario), Pow (Coeficiente de reparto n-octanol/agua), S.C. (subcutáneo), STEL (Límite de Exposición a Corto Plazo), TLV-C (Valor umbral límite- máximo), TLV-TWA (Valor umbral límite - Límite medio ponderado en el tiempo), UEL (Límite superior de inflamabilidad)

Esta Hoja de Datos de Seguridad (MSDS) tiene un fin distinto que la ETIQUETA DEL PRODUCTO (adherida al envase del mismo) Y NO REEMPLAZA NI MODIFICA TAL ETIQUETA. Esta MSDS suministra información importante sobre salud, seguridad y medioambiente a empleadores, empleados, personas encargadas de situaciones de emergencia y otras que manipulen grandes cantidades del producto en actividades que no sean aquellas en que se usa el producto, mientras que la etiqueta brinda información específicamente para la utilización normal del producto.

Si bien la información y recomendaciones contenidas en esta Hoja de Datos de Seguridad (en adelante, la "Información") se presentan de buena fe y se considera que son correctas a la fecha del presente, Monsanto no efectúa declaración alguna respecto de que tales datos son completos y exactos. Se suministra tal Información a condición de que la persona que las reciba determine por sí misma si le es útil a sus fines antes de usarla. En ningún caso, Monsanto será responsable por los daños de cualquier naturaleza que resulten de haber utilizado o confiado en dicha Información. **NO SE REALIZA EN VIRTUD DEL PRESENTE MANIFESTACIÓN O GARANTÍA ALGUNA, YA SEA EN FORMA EXPRESA O IMPLÍCITA, RESPECTO DE LA COMERCIABILIDAD O DE LA APTITUD DEL PRODUCTO PARA UN USO ESPECÍFICO EN RELACIÓN CON LA INFORMACIÓN O CON EL PRODUCTO A QUE SE REFIERE TAL INFORMACIÓN.**

Anexo II

Usos del liofilizado de *Chorella vulgaris* en cosmetología

1. INTRODUCCION

La evaluación sobre el uso de *Chorella vulgaris* fue realizada por el Instituto de Estética “Ana Fischer” de la ciudad de Santa Fe. La misma consistió en identificar los beneficios y efectos posibles sobre la piel del emplasto *C. vulgaris*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La prueba tuvo una duración de 6 sesiones semanales, donde se trabajó el rostro por hemicaras. En la hemicara derecha, se aplicó un jabón de manzanilla orgánico como limpieza de arrastre, luego un fango natural para la exfoliación, un agua termal como tónico y, finalmente, un emplasto de *C. vulgaris*. En la hemicara izquierda sólo se colocó el emplasto, sin preparación de la piel.

Previo a la evaluación personal del Instituto, tomo los siguientes datos personales y realizo un diagnóstico de la piel a tratar:

2.1. Datos personales de la modelo

| |
|--------------------------------------------------------------------|
| Sexo: Femenino |
| Hora de trabajo: 8h |
| Peso: 53 kg |
| Altura: 1,61 m |
| Hijos: 3 |
| Hábitos y Consumos |
| Ingesta de Agua: Normal |
| Diuréticos: No |
| Consumo de Hidratos de Carbono y Grasas: Moderado |
| Consumo de alcohol: Moderado |
| Fumadora: No |
| Medicamentos: Levotiroxina y Vitamina D. |
| Exposición Solar: Si |
| Productos cosméticos de uso cotidiano: Hidratante |
| Diagnostico de la Piel |
| Tipo de Piel: Mixta |
| Color: Normal |
| Textura: Lisa |
| Brillo: Opaco |
| Espesor: Normal |
| Turgencia: Buena |
| Hidratación: Deshidratada (Observaciones: Leve) |
| Sensibilidad: No |
| Orificios pilo-sebáceos: perceptibles (Observaciones: Leve) |
| Lesiones Elementales: Comedones (Observaciones: Leve) |
| Parpados: Ojeras (Observaciones: Leve) |
| Pigmentación: Hiperpigmentación |
| Arrugas: Frontales-Glabalares-Periorbiculares-Nasogenianas. |
| Flacidez: Parpados-Mejillas-Cuello |
| Dermatosis: No. |

Para constatar los posibles cambios que se podían dar en la piel, se tomaron fotografías con USB Digital Microscope TK-U602B (Figura 1), durante las 6 sesiones antes del tratamiento y después del mismo.



Figura 1: USB Digital Microscope TK-U602B, utilizado para tomar fotografías de la piel y realizar el seguimiento del ensayo

3. RESULTADOS

En la evaluación de las fotografías las profesionales del Instituto junto con el tésinista pudieron constatar que la piel, al inicio del tratamiento, se encontraba seca, desvitalizada, opaca y con líneas notorias (Figura 2). Desde la primera aplicación, se identificó un incremento en la hidratación, humectación y luminosidad, que se mantuvo y se intensificó a lo largo de las sesiones; lo cual trajo aparejado una mejora en la textura, tornándola más lisa; en el color, unificándolo; en las líneas, disminuyéndolas y devolviéndole a la piel su vitalidad (Figura 3).

Estos resultados fueron positivos en ambos casos (hemi caras), siendo más notorios en la hemi cara que recibió tratamiento previo (hemi caras derecha) (Figura 4).

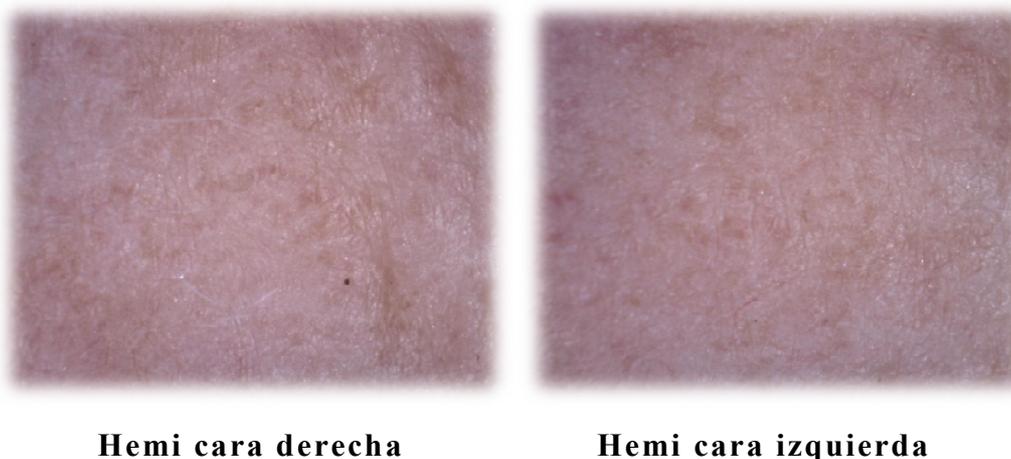


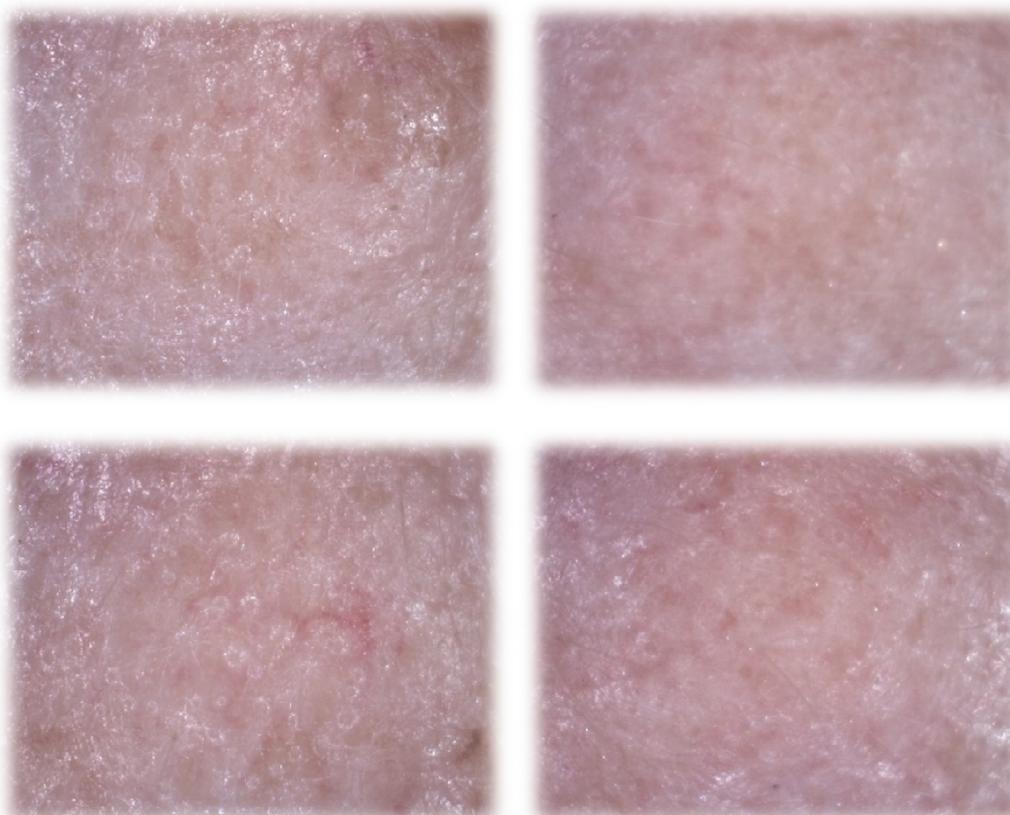
Figura 2: Fotografías del día 1 de las dos hemi caras, previo al tratamiento con emplastro de *C. vulgaris*



Hemi cara derecha

Hemi cara izquierda

Figura 3: Fotografías del día 1 de las dos hemi caras, después de la primer sesión con emplasto de *C. vulgaris*



Hemi cara derecha

Hemi cara izquierda

Figura 4: Fotografías de las dos hemi caras, luego de la sexta sesión con emplasto de *C. vulgaris*