



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Programa de Posgrado en
Ciencias Ambientales



**Destino ambiental de plaguicidas utilizados en rotaciones
arroceras: glifosato como caso de estudio**

Estudiante: Beatriz Alonso Vignola (bealonso91@gmail.com)

Orientador: Andrés Pérez Parada (aperez@cure.edu.uy)

Co-orientador: Angel Segura (asegura@cure.edu.uy)

Tribunal: Néstor Mazzeo, Javier Garcia Alonso, Renato Zanella

Mayo 2024

Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales

Resumen

La intensificación del cultivo de arroz requiere una evaluación de sus efectos ambientales. En Uruguay incluye una fase de inundación, que modifica las condiciones del suelo, y no es conocido como afecta la dinámica de los plaguicidas. En esta tesis se tomó como caso de estudio el uso de glifosato (GLY) como barbecho químico en el cultivo de arroz. Este trabajo se situó en el Experimento a Largo Plazo (ELP) de rotaciones arroceras ubicado en Paso de la Laguna, INIA Treinta y Tres. Se seleccionaron cuatro rotaciones con distintos niveles de intensificación en el uso del suelo (arroz continuo, arroz-soja y dos rotaciones arroz-pastura), aplicándose GLY como barbecho químico y herbicida pre-emergente en la zafra 2019/2020.

En la primera etapa, se validó una técnica analítica para determinar residuos de GLY y su metabolito AMPA en muestras de suelo y lámina de agua tomadas durante la zafra. Se muestrearon periódicamente muestras de suelo, agua de inundación y analizó la dinámica de la concentración de GLY y AMPA. En la segunda etapa de esta investigación, se ajustó modelos de decaimiento exponencial en diferentes intervalos de tiempo desde la primera aplicación de GLY hasta la cosecha del cultivo, utilizando las rotaciones como covariables.

Los resultados confirman la transferencia de GLY y AMPA desde el suelo hacia la lámina de agua, la disminución de las tasas de degradación durante el período de inundación y la residualidad de ambos compuestos al finalizar la zafra de arroz.

Estos hallazgos contribuyen a la comprensión del comportamiento y destino del GLY en suelo y agua en un sistema agrícola que alterna condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se han generado también conocimientos útiles para la toma de decisiones y gestión del cultivo con el fin de minimizar la posible exportación de GLY y AMPA a otros cursos de agua.

Palabras clave: glifosato; AMPA; arroz; modelado; LC-FLD; LC-MS/MS, decaimiento

Agradecimientos

Esta investigación pudo realizarse gracias al financiamiento del fondo INNOVAGRO FSA_PI_2018_1_148630, beca ANII POS_FSA_2019_1_100852 y el apoyo de muchas personas.

Quiero agradecer a mi tutor, Andrés Pérez, por su enseñanza, guía y apoyo en todas las etapas de mi proceso de formación como Química, desde los créditos experimentales en Farmacognosia hasta la escritura de mi tesis de Maestría. Por confiar en mi trabajo, tenerme mucha paciencia y también, junto a su familia, abrirme las puertas de su casa cuando el COVID trastocó toda planificación posible.

A mi co-tutor, Angel Segura, por introducirme en el mundo de la estadística y las líneas de código para aprender que hay mucho más atrás de un simple número como resultado.

Al personal del INIA, en particular a Leonidas Carrasco, José Terra, Álvaro Roel y Sebastián Martínez, por darme la posibilidad de aportar otra mirada al trabajo que vienen haciendo desde hace años en el ELP y por brindar su punto de vista agronómico a esta tesis. Un agradecimiento especial a Fernando Escalante y a Jara, quienes me recibieron y acompañaron las mañanas de muestreo en Paso de la Laguna, compartiéndome su experiencia mientras cuidaban que no derrapara por una taipa.

A todos los integrantes del DDT del CURE Rocha, que durante casi dos años hicieron que jueves y viernes me sintiera en casa; a Luciana, la mejor analista 2 y compañera de horas eternas de laboratorio que pude tener. También a Lucía Pareja, por su colaboración en los análisis de suelo. A los estudiantes que pasaron por mis salones, compañeros profes y en este último tiempo de DINACEA, que han escuchado y acompañado las idas y vueltas de este proyecto.

Finalmente, agradezco a mi familia y amigos, quienes de distintas formas me han acompañado en cada kilómetro de los casi 14000 km recorridos entre Rocha y Montevideo para llegar hasta este punto. En especial a mi madre, por ser siempre sostén y a Dani, que, sin quererlo, el glifo se convirtió en parte de nuestra historia, apoyándome de forma incondicional en cada etapa de este camino.

Índice

Resumen	1
Agradecimientos	2
Índice.....	3
Listado de siglas	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas	8
2 Introducción general	10
2.1 La intensificación agrícola.....	10
2.2 Destino ambiental de los plaguicidas	12
2.3 El cultivo de arroz en Uruguay.....	14
2.4 Glifosato como caso de estudio.....	18
2.5 Objetivos	21
2.5.1 Objetivo general	21
2.5.2 Objetivos específicos	21
3 Determinación de glifosato y AMPA en agua y suelo	22
3.1 Introducción	22
3.2 Materiales y métodos.....	26
3.2.1 Sustancias y reactivos	26
3.2.2 Muestreo, almacenamiento y muestras de blancos	26
3.2.3 Preparación de muestras de agua	27
3.2.4 Preparación de muestras de suelo	27
3.2.5 Instrumentos	28
3.3 Resultados y discusión.....	30
3.3.1 Optimización de las condiciones instrumentales.....	30
3.3.2 Optimización de la preparación de muestra	34
3.3.3 Validación de la técnica analítica	36
3.4 Conclusiones.....	38
4 Decaimiento de GLY y AMPA en rotaciones arroceras contrastantes	39
4.1 Introducción	39
4.2 Materiales y métodos.....	40
4.2.1 Sitio de estudio y gestión del cultivo	40
4.2.2 Aplicaciones de glifosato	42
4.2.3 Condiciones de riego	43
4.2.4 Condiciones meteorológicas.....	43

4.2.5	Diseño de monitoreo	44
4.2.6	Análisis de datos	46
4.3	Resultados	47
4.3.1	Monitoreo de GLY y AMPA	47
4.3.2	Decaimiento en suelo y lámina de agua	48
4.4	Discusión	53
4.4.1	Consideraciones generales	53
4.4.2	Decaimiento en suelo	54
4.4.3	Decaimiento durante el período de inundación	56
4.4.4	Diferentes escenarios de intensificación	58
4.5	Conclusiones.....	60
5	Conclusiones y perspectivas	62
6	Bibliografía	64
7	Anexos.....	76
7.1	Uso de modelos predictivos de destino ambiental de plaguicidas en cultivo de arroz 76	
7.2	Presentaciones realizadas	88

Listado de siglas

AIC	Criterio de información de Akaike
ACN	Acetonitrilo
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
AMPA-FMOC	Producto de derivatización de AMPA con FMOC
DCM	Diclorometano
DT ₅₀	Tiempo de vida media
ELP	Experimento a largo plazo
FLD	Detector de fluorescencia
FMOC-Cl	Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo
FPTA	Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria
GLY	Glifosato (N-fosfometilglicina)
GLY-FMOC	Producto de derivatización de glifosato con FMOC
IC	Intervalo de confianza
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
LC	Cromatografía líquida
LOQ	Límite de cuantificación
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
OGM	Organismo genéticamente modificado
RSD	Desviación estándar relativa
R1	Rotación arroz continuo
R2	Rotación arroz-otros cultivos
R3	Rotación arroz-pastura corta
R4	Rotación arroz-pastura larga
R5	Rotación arroz-soja-pastura
R6	Rotación arroz-soja
tR	Tiempo de retención (en minutos)

Índice de figuras

Figura 1.1: Ciclo de los plaguicidas en el ambiente, basado en FAO 2018	12
Figura 1.2: Procesos involucrados en los modelos de destino ambiental de los plaguicidas en arroz. Basado en Williams et al. 2011	13
Figura 1.3: Distribución de las chacras de arroz en Uruguay basado en MGAP, 2023 ...	15
Figura 1.4: Estación Experimental Paso de la Laguna en el departamento de Treinta y Tres, representada por el punto rojo (izquierda). Imagen satelital de la Estación Experimental Paso de la Laguna, delimitada en el área roja (medio). Imagen satelital del ELP (derecha).....	16
Figura 1.5: Porcentaje en masa de los principios activos de mayor tasa de aplicación en el ELP en las 5 zafras previas al trabajo. Datos brindados por INIA.	17
Figura 1.6: Principales vías de degradación de GLY	20
Figura 2.1: Estructuras de GLY y AMPA y sus valores de pKa (adaptado de Ramirez et al., 2014).....	22
Figura 2.2: Reacción de derivatización de GLY y AMPA con FMOC	23
Figura 2.3: Esquema de la preparación de muestra en ambas matrices	28
Figura 2.4: Cromatograma de GLY (tR=8,3 min) y AMPA (tR=11,8) en agua fortificada a 5 μgL^{-1} por LC-FLD.....	31
Figura 2.5: Diferencias en el tR de GLY en dos inyecciones de la misma muestra con 6 horas de diferencia	31
Figura 2.6: Cromatogramas de GLY (arriba) y AMPA (abajo) con detección por 3D por FLD	32
Figura 2.7: Detección de impurezas en matriz suelo en muestra fortificada con AMPA y muestra blanco. Las impurezas se solapan con AMPA-FMOC al mismo tR.....	33

Figura 2.8:Cromatograma de una muestra de agua fortificada a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ por LC-MS/MS	34
Figura 2.9:Evaluación exploratoria de la recuperación de GLY-FMOC en diferentes condiciones de reacción	35
Figura 3.1:Variación de precipitaciones, evapotranspiración y temperatura promedio durante el tiempo estudiado	44
Figura 3.2:(1) Esquema del ciclo del cultivo del arroz, aplicaciones de GLY y muestreos realizados Adaptado de Asociación de Cultivadores de Arroz (ACA), 2018. En la primera aplicación de GLY se indican las fechas según la rotación. (2) Esquema conceptual del destino ambiental de GLY en las diferentes etapas del ciclo del cultivo, las cajas azules representan la lámina de agua, cajas grises suelo, k son constantes de decaimiento, s transferencia del suelo al agua, m movilidad en el suelo a niveles subsuperficiales y d exportaciones por escurrimiento	45
Figura 3.3:Comportamiento de GLY (arriba) y AMPA (abajo) en suelo ajustado a cinética de primer orden (SFO). Los puntos representan los resultados experimentales, las líneas los modelos cinéticos calculados y el área sombreada celeste el riego por inundación.	50
Figura 3.4:Comportamiento de GLY (arriba) y AMPA (abajo) en lámina de agua ajustado a cinética de primer orden (SFO). Los puntos representan los resultados experimentales, las líneas los modelos cinéticos calculados y el área sombreada celeste el riego por inundación	52
Figura 3.5:Masa total de GLY aplicada en las parcelas estudiadas en las últimas 5 zafras.	58

Índice de tablas

Tabla 2.1:Comparación de técnicas analíticas para la detección de GLY y AMPA en suelo y agua por derivatización con FMOC-Cl. CE: Calibración externa DEE: dietil éter, DV: derivatización AF: Ácido fórmico; ILIS: Estándar interno isotópicamente marcado; NH ₄ Ac: Acetato de amonio	24
Tabla 2.2:Condiciones de adquisición en LC-MS/MS para ambos compuestos. Q: transición utilizada para cuantificación; q: transición utilizada para identificación DP: potencial de declusteing; CE: energía de colisión	30
Tabla 2.3:Cifras de mérito en agua superficial por LC-FLD.....	36
Tabla 2.4:Cifras de mérito en agua superficial y suelo para LC-MS/MS	37
Tabla 3.1:Propiedades del suelo superficial (0-15 cm) en el ELP (Macedo et al., 2022)	40
Tabla 3.2: Sistema de rotaciones de cultivos en el ELP, calendario estacional y anual (P-V: primavera/ verano; O-I: otoño/invierno. CC indica cultivo de cobertura.....	41
Tabla 3.3:Calendario y tasas de aplicación de GLY en la zafra 2019/2020	43
Tabla 3.4:Resumen de resultados de concentración obtenidos	48
Tabla 3.5:Variación del Criterio de Información de Akaike (AIC) para los modelos evaluados en suelo	49
Tabla 3.6:Parámetros estimados para el modelo de decaimiento de primer orden de GLY y AMPA en suelo de las diferentes rotaciones (R). Se presenta el intervalo de confianza (IC)s y el coeficiente de determinación (R ²).	49
Tabla 3.7: Variación del Criterio de Información de Akaike (AIC) para los modelos evaluados en lámina de agua	50
Tabla 3.8:Parámetros estimados para el modelo de primer orden de transferencia de GLY y AMPA del suelo a la lámina de agua en las diferentes rotaciones (R). Se presenta el intervalo de confianza (IC)s y el coeficiente de determinación (R ²).....	51
Tabla 3.9:Parámetros estimados para el modelo de decaimiento de primer orden de GLY y AMPA en lámina de agua, obteniéndose una única ecuación para todas las rotaciones. Se presenta el intervalo de confianza (IC) y el coeficiente de determinación (R ²).	51
Tabla 3.10:Constantes de decaimiento y DT ₅₀ calculados para GLY y AMPA según los modelos obtenidos en cada compartimento. Los DT ₅₀ para lámina de agua marcados con * tienen en cuenta el tiempo de transferencia del suelo al agua.	57

Tabla 3.11:DT ₅₀ reportados en bibliografía para GLY y AMPA en suelo y agua	57
Tabla 3.12:Aplicaciones totales de GLY en los últimos 5 años en las rotaciones evaluadas. Las celdas azules corresponden a arroz, verde pastura y amarillo soja.....	59

1 Introducción general

1.1 La intensificación agrícola

La intensificación agrícola ha surgido como una respuesta estratégica para hacer frente al desafío de la ampliación de la demanda de determinados productos agrícolas a nivel global (Mateo-Sagasta et al., 2018; Tilman et al., 2011). Se entiende como *intensificación agrícola* al proceso por el que se busca aumentar la producción en una determinada área, mediante prácticas como la irrigación y la mecanización y el aumento del uso de insumos para fertilización y control de plagas (Foley et al., 2011).

La multiplicidad de estrategias para intensificar los sistemas agrícolas ha generado diversos escenarios que requieren indicadores para evaluar el grado de sostenibilidad ambiental de los sistemas de producción agropecuarios, especialmente debido a la presión sobre los recursos naturales (INIA, 2016). Algunos ejemplos de estos indicadores son el uso de energía, la relación entre productividad y uso de fertilizantes o el riesgo de contaminación por agroquímicos, obteniendo información cuantitativa que permita la comparación de resultados e impactos entre distintos sistemas de producción (Tseng et al., 2021).

La siembra directa, o también denominada de *mínima labranza* o *no tillage* en inglés, ha sido la estrategia más extendida a la hora de la intensificación agrícola en Uruguay desde la década de 1990. Mediante esta práctica se busca reducir la erosión y la pérdida de suelo al mantenerlo cubierto con cultivos o pasturas, y al reintroducir suficiente biomasa al suelo mediante la degradación del rastrojo (García Préchac et al., 2010; Wuest et al., 2023). De esta forma, se busca preparar el suelo minimizando su perturbación para la colocación de la semilla, siendo dependiente del uso de herbicidas para el control de las malezas. El control de malezas, en los sistemas de mínima labranza, introduce el concepto de *barbecho químico*, entendiéndose como el tiempo transcurrido entre la aplicación de herbicidas para eliminar el cultivo anterior y la siembra del cultivo siguiente (Dabalá, 2009; García-Préchac et al., 2004).

El uso de barbecho químico en sistemas de mínima labranza, como estrategia de intensificación también ha llevado a un incremento en la cantidad de plaguicidas aplicados por unidad de área (Schreinemachers y Tipraqsa, 2012).

Los plaguicidas son sustancias empleadas en la agricultura para prevenir y controlar factores bióticos, como diversas enfermedades y malezas, que afectan a los cultivos. Cuando la sustancia tiene un amplio espectro de acción se denomina biocida, pues no está enfocado en una plaga o maleza en particular. En esta tesis llamaremos de forma genérica plaguicida a este tipo de sustancias sin distinción. Los plaguicidas contienen sustancias activas que pueden ser de origen químico (sintéticos o naturales) o biológicos, que pueden ser empleadas como insecticidas, herbicidas, fungicidas y reguladores del crecimiento (Codex Alimentarius, 2022; Mateo-Sagasta et al., 2018).

Mas allá que los plaguicidas sean aplicados en un cultivo específico, independientemente de su modo de acción, se distribuyen parcialmente en el ambiente, presentado diferentes destinos ambientales. Este reparto entre compartimentos ambientales se ejemplifica en la Figura 1.1.



Figura 1.1: Ciclo de los plaguicidas en el ambiente, basado en FAO 2018

1.2 Destino ambiental de los plaguicidas

El destino ambiental de un plaguicida depende de su estructura molecular y consecuentemente de sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo solubilidad, volatilidad, coeficientes de partición, etc., que determinan su comportamiento y afinidad en los distintos medios y condiciones ambientales. Los factores determinantes de destino ambiental de un plaguicida son: la partición de la sustancia en los compartimientos ambientales, los procesos de transporte y transferencia en el medio, por ejemplo, lixiviado, escorrentía, absorción, coeficiente octanol-agua, y por último la degradación o transformación del plaguicida (Covaci, 2014).

Los procesos de degradación, como la hidrólisis, fotólisis o degradación microbiana, conducen a la disipación de la sustancia en el ambiente, sin embargo, conllevan a la aparición de otras sustancias, en algunos casos más tóxicas o persistentes que el compuesto original (FOCUS, 2006).

El destino ambiental de los plaguicidas tiene como consecuencia la contaminación tanto de aguas superficiales, subterráneas y suelos. El aumento de su uso conlleva a diversas problemáticas asociadas a su aplicación y distribución en el ambiente, ya que la presencia de ellos en el ambiente permite su afectación e ingreso en organismos que no son blanco de los mismos, pudiéndose observar efectos de bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica (Mateo-Sagasta et al., 2018).

La posibilidad de movilidad y transformación complejiza el estudio de los plaguicidas en el ambiente. Esto se debe a que para comprender el destino ambiental de una sustancia no alcanza con el análisis de algunas muestras, que solo brindarán información del momento que se muestreó. Para estudiar la dinámica y las transformaciones de estas sustancias en el tiempo es necesario inferir la movilidad y el destino de estas de forma más precisa. Con este objetivo, se han desarrollado modelos predictivos como herramientas para estimar posibles impactos en el ambiente (Ippolito & Fait, 2019).

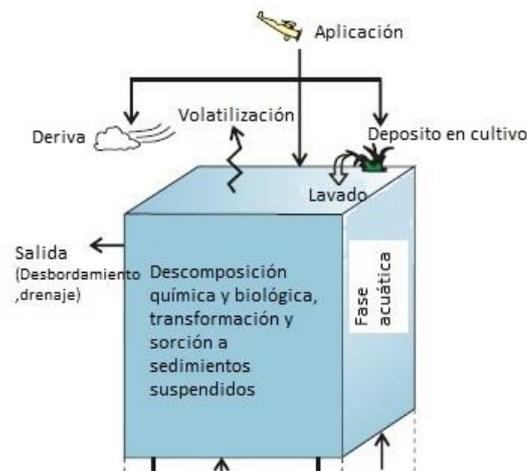
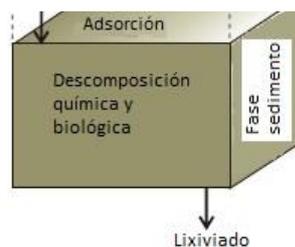


Figura 1.2: Procesos involucrados en los modelos de destino ambiental de los plaguicidas en arroz. Basado en Williams et al. 2014



El cultivo de arroz es un sistema particular para estudiar el destino ambiental de plaguicidas, debido a que el riego por inundación desencadena diferentes procesos químicos y microbiológicos muy atípicos en relación a otros cultivos agrícolas (Figura 1.2).

Diferentes modelos predictivos se han desarrollado para estudiar la distribución de los plaguicidas en el cultivo del arroz, estos deben adaptarse a las prácticas de gestión del agua y del suelo de cada sistema productivo (Luo et al., 2012). Por ejemplo, se ha investigado la distribución del clorotraniliprol en el suelo, las plantas y los lixiviados bajo distintos regímenes de riego (Pandey et al., 2020). Además, se ha desarrollado el modelo PADDY para simular los cambios de concentración de fipronil e isoprotholane en

agua, suelo y plantas (Inao et al., 2018). Por otro lado, el modelo RICEWQ se empleó para simular la distribución de molinato bajo diferentes escenarios de manejo de cultivos (Christen et al., 2006), y el destino ambiental de carbofurano en un campo de arroz se ha explorado utilizando un modelo de fugacidad de nivel IV acoplado con una ecuación de dispersión-advección (Contreras et al., 2008).

Los ejemplos presentados ponen en relieve los avances significativos que se han tenido en la simulación del destino ambiental de los plaguicidas, en el contexto específico del cultivo del arroz.

1.3 El cultivo de arroz en Uruguay

En Uruguay, el cultivo de arroz es uno de los ejemplos más claros que ha atravesado el proceso de intensificación agrícola. Durante las últimas tres décadas se ha registrado una adopción gradual de variedades de plantas de alto rendimiento, así como mejoras en las prácticas de manejo del suelo. Adicionalmente, el control temprano de malezas, el control del riego y ajustes en la fertilización y el manejo de enfermedades han resultado en notables incrementos en la productividad del cultivo (Pittelkow et al., 2016; Tseng et al., 2021). Ejemplo de esto es la zafra 2022/2023, la cual alcanzó valores históricos de productividad con un rendimiento promedio a nivel país de 9336 kg/ha de arroz (MGAP, 2023).

El área de siembra de arroz en Uruguay se extiende por alrededor de 170.000 ha, distribuidas en tres zonas predominantes del país, encontrándose en la zona Este la mayor concentración de chacras, como puede observarse en la Figura 1.3 (MGAP, 2023).

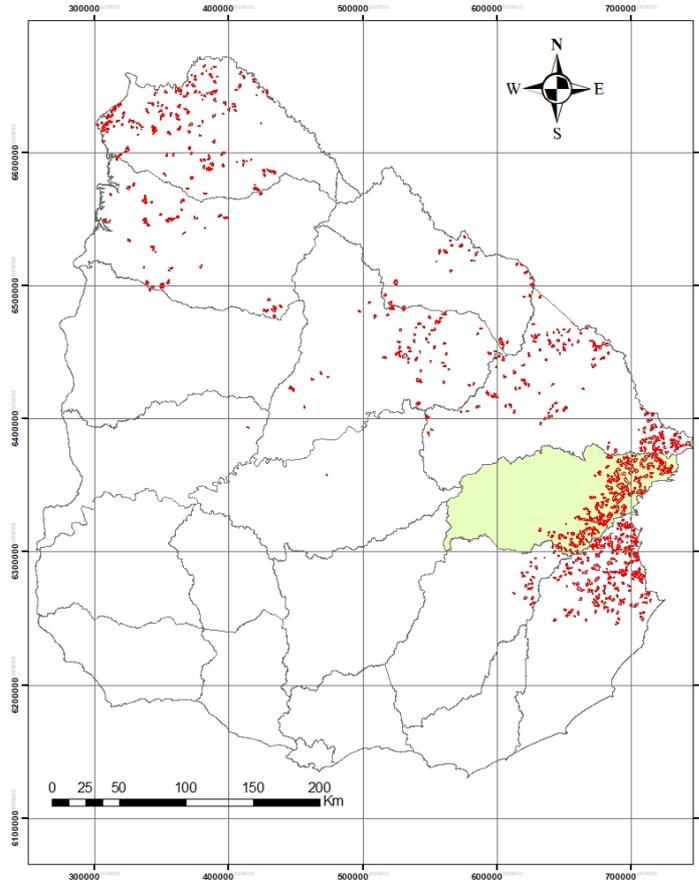


Figura 1.3: Distribución de las chacras de arroz en Uruguay basado en MGAP, 2023

Su producción se caracteriza por una alta mecanización y se realiza en rotación con pasturas para el pastoreo de ganado o cultivos de secano (ej. soja). La rotación típica consiste en 1-2 años de cultivo de arroz y 3-4 años de pastura u otros cultivos como soja y sorgo. En este contexto, es posible encontrar variedad de escenarios de rotaciones contrastantes en la intensidad del uso del suelo (Molina et al., 2019; Tseng et al., 2020).

La gestión del agua tiene un rol fundamental en la producción de arroz en Uruguay, ya que el cultivo crece bajo condiciones de inundación desde 20 a 30 días, desde la emergencia de la planta hasta la madurez vegetativa (Cantou et al., 2010). En consecuencia, al caracterizarse por emplear un volumen de agua en el riego que excede significativamente la tasa de evapotranspiración (Bouman et al., 2007) en comparación

con otros cultivos, resulta en una mayor sensibilidad a la escorrentía o también la exportación de plaguicidas.

Los campos de arroz en Uruguay son irrigados con entradas de agua en un promedio de 14.000 m³/ha (Pittelkow et al., 2016). Esta agua de riego proviene de ecosistemas naturales (ríos, arroyos) e intervenidos (embalses); no obstante, la liberación del agua de riego puede realizarse mediante canales que conducen a otros sistemas o que desembocan aguas abajo de la ubicación original de toma, teniendo como consecuencia el trasvase de estas aguas. Esta práctica conlleva impactos adversos en la dinámica de nutrientes y plaguicidas, que son exportados fuera del sistema productivo.

Con el objetivo de generar información cuantitativa sobre los efectos del sistema productivo del arroz en Uruguay, en el año 2012 el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) estableció un Experimento a Largo Plazo (ELP) de rotaciones arroz-pastura-otros cultivos. Este se encuentra ubicado en la Unidad Experimental *Paso de la Laguna* del INIA, en departamento de Treinta y Tres a orillas del río Olimar Grande (Figura 1.4).



Figura 1.4: Estación Experimental Paso de la Laguna en el departamento de Treinta y Tres, representada por el punto rojo (izquierda). Imagen satelital de la Estación Experimental Paso de la Laguna, delimitada en el área roja (medio). Imagen satelital del ELP (derecha)

Las investigaciones realizadas en el ELP buscan identificar sistemas de intensificación del uso del suelo mediante el contraste de rotaciones de arroz continuo, arroz-pastura y otras rotaciones, incorporando nuevos rubros agrícolas -como cultivos de secano- que

constituyan alternativas para los sistemas arroceros y resulten sustentables en términos físicos y económicos (Terra, 2017; Terra et al., 2014).

Dentro del ámbito de la producción arrocerá, se ha observado un incremento en la utilización de plaguicidas, tanto en la incorporación de nuevas moléculas, como en la cantidad aplicada (Schreinemachers & Tipraqsa, 2012). Las estrategias de manejo de plaguicidas se orientan hacia la prevención de plagas y, en los últimos años, se ha experimentado un cambio en la composición y el aumento del uso de herbicidas y fungicidas (Molina et al., 2019). Aunque los insecticidas solo se aplican en aproximadamente el 10% del área cultivada, su impacto en el ecosistema es más notorio en comparación con otros plaguicidas empleados en mayores proporciones (Pittelkow et al., 2016).

En los últimos 5 años la mayor proporción de aplicaciones de plaguicidas realizadas en el ELP corresponde a herbicidas (Figura 1.5). En menores proporciones, en las zafras anteriores al 2019 se realizó aplicaciones de formulados de los insecticidas azoxiestrobin, kresoxim metil y ciproconazol durante el período de inundación.

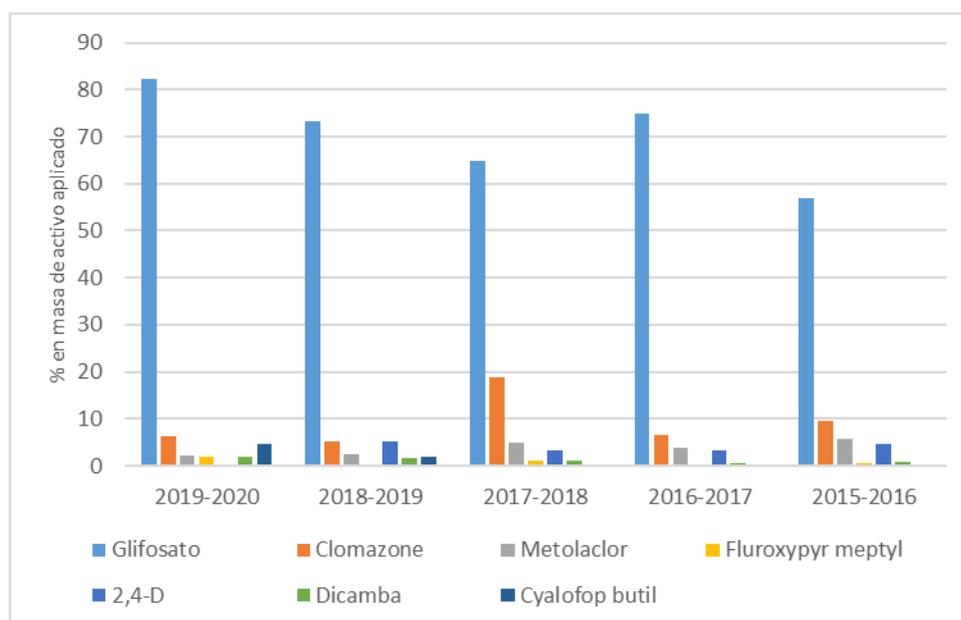


Figura 1.5: Porcentaje en masa de los principios activos de mayor tasa de aplicación en el ELP en las 5 zafras previas al trabajo. Datos brindados por INIA.

Existen algunos antecedentes de residuos de plaguicidas en suelos, aguas y granos, provenientes de predios arroceros del país; detectados en proyectos de investigación

desarrollados entre los años 2006 y 2012. Como resultados, se destaca que, en algunas muestras de láminas de agua, se detectaron plaguicidas, herbicidas y fungicidas en algunas muestras, mientras que en las muestras de suelo analizadas no se detectaron plaguicidas (Carlomagno et al., 2010; Hill & Clérici, 2008; Queheille, 2017).

Debido a estas características del cultivo de arroz y los antecedentes reportados, surge la necesidad de conocer y comprender más a fondo la dinámica de los plaguicidas utilizados en el sistema y su destino en el ambiente.

1.4 Glifosato como caso de estudio

Este trabajo toma al glifosato (GLY) como caso de estudio. El foco en este plaguicida se justifica por dos razones: en primer lugar, su uso en etapas de barbecho químico para sistemas de mínima labranza (Dabalá, 2009), siendo aplicado en el 83% del área cultivada de arroz (Molina et al., 2023); en segundo lugar, es el plaguicida con mayor uso en Uruguay (DGSA, 2023), incluyendo el ELP (Figura 1.5), y posiblemente el menos estudiado en antecedentes de monitoreo.

El GLY fue sintetizado en 1950, inhibidor en las vías metabólicas de las plantas, es un herbicida de amplio espectro no selectivo, sistémico y de rápida acción. Marcas como Roundup™ (Monsanto) contienen GLY como ingrediente activo y se utilizan con diferentes fines como la agricultura y la jardinería. Algunos cultivos, como la soja y el algodón, han sido genéticamente modificados para resistir el GLY, lo que ha derivado en su uso como herbicida post-emergente en cultivos extensivos de secano (Gillezeau et al., 2019; Richmond, 2018).

Su modo de acción es a través de la inhibición la enzima 3-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), interfiriendo en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Esta enzima forma parte de la vía metabólica del ácido shikimico, presente en plantas, hongos y bacterias, y no existe en animales. A pesar de esto, el GLY es un plaguicida mundialmente controversial, cuya mayor preocupación ambiental es su gran uso y los riesgos a la salud. Por un lado, existe un posible efecto cancerígeno en humanos y por otro lado está

vinculado a la promoción de modelos productivos con organismos genéticamente modificados (OGM) (Aparicio et al., 2013).

La toxicidad del GLY en organismos no objetivo es variable debido a varios factores. Por ejemplo, sus características anfotéricas permiten que a pH bajo sea más lipofílico, favoreciendo su entrada en las células y pudiendo interferir con la morfología y absorción celular. A su vez, los adyuvantes podrían facilitar la penetración a través de la membrana plasmática, potenciando la acción del GLY y por ende su toxicidad (Hedberg & Wallin, 2010). A su vez, el dato de ecotoxicidad de las distintas sales y formulaciones de GLY, incluyendo sus adyuvantes, no suele estar disponible. Entre los adyuvantes más comunes en las formulaciones comerciales se encuentra la polioxietilienamina (POEA) (Annett et al., 2014). Se ha sugerido que la permeabilidad de la membrana celular por la POEA, similar a lo observado en células vegetales, posibilita la entrada del GLY al citoplasma de las células animales. Se ha evaluado la toxicidad de GLY y sus adyuvantes en diversos organismos no blanco. Algunos ejemplos de los efectos de las formulaciones de GLY son: la actividad fungicida en hongos entomopatógenos (Morjan et al., 2002); variaciones en las comunidades de biofilms de sedimentos de lagos (Corrales et al., 2021; Sabio y García et al., 2022); efectos perjudiciales en el comportamiento y desarrollo de abejas (Castelli et al., 2021); malformaciones en embriones vertebrados (Paganelli et al., 2010). También se han encontrado evidencia de que el GLY tiene características de disruptor endócrino en humanos (Muñoz et al., 2021).

Sin embargo, las opiniones sobre el GLY difieren entre los organismos reguladores. Mientras la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica al GLY como "probablemente carcinogénico para los seres humanos" (IARC, 2015), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) concluye que no existen riesgos significativos para la salud humana cuando se usa adecuadamente (EPA, 2016). Sin embargo, se han identificado posibles riesgos ecológicos. Aunque el proceso de revisión del registro del GLY ha tenido desafíos legales, la EPA tiene la intención de abordar las preocupaciones planteadas y mejorar su evaluación del potencial carcinogénico, así como analizar los efectos del GLY en hábitats de especies en peligro de extinción (Benbrook, 2019; EPA, 2023). Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), luego de un proceso de evaluación iniciado en el año 2019 en el cual

se evaluaron 780 trabajos sobre GLY, ha renovado recientemente la autorización de GLY por un período de 10 años; ha establecido condiciones y restricciones, como la prohibición del uso como secante y limitación en las impurezas (EFSA, 2023).

El GLY, al ser un herbicida de amplio espectro, llega al medio ambiente tanto a través del uso agrícola como residencial. Los caminos de degradación en el medio ambiente del GLY producen Ácido Aminometilfosfónico (AMPA), Glicina y Sarcosina, como puede observarse en la figura 1.7; siendo el AMPA el metabolito principal (Aslam et al., 2023; la Cecilia & Maggi, 2018; Roberts et al., 1998).

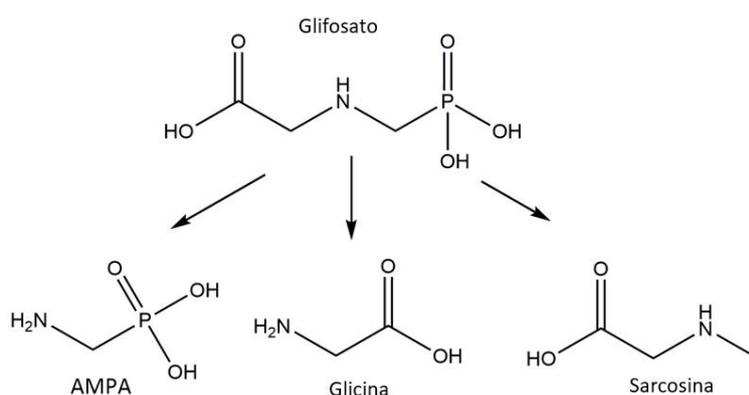


Figura 1.6: Principales vías de degradación de GLY

La degradación biológica es la ruta principal para la degradación de ambas sustancias; es posible en condiciones aeróbicas mediante microorganismos del suelo. La degradación en condiciones anaeróbicas es mínima y no se ha detectado degradación en suelos esterilizados (Sun et al., 2019).

El uso generalizado de GLY en todo el mundo ha permitido detectar tanto GLY como AMPA en el agua de lluvia (Alonso et al., 2018; Battaglin et al., 2014). A pesar de su relativamente baja volatilidad, la deriva de pulverización y la erosión eólica son las principales fuentes de GLY en la atmósfera, siendo la precipitación su vía de eliminación (Battaglin et al., 2014).

Varios estudios han encontrado GLY y AMPA en agua dulce y sedimentos, principalmente en cuencas asociadas con el cultivo extensivo de OGM, donde las

aplicaciones de GLY se repiten a lo largo del tiempo (Bonansea et al., 2017; Lupi et al., 2019; Primost et al., 2017). Las concentraciones máximas se encontraron después de eventos de lluvia en agua de escorrentía en zonas de cultivo de soja (Didoné & Evrard, 2021).

Algunos estudios muestran que GLY y AMPA poseen un potencial de lixiviación en condiciones de irrigación (Candela et al., 2010). Estas características hacen relevante la necesidad de profundizar en comprender el comportamiento de este herbicida en un cultivo inundado.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar herramientas analíticas y de modelización para estudiar el destino ambiental de plaguicidas en rotaciones arroceras contrastantes utilizando el GLY como caso de estudio.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Validar una técnica de determinación de GLY y AMPA en agua y suelo de cultivo de arroz.
2. Determinar residuos de GLY y su metabolito AMPA en suelo y agua de cultivo de arroz del Experimento a Largo Plazo, Paso de la Laguna, INIA Treinta y Tres.
3. Modelar el destino ambiental de GLY en el ELP, Paso de la Laguna, INIA Treinta y Tres.
4. Proponer herramientas de gestión ambiental aplicables al sector productivo del cultivo de arroz en Uruguay.

2 Determinación de glifosato y AMPA en agua y suelo

2.1 Introducción

El herbicida glifosato (GLY) y su metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA) son dos compuestos que se diferencian de la mayoría de los herbicidas por sus propiedades fisicoquímicas anfotéricas, lo que resulta en su presencia en forma iónica en soluciones acuosas, como puede observarse en la Figura 2.1. Además, estas moléculas tienen la capacidad de interactuar con la materia orgánica presente en el suelo y las partículas suspendidas en el agua (Roberts et al., 1998; You & Koropchak, 2003).

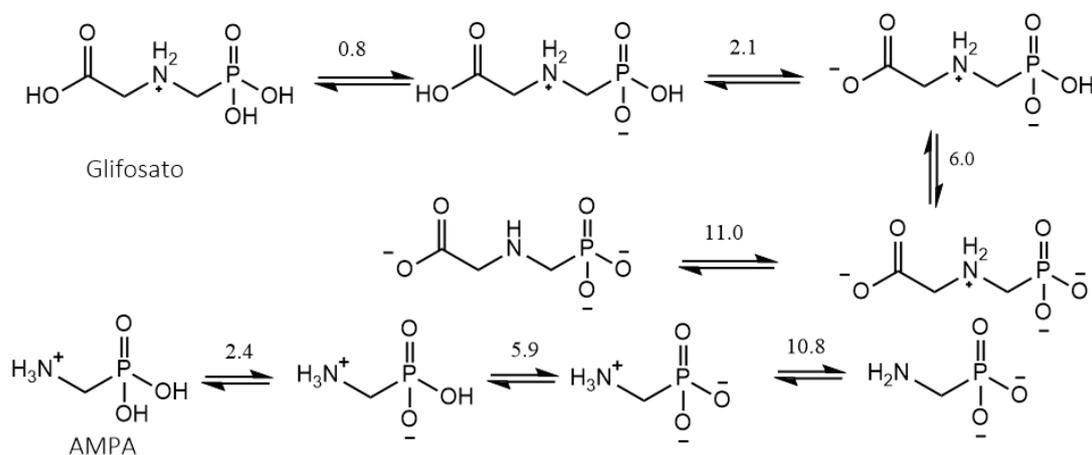


Figura 2.1: Estructuras de GLY y AMPA y sus valores de pKa (adaptado de Ramirez et al., 2014)

La detección y el análisis de GLY y AMPA, mediante los métodos de análisis típicos para plaguicidas, presentan dificultades significativas debido a su carácter iónico y bajo peso molecular (Huhn, 2018; Ulrich & Ferguson, 2021).

Una estrategia eficaz para la detección analítica de GLY y AMPA es la derivatización con FMOC-Cl (ver tabla 2.4). A través de esta reacción se genera los productos GLY-FMOC y AMPA-FMOC, los cuales presentan una mayor masa molar y una disminución en la polaridad en comparación con las moléculas originales. A favor de este método, es que el resultado obtenido facilita su separación cromatográfica y ofrece alta selectividad y sensibilidad analítica, debido a la fluorescencia de los productos derivatizados (ver Figura 2.2). Por el contrario, las desventajas más importantes de la derivatización con

FMOC son la formación de subproductos no deseados como FMOC-OH (Ramirez et al., 2014) y la posible inestabilidad de los productos derivatizados con el tiempo.

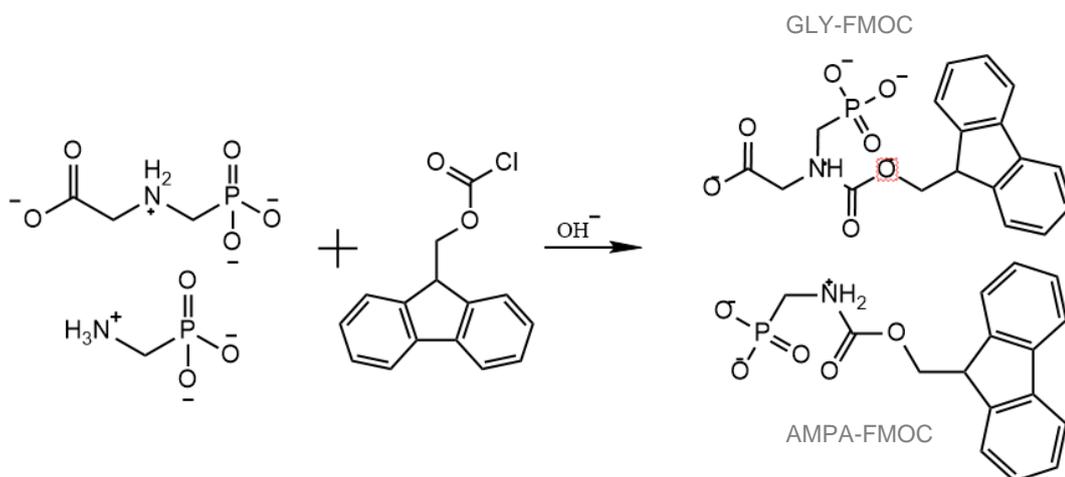


Figura 2.2: Reacción de derivatización de GLY y AMPA con FMOC

El desarrollo de métodos de análisis sencillos, rápidos y económicos para determinar el GLY y AMPA aún es una necesidad (Huhn, 2018). Se han reportado diferentes métodos utilizando detección FLD (ISO, 2008; Mallat & Barceló, 1998; Ramirez et al., 2014). Estos métodos se basan generalmente en los fundamentos de dos métodos oficiales para la determinación de GLY y AMPA en agua: (i) ISO 21458:2008, que propone la derivatización en medio básico antes de la separación cromatográfica (ISO, 2008); y (ii) el Método 547 de la EPA de EE. UU., en el que la derivatización se realiza después de la separación cromatográfica seguida de la detección FLD (Winfield et al., 1990).

La Tabla 2.1 muestra diferentes métodos reportados en agua y suelo mediante derivatización con FMOC, con variaciones en productos químicos, condiciones experimentales y técnicas instrumentales. El método analítico que se presentará a continuación fue publicado en la revista *Methods X* (Alonso et al., 2022). El mismo se basó en el esquema de trabajo del método ISO 21458:2008, considerando la preparación de muestras propuesta por Demonte et al. (2018) para muestras de agua subterránea, la preparación de muestras de suelo propuesta por Lupi et al. (2019) y el análisis de LC-FLD y LC-MS/MS propuesto por Ramirez et al. (2014).

Tabla 2.1: Comparación de técnicas analíticas para la detección de GLY y AMPA en suelo y agua por derivatización con FMOC-Cl. CE: Calibración externa DEE: dietil éter, DV: derivatización AF: Ácido fórmico; ILIS: Estándar interno isotópicamente marcado; NH₄Ac: Acetato de amonio

Matriz	Analito	Preparación de muestra	Sistema instrumental	Columna cromatográfica y fase móvil	Enfoque de cuantificación	LOQ	Ocurrencia en muestras reales	Referencia
Suelo	GLY	5g muestra + KH ₂ PO ₄ + Na ₂ B ₇ O ₄ 40 mM + FMOC-Cl (DV toda la noche)	LC-MS/MS ESI+	C18 (50 mm x 2.1mm i.d. x 1.7µm Gradiente A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY)	10 µg kg ⁻¹	35 - 1502 µg kg ⁻¹	Aparicio et al., 2013
	AMPA					10 µg kg ⁻¹	299 - 2296 µg kg ⁻¹	
Agua superficial	GLY	2mL muestra + KH ₂ PO ₄ + Na ₂ B ₇ O ₄ 40 mM + FMOC-Cl (DV toda la noche)	LC-MS/MS ESI+	C18 (100 mm x 2.1 mm i.d. x 1.8µm) gradiente A)H ₂ O:MeCN(98:2)+0.1%F A B)MeCN+0.1%HCO ₂ H	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY) ¹³ C ¹⁵ N (AMPA)	0.5 µg L ⁻¹	0.5 - 7.6 µg L ⁻¹	Demonte et al., 2018
	AMPA					0.5 µg L ⁻¹	0.5 - 2.6 µg L ⁻¹	
Agua subterránea	GLY	3mL muestra + HCl + KOH + Na ₂ B ₇ O ₄ 40 mM + FMOC-Cl + ACN (2hs DV). DCM cleanup	LC-MS/MS ESI+	C18 (100 mm x 2.1 mm i.d. x 1.8µm) gradiente A)H ₂ O:MeCN(98:2)+0.1%F A B)MeCN+0.1%HCO ₂ H	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY) ¹³ C ¹⁵ N (AMPA)	0.6 µg L ⁻¹	0.6 - 11.3 µg L ⁻¹	Demonte et al., 2018
AMPA	0.2 µg L ⁻¹					0.2 - 6.5 µg L ⁻¹		
Agua superficial, de la canilla y subterránea	GLY y AMPA	3 mL muestra + HCl +KOH + Na ₂ B ₇ O ₄ 50mM+ DEE+ ACN + FMOC-Cl (1h DV) + H ₃ PO ₃ (fin reacción). DEE cleanup	LC-FLD	C18 (250 mm x 3 mm, i.d. x 5µm) gradiente A) KH ₂ PO ₄ 2mM (pH=7) B) MeCN	CE	No reportado	No reportado	ISO, 2008
Suelo	GLY	5g muestra + KH ₂ PO ₄ 0.1M + Na ₂ B ₇ O ₄ 0.1M + FMOC-Cl (DV toda la noche). DCM cleanup	LC-MS/MS ESI+	C18 (50 mm x 2.1mm i.d. x 1.7µm) gradiente A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY)	0.9 µg kg ⁻¹	0.9 - 1.3 µg kg ⁻¹	Ramirez et al., 2014
	AMPA					0.9 µg kg ⁻¹	0.9 - 1.3 µg kg ⁻¹	
Agua de lluvia	GLY	2mL muestra + KH ₂ PO ₄ 0.1M + Na ₂ B ₇ O ₄ 0.1 mM + FMOC-Cl (DV toda la noche). DCM cleanup	LC-MS/MS ESI+	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. x 5µm) gradiente A) MeCN B) 5mM NH ₄ Ac	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY)	0.75 µg L ⁻¹	0.75 - 2.5 µg L ⁻¹	Bonansea et al., 2017
	AMPA					0.75 µg L ⁻¹	0.75 - 7.1µg L ⁻¹	
Agua	GLY	20 ml muestra + liofilizado + Na ₂ B ₇ O ₄ 25 mM + EDTA+ FMOC-Cl (3h DV). Sin cleanup	LC-FLD-MS/MS	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. x 5µm) gradiente A) MeCN B) 5mM NH ₄ Ac	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY)	0.058 µg L ⁻¹	0.44 - 59.9 µg L ⁻¹	Yang et al., 2015
AMPA	0.108 µg L ⁻¹					1.15 - 9.09 µg L ⁻¹		
Agua superficial	GLY	1 mL muestra + Na ₂ B ₇ O ₄ 400 mM + FMOC-Cl +MeCN (DV toda la noche)	LC-MS	C 18 (75 mm x 4.6 mm, i.d. 3µm), gradiente A) MeOH B) NH ₄ Ac 5Mm	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY)	1 µg L ⁻¹	17.5 - 125 µg L ⁻¹	Yang et al., 2015
	AMPA					1 µg L ⁻¹	1 - 4.8 µg L ⁻¹	

Suelo	GLY	2 g muestra +KOH 0.6 M + HCl+ Na ₂ B ₇ O ₄ 5% + FMOC-Cl + ACN (30 min) + AF conc.	LC-MS/MS ESI-	C18 (150 mm x 2.1mm i.d. x 3.5µm) gradiente A) NH ₄ Ac 5Mm (pH=9) B) MeOH:H ₂ O (9:1)	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY) ¹³ C ¹⁵ N (AMPA)	50 µg kg ⁻¹	200 - 2129 µg kg ⁻¹	
	AMPA					50 µg kg ⁻¹	110 - 1270 µg kg ⁻¹	
Agua de la canilla	GLY	1 mL muestra + Na ₂ B ₇ O ₄ 5% + FMOC-Cl +ACN (30 min) + AF				10 µg L ⁻¹	170 - 2900 µg L ⁻¹	
	AMPA					10 µg L ⁻¹	10 - 80 µg L ⁻¹	
Agua superficial	GLY	5 mL muestra + Na ₂ B ₇ O ₄ 0.1M + FMOC-Cl (DV toda la noche) + SPE en línea	LC-MS/MS ESI-	C18 (150 mm x 2.0 mm i.d. x 5µm) gradiente A) (NH ₄) ₂ CO ₃ B) MeOH	ILIS 1,2- ¹³ C ¹⁵ N (GLY) ¹³ C ¹⁵ N (AMPA)	0.005 µg L ⁻¹	0.005 - 2.5 µg L ⁻¹	Poiger et al., 2017
	AMPA					0.005 µg L ⁻¹	0.005 - 2.6 µg L ⁻¹	
Suelo	GLY	5 g muestra +KH ₂ PO ₄ 0.1 M + Na ₂ B ₇ O ₄ 0.1M + FMOC-Cl +ACN (1h DV).DCM cleanup	LC-MS/MS ESI-	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. x 5µm), gradiente A) MeCN B) NH ₄ Ac 1mM (pH=9.5)		50 µg kg ⁻¹	50 - 825 µg kg ⁻¹	
	AMPA					50 µg kg ⁻¹	238 - 1182 µg kg ⁻¹	
Agua superficial	GLY	3mL muestra + Na ₂ B ₇ O ₄ 25 mM + FMOC-Cl +ACN(1h DV)-DCM cleanup	LC-FLD	C18 (250 mm x 4.6 mm, i.d. 5µm) gradiente A) MeCN B) NH ₄ Ac 1mM (pH=9.5)	CE	0.25 µg L ⁻¹	0.25 - 14.6 µg L ⁻¹	Este trabajo
	AMPA					1 µg L ⁻¹	1 - 36.6 µg L ⁻¹	
	GLY		1 µg L ⁻¹					
	AMPA		1 µg L ⁻¹	-				

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sustancias y reactivos

GLY (99.4%), AMPA (99%), GLY-FMOC (98%), así como el reactivo de derivatización FMOC-Cl (cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 99%), fueron adquiridos a través de HPC Standards GmbH (Cunnersdorf, Alemania). Los solventes diclorometano (DCM), acetonitrilo (ACN) y metanol de calidad LC, se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua ultrapura se obtuvo mediante un Smart2Pure 3 UV de Thermo Scientific (Massachusetts, EE. UU.). Las soluciones patrón de GLY y AMPA se prepararon con agua ultrapura utilizando las sustancias estándar a una concentración de 2000 mg L⁻¹. Las soluciones de trabajo se prepararon mediante dilución apropiada de las soluciones patrón con agua ultrapura. La solución de derivatización se preparó en ACN a una concentración de 6 g L⁻¹ (23 mM) de FMOC-Cl. Las soluciones de trabajo y de derivatización se almacenaron en la oscuridad a 4±2 °C. El borato de sodio decahidratado (Na₂B₄O₇ · 10H₂O), el fosfato monopotásico (KH₂PO₄), el acetato de amonio (NH₄CH₃CO₂) y el hidróxido de amonio (NH₄OH) de calidad analítica se suministraron a través de Carlo Erba (Cornaredo, Italia). Las soluciones de estos reactivos se prepararon por separado en agua ultrapura a las siguientes concentraciones: 100; 10; 1,0; 0,50 mg L⁻¹.

2.2.2 Muestreo, almacenamiento y muestras de blancos

Se obtuvieron muestras blanco de agua dulce de un campo productivo ubicado en una zona de pastizales naturales para ganado (34°15'29"S 54°57'09.9"W). Las muestras blanco de suelo se tomaron en una zona próxima al ELP (33°6'23"S, 54°10'24"W) donde nunca se han realizado aplicaciones de GLY. Igualmente, la ausencia de GLY y AMPA en ambas matrices se verificó experimentalmente mediante LC-FLD y LC-MS/MS.

Se tomó una muestra representativa de aproximadamente 500 g de suelo. La muestra se redujo mediante molienda y cuarteo para obtener una submuestra homogénea de aproximadamente 40 g, que se liofilizó y se almacenó en bolsas de polietileno a -18 °C hasta su análisis. Para el caso del agua, se obtuvo una submuestra representativa de 40

mL en tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL y se mantuvo a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todas las submuestras se conservaron en la oscuridad hasta el análisis. No se encontraron evidencias de degradación al volver a analizar las muestras después de 3 meses de almacenamiento congelado.

2.2.3 Preparación de muestras de agua

La preparación de muestras de agua se basó en la propuesta por Demonte en el año 2018. Se toma una alícuota de 3,0 mL de agua dulce y se transfiere a un tubo de centrífuga de 50 mL. Luego es sonicado en un baño ultrasónico durante 3 minutos. Se agrega 0,5 mL de una solución de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a 25 mM, 0,5 mL de FMOC-Cl $6,0\text{ g L}^{-1}$ (0,023 M) y 0,5 mL de ACN. Se agita manualmente y luego en vortex durante 30 s, para dejar reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente ($22 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente se agrega 4,5 mL de DCM, nuevamente agitando de forma manual y luego en vortex durante 30 s. Finalmente se filtra 1,0 mL del sobrenadante a través de un filtro de PVDF de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ y se recolecta en un vial de 2,0 mL con tapa de rosca para el análisis por LC-FLD y LC-MS/MS.

2.2.4 Preparación de muestras de suelo

En cuanto a las muestras de suelo, se siguió el procedimiento propuesto por Lupi en 2019. En primer lugar, se pesan 5,0 g de muestra de suelo liofilizada en un tubo de centrífuga de 50 mL, se agregan 10 mL de una solución de KH_2PO_4 0,1 M y se sonica durante 30 min para favorecer la extracción. Luego se centrifuga a 4000 rpm durante 5 min, se filtran 2,0 mL del sobrenadante a través de un filtro de PVDF de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ a los cuales se agregan 2,0 mL de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M. Se transfiere una alícuota de 3,5 mL a un tubo de centrífuga de 50 mL y se agregan 0,5 mL de FMOC-Cl 6 g L^{-1} y 0,5 mL de ACN. Se agita manualmente y luego en vortex durante 30 s. Luego se deja que reaccione durante 1 hora a temperatura ambiente ($22 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente se agregan 4,5 mL de DCM y se agita de forma manual y luego en vortex durante 30 segundos. Finalmente se filtra

1,0 mL del sobrenadante a través de un filtro de PVDF de 0,45 μm y se recolecta en viales con tapa de rosca de 2,0 mL para el análisis por LC-MS/MS.



Figura 2.3: Esquema de la preparación de muestra en ambas matrices

2.2.5 Instrumentos

2.2.5.1 Cromatografía líquida con detección de fluorescencia

Se utilizó un sistema Thermo Scientific Ultimate 3000 LC acoplado a un detector de fluorescencia Thermo Scientific FLD 3400RS para el análisis de GLY y AMPA en muestras de agua dulce. Se empleó una columna Thermo Scientific Hypersil Gold C18 (250 mm x 4,6 mm id, 5 μm). La temperatura del horno de la columna se estableció en 30 °C. La fase móvil consistió en (A) buffer de acetato de amonio de 5 mM (pH = 9,5), cuyo pH se ajustó con una solución diluida de NH_4OH , y (B) ACN calidad cromatografía líquida. La separación se realizó a un caudal de 1 mL min^{-1} con el siguiente programa de elución: comienza con 5% de B, cambiando gradualmente hasta alcanzar el 19% de B a los 6 minutos y se mantiene estable durante 4 minutos, luego se aumenta al 95% en 2 minutos y se mantiene estable durante 7 minutos. El programa finaliza disminuyendo la

concentración de ACN (B) al 5% para estabilizar la columna. El volumen de inyección fue de 10 μL . Para la limpieza de la jeringa, se utilizó un volumen de lavado de 1 mL de metanol después de cada inyección. El detector operó en longitudes de onda fijas (λ de excitación: 270 nm, λ de emisión: 315 nm), con una adquisición de fluorescencia programada de 5 a 10 minutos con un factor de sensibilidad de 2 para GLY y entre 10 y 13 minutos con un factor de sensibilidad de 3 para AMPA. Se empleó el software Chromeleon v.7.2.9 de Thermo Scientific para el control del instrumento y el procesamiento de datos.

2.2.5.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

Para el análisis LC-MS/MS, se utilizó un sistema Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem AB Sciex 4000 QTRAP (Concord, Canadá) operado en modo de adquisición MS/MS programada. El sistema estaba equipado con una fuente de electrospray (ESI) Turbo V operada en modo de ionización negativa. Se empleó una columna ZORBAX Eclipse XBD-C18 de Agilent Technologies (150 mm x 4,6 mm id, 5 μm). La separación se realizó a 20 °C utilizando la misma fase móvil y gradiente que en el análisis por LC-FLD, con un caudal constante de 0,6 mL min^{-1} . El volumen de inyección fue de 5 μL . La detección en tándem MS se realizó utilizando el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) con ionización negativa por ESI. Las condiciones óptimas de MRM se optimizaron mediante inyección directa en la fuente ESI. La temperatura de la fuente se estableció en 500 °C, el voltaje de ionización fue de 500 V, el gas de cortina fue nitrógeno a 20 psi y el gas nebulizador fue nitrógeno a 50 psi. Se utilizó MRM programado con una ventana de detección de 90 s que cubría el tiempo de retención esperado (t_R (min)) de ambos analitos. Se utilizó el software Analyst v 1.7.1 para el control del instrumento y el procesamiento de datos. En la Tabla 2.2 se describen transiciones adquiridas para GLY-FMOC y AMPA-FMOC.

Tabla 2.2: Condiciones de adquisición en LC-MS/MS para ambos compuestos. Q: transición utilizada para cuantificación; q: transición utilizada para identificación DP: potencial de declustering; CE: energía de colisión

Analito	tR (min)	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	DP (V)	CE (V)
GLY-FMOC	6,5	390	Q: 168	-35	-17
			q: 150	-35	-36
AMPA-FMOC	10,5	332	Q: 110	-30	-11
			q: 136	-30	-23

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Optimización de las condiciones instrumentales

Se evaluó el desempeño de LC-FLD y LC-MS/MS para la detección y cuantificación de GLY y AMPA, considerando que el LC-FLD es una técnica analítica altamente difundida, mientras que LC-MS/MS es una técnica estándar y robusta, aplicada en la mayoría de los laboratorios de residuos de plaguicidas.

Debido a las características anfotéricas de GLY y AMPA, se evaluó diferentes condiciones de fase móvil. En la bibliografía, se puede encontrar el uso de gradientes en un medio ácido con la adición de ácido fórmico (Demonte et al., 2018) o un medio básico como soluciones de acetato de amonio (Aparicio et al., 2013; Bonansea et al., 2017; Ramirez et al., 2014). Se seleccionó las condiciones de fase móvil propuestas por Ramírez et al. (2014), en las cuales un pH = 9,5 permite la forma aniónica de GLY-FMOC y AMPA-FMOC, asegurando una elución temprana de los compuestos de interés y aumentando el tiempo de retención de las interferencias neutras y subproductos de FMOC. Esta fase móvil también obtuvo una buena resolución cromatográfica (R_s) con respecto a las interferencias más cercanas a los picos de señal de GLY-FMOC ($R_s = 13,97$) y AMPA-FMOC ($R_s = 2,33$), como se muestra en la Fig.2.4.

Se encontró una variación suave del pH de la fase móvil y un cambio en el tR, probablemente debido a la volatilización de NH_3 durante secuencias analíticas prolongadas. En la Figura 2.5 se observa la variación en el tR en dos cromatogramas correspondientes a la misma muestra con una diferencia de 6 horas entre los análisis.

Por lo tanto, la precisión del ajuste del pH de la fase móvil y su preparación diaria son críticas para reducir la variabilidad en el tR de cada batch analítico.

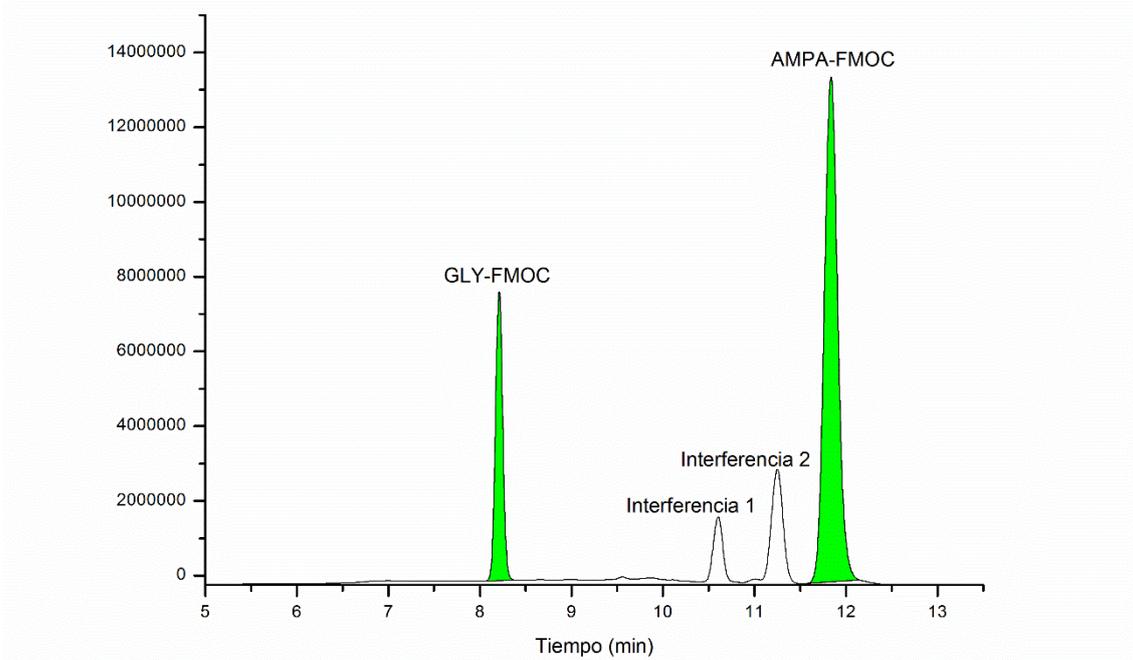


Figura 2.4: Cromatograma de GLY ($t_R=8,3$ min) y AMPA ($t_R=11,8$ min) en agua fortificada a $5 \mu\text{gL}^{-1}$ por LC-FLD

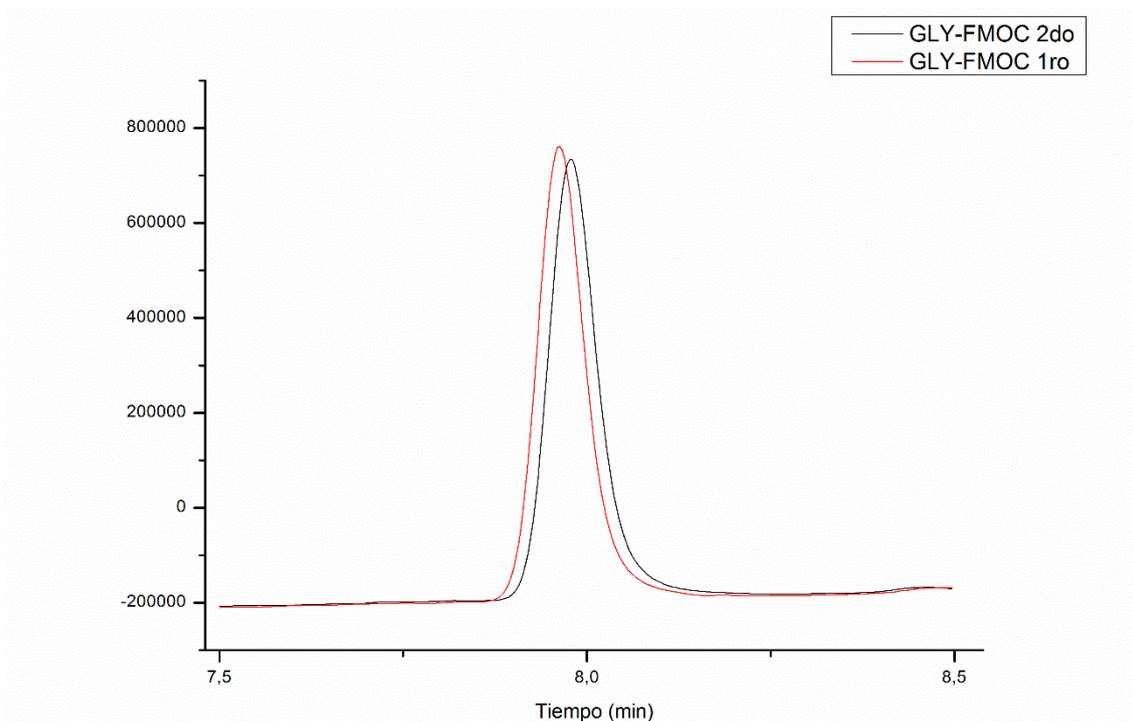


Figura 2.5: Diferencias en el tR de GLY en dos inyecciones de la misma muestra con 6 horas de diferencia

Tanto GLY-FMOC como AMPA-FMOC son propensos a *carry-over* (efecto de arrastre) en el módulo de inyección. Este problema se minimizó utilizando un solvente de limpieza del sistema de inyección con gran polaridad como el metanol; también se aumentó el volumen de enjuague utilizado para la limpieza entre inyecciones a 1 mL después de cada inyección. Para disminuir el efecto *carry-over* en el sistema, después de la elución de los analitos, el gradiente de fase móvil tiene una etapa final en la que la composición del solvente orgánico se maximiza para eliminar subproductos de derivatización.

El detector de fluorescencia utilizado permite el uso de diferentes canales de adquisición con longitudes de onda variables y factores de sensibilidad del fotomultiplicador. Estos factores se ajustaron para cada analito, empleando un factor de sensibilidad más alto para la detección de AMPA-FMOC en comparación con la detección de GLY-FMOC.

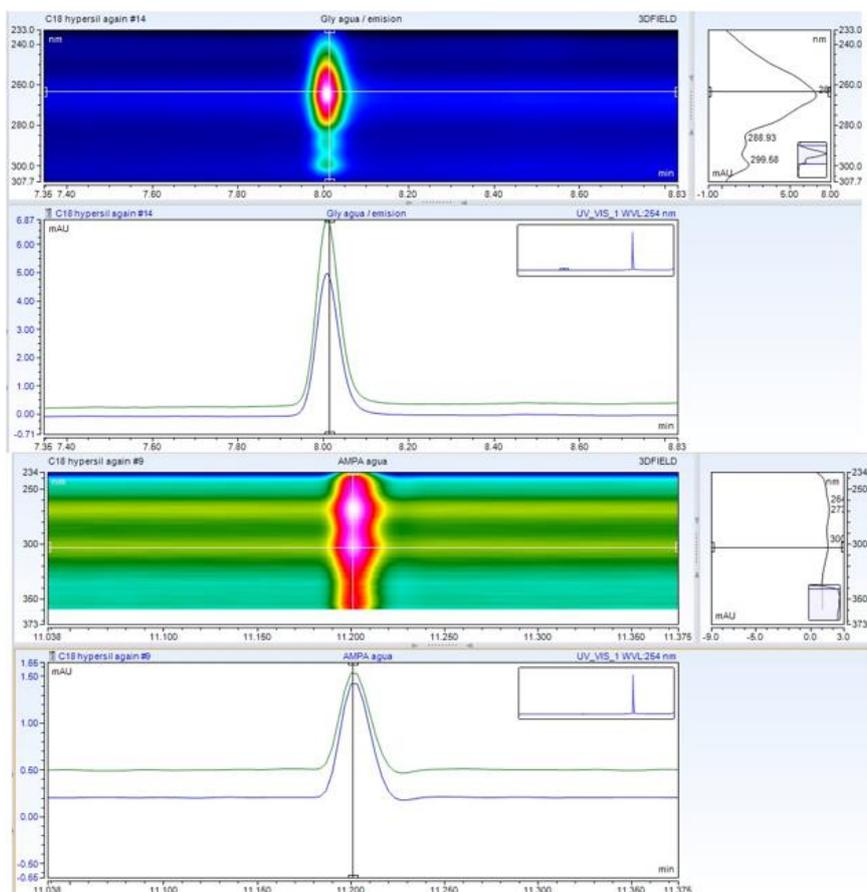


Figura 2.6: Cromatogramas de GLY (arriba) y AMPA (abajo) con detección por 3D por FLD

De esta forma, se obtuvo una buena selectividad de detección para ambos compuestos en agua. En el caso del suelo, la detección por FLD permite determinar solo GLY-FMOC. Se presentó algunas interferencias de los subproductos de reacción de la matriz del suelo con el mismo tR que AMPA-FMOC (figura 2.7). Si bien se probaron diferentes gradientes y fases estacionarias, no se logró separarlos.

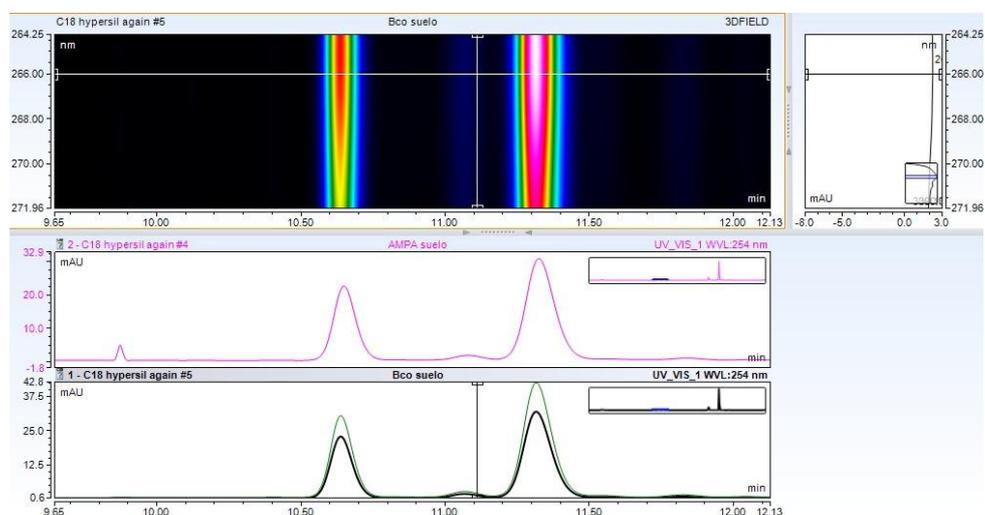


Figura 2.7: Detección de impurezas en matriz suelo en muestra fortificada con AMPA y muestra blanco. Las impurezas se solapan con AMPA-FMOC al mismo tR.

Las condiciones cromatográficas para LC-MS/MS fueron idénticas a las seleccionadas para LC-FLD (ver cromatograma LC-MS/MS en la Fig. 2.8). En este caso, debido a la mayor selectividad de MS/MS, la etapa de lavado prolongada de la columna LC se acortó para reducir el tiempo de ejecución. Las condiciones de adquisición LC-MS/MS para ambos compuestos se muestran en la tabla 2.2 para el modo de ionización negativo de ESI. Estas condiciones MRM se optimizaron utilizando GLY-FMOC y AMPA-FMOC preparados por separado en el laboratorio con una concentración de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$.

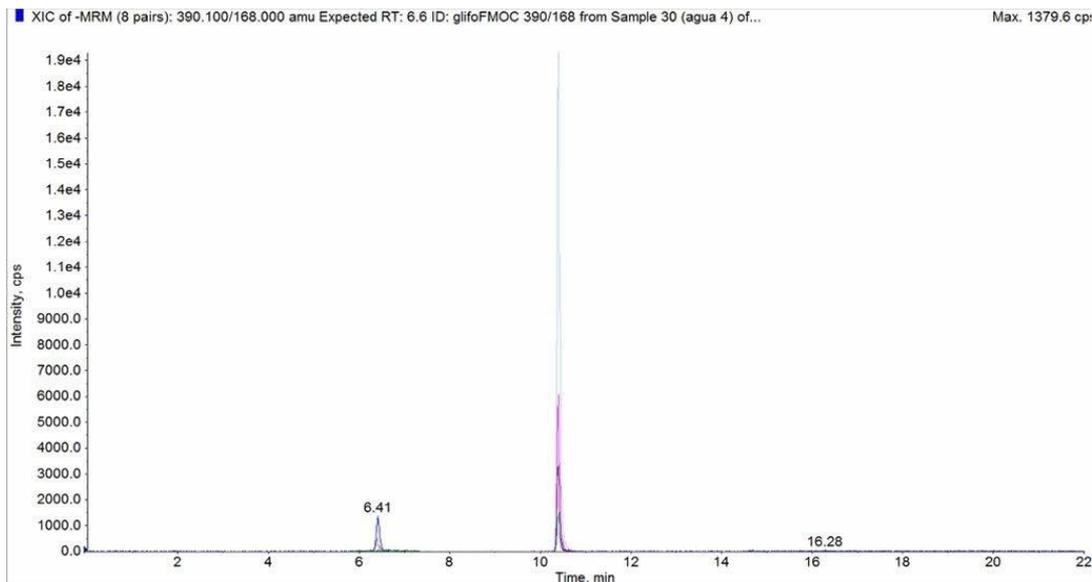


Figura 2.8: Cromatograma de una muestra de agua fortificada a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ por LC-MS/MS

2.3.2 Optimización de la preparación de muestra

En la preparación de muestra se utilizó material desechable de plástico siempre que fue posible y viales de vidrio luego de la derivatización, dado que para el análisis de GLY no se recomienda el uso de materiales de vidrio ya que se conocen posibles pérdidas por adsorción (ISO, 2008).

Demonte et al., (2018), presentó una metodología para determinar GLY y AMPA en agua subterránea, cuya preparación de muestra requiere un paso de pre-acondicionamiento mediante acidificación fuerte de la muestra con ácido clorhídrico, para reducir la interacción de cationes multivalentes con el comportamiento anfotérico de GLY y AMPA. En este caso, al tratarse de agua dulce superficial de río e inundación de cultivo es posible evitar este paso. Para comprobarlo, esta estrategia simplificada se probó en diferentes fuentes de agua dulce sin evidencia de perturbación de la matriz, si se evita el pretratamiento de acidificación.

Con respecto a la reacción de derivatización, en la literatura se encuentran diferencias, principalmente en el tiempo y la temperatura requeridos. Se ha registrado autores que han realizado la derivatización con FMOC-Cl por 30 minutos (Bonansea et al., 2017) y otros durante toda la noche (Lupi et al., 2019). Por lo tanto, se realizó una evaluación

exploratoria de las condiciones óptimas para la reacción a 3 temperaturas diferentes (22 °C, 30 °C y 45 °C) y tiempos de reacción (30, 60 y 120 minutos). Después de 60 minutos de reacción, no se encontraron diferencias significativas en las áreas obtenidas para los tratamientos (prueba de ANOVA, $p = 0,51$; $\alpha 0,5\%$). Luego, se seleccionaron las condiciones más favorables para un flujo de trabajo de laboratorio, dejando la reacción a temperatura ambiente (22 ± 3 °C) durante 60 minutos (Fig. 2.9). Estas condiciones son de suma importancia para un método de rutina de alto rendimiento para la determinación de GLY.

Con respecto a la estabilidad de los productos de derivatización GLY-FMOC y AMPA-FMOC, se ha reportado que pueden alcanzar los 10 días (Druart et al., 2011). No obstante, se observó disminuciones en la altura y el área del pico al analizar los mismos viales en diferentes días. Para confirmarlo, se volvió a analizar una curva de calibración almacenada durante 7 días a temperatura ambiente en la oscuridad. Se evidenció una disminución del área de GLY-FMOC del 5,0%, mientras que para AMPA-FMOC fue del 10%. En base a estos resultados, las secuencias de análisis fueron derivatizadas para cada día de trabajo, incluyendo blancos, estándares de calibración, controles de calidad y muestras, para ser analizarlos en la misma secuencia analítica.

Con el objetivo de facilitar la preparación de muestra, se utilizó diclorometano en lugar de éter etílico en el paso de limpieza como propone el método ISO 21458:2008. El diclorometano, al ser más denso que una solución acuosa, permite una separación rápida de fases para el muestreo directo de alícuotas desde la fase superior. El esquema

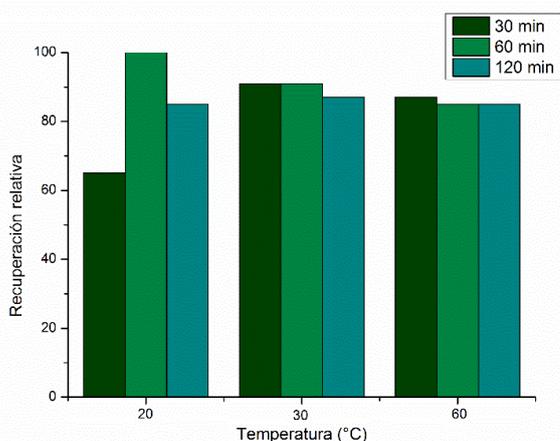


Figura 2.9: Evaluación exploratoria de la recuperación de GLY-FMOC en diferentes condiciones de reacción

final de la preparación de muestras en ambas matrices puede observarse en la Figura 2.3.

2.3.3 Validación de la técnica analítica

La validación fue realizada utilizando calibración externa, que se puede efectuar con muestras blanco representativas adecuadas, mientras que la norma ISO 21458:2008 sugiere un método de adición estándar. En experimentos preliminares, se estudió la selectividad y especificidad de LC-FLD en muestras naturales de agua dulce y agua ultrapura.

Se probó la linealidad de LC-FLD, para GLY, en el rango de 0,25 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ y entre 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, para AMPA. Las curvas de calibración de GLY-FMOC y AMPA-FMOC se obtuvo agregando GLY y AMPA en diferentes niveles. Estos estándares de calibración se sometieron al procedimiento analítico completo y se corrigieron finalmente por recuperación. Para LC-FLD, el nivel de calibración más bajo (LCL) con una relación señal-ruido (S/N) > 10 se seleccionó como el *límite de cuantificación* (LOQ). El LOQ fue de 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLY y 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA.

El efecto de matriz en agua dulce para ambos compuestos fue del 4,0%. La repetibilidad instrumental se analizó por triplicado en los niveles de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, obteniendo una desviación estándar relativa (RSD, %) en el tR del 0,16% para ambos compuestos. La repetibilidad intra-día fue del 4,0%, para ambos compuestos, para un analista. En el caso de la repetibilidad inter-día, el procedimiento se realizó por dos analistas diferentes en el lapso de una semana. En este caso, la RSD para GLY y AMPA fue del 5,0%. La Tabla 2.3 muestra los resultados de validación obtenidos para el análisis de agua por LC-FLD.

Tabla 2.3: Cifras de mérito en agua superficial por LC-FLD

Agua superficial				
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango dinámico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz (%)	Repetibilidad RSD (%)
GLY	0,25	0,25-100	4	4
AMPA	1	1-100	4	4

La identificación por LC-FLD se basa únicamente en el tR. Por otro lado, LC-MS/MS permite la identificación de GLY y AMPA basada en el tR de iones específicos de GLY-FMOC y AMPA-FMOC y su abundancia relativa. Para el análisis de agua superficial, se encontró que la detección por FLD tiene una sensibilidad mayor que MS/MS, alcanzando también valores de LOQ más bajos en el caso de GLY. Para la matriz del suelo, LC-FLD permitió el análisis de GLY-FMOC, sin lograr la separación cromatográfica de AMPA-FMOC de otros picos irresolubles. Este resultado persistió a pesar de haber probado diferentes pasos de limpieza y columnas cromatográficas.

Dada la falta de selectividad de AMPA-FMOC para el análisis de suelo por LC-FLD, la validación de los residuos de GLY y AMPA en el suelo se realizó únicamente por LC-MS/MS. En el caso del suelo, se probó la linealidad para ambos analitos en el rango de 50 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para LC-MS/MS. De manera similar a las muestras de agua superficial, las curvas de calibración se corrigieron por recuperación analítica. Aquí, se seleccionó LCL como LOQ a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La repetibilidad intra-día se evaluó para un analista ($n = 4$) y fue del 4,0% para ambos compuestos. La repetibilidad inter-día se realizó por dos analistas con una diferencia de una semana, obteniendo una RSD del 12.0% para GLY y 13.0% para AMPA. La Tabla 2.4 muestra los resultados de validación recabados para el análisis de agua y suelo por LC-MS/MS. Se encontró una fuerte supresión iónica en la matriz del suelo para ambos derivados. El efecto matriz se estimó en -90% y -88% para GLY-FMOC y AMPA-FMOC, respectivamente. Basándonos en estos resultados, se recomienda el uso de calibración coincidente con la matriz para el análisis de suelo.

Tabla 2.4: Cifras de mérito en agua superficial y suelo para LC-MS/MS

Agua superficial				
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango dinámico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz (%)	Repetibilidad RSD (%)
GLY	1	1-100	0,3	5
AMPA	1	1-100	-1,6	3
Suelo				
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango dinámico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Efecto matriz (%)	Repetibilidad RSD (%)
GLY	50	50-100	-90	12
AMPA	50	50-100	-88	12

Una de las principales dificultades es la falta de estándares comerciales de GLY-FMOC y AMPA-FMOC. Actualmente, solo está disponible el estándar de GLY-FMOC de grado analítico que, además, se encontró es inestable en solución acuosa. En otros trabajos utilizan estándar interno isotópicamente etiquetado (ILIS) para MS/MS (ver Tabla 2.1), en este caso, para disminuir el costo del análisis se utilizó calibración externa de GLY y AMPA, preparando derivados de FMOC con blancos y muestras fortificadas.

Los LOQ obtenidos son competitivos y adecuados para el análisis de muestras ambientales, tanto en condiciones de FLD como de MS/MS. En la tabla 2.1 se presenta una comparación de los LOQ para diferentes técnicas reportadas utilizando derivatización con FMOC.

2.4 Conclusiones

En esta etapa de investigación se validó una técnica analítica para la determinación de GLY y AMPA en agua superficial por derivatización con FMOC, siendo complementarias la detección por FLD y MS/MS, en términos de capacidades cualitativas y cuantitativas.

Por otra parte, la falta de selectividad de FLD para el análisis de AMPA en suelo representa la principal limitación para la determinación en esa matriz, validándose la técnica analítica para ambos compuestos en suelo mediante detección por MS/MS.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que el FLD ofrece un enfoque sensible, robusto y económico para laboratorios que buscan analizar GLY en agua, en un entorno de rutina. Esto se debe a que por detección FLD fue posible alcanzar LOQ más bajos para la cuantificación de GLY en agua superficial. Asimismo, los flujos de trabajo deben ser respaldados por una confirmación de residuos basada en MS/MS.

3 Decaimiento de GLY y AMPA en rotaciones arroceras contrastantes

3.1 Introducción

En Uruguay la producción de arroz se caracteriza por la rotación regular de pasturas para ganado. El sistema arrocero tradicional alterna 1-2 años de cultivo de arroz con 3-4 años de pasturas. Estos sistemas de rotación proporcionan beneficios significativos, como el mantenimiento de altos niveles de productividad, la preservación de la calidad del suelo y la diversificación de las fuentes de ingresos agrícolas (Pittelkow et al., 2016). La gestión del agua desempeña un papel crucial en este contexto, ya que el arroz se cultiva bajo riego continuo por inundación, utilizando agua de fuentes naturales (Cantou et al., 2010). Sin embargo, recientemente se han incluido rotaciones anuales con otros cultivos como soja y sorgo (Tseng et al., 2020). Estas rotaciones incluyen un uso masivo de insumos, con posibles impactos ambientales relacionados con la escorrentía de nutrientes y pesticidas.

El cultivo de arroz es un sistema particular para evaluar el destino ambiental de los plaguicidas utilizados, dado que la irrigación por inundación transforma las condiciones aeróbicas del suelo en un entorno anaeróbico, ya que desencadena diversos procesos químicos y microbiológicos. Al mismo tiempo, herbicidas como el GLY suelen aplicarse en las etapas previas a la siembra del arroz, como barbecho químico. Como resultado, se plantea la hipótesis de un decaimiento diferencial del GLY desde las fases aeróbicas (pre-siembra, siembra y emergencia) hasta las fases anaeróbicas (etapa de inundación) y nuevamente aeróbicas (cosecha), así como niveles diferenciales de residuos de GLY en distintos escenarios de intensificación del cultivo de arroz.

El propósito principal de este capítulo es evaluar la dinámica del GLY a lo largo del ciclo del cultivo de arroz, con foco en las interacciones entre el agua y el suelo durante la inundación, así como en la degradación del GLY a AMPA en ambos compartimentos.

El comportamiento de ambos compuestos fue analizado en cuatro escenarios de intensificación distintos en la fase de cultivo de arroz, comparando la cinética de GLY y AMPA en las diferentes rotaciones.

En base a este capítulo se está escribiendo un manuscrito con el objetivo de ser publicado.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Sitio de estudio y gestión del cultivo

El experimento a largo plazo (ELP) de rotaciones arroceras se encuentra ubicado en la Estación Experimental INIA Paso de la Laguna en Treinta y Tres, Uruguay (33°6'23" S, 54°10'24" O; ubicado a 22 m sobre el nivel del mar) con suelos representativos de la cuenca de la Laguna Merín, en donde se siembra más de 60 % del arroz del Uruguay. Se estableció en 2012 en un suelo donde previamente se cultivó el sistema de rotación arroz-pastura durante 34 años (Macedo et al., 2022; Terra, 2017).

El sitio donde se encuentra establecido el ELP se caracteriza por un suelo Argiaboll con una pendiente inferior al 0,5%. Las características específicas del suelo se presentan en la tabla 3.1:

Tabla 3.1: Propiedades del suelo superficial (0-15 cm) en el ELP (Macedo et al., 2022)

Característica	Valor
Arcilla, g kg ⁻¹	300
Limo, g kg ⁻¹	510
Arena, g kg ⁻¹	190
Densidad, g cm ⁻³	1,25
pH	5,7
K, cmol kg ⁻¹	0,25
Ca, cmol kg ⁻¹	7
Mg, cmol kg ⁻¹	2,8
Na, cmol kg ⁻¹	0,35
P (Bray I), mg kg ⁻¹	10,3

Este experimento tiene como objetivo evaluar seis intensidades de sistemas de cultivo de arroz bajo condiciones de siembra directa; cuenta con 60 parcelas de 0,115 ha, en las que todas las fases de los sistemas de rotación se encuentran presentes con tres repeticiones, dispuestas en un diseño de bloques al azar.

Como puede observarse en la tabla 3.2, los escenarios de intensidad de cultivo se diferencian en función de la proporción de la duración en el tiempo de las diferentes fases.

Tabla 3.2: Sistema de rotaciones de cultivos en el ELP, calendario estacional y anual (P-V: primavera/ verano; O-I: otoño/invierno. CC indica cultivo de cobertura

Diferentes rotaciones arroceras	1er año		2do año		3er año		4to año		5to año	
	P-V	O-I	P-V	O-I	P-V	O-I	P-V	O-I	P-V	O-I
Arroz continuo (R1)	Arroz	CC	Arroz	CC	Arroz	CC	Arroz	CC	Arroz	CC
Arroz - otros cultivos (R2)	Arroz	CC	Soja	CC	Arroz	CC	Sorgo	CC	Arroz	CC
Arroz – pastura corta (R3)	Arroz	Pastura corta		Arroz	Pastura corta		Arroz	Pastura		
Arroz – pastura larga (R4)	Arroz	CC	Arroz	Pastura larga						
Arroz – soja – pastura (R5)	Arroz	CC	Soja	CC	Soja	CC	Arroz	Pastura corta		
Arroz – soja (R6)	Arroz	CC	Soja	CC	Arroz	CC	Soja	CC	Arroz	CC

Se seleccionaron cuatro rotaciones contrastantes en el uso del suelo, definidas en base a la duración de la fase pastura versus arroz y otros cultivos en la rotación. A saber:

R1. arroz continuo: es un sistema de intensificación extrema y es tomado como referencia. En Uruguay no está permitido este sistema de cultivo, pero es característico del Sudeste Asiático;

R3. arroz-pastura a corto plazo: con 1,5 años de pastura para ganadería luego de la cosecha de arroz;

R4. arroz-pastura a largo plazo: con dos años de arroz (R4₁ seguido de R4₂) seguido de 3,5 años de pastura para ganadería, representando la rotación tradicional de Uruguay;

R6. arroz-soja: como el primer paso hacia la intensificación al alternar arroz con cultivo de secano, en este caso soja. Esta práctica ya se realiza en Uruguay y es común en el sur de Brasil. Esta rotación representa un escenario de intensificación de creciente aumento en superficie en Uruguay.

En todos los casos, luego de la cosecha de arroz o soja, fueron sembrados *Trifolium alexandrinum* y *Lolium multiflorum* como cultivos de cobertura. El manejo del cultivo sigue las recomendaciones del Programa de Arroz del INIA, utilizando maquinaria similar a la utilizada por los agricultores, a nivel productivo, para todas las operaciones (siembra, fertilización, aplicación de pesticidas, ganadería y cosecha). El equipo del Programa de Arroz del INIA registra las prácticas realizadas y los resultados obtenidos en cada zafra.

La evaluación de esta investigación se centró en las parcelas donde se cultivó arroz durante la cosecha 2019/2020, lo que resultó en un total de 15 parcelas, evaluadas desde setiembre de 2019 hasta abril de 2020.

3.2.2 Aplicaciones de glifosato

Las aplicaciones de GLY se realizaron siguiendo escenarios reales para la producción de arroz. Las parcelas que utilizaron cultivos de cobertura después de la cosecha previa (R1, R4₂, R6) recibieron la primera aplicación de GLY como barbecho químico el 24/9/2019. Las parcelas donde el cultivo previo fue pastura (R3, R4₁) recibieron la primera aplicación de GLY 19 días antes, el 05/09/2019.

En ambas fechas, la aplicación del barbecho químico se realizó a una tasa de 2,17 kg ha⁻¹ de GLY como equivalente ácido de Glifoweed y 2,0 kg ha⁻¹ de Power Rango en las parcelas de 1^{er} año de R4; ambas formulaciones fueron adquiridas en la empresa Cibeles, Uruguay. En todas las parcelas se realizó una aplicación pre-emergencia de arroz el 26/10/2019 con una tasa de 1,68 kg ha⁻¹ de GLY como equivalente ácido de Glifoweed. Las aplicaciones de GLY se resumen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Calendario y tasas de aplicación de GLY en la zafra 2019/2020

Rotación	1er aplicación – Barbecho químico			2da aplicación – Pre-emergencia	
	Fecha	Tasa de aplicación Glifoweed (kg ha ⁻¹ eq ácido)	Tasa de aplicación Power Rango (kg ha ⁻¹ eq ácido)	Fecha	Tasa de aplicación Glifoweed (kg ha ⁻¹ eq ácido)
Arroz (R1)	24/09/2019		0		
Arroz-pastura corta (R3)	05/09/2019		0		
Arroz-pastura larga 1er año (R4 ₁)	05/09/2019	2,17	2,0	26/10/2019	1,68
Arroz-pastura larga 2do año (R4 ₂)	24/09/2019		0		
Arroz-soja (R6)	24/09/2019		0		

3.2.3 Condiciones de riego

El riego se llevó a cabo mediante inundación, utilizando agua bombeada desde el río Olimar. La irrigación se realizó dos veces por semana a partir del 3/12/2019, manteniendo una lámina de agua de 10 cm por encima del suelo, finalizando el 25/3/2020 y permitiendo que el agua restante se evapore antes de la cosecha.

3.2.4 Condiciones meteorológicas

Los datos meteorológicos en el ELP fueron obtenidos del Banco de datos Agroclimáticos de INIA (INIA, 2023). Se extrajeron de la base para el período de estudio la evapotranspiración Tanque A, precipitación acumulada y temperatura media (Fig. 3.1).

En el tiempo del estudio, principalmente luego de la segunda aplicación y durante el período de inundación, las precipitaciones fueron escasas, por lo que las pérdidas por escurrimiento se las consideró mínimas.

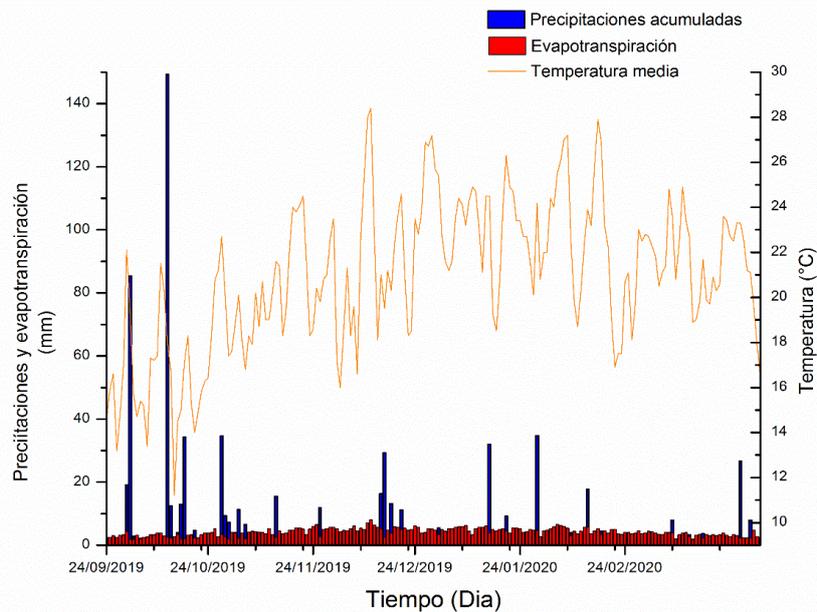


Figura 3.1: Variación de precipitaciones, evapotranspiración y temperatura promedio durante el tiempo estudiado

3.2.5 Diseño de monitoreo

Dado que este estudio abarca todo el ciclo del cultivo de arroz, desde la siembra hasta la cosecha, se realizó campañas de muestreo en cada etapa, centrándose en la matriz suelo previo a la inundación y en la cosecha y lámina de agua durante la inundación.

3.2.5.1 Monitoreo de suelo

Se recolectaron muestras compuestas de suelo de cada parcela a una profundidad de 0-5,0 cm. Se tomaron 14 muestras aleatorias de cada parcela utilizando un bastón de muestreo con un diámetro de 1,0 cm, alcanzando aproximadamente 500 g de suelo. Las muestras se redujeron mediante trituración y cuarteo para obtener una muestra homogénea de aproximadamente 40 g. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron en bolsas de polietileno a -18 °C hasta el análisis.

Las campañas de muestreo de suelo se realizaron en momentos específicos: 3 días antes de la aplicación de GLY pre-emergente, 5 días después de la aplicación de GLY pre-emergente, 3 días antes del riego, 8 días después de la inundación y después de la cosecha (Figura 3.2). En total, se llevaron a cabo cinco eventos de muestreo, resultando en un total de 75 muestras de suelo que cubrían las diferentes fases del experimento.

3.2.5.2 Monitoreo de lámina de agua

Se recolectó muestras compuestas de lámina de agua en las parcelas donde se sembró arroz; se tomó muestras aleatorias de lámina de agua hasta obtener un volumen de aproximadamente 5 L. Del mismo modo, se recolectó un volumen de aproximadamente 5 L del río Olimar y del canal de riego. En todos los casos, se reservó una submuestra de 500 mL en una botella de plástico, se congeló y se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

El muestreo de lámina de agua se realizó 48 horas después del inicio del riego, seguido de muestreos cada dos semanas hasta el final del riego (Figura 3.2). Durante este período, se llevaron a cabo un total de 9 campañas de muestreo, obteniendo un total de 153 muestras de agua.

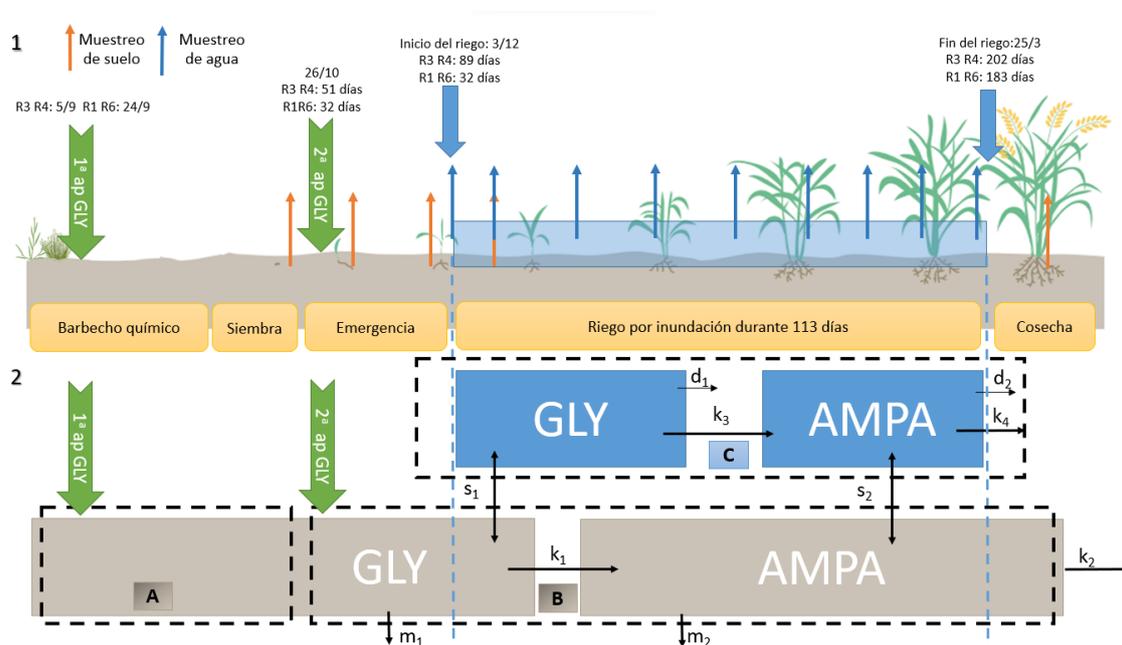


Figura 3.2:(1) Esquema del ciclo del cultivo del arroz, aplicaciones de GLY y muestreos realizados Adaptado de Asociación de Cultivadores de Arroz (ACA), 2018. En la primera aplicación de GLY se indican las fechas según la rotación. (2) Esquema conceptual del destino ambiental de GLY en las diferentes etapas del ciclo del cultivo, las cajas azules representan la lámina de agua, cajas grises suelo, k son constantes de decaimiento, s transferencia del suelo a agua, m movilidad en el suelo a niveles subsuperficiales y d exportaciones por escurrimiento

3.2.6 Análisis de datos

Se analizó los datos de la dinámica de GLY y AMPA en suelo y lámina de agua. Debido a las dos aplicaciones consecutivas de GLY (barbecho químico en setiembre y pre-emergencia en octubre) y a la concentración de las muestras durante esos períodos, el estudio del comportamiento de GLY y AMPA en el sistema se dividió en tres secciones: (A) suelo entre aplicaciones, (B) suelo desde la segunda aplicación hasta la cosecha, y (C) lámina de agua durante el riego por inundación (Fig. 3.2).

Para el análisis estadístico de las concentraciones en lámina de agua, se observó que la mayoría de las medidas estaban por debajo del LOQ, por lo que la concentración siguiente al último resultado cuantificable, así como los valores no cuantificables cuando una muestra posterior era cuantificable, se sustituyeron por LOQ/2 (Bernasconi et al., 2021; FOCUS, 2006).

Las tasas de degradación y el tiempo de vida media (DT_{50}) se determinaron siguiendo la guía de la Unión Europea (FOCUS, 2006). La modelización se realizó utilizando el software R (R Core Team, 2023). Se ajustaron modelos de cinética de primer orden en el suelo (B) y lámina de agua (C) para GLY y AMPA. La ecuación utilizada para modelar el decaimiento fue:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

donde C es la concentración en el día t , C_0 es la concentración inicial, k es la constante de velocidad de degradación y t el tiempo de decaimiento para cada compuesto.

Para el suelo, el modelado consideró t_0 como el día de la segunda aplicación de GLY, mientras que para el agua t_0 se definió como el inicio del riego por inundación.

Para evaluar el decaimiento de GLY y AMPA en suelo se consideró la sección B, luego de la segunda aplicación de GLY. Esto se debe a que no se contaban con resultados previos a la primera aplicación de GLY para tomar como concentración a tiempo cero o evaluar la residualidad interanual. A su vez, considerando el cambio en las condiciones de aerobiosis del suelo durante la inundación, la degradación en suelo se estudió utilizando las tres campañas de seguimiento realizadas luego de la segunda aplicación de GLY para

ajustar el modelo y comparando los resultados obtenidos por el modelo ajustado con la concentración de GLY y AMPA en el monitoreo posterior a la cosecha.

En el suelo (sección B), se evaluó cuatro modelos de decaimiento exponencial: constante, con variación en el intercepto entre las rotaciones y con interacción entre las rotaciones (cambios en las tasas (k) y los interceptos).

Para la lámina de agua (sección C), se evaluaron los mismos tipos de modelos, y se agregó un decaimiento exponencial en dos fases que fue ajustado en base a un modelo de segmentos:

$$C_1 = C_0 e^{-k_1 t} \text{ if } t \leq BP$$

$$C_2 = C_1 e^{-k_2 t} \text{ if } t > BP$$

donde BP se refiere al punto de quiebre, que representa el punto temporal en el que cambia la tasa de decaimiento k .

Para ambos compartimentos, se seleccionó el modelo que mejor se ajustaba según el criterio de información de Akaike (AIC) y ante modelos similares utilizando el principio de parsimonia (Peña, 2002).

3.3 Resultados

3.3.1 Monitoreo de GLY y AMPA

Las campañas de monitoreo fueron llevadas adelante junto con personal de INIA Treinta y Tres. Cabe destacar que la logística en el ELP, al final de la zafra, fue afectada por el inicio de la pandemia causada por el virus SARS-COVID19. Igualmente, la cantidad de campañas realizadas se alinean con lo propuesto por la Guía FOCUS (FOCUS, 2006), realizando más de 4 monitoreos de suelo y entre 6 y 10 de agua.

El análisis de GLY y AMPA en las muestras obtenidas se realizó según la metodología descrita en el capítulo 2. Para el caso de la determinación de AMPA en lámina de agua,

el LOQ fue de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, dado que la derivatización con FMOC se vio afectada por la materia orgánica disuelta en el agua, reduciendo la sensibilidad de la determinación.

GLY y AMPA fueron detectados por encima del LOQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ en muestras de suelo hasta la última campaña de muestreo, realizada 161 días después de la aplicación pre-emergente (2da aplicación). En la tabla 3.4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en ambas matrices.

Tabla 3.4: Resumen de resultados de concentración obtenidos

Resumen de resultados	Suelo			Lámina de agua		
	Mínimo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Promedio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mínimo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Máximo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Promedio ($\mu\text{g L}^{-1}$)
GLY	53	824	231	0,25	14,6	2,6
AMPA	238	1183	619	5	36,3	12,6

En las muestras de lámina de agua, se observó un aumento inicial en las concentraciones de GLY y AMPA durante los primeros 8 días de riego, seguido de una disminución posterior. Después de 38 días desde el inicio del riego, las concentraciones de GLY y AMPA en la mayoría de las parcelas muestreadas estaban por debajo del LOQ. Sin embargo, se encontraron niveles detectables de GLY en algunas parcelas hasta 112 días después del inicio del riego.

También se recolectaron y analizaron muestras de agua de riego, procedentes del río y del canal responsable del transporte de agua hacia el ELP. En todas las campañas de muestreo, los resultados de estas muestras estuvieron por debajo del LOQ. Por lo tanto, consideramos que la contribución de GLY y AMPA a través del agua de riego al cultivo es insignificante.

3.3.2 Decaimiento en suelo y lámina de agua

El decaimiento de GLY y AMPA se ajustó satisfactoriamente a modelos cinéticos de primer orden (SFO) con interceptos diferentes en cada rotación, obteniendo en ambos casos los menores valores del AIC (Tabla 3.5). Los parámetros estimados para los

modelos obtenidos se observan en la tabla 3.6 y su representación gráfica en la figura 3.3.

Respecto al AMPA, se observaron pendientes positivas durante las tres primeras campañas de monitoreo. Sin embargo, no fue posible calcular el DT_{50} del AMPA en el suelo, ya que no se observaron variaciones en las concentraciones tras la inundación. Cabe destacar que el valor obtenido fue positivo con un valor absoluto de 0,006 (Tabla 3.6).

Tabla 3.5: Variación del Criterio de Información de Akaike (AIC) para los modelos evaluados en suelo

Modelo	Valor del ΔAIC	
	GLY	AMPA
Diferentes interceptos por rotación	0	0
Diferentes tasas e interceptos para cada rotación	1,2	2,18
Constante	46	26,68
Mismo intercepto y tasa	21,3	25,25

Tabla 3.6: Parámetros estimados para el modelo de decaimiento de primer orden de GLY y AMPA en suelo de las diferentes rotaciones (R). Se presenta el intervalo de confianza (IC) y el coeficiente de determinación (R^2).

Predictores	GLY		AMPA	
	Estimadores	IC	Estimadores	IC
Pendiente	-0,02	-0,03 – -0,02	0,006	0,001 – 0,01
$\log C_0$ (R1, R6)	6,45	6,17 – 6,72	6,49	6,26 – 6,72
$\log C_0$ (R3)	5,57	4,97 – 6,15	5,82	5,35 – 6,30
$\log C_0$ (R4)	6,06	5,50 – 6,60	6,20	5,76 – 6,65
Observaciones	45		45	
R^2 / R^2 ajustado	0,70 / 0,7		0,54/0,49	

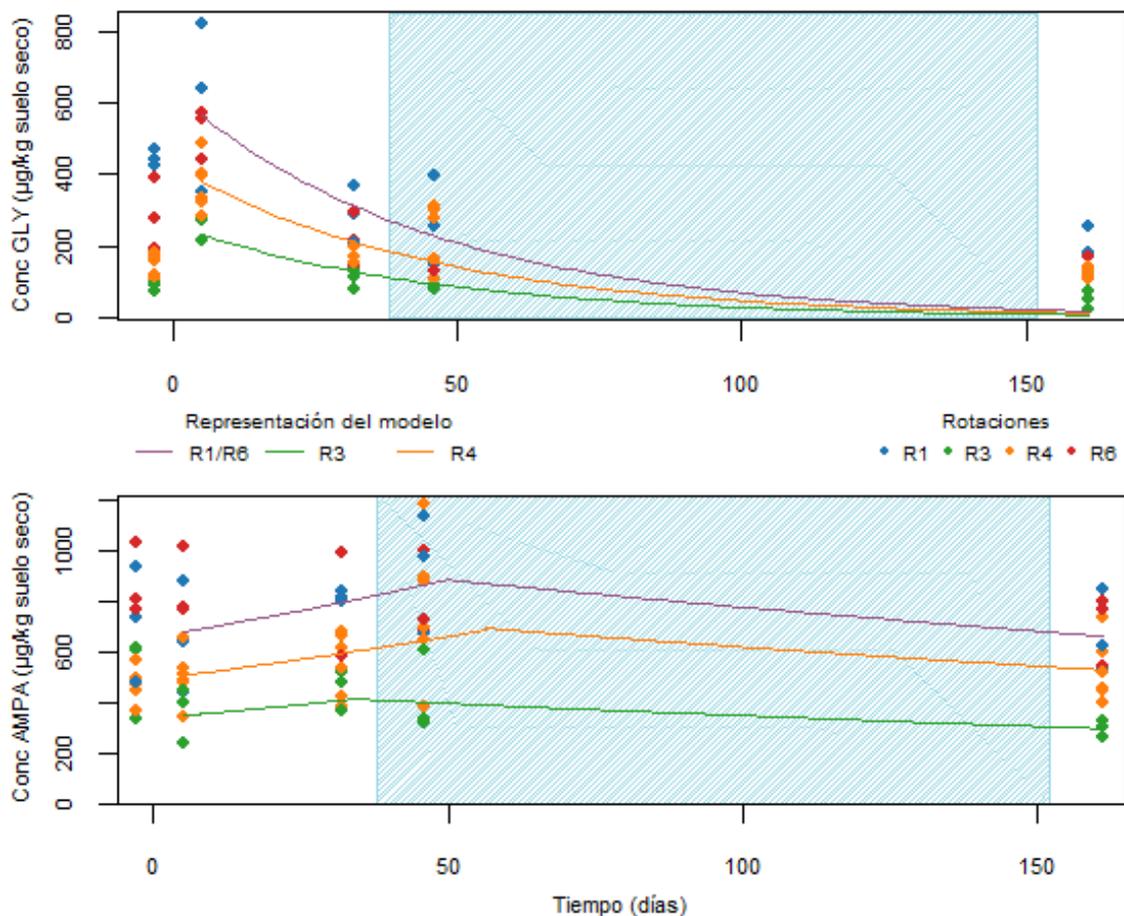


Figura 3.3: Comportamiento de GLY (arriba) y AMPA (abajo) en suelo ajustado a cinética de primer orden (SFO). Los puntos representan los resultados experimentales, las líneas los modelos cinéticos calculados y el área sombreada celeste el riego por inundación.

El análisis del decaimiento en la lámina de agua se efectuó de manera separada para el periodo previo y posterior a alcanzar la concentración máxima después del inicio del riego. Con esta división, el estudio se divide en dos fases distintas: la transferencia de ambos compuestos a la lámina de agua y el posterior decaimiento.

Tabla 3.7: Variación del Criterio de Información de Akaike (AIC) para los modelos evaluados en lámina de agua

Modelo	Valor del Δ AIC para transferencia		Valor del Δ AIC para decaimiento	
	GLY	AMPA	GLY	AMPA
Diferentes interceptos por rotación	0	0	115,9	5,1
Diferentes tasas e interceptos para cada rotación	4,8	5,2	120,5	10
Constante	23,2	26,5	117,1	0
Mismo intercepto y tasa	1,2	1,4	0	10,1

Al evaluar los resultados de los AIC obtenidos en la tabla 3.7, puede observarse que, en el caso de la transferencia para GLY, el modelo con diferentes interceptos por rotación y con el mismo intercepto y tasa difieren en una unidad. Por lo tanto, se aplicó el principio de parsimonia seleccionando el modelo más sencillo, con el mismo intercepto y una pendiente positiva (ver tabla 3.8). Para el caso de la transferencia de AMPA, si bien el modelo con menor AIC es el constante, se seleccionó el modelo con diferentes interceptos por rotación, dado que a través del R^2 se observó que este explicaba un 5% más de la varianza. Presentó diferencias significativas en el intercepto de la rotación R4, lo que es coherente con la diferencia en las fechas de aplicación de GLY en las dos fases arroz de la misma (tabla 3.8).

Tabla 3.8: Parámetros estimados para el modelo de primer orden de transferencia de GLY y AMPA del suelo a la lámina de agua en las diferentes rotaciones (R). Se presenta el intervalo de confianza (IC)s y el coeficiente de determinación (R^2).

GLY			AMPA		
Predictores	Estimadores	IC	Predictores	Estimadores	IC
Pendiente	0,15	0,10 – 0,20	Pendiente	0,11	0,08 – 0,15
logC ₀ (R1, R3,R4,R6)	0,77	0,47 – 1,07	logC ₀ (R1,R3,R6) logC ₀ (R3)	2,46 2,05	2,18 – 2,72 1,47 – 2,69
Observaciones	30		30		
R ² / R ² ajustado	0,55 / 0,53		0,68/0,63		

Tabla 3.9: Parámetros estimados para el modelo de decaimiento de primer orden de GLY y AMPA en lámina de agua, obteniéndose una única ecuación para todas las rotaciones. Se presenta el intervalo de confianza (IC) y el coeficiente de determinación (R^2).

GLY			AMPA	
Predictores	Estimadores	IC	Estimadores	IC
Pendiente 1	-0,13	-0,01 – -0,10	-0,09	-0,12 - -0,07
logC ₁	3,24	2,88 – 3,60	3,98	3,60 – 4,36
Punto de quiebre	39,06	35,24 – 42,88	23,4	11,95 – 34,83
Pendiente 2	0,00	-3,82 – 3,82	-0,032	-0,07 – 0,0
logC ₂	0,13	0,12 – 0,15	2,53	0,02 – 0,10
Observaciones	74		50	
R ² / R ² ajustado	0,89 / 0,89		0,79 / 0,78	

Una vez alcanzada la concentración máxima en la lámina de agua, el decaimiento del GLY y AMPA se modeló mediante un modelo cinético segmentado de primer orden, el cual incluyó un decaimiento exponencial con dos fases. Las pendientes e interceptos no mostraron diferencias significativas (Figura 3.4; Tabla 3.9).

Los modelos segmentados revelaron la presencia de un punto de inflexión que denota un cambio en la pendiente. Posterior a este punto, la pendiente tiende a cero. El punto de inflexión para el GLY ocurrió 39 días después de la inundación, mientras que para el AMPA se observó 23 días después del inicio de la inundación. El cálculo del DT_{50} para el GLY y AMPA en agua se basó en el primer decaimiento exponencial. En este sentido, se determinó que el DT_{50} para el GLY fue de 5,3 días, mientras que para el AMPA se estimó en 7,4 días. Teniendo en cuenta el tiempo desde el inicio de la inundación, se puede estimar que la concentración se reduce a la mitad en 13,3 días para GLY y 15,4 días para AMPA. Sin embargo, la segunda pendiente de decaimiento es cercana a cero y por lo tanto indica que en esas condiciones el tiempo de vida media tiende a infinito.

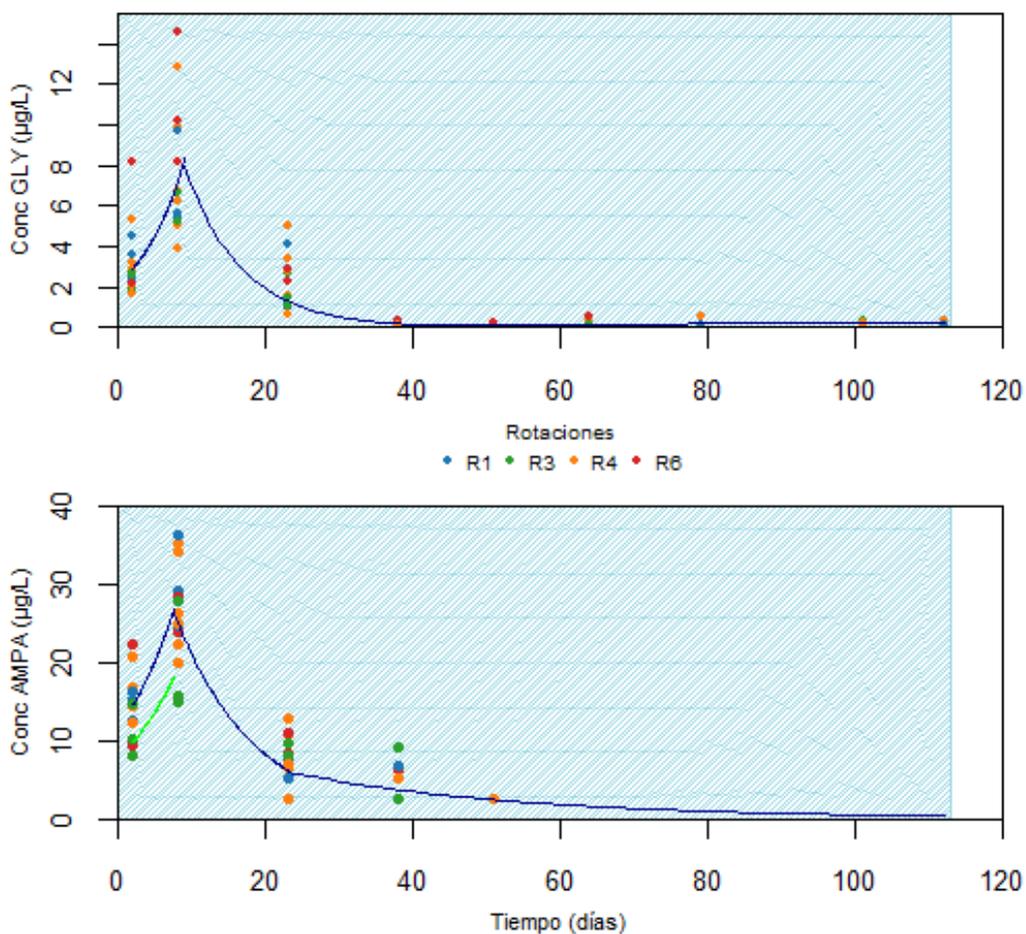


Figura 3.4: Comportamiento de GLY (arriba) y AMPA (abajo) en lámina de agua ajustado a cinética de primer orden (SFO). Los puntos representan los resultados experimentales, las líneas los modelos cinéticos calculados y el área sombreada celeste el riesgo por inundación

3.4 Discusión

3.4.1 Consideraciones generales

Al analizar las aplicaciones de GLY en el período entre las rotaciones (Tabla 3.3), se observó que hubo diferencias en la fecha en que se realiza el barbecho químico en las parcelas que previamente tuvieron pasturas en la zafra anterior (R3 y R4₁).

En las parcelas con pastura, la primera aplicación se realizó 50 días antes de la siembra, mientras que en las parcelas donde se cultivaron arroz o soja en la zafra anterior (R1, R4₂, R6), con cultivo de cobertura durante el invierno, la primera aplicación se llevó a cabo 31 días antes de la siembra del arroz. Esto se debe a que, en las praderas con festuca u otras especies perennes, el tiempo de barbecho es un factor importante para permitir la descomposición de las especies perennes y lograr que el suelo alcance un estado friable que facilite la uniformidad en la profundidad de siembra (INIA, 2019).

Teniendo en cuenta las siguientes observaciones: que las aplicaciones de GLY se realizó antes del inicio del riego, la alta solubilidad en agua de ambos y que no se detectaron GLY y AMPA en las muestras de agua de río, se puede inferir que hay una transferencia de ambos compuestos desde el suelo hacia la lámina de agua, principalmente durante el período de estabilización posterior a la inundación.

Al interpretar los resultados obtenidos, es de suma importancia considerar el impacto del riego por inundación en las condiciones del suelo en el cultivo del arroz. Después de un período de 39 días desde la última aplicación de GLY durante la fase de preemergencia, se inició el riego por inundación, lo que condujo al establecimiento de un ambiente anaeróbico en el suelo durante 115 días. Esta alteración en las condiciones del suelo tiene implicaciones para la degradación del GLY, como se aprecia en la Figura 3.3.

Investigaciones previas han demostrado que la degradación del GLY en el suelo requiere condiciones aeróbicas (Bento et al., 2016; Cecilia & Maggi, 2018; Sun et al., 2019). En cambio, durante el período de inundación, la disponibilidad de oxígeno disminuye, lo que resulta en una reducción en la degradación biológica del GLY, que es la principal vía

de degradación (la Cecilia & Maggi, 2018; Roberts et al., 1998). Incluso se observa un pasaje del suelo al agua en los primeros días que incrementa la concentración, para luego iniciar un proceso de decaimiento.

La disminución de la tasa de degradación de GLY durante el período de inundación coincide con los hallazgos de investigaciones previas de herbicidas en lámina de agua de cultivo de arroz. Uno de estos trabajos fue también realizado en experimentos de arroz de INIA Treinta y Tres para el herbicida clomazone, el cual se aplicó 2 días antes de que comenzara la inundación (Carlomagno et al., 2010); y el otro realizado en Brasil para los herbicidas clomazone, imazapir e imazapic en diferentes fechas de aplicación y cambios en los regímenes de riego (Schreiber et al., 2017).

En ambos casos, los residuos en el agua tuvieron un comportamiento similar al cambiar las condiciones del suelo de aeróbicas a anaeróbicas (inicio de la inundación), observándose un aumento en la concentración debido a la transferencia al agua de inundación y luego una disminución. Esto subraya la importancia de las condiciones aeróbicas para favorecer la degradación de GLY y destaca la influencia del riego en los procesos de degradación en campos de arroz. No obstante, se podría mejorar el trabajo realizado en el futuro si se realiza un monitoreo de suelo previo a la primera aplicación de GLY y se aumenta la frecuencia de monitoreo de lámina de agua en los primeros 15 días de inundación. Esto permitiría obtener mayor definición del comportamiento de GLY y AMPA en el sistema arrocero.

3.4.2 Decaimiento en suelo

Es relevante destacar las diferencias identificadas en los interceptos, las cuales pudieron atribuirse a las variaciones en las fechas de aplicación entre las rotaciones. En efecto, no se observaron diferencias significativas en los interceptos entre los tratamientos R1 y R6, los cuales recibieron aplicaciones de GLY en las mismas condiciones. Los cuatro tratamientos modelados no presentaron diferencias en las pendientes, obteniendo como resultado un valor único de 31,5 días para el DT_{50} de GLY en el suelo (Figura 3.3 y Tabla 3.6).

Basándonos en los resultados obtenidos, es evidente que la descomposición de GLY en el suelo se ve fuertemente influenciada por las condiciones aeróbicas. El cálculo de DT_{50} para el GLY (31,5 días) sugiere que la degradación ocurre predominantemente durante la fase aeróbica, antes de que el suelo se vea sometido a inundación. Este hallazgo se alinea con los tiempos de vida media presentados en la literatura (ver tabla 3.11) y refuerzan la importancia de las condiciones aeróbicas para una degradación eficaz del GLY (Aparicio et al., 2013; Bento et al., 2016).

Al mismo tiempo, como se muestra en la Fig. 3.3, los resultados de concentración de GLY, obtenidos en el monitoreo del suelo tras la cosecha, fueron superiores a los predichos por el modelo de primer orden. Esto sugiere una disminución de la degradación biológica durante el período de inundación. Es importante subrayar que el modelo aplicado no consideró el cambio en las condiciones de oxígeno en el suelo como una variable, lo que probablemente contribuyó a la desviación entre las concentraciones de GLY observadas y predichas. Futuros estudios deberían incorporar este factor para mejorar la precisión de las predicciones de degradación.

Con respecto al AMPA, se obtuvieron pendientes positivas durante las tres campañas iniciales de monitoreo, indicando que la conversión de GLY en AMPA ocurre predominantemente antes de la inundación cuando prevalecen las condiciones aeróbicas. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en las concentraciones de AMPA tras la inundación. Esto puede atribuirse a la tasa de degradación más lenta de AMPA en comparación con GLY, como se informa en la literatura (Bento et al., 2016). El rango reportado de valores DT_{50} para AMPA, que van de 32 a 419 días (ver Tabla 3.11), sugiriendo que la degradación de AMPA es un proceso lento. Además, las propiedades del suelo juegan un papel crucial en la adsorción de GLY y AMPA, influyendo en la disponibilidad de AMPA para la degradación. En consecuencia, la degradación del AMPA está influenciada por procesos complejos, lo que hace difícil determinar el peso preciso de cada factor que afecta al proceso de descomposición (Aparicio et al., 2013).

Es importante considerar que la ausencia de concentraciones de referencia antes de la aplicación inicial de GLY, previo a la siembra, planteó retos a la hora de diferenciar la

contribución interanual de AMPA generada por la degradación de GLY en el período de estudio. Esta limitación dificulta la cuantificación precisa de la influencia específica de las aplicaciones de GLY sobre los niveles de AMPA en el suelo. Se recomienda que para futuras investigaciones se considere el establecimiento de líneas de base apropiadas para evaluaciones más exhaustivas. Además, cabe destacar que nuestro estudio no encontró diferencias estadísticas entre los cultivos de arroz y soja, ya que ambos reciben aplicaciones anuales de GLY. Esto subraya la importancia de considerar las prácticas específicas de gestión de los cultivos y su influencia en la dinámica de degradación de GLY.

3.4.3 Decaimiento durante el período de inundación

Teniendo en cuenta que las aplicaciones de herbicidas se realizan antes del inicio del riego, la alta solubilidad en agua de GLY y AMPA, y el hecho de que estos compuestos no se detectaron en el agua de riego, se puede concluir que ambos se transfieren desde el suelo a la lámina de agua.

Debido a la ocurrencia simultánea de la transferencia por disolución y la degradación de GLY en la lámina de agua, los resultados obtenidos sugieren que el proceso de transferencia sirve como mecanismo primario al comienzo de la inundación, seguido de la degradación.

Cabe destacar que el momento de la aplicación de GLY antes de la inundación no influye significativamente en la tasa de transferencia de GLY a la lámina de agua, a diferencia de su influencia en el suelo. Esta observación se ve apoyada por el hallazgo de una única ecuación para modelizar la degradación de GLY en lámina de agua para todas las rotaciones evaluadas (Véase Tabla 3.8 y Fig. 3.4).

La transferencia suelo-agua durante las primeras etapas del riego del cultivo se alinea con investigaciones previas realizadas por Carlomagno et al. (2010). En ese trabajo se observó que la concentración máxima del herbicida clomazone en muestras de lámina de agua se alcanzó 6 días después del inicio de la inundación, con concentraciones que cayeron por debajo del límite de detección después de 41 días. Estos resultados apoyan

aún más la idea de que la transferencia de suelo a agua es un fenómeno común durante las fases iniciales del riego (Carlomagno et al., 2010; Schreiber et al., 2017).

Los resultados obtenidos con respecto al destino ambiental de GLY y AMPA y su correspondencia con los hallados para otros herbicidas, en trabajos previos, permiten realizar sugerencias de gestión para minimizar la exportación de plaguicidas del cultivo. Al observar los DT₅₀ que se resumen en la tabla 3.10 y los puntos de quiebre obtenidos, se entiende que es necesario tomar medidas de gestión para evitar la salida de agua de las parcelas de arroz, desde la aplicación pre-emergente hasta los primeros 30 días de iniciada la inundación.

*Tabla 3.10: Constantes de decaimiento y DT₅₀ calculados para GLY y AMPA según los modelos obtenidos en cada compartimiento. Los DT₅₀ para lámina de agua marcados con * tienen en cuenta el tiempo de transferencia del suelo al agua.*

Compuesto	Compartimiento	k (días ⁻¹)	DT ₅₀ (días)
GLY	Suelo	0,02	31,5
	Lámina de agua	0,13	5,3 / 13,3*
AMPA	Suelo	0,001	> Al tiempo experimental
	Lámina de agua	0,09	7,4 / 15,4*

Tabla 3.11: DT₅₀ reportados en bibliografía para GLY y AMPA en suelo y agua

Condiciones	Suelo		Agua		Referencias
	GLY DT ₅₀ (días)	AMPA DT ₅₀ (días)	GLY DT ₅₀ (días)	AMPA DT ₅₀ (días)	
Adición de GLY al suelo e incubación en laboratorio	9,0	32,0	-	-	Simonsen et al., 2008
Aplicación de GLY en cultivo de soja	5,8	53,3	-	-	Bento et al., 2019
Aplicación de GLY en cultivo de maíz	11,6	69,3	-	-	
Aplicación de GLY en cultivo de té	31,5	-	-	-	Bandana et al., 2015
Aplicación de GLY en cultivo de té	25,7	-	-	-	
Adición de GLY al suelo e incubación en laboratorio	28,9	138,6	-	-	Sun et al., 2019
	31,5	173,3	-	-	
Base de datos IUPAC	23,8	419,0	9,9	5,47	PPDB, 2023
Agua subterránea a pH=7 bajo luz UV	-	-	11,75	-	Yadav et al., 2017

Monitoreo de agua superficial	-	-	3,6	52,5	Desmet et al., 2016
Aplicación de GLY en cultivo de arroz como barbecho	31,5	> al tiempo experimental (161 días)	5,3	7,4	Este trabajo

3.4.4 Diferentes escenarios de intensificación

Se analizó cuatro rotaciones con diferentes escenarios de intensificación del uso de la tierra. Se observó que las rotaciones que incorporan pasturas a lo largo del ciclo de rotación (R3, R4), considerando las tasas de aplicaciones de los últimos 5 años, mostraron una menor aplicación media de GLY debido a menor necesidad de barbecho químico (ver Fig. 3.5 y Tabla 3.12). Esto sugiere que las rotaciones que incorporan pasturas dan lugar a menores cargas de GLY y AMPA en el suelo a lo largo de los sucesivos ciclos de rotación, contando con niveles de referencia más bajos en comparación con las rotaciones R1 y R6.

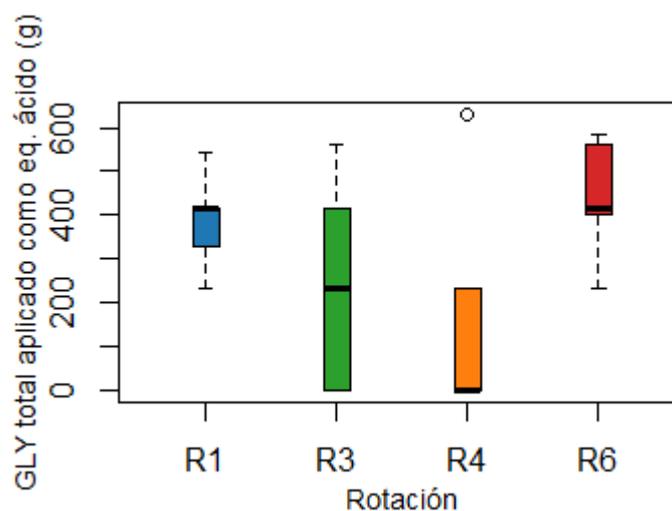


Figura 3.5: Masa total de GLY aplicada en las parcelas estudiadas en las últimas 5 zafras.

Tabla 3.12: Aplicaciones totales de GLY en los últimos 5 años en las rotaciones evaluadas. Las celdas azules corresponden a arroz, verde pastura y amarillo soja.

Diferentes escenarios de rotación	Masa total de GLY aplicada como equivalente ácido (g) en la zafra					Total 5 años
	15/16	16/17	17/18	18/19	19/20	
Arroz continuo (R1)	233	415	327	544	415	1934
Arroz pastura corta (R3)	233	0	560	0	415	1208
Arroz pastura larga (R4 ₁)	233	0	0	0	631	864
Arroz pastura larga (R4 ₂)	0	0	0	544	415	959
Arroz soja (R6)	233	560	404	586	414	2197

Como se discutió en secciones anteriores, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de GLY y AMPA en el suelo para las rotaciones R1 y R6. En la rotación R1, la aplicación de GLY como barbecho ocurre anualmente, mientras que en R6, GLY también se aplica como post-emergente en los años de soja. Estas similitudes en las concentraciones de GLY y AMPA sugieren que ambos compuestos se manejan de forma similar en estas rotaciones.

Los resultados experimentales en suelo al final del período de estudio (Fig. 3.3) indicaron el siguiente orden para los niveles basales de GLY: R1 > R6 > R4 > R3. Este orden se alinea con el GLY acumulado aplicado (Fig 3.5), demostrando una relación entre el grado de intensificación en la aplicación de GLY y los niveles basales experimentales.

Los niveles acumulativos de aplicación de GLY son consistentes con los niveles iniciales determinados experimentalmente, resaltando el impacto de la intensificación de las prácticas de aplicación de GLY. Esto enfatiza aún más la importancia de considerar las estrategias de intensificación del uso de la tierra en la gestión de los residuos de GLY y AMPA.

Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de la relación entre los sistemas de rotaciones, la intensificación de la aplicación de GLY, y los niveles basales resultantes de GLY y AMPA en suelos agrícolas. La integración de pasturas en las rotaciones puede desempeñar un papel crucial en la reducción de las tasas de aplicación de GLY y en la mitigación de la carga de estos compuestos en el suelo.

Existen otras herramientas para simular y comparar diversos escenarios de intensificación en el cultivo de arroz, como el modelo RICEWQ y variantes (Williams et al. 2014). Se exploraron dichos modelos, (véase anexo en el Capítulo 6) pero al ser de código cerrado y poco flexibles no se logró operativizar los mismos. Es deseable avanzar en códigos abiertos que permitan explorar las dinámicas de los pesticidas en cultivos con fase inundada para generar modelos con capacidad predictiva aplicables a la realidad nacional.

3.5 Conclusiones

Se obtuvo resultados de concentraciones de GLY y AMPA en muestras reales de suelo y lámina de agua del cultivo de arroz. Asimismo, las campañas de monitoreo permitieron obtener información sobre el comportamiento de GLY y su metabolito AMPA en este cultivo.

Se ajustó modelos de degradación cinética de primer orden en lámina de agua y suelo para analizar la degradación de GLY y AMPA, remarcando la importancia de las etapas aeróbicas y anaeróbicas en el ciclo del arroz. La degradación de GLY mostró variaciones entre las rotaciones, y se identificó el momento de la aplicación inicial de GLY como el factor principal que contribuye a las diferencias entre las rotaciones. Se observó la transferencia de ambos compuestos del suelo a la lámina de agua, sin encontrar diferencias en la degradación en ella entre las diferentes rotaciones de cultivos.

Los resultados resaltan que las exportaciones de GLY y AMPA de los campos de arroz pueden ocurrir por escorrentía antes de la inundación y en las etapas iniciales de la inundación por desborde. Por lo tanto, las prácticas de gestión que minimizan las pérdidas de agua por escorrentía o desborde durante este período (desde la última aplicación de GLY hasta 30 días después de la irrigación) son críticas. Asimismo, la prolongación de la etapa aerobia en barbecho, entre aplicación e inundación, redundará en minimizar los niveles de GLY en lámina de agua y sus posibles exportaciones a cursos. El DT_{50} de GLY mostró ser independiente de la rotación arrocerá.

En términos generales, estos resultados sugieren que las rotaciones con pasturas (R3 y R4) resultan en niveles de referencia más bajos de GLY. No obstante, se sugiere realizar un rediseño en las frecuencias de monitoreos para conocer aportes interanuales y transferencias del suelo al agua con mayor precisión.

4 Conclusiones y perspectivas

Los resultados presentados en esta tesis significan un antecedente relevante a la construcción de capacidades de trabajo nacionales en relación con el plaguicida más utilizado en Uruguay.

El trabajo realizado en el transcurso de esta tesis ha permitido desarrollar diferentes herramientas para estudiar el destino ambiental de GLY en rotaciones arroceras contrastantes, alcanzando por tanto el objetivo general planteado.

El desarrollo de la técnica para la determinación de GLY en agua superficial con detección por FLD, permitió obtener los resultados experimentales para esta tesis y aumentar la capacidad analítica del laboratorio del Departamento de Desarrollo Tecnológico (DDT) del CURE Rocha. Desde el año 2020, en el cual se desarrolló esta técnica, se han brindado diversos servicios analíticos a instituciones nacionales (DINACEA, OSE, OSE-UGD), investigadores nacionales, tesistas, estudiantes y particulares con enfoque sensible, robusto y económico. La determinación de GLY y AMPA continúa siendo un desafío analítico en diversas matrices, por lo que la técnica desarrollada en aguas superficiales mediante LC-FLD ha sido utilizada en otras investigaciones, asesoramientos y como punto de partida para otros ajustes en el DDT.

Los resultados obtenidos de concentración de GLY y AMPA en el ELP permitieron ajustar modelos de cinética de primer orden, para comprender el comportamiento y destino ambiental del GLY en el cultivo de arroz. También, se confirmó la singularidad de este cultivo debido a la afectación de los procesos microbiológicos involucrados en la disipación de GLY. Este último aspecto debería ser incluido como covariable en los modelos de decaimiento, para tener una descripción estadística comparable a la realidad, con el fin de su uso en otros escenarios de gestión de cultivo fuera del ELP.

Por otro lado, se observó que la intensificación del uso del suelo mediante la incorporación de otros cultivos, cambiando la rotación típica de arroz, tiene como consecuencia el aumento de las aplicaciones de GLY y, por lo tanto, el aumento de niveles de residuos en el suelo tanto de GLY como de su metabolito AMPA. En consecuencia, la integración de pasturas en las rotaciones puede desempeñar un papel

crucial en la reducción de las tasas de aplicación de GLY y en la mitigación de la carga de estos compuestos en el suelo.

Dado que se comprobó la residualidad en el suelo de ambos al final de la zafra, se recomienda profundizar en este aspecto en futuros trabajos, mediante un plan de monitoreo anual que permita conocer la dinámica interanual de GLY y AMPA, más allá del período de una zafra. La continuación de la investigación permitiría ahondar el conocimiento sobre el impacto del uso de GLY como barbecho químico, tanto en las en las rotaciones con pasturas típicas en nuestro país, así como en la incorporación de otros cultivos resistentes al GLY como la soja.

Otro hallazgo interesante surgido de la investigación es que el comportamiento en lámina de agua es el fenómeno de transferencia de suelo a agua al inicio de la inundación. Este hallazgo permite generalizar estrategias de gestión hacia otros herbicidas de aplicación previa al inicio de la inundación como clomazone, metolaclor, entre otros.

Para concluir, los resultados de esta tesis resaltan que las exportaciones relevantes de plaguicidas (fundamentalmente herbicidas) de los campos de arroz pueden ocurrir por escorrentía en etapas previas a la inundación y en las etapas iniciales de la misma; siendo esta crítica en la gestión ambiental. Es necesario entonces diseñar estrategias de gestión del agua para minimizar las exportaciones de agua por escorrentía, de manera tal, que la exportación de GLY se reduzca drásticamente en la ventana temporal desde la última aplicación hasta 30 días luego del inicio del riego por inundación.

5 Bibliografía

- Alonso, B., Griffero, L., Bentos Pereira, H., Pareja, L., & Pérez Parada, A. (2022). Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography - fluorescence detection and tandem mass spectrometry. *MethodsX*, 9, 101730. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101730>
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., & Marino, D. J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*, 645, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Annett, R., Habibi, H. R., & Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., & Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>
- Aslam, S., Jing, Y., & Nowak, K. M. (2023). Fate of glyphosate and its degradation products AMPA, glycine and sarcosine in an agricultural soil: Implications for environmental risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 447. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130847>
- Bandana, B., Sharma, N., Joshi, R., Gulati, A., & Sondhia, S. (2015). Dissipation kinetics of glyphosate in tea and tea-field under northwestern mid-hill conditions of India. *Journal of Pesticide Science*, 40(3), 82–86. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D14-085>
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., & Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water,

- groundwater, and precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), 275-290. <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>
- Benbrook, C. M. (2019). How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environmental Sciences Europe*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0184-7>
- Bento, C. P. M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2016). Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of the Total Environment*, 572, 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>
- Bento, C. P. M., van der Hoeven, S., Yang, X., Riksen, M. M. J. P. M., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Dynamics of glyphosate and AMPA in the soil surface layer of glyphosate-resistant crop cultivations in the loess Pampas of Argentina. *Environmental Pollution*, 244, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.046>
- Bernasconi, C., Demetrio, P. M., Alonso, L. L., Mac Loughlin, T. M., Cerdá, E., Sarandón, S. J., & Marino, D. J. (2021). Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 313(January). <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107341>
- Bonanse, R. I., Filippi, I., Wunderlin, D. A., Marino, D. J. G., & Amé, M. V. (2017). The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment. *Toxics*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>
- Bouman, B. A. M., Humphreys, E., Tuong, T. P., & Barker, R. (2007). Rice and Water. *Advances in Agronomy*, 92(04), 187-237. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)92004-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)92004-4)
- Candela, L., Caballero, J., & Ronen, D. (2010). Glyphosate transport through weathered granite soils under irrigated and non-irrigated conditions - Barcelona, Spain. *Science*

of the Total Environment, 408(12), 2509-2516.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.006>

Cantou, G., Roel, Á., García, C., & Lavecchia, A. (2010). Manejo del agua en arroz: conservación y uso eficiente. En *GRUPO DE DESARROLLO DE RIEGO; SEMINARIO INTERNACIONAL, 1ER. AGOSTO 2010, PAYSANDÚ, URUGUAY. Potencial del riego extensivo en cultivos y pasturas. Montevideo (Uruguay): INIA, 2010* (pp. 115-123).

Carlomagno, M., Mathó, C., Cantou, G., Sanborn, J. R., Last, J. A., Hammock, B. D., Roel, A., González, D., & González-Sapienza, G. (2010). A clomazone immunoassay to study the environmental fate of the herbicide in rice (*Oryza sativa*) agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4367-4371.

<https://doi.org/10.1021/jf9043259>

Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., & Antúnez, K. (2021). Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms*, 9(4).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040845>

Christen, E. W., Chung, S. O., & Quayle, W. (2006). Simulating the fate of molinate in rice paddies using the RICEWQ model. *Agricultural Water Management*, 85(1-2), 38-46.

<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.03.008>

Codex Alimentarius, FAO, & OMS. (2022). CXG-097-2022. [https://www.fao.org/fao-](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B97-2022%252FCXG_097s.pdf)

[who-codexalimentarius/sh-](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B97-2022%252FCXG_097s.pdf)

[proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%25](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B97-2022%252FCXG_097s.pdf)

[2Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B97-2022%252FCXG_097s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B97-2022%252FCXG_097s.pdf)

Contreras, W. A., Ginestar, D., Paraíba, L. C., & Bru, R. (2008). Modelling the pesticide concentration in a rice field by a level IV fugacity model coupled with a dispersion-advection equation. *Computers and Mathematics with Applications*, 56(3), 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.camwa.2008.01.009>

Corrales, N., Meerhoff, M., & Antoniadis, D. (2021). Glyphosate-based herbicide exposure affects diatom community development in natural biofilms.

Environmental Pollution, 284(February), 117354.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117354>

Covaci, A. (2014). Environmental Fate and Behavior. En *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (pp. 372-374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01041-1>

Dabalá, L., & Asociación Uruguaya pro Siembra Directa. (2009). *Guía de Siembra Directa*.

Demonte, L. D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C. G., Beldoménico, H. R., & Repetti, M. R. (2018). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of the Total Environment*, 645, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.340>

Desmet, N., Touchant, K., Seuntjens, P., Tang, T., & Bronders, J. (2016). A hybrid monitoring and modelling approach to assess the contribution of sources of glyphosate and AMPA in large river catchments. *Science of the Total Environment*, 573, 1580–1588. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.100>

DGSA. (2023). *Importaciones de productos fitosanitarios*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/importaciones-productos-fitosanitarios>

Didoné, E. J., & Evrard, O. (2021). Mobilization and transport of pesticides with runoff and suspended sediment during flooding events in an agricultural catchment of Southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(10), 13303-13312. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13303-z>

Druart, C., Delhomme, O., De Vaufleury, A., Ntcho, E., & Millet, M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(4), 1725-1732. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4468-z>

EFSA. (2023). *Renovación de la autorización del glifosato: Preguntas y respuestas**. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/qanda_23_5793

Environmental Protection Agency. (2016). Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential. *EPA's Office of Pesticide Programs, 12 december 2017*, 216. https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf

Environmental Protection Agency (2023). *Glyphosate*. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>.

FOCUS. (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. *Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference. Sanco/10058/2005 version 2.0, June, 1-434*.

Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., ... Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>

Fuentes-Edfuf, Y., & Martínez-Megías, C. (2022). *autoRICEWQ* (v1.0.2). <https://doi.org/10.5281/zenodo.5940234>

García Préchac, F., Ernst, O., Arbeletche, P., Pérez Bidegain, M., Pritsch, C., Ferenczi, A., & Rivas, M. (2010). *Intensificación Agrícola: oportunidades y amenazas para un país productivo y natural*. CSIC.

García-Préchac, F., Ernst, O., Siri-Prieto, G., & Terra, J. A. (2004). Integrating no-till into crop-pasture rotations in Uruguay. En *Soil and Tillage Research* (Vol. 77, Número 1, pp. 1-13). <https://doi.org/10.1016/j.still.2003.12.002>

Gillezeau, C., van Gerwen, M., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., & Taioli, E. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environmental Health*, 18(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>

- Hedberg, D., & Wallin, M. (2010). Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology in Vitro*, 24(3), 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.020>
- Hill M., & Clérico, C. (2008). FPTA 171 Residualidad de agroquímicos en arroz. *Arroz*.
- Huhn, C. (2018). More and enhanced glyphosate analysis is needed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(13), 3041-3045. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1000-3>
- Inao, K., Iwafune, T., & Horio, T. (2018). An improved PADDY model including uptake by rice roots to predict pesticide behavior in paddy fields under nursery-box and submerged applications. *Journal of Pesticide Science*, 43(2), 142-152. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D17-084>
- INIA. (2016). Desafíos de la intensificación sostenible para la política pública. *Serie técnica INIA*.
- INIA. (2019). *Ficha técnica N° 50 Barbechos químicos*. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12897/1/Ficha-tecnica-50.pdf>
- INIA. (2023). *Banco datos agroclimático*. <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>
- International Agency for Research on Cancer. (2015). IARC Monograph on Glyphosate. En *Who* (Vol. 112). <https://www.iarc.fr/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>
- International Organization for Standardization. (2008). *Water quality - Determination of glyphosate and AMPA - Method using high performance chromatography (HPLC) and fluorometric detection (ISO 21458)*.
- Ippolito, A., & Fait, G. (2019). Pesticides in surface waters: from edge-of-field to global modelling. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 36, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2018.10.023>

- la Cecilia, D., & Maggi, F. (2018). Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environmental Pollution*, 233, 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.017>
- Luo, Y., Spurlock, F., Gill, S., & Goh, K. S. (2012). Modeling complexity in simulating pesticide fate in a rice paddy. *Water Research*, 46(19), 6300-6308. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.006>
- Lupi, L., Bedmar, F., Puricelli, M., Marino, D., Aparicio, V. C., Wunderlin, D., & Miglioranza, K. S. B. (2019). Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, 225, 906-914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.090>
- Macedo, I., Roel, A., Ayala, W., Pravia, M. V., Terra, J. A., & Pittelkow, C. M. (2022). Irrigated rice rotations affect yield and soil organic carbon sequestration in temperate South America. *Agronomy Journal*, 114(2), 961-975. <https://doi.org/10.1002/agj2.20964>
- Mallat, E., & Barceló, D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 129-136. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00362-8)
- Martínez-Megías, C., Mentzel, S., Fuentes-Edfuf, Y., Moe, S. J., & Rico, A. (2023). Influence of climate change and pesticide use practices on the ecological risks of pesticides in a protected Mediterranean wetland: A Bayesian network approach. *Science of the Total Environment*, 878. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163018>
- Mateo-Sagasta, J., Zadeh, S. M., & Turrall, H. (2018). More people, more food, worse water? - a global review of water pollution from agriculture. En *FAO of the United Nations & IWMI*.

- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2023). *DIEA presenta los resultados de la Encuesta de Arroz "Zafra 2022/23"*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-encuesta-arroz-zafra-202223>.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2023). *Relevamiento de chacras de arroz zafra 2022/2023*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/relevamiento-chacras-arroz-zafra-20222023>.
- Molina, F., Terra, J., & Oxley, M. (2023). *Informes de zafra*. <http://www.inia.uy/investigaci%C3%B3n-e-innovaci%C3%B3n/programas-nacionales-de-investigaci%C3%B3n/Programa-Nacional-de-Investigacion-en-Produccion-de-Arroz/informes-de-zafras>
- Molina, F., Terra, J., & Roel, A. (2019). Evolución de algunas variables tecnológicas en el cultivo de arroz en Uruguay. En J. Terra, S. Martínez, & H. Saravia (Eds.), *Serie técnica N°250 Arroz 2018* (pp. 1-4). INIA. <https://doi.org/http://doi.org.10.35676/INIA/ST.250>
- Morjan, W. E., Pedigo, L. P., & Lewis, L. C. (2002). Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. *Environmental Entomology*, 31(6), 1206–1212. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.6.1206>
- Muñoz, J. P., Bleak, T. C., & Calaf, G. M. (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere*, 270, 128619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619>
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>
- Pandey, N., Rana, D., Chandrakar, G., Gowda, G. B., Patil, N. B., Pandi G, G. P., Annamalai, M., Pokhare, S. S., Rath, P. C., & Adak, T. (2020). Role of climate change variables

- (standing water and rainfall) on dissipation of chlorantraniliprole from a simulated rice ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205(September), 111324. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111324>
- Peña, D. (2002). *Análisis de Datos Multivariantes*. Madrid: McGraw Hills (McGraw-Hill Interamericana de España, Ed.).
- Pittelkow, C. M., Zorrilla, G., Terra, J., Riccetto, S., Macedo, I., Bonilla, C., & Roel, A. (2016). Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Global Food Security*, 9, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.05.003>
- Poiger, T., Buerge, I. J., Bächli, A., Müller, M. D., & Balmer, M. E. (2017). Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1588-1596. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7835-2>
- PPDB (2023) Aminomethylphosphonic acid. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/842.htm>
- PPDB (2023) Glyphosate. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/373.htm>
- Primost, J. E., Marino, D. J. G., Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution*, 229, 771-779. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>
- Queheille, N. (2017). La búsqueda de la sustentabilidad en los sistemas arroceros uruguayos. En *Arroz 2017* (Vol. 1, Número October, pp. 115-118). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

- Ramirez, C. E., Bellmund, S., & Gardinali, P. R. (2014). A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case study: Canals with influence on Biscayne National Park. *Science of the Total Environment*, 496, 389-401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.118>
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 8(4), 416-434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>
- Roberts, T., Huston, D., Lee, P., Nicholls, P., & Plimmer, J. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals* (T. R. Roberts, D. H. Hutson, P. W. Lee, P. H. Nicholls, & J. R. Plimmer, Eds.; 1st ed.). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551382>
- Sabio y García, C. A., Vera, M. S., Vinocur, A., Graziano, M., Miranda, C., & Pizarro, H. N. (2022). Rethinking the term “glyphosate effect” through the evaluation of different glyphosate-based herbicide effects over aquatic microbial communities. *Environmental Pollution*, 292(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118382>
- Schreiber, F., Scherner, A., Massey, J. H., Zanella, R., & Avila, L. A. (2017). Dissipation of Clomazone, Imazapyr, and Imazapic herbicides in paddy water under two rice flood management regimes. *Weed Technology*, 31(2), 330-340. <https://doi.org/10.1017/wet.2017.5>
- Schreinemachers, P., & Tipraqsa, P. (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37(6), 616-626. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.06.003>
- Simonsen, L., Fomsgaard, I. S., Svensmark, B., & Spliid, N. H. (2008). Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(5), 365–375. <https://doi.org/10.1080/03601230802062000>

- Sun, M., Li, H., & Jaisi, D. P. (2019). Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system. *Water Research*, 163, 114840. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.007>
- Terra, J. (2017). Experimentos De Largo Plazo Como Plataforma Agroambiental Para La Intensificación Sostenible. *Revista INIA*, 48, 67-72.
- Terra, J., Castillo, J., Saldain, S., Martinez, S., Bermudez, R., Hernandez, J., & Macedo, I. (2014). Rotaciones Arroceras: Resultados Productivos En Las Primeras Tres Zafras. En *Arroz-soja: resultados experimentales 2013-2014* (Número Agosto, pp. 22-24).
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20260-20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Tseng, M. C., Roel, A., Deambrosi, E., Terra, J. A., Zorrilla, G., Riccetto, S., & Pittelkow, C. M. (2020). Towards actionable research frameworks for sustainable intensification in high-yielding rice systems. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63251-w>
- Tseng, M. C., Roel, Á., Macedo, I., Marella, M., Terra, J. A., & Pittelkow, C. M. (2021). Synergies and tradeoffs among yield, resource use efficiency, and environmental footprint indicators in rice systems. *Current Research in Environmental Sustainability*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2021.100070>
- Ulrich, J. C., & Ferguson, P. L. (2021). Development of a sensitive direct injection LC-MS/MS method for the detection of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in hard waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 3763-3774. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03324-5/Published>
- Williams, W. M., Ritter, A. M., Zdinak, C. E., & Cheplick, J. M. (2014). *Ricewq: Pesticide Runoff Model for Rice Crops Users Manual and Program Documentation Version 1.9.2. February*.

- Winfield, W. J., Bashe, W. J., & Baker, T. V. (1990). Method 547 - Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection. *Environmental Monitoring Systems Laboratory*, 1. https://doi.org/10.1241/johokanri.4.12_19
- Wuest, S. B., Schillinger, W. F., & Machado, S. (2023). Variation in soil organic carbon over time in no-till versus minimum tillage dryland wheat-fallow. *Soil and Tillage Research*, 229. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105677>
- Yadav, V., Kaur, P., & Kaur, P. (2017). Effect of light conditions and chemical characteristics of water on dissipation of glyphosate in aqueous medium. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6334-3>
- Yang, X., Wang, F., Bento, C. P. M., Xue, S., Gai, L., van Dam, R., Mol, H., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2015). Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil - A flume experiment. *Science of the Total Environment*, 512-513, 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.071>
- You, J., & Koropchak, J. A. (2003). Condensation nucleation light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. *Journal of Chromatography A*, 989(2), 231-238. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00084-0)

6 Anexos

6.1 Uso de modelos predictivos de destino ambiental de plaguicidas en cultivo de arroz

6.1.1 Introducción

Dentro de los modelos predictivos de destino ambiental de plaguicidas específicos para el cultivo de arroz, se encuentra el Modelo de Calidad del Agua (Rice Water Quality Model), RICEWQ por sus siglas en inglés. Este modelo de simulación fue desarrollado por Waterbone Environmental Inc. para reflejar los procesos que ocurren en el cultivo, asociados a las condiciones de inundación típicas de la producción de arroz (Williams et al., 2014).

El modelo RICEWQ simula la disipación de plaguicidas y las pérdidas por escurrimiento a cuerpos de agua. Se basa en balances hídricos y de masa de los procesos que experimentan los plaguicidas, reflejando procesos hidrológicos, biológicos y fisicoquímicos, así como el intercambio en el suelo y las pérdidas por degradación. El objetivo de este trabajo fue calibrar el modelo RICEWQ para el ELP con los resultados obtenidos en campo. A continuación, se expondrán los avances alcanzados.

6.1.2 Métodos

6.1.2.1 RICEWQ

El modelo RICEWQ, suministrado por Waterborne Inc. es un software cerrado ejecutable en Windows. Es gobernado por los siguientes balances que se muestran en la Figura 4.1, mediante los cuales se representan todos los procesos de transferencia y transformaciones del plaguicida entre sedimento, agua y follaje, así como el balance de agua. Los procesos implicados se detallan en la tabla 6.1.

El balance hídrico tiene en cuenta flujos de entra y salida; incluyendo en la entrada riego y precipitaciones y en la salida escurrimiento, evapotranspiración y filtración. El riego puede ser establecido por el usuario, como volumen fijo o automático. Para simular el destino ambiental de los plaguicidas el modelo aplica ley de conservación de masa entre agua, follaje y sedimento. A su vez, la tasa de aplicación de plaguicida es atenuada mediante la eficiencia de la aplicación, la deriva y otras pérdidas posibles (Christen et al., 2006).

$$\begin{aligned}
 1- \frac{\partial S}{\partial t} &= \sum I - \sum O \\
 2- \frac{\partial M_F}{\partial t} &= M_{Fapp} - M_{Fdeg} + M_{Ftran} - M_{wash} - M_{harv} \\
 3- \frac{\partial M_W}{\partial t} &= M_{Wapp} + M_{wash} - M_{Wdeg} + M_{Wtran} - M_{volat} - M_{out} - M_{seep} - M_{W-S} - \\
 &M_{setl} + M_{resus} \pm M_{diff} \\
 4- \frac{\partial M_S}{\partial t} &= M_{Sapp} - M_{Sdeg} + M_{Stran} + M_{W-S} + M_{setl} - M_{resus} \pm M_{diff}
 \end{aligned}$$

Figura 6.1: Ecuaciones diferenciales gobernantes del modelo RICEWQ

Tabla 6.1: Símbolos y variables utilizadas en las ecuaciones gobernantes del modelo RICEWQ

Símbolo	Variable	Símbolo	Variable
S	Cantidad de agua acumulada	M_{wash}	Masa de plaguicida lavado desde el follaje
I	Entradas de agua	M_{harv}	Masa de plaguicida removida en la cosecha
O	Salidas de agua	M_{volat}	Masa perdida por volatilización
M_F	Masa de plaguicida en follaje	M_{out}	Masa de plaguicida que sale del predio por drenaje o desborde
M_W	Masa de plaguicida en agua	M_{seep}	Masa perdida por lixiviado
M_S	Masa de plaguicida en sedimento	M_{bed}	Masa de plaguicida transferida por partición en la interfase agua-sedimento
M_{Xapp}	Masa de plaguicida interceptada por cada compartimiento	M_{setl}	Masa de plaguicida transferida al sedimento por asentamiento
M_{Xdeg}	Masa degradada en cada compartimiento	M_{resus}	Masa en suspensión
M_{Xtran}	Masa de plaguicida transformada a metabolito	M_{diff}	Masa de plaguicida difusa entre agua y suelo

El ingreso de datos para ejecutar el modelo se realiza 2 archivos input txt en los cuales la separación de los datos se realiza por espacios. Uno de ellos es para el ingreso de datos meteorológicos (.MET) (Figura 4.3) y el otro para el ingreso de datos referidos a la

simulación, agronómicos y fisicoquímicos de los plaguicidas (.IMP) (Figura 4.2). Luego de ejecutar, se obtienen archivos de salida (nuevamente txt con separación de datos por espacio):

.ZZZ Eco de los datos ingresados

.ZZH Balance hídrico diario incluyendo pérdidas por escurrimiento y días en los cuales se realizó riego

.ZPO Concentración diaria de plaguicida en sedimento, agua y follaje

.ZP(I) Balance de masa diario de cada plaguicida simulado incluyendo pérdidas y degradación

.ZT Serie temporal de masa de RICEWQ plaguicida y volumen de agua perdida por escurrimiento o drenaje.

Con el objetivo de procesar los datos obtenidos en los archivos de salida, se utilizó el software R (R Core Team, 2023) para obtener visualizaciones gráficas de los archivos .ZZH y .ZPO.

```

TEST2019.INP
Hypothetical simulation of RICEWQ Version 1.92
Four chemicals. Q10 Option.
** JM JD JY KM KD KY NTSD EXFL -- Simulation dates / EXAMS flag
  01 01 19 07 07 19 24 0
** JEM JED KMM KMD KHM KHD COVMAX IHFL -- Crop dates, canopy
  02 22 07 02 07 11 1.00 -1
** IDM IDD IRFLAG DIRRI DIRR2 IRATE DOUT DRGMAX -- Irrigation & drainage
  3
  01 01 0 0.0 00.0 0.0 0.0 0.0
  03 11 2 5.0 10.0 3.5 3.0 0.0
  07 02 0 0.0 00.0 0.0 0.0 0.0
** SA DMAX DLAKE SEEP DACT FC WP SM BD CSS
  0.155 30.0 0 0.01 5.0 .31 .15 .21 1.41 50.
** EVAPM(I),I=-1
  -8.00 8.00 8.00 10.00 12.00 13.00 13.00 12.00 11.00 10.00 8.00 8.00
** IAM IAD APP DINC APPEF DRIFT -- Appl. rates, efficiency (fraction), incorporation, drift(%)
  2
  01 01 2.17 0.00 1.00 0.0
  02 01 1.68 0.00 1.00 0.0
** NCHEM NPATHS Q10FL
  2 1 1
** CNAME CW0 CS0 CFO
'GLY' 0.0 0.0 0.0
'AMPA' 0.0 0.0 0.0
** KWM KWH KWP KSW KSD KF WO KD VVOL VSETL VBIND VMIX SOLUB RREAC SNK BI-P
  .183 .000 .014 .002 .032 .094 0.0 209 0.0 0.0 0.1 .001 1.E5 0.00 0.0 0
  .189 .000 .000 .001 .004 .000 0.0 197 0.0 0.0 0.1 .001 1.4E6 0.00 0.0 0

```

Figura 6.2: Visualización del archivo de entrada de datos (.IMP)

1	10119	0.000	0.230	14.600
2	10219	0.000	0.250	15.900
3	10319	0.000	0.300	16.600
4	10419	0.000	0.250	13.200
5	10519	0.000	0.310	14.700
6	10619	0.000	0.330	17.000
7	10719	1.910	0.430	22.100
8	10819	8.540	0.190	19.200

Figura 6.3: Visualización del archivo de entrada de datos meteorológicos (.MET)

6.1.2.2 autoRICEWQ

AutoRICEWQ es un software para gestionar el modelo RICEWQ de una forma más amigable (Fuentes-Edfuf & Martínez-Megías, 2022). Este gestor crea automáticamente los archivos de entrada, ejecuta el RICEWQ y procesa los datos de salida en un único archivo .xsl. AutoRICEWQ fue realizado utilizando código abierto bajo la Licencia GPL-3.0, programado en Python 3 (Martínez-Megías et al., 2023).

6.1.2.3 Datos

La obtención de datos meteorológicos fue descrita en el apartado 3.2.4. Fue necesario realizar cambios en las unidades, dado que la interfaz de RICEWQ original solicita los valores de precipitaciones y evapotranspiración en cm. En cambio, autoRICEWQ permite el ingreso de estos datos como mm, tal como son compartidos en la mayoría de los servicios de datos meteorológicos. Los datos de geometría de la parcela, condiciones de campo y de gestión del cultivo fueron aportados por el personal de INIA Treinta y Tres.

Tanto para el RICEWQ como para autoRICEWQ se realizó la simulación para una parcela de arroz de la rotación R6. La tabla 4.3 resume la mayoría de los datos requeridos por el modelo.

Tabla 6.2: Parámetros del modelo RICEWQ y datos utilizados. Las unidades descritas se muestran tal cual fueron obtenidas del manual del usuario

Símbolo	Descripción	Unidades u opciones	Valor utilizado	Fuente
JM JD JY	Fecha de inicio de la simulación	-		
KM KD KY	Fecha de fin de la simulación			
JEM JED	Fecha de emergencia		11/16	
KMM KMD	Fecha de maduración		3/25	
KHM KHD	Fecha de cosecha		4/3	
COVMAX	Área de cobertura de cultivo	Fracción	1	Gestión del ELP - INIA
IHFL	Remoción de restos vegetales en la cosecha	-1 no laboreo -2 remoción 0-100 laboreo	-1	
IDM IDD	Fecha de inicio/fin de riego		Inicio: 12/2 Fin: 3/25	

IRFLAG	Gestión del riego	0: seco 1: automático >1: vol fijo	Variable en diferentes pruebas	
DIRR1	Altura de lámina de agua para iniciar riego	cm	5	
DIRR2	Altura de lámina de agua para finalizar riego	cm	10	
IRATE	Tasa de riego	cm día ⁻¹	3,5 / 100cm ³ en 100 días	
DOUT	Profundidad de la parcela	cm	30	
DR8MAX	Tasa máxima de drenaje	cm día ⁻¹	0	
SA	Área del cultivo	Ha	0,115	
DMAX	Altura de la taipa	cm	30	
DLAKE	Profundidad inicial de agua en la parcela	cm	0	
SEEP	Tasa de filtración	cm ha ⁻¹ día ⁻¹	0	
DACT	Profundidad de capa activa de sedimento	cm	5	
FC	Capacidad de campo	cm cm ⁻¹	0,31	
WP	Punto de marchitez	cm cm ⁻¹	0,15	
SM	Humedad inicial del suelo	cm cm ⁻¹	0,21	
BD	Densidad aparente del sedimento	g cm ⁻¹	1,25	
CSS	Concentración del sedimento en suspensión	g L ⁻¹		
IAM IAD	Fechas de aplicación de plaguicidas		9/24 10/26	
APP	Tasa de aplicación	Kg ha ⁻¹	2,75 2,14	
APPEF	Eficiencia de la aplicación	Fracción	1	
DINC	Profundidad de incorporación	cm	5	
DRIFT	Porcentaje de deriva	Fracción	0	
KWM	Degradación metabólica en agua	dia ⁻¹	0,187	DT ₅₀ obtenido en ELP
KWH	Hidrólisis en agua	dia ⁻¹	0 (estable)	PPDB
KWP	Fotólisis en agua	dia ⁻¹	0,015	PPDB
KSW	Degradación en suelo saturado	dia ⁻¹	0,014	PPDB
KSD	Degradación en suelo insaturado	dia ⁻¹	0,032	DT ₅₀ obtenido en ELP
KF	Degradación en follaje	dia ⁻¹	0,094	PPDB
KD	Coefficiente de partición agua/sedimento	cm ³ g ⁻¹	209	PPDB
SOLUB	Solubilidad	ppm	100000	PPDB
SNK	Masa de plaguicida interceptada por el agua y transformada a producto inocuo	Fracción	0	Sugerencia Manual (Williams et al., 2014)

6.1.3 Resultados y discusión

6.1.3.1 Simulaciones de prueba por RICEWQ

Los archivos de input requieren el ingreso de fechas en formato mes/día/año, sin embargo, el modelo realiza conteo de días, comenzando nuevamente cada cuenta el 1 de enero. Dado que la zafra estudiada abarca dos años, encontrándose el 1° de enero en el medio de la misma, fue necesario ingresar fechas hipotéticas para poder realizar el cálculo.

Para la discusión de los resultados obtenidos mediante las representaciones gráficas solo se considerarán los perfiles observados, dado que RICEWQ devuelve resultados en unidades de masa (mg) por lo que el cálculo en concentraciones es realizado dentro del código generado en R, aproximando volúmenes tanto de suelo como de agua para el cálculo.

En la figura 6.4 se encuentra la representación gráfica de los resultados obtenidos, al considerar el riego como un volumen fijo con una tasa de $3,5 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$. Como puede observarse, el modelo simula una lámina de agua en la parcela previo al inicio del riego. Esta simulación de lámina de agua anticipada a lo ocurrido en campo, conlleva a la degradación de GLY y AMPA previo al inicio de la simulación de riego.

Dado que el personal del INIA informó que, si bien el riego no se realiza todos los días, aproximadamente ingresan a la parcela 100 cm^3 en 100 días, se realizó otra prueba considerando el riego automático a una tasa de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$. Como puede observarse en la figura 6.5, a pesar de que nuevamente se observa la simulación de lámina de agua previo al inicio de la inundación, hay un cambio en el perfil de degradación en agua de ambos compuestos, que, de todas formas, no se asemeja a los resultados experimentales obtenidos en esta tesis (figura 3.3 y 3.4).

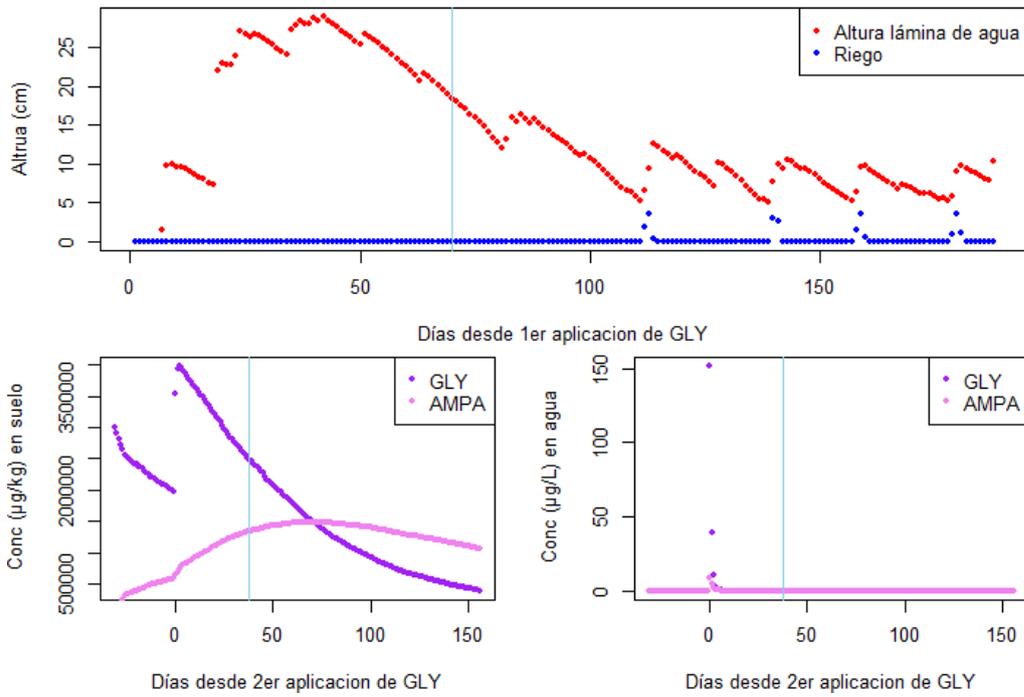


Figura 6.4: RICEWQ simulación 1, tomando riego con volumen fijo ($IRFLAG=2$), con una tasa de riego de $3.5 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$, la línea vertical celeste indica el día en el que se inició el riego por inundación en el ELP

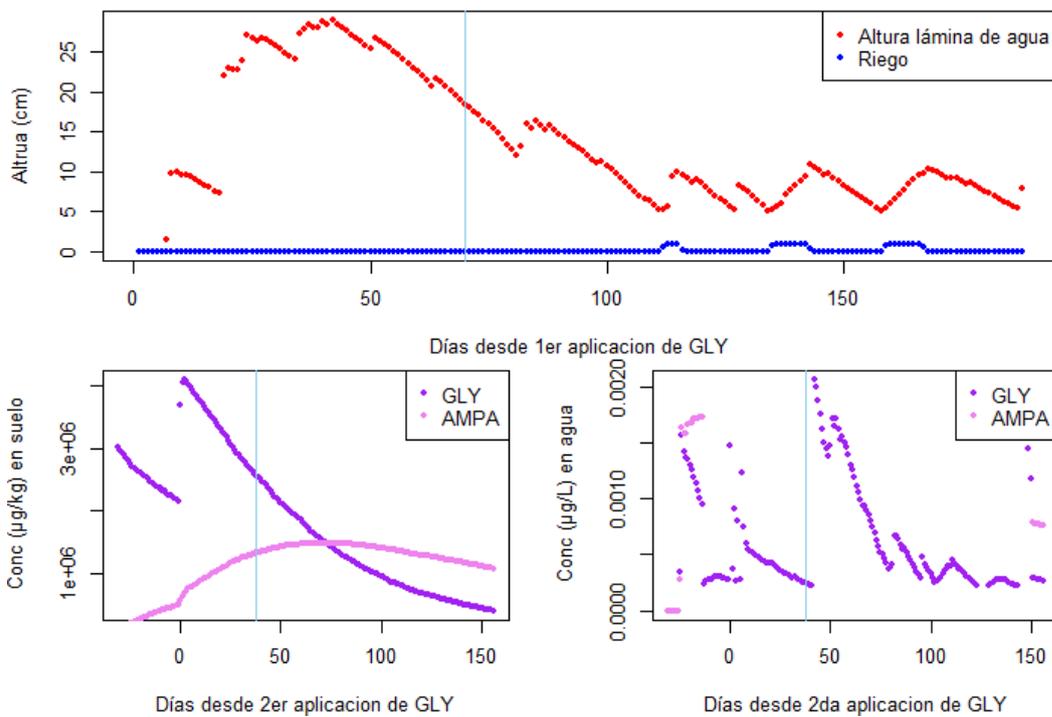


Figura 6.5: RICEWQ simulación 2, tomando riego automático ($IRFLAG=1$), con una tasa de riego de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$, la línea vertical celeste indica el día en el que se inició el riego por inundación en el ELP

Para buscar una simulación del riego más cercana a la observada experimentalmente, se fuerza la simulación indicando 0 riego hasta el inicio de la inundación, como puede observarse en captura del archivo .IMP (Figura 6.6).

```

** IDM  IDD  IRFLAG  DIRR1  DIRR2  IRATE  DOUT  DR8MAX  -- Irrigation & drainage
3
01  01  0  0.0  00.0  0.0  0.0  0.0
03  11  2  5.0  10.0  1  3.0  0.0
07  02  0  5.0  10.0  0.0  3.0  0.0

```

Figura 6.6: Visualización de los datos de riego del archivo de entrada para RICEWQ simulación 3

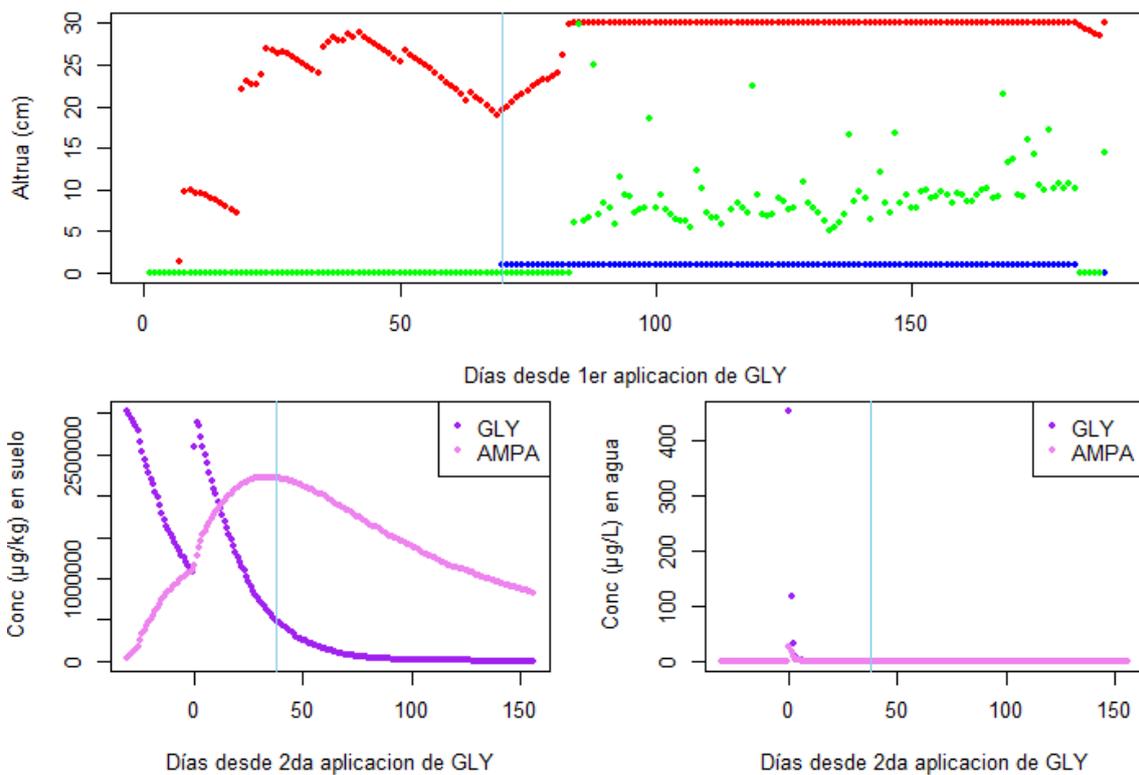


Figura 6.7: RICEWQ simulación 3, tomando riego con volumen fijo ($IRFLAG=2$), con una tasa de riego de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$. En el primer gráfico los puntos verdes representan salidas de agua de la parcela. La línea vertical celeste indica el día en el que se inició el riego

En esta prueba, también se graficaron las salidas de agua de la parcela por escurrimiento, observándolas durante todo el tiempo de inundación, cabe aclarar que la información sobre la gestión del cultivo, INIA indicó que las salidas de agua del predio por escurrimiento fueron despreciables.

Visto que el principal problema encontrado para calibrar el modelo fue la fidelidad de la simulación de riego y lámina de agua, se planteó como posible causa errores de sintaxis en el ingreso de datos meteorológicos. Esto se debe, como se expuso en el apartado

6.1.2.3, a que el archivo .MET separa los valores mediante espacios, aumentando la probabilidad de errores al ingreso.

6.1.3.2 Resultados obtenidos utilizando la interfaz autoRICEWQ

Como resultado de lo expuesto en el apartado anterior, se realizaron simulaciones utilizando la interfaz autoRICEWQ, cuyo ingreso de datos se realiza a partir de planillas de cálculo .xls. Estas pruebas fueron realizadas únicamente para GLY.

Nuevamente, el formato de fechas resulto un factor sensible, por lo que se optó por no variar las fechas en el ejemplo precargado y realizar cuenta de días como para el RICEWQ original. A su vez, al igual que el modelo original, es muy sensible a los formatos de puntos y comas, por lo que los valores se cambian del ejemplo uno a uno.

En primer lugar, se replicó la prueba 2, tomando IRFLAG=1 (riego automático) con una tasa de riego de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$.

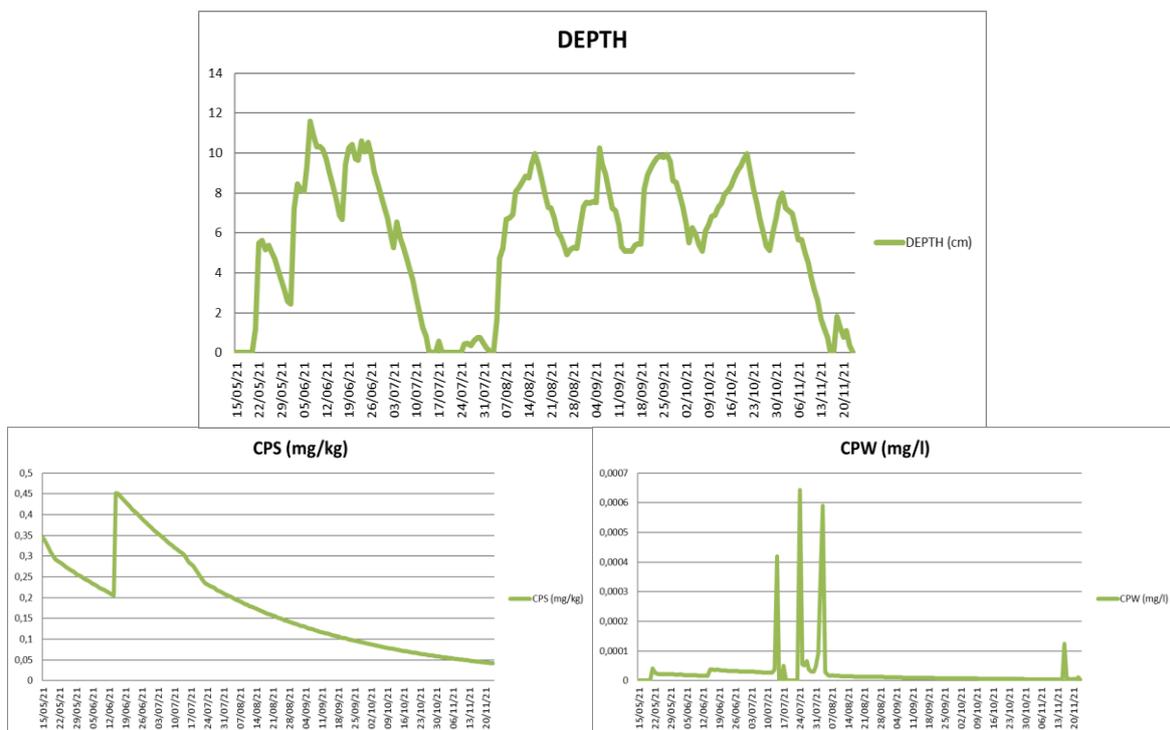


Figura 6.8: Simulación 1 realizada utilizando autoRICEWQ, tomando riego automático (IRFLAG=1), con una tasa de riego de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$. El inicio del riego se simula en la fecha 24/7/2021

Al igual que al aplicar el modelo original, se simula lámina de agua previo al inicio del riego (24/7/2021), obteniendo concentración y degradación de GLY antes del inicio del riego (Figura 6.8).

En la segunda simulación realizada, se obtienen resultados similares con respecto al decaimiento de GLY en suelo y agua, dado que la lámina de agua es simulada desde antes del inicio del riego. A su vez, al simular un volumen fijo de riego se obtienen salidas de agua de la parcela (Figura 6.9).

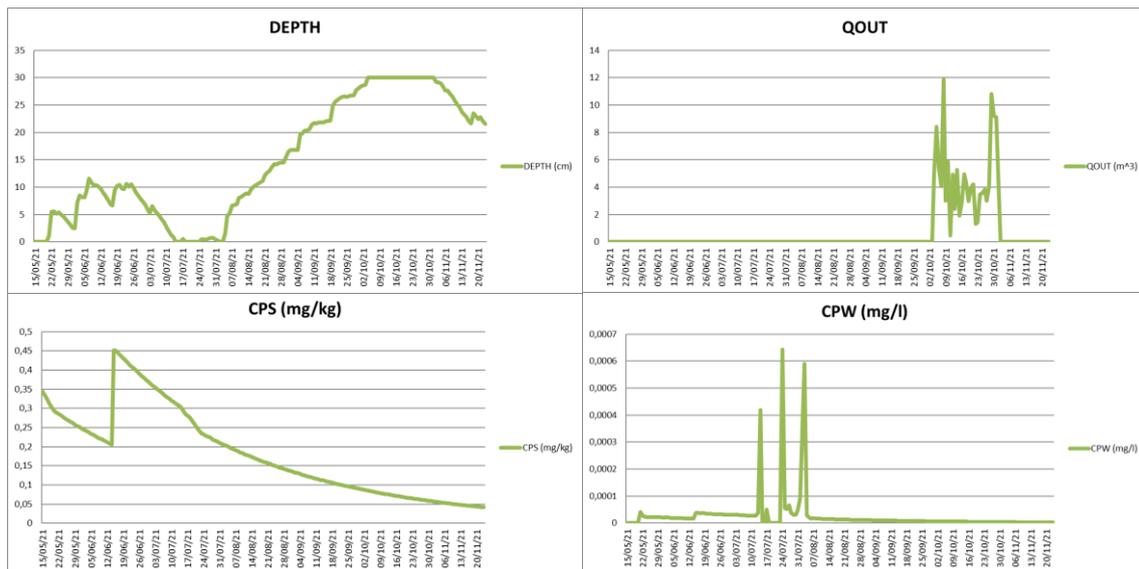


Figura 6.9: Simulación 2 realizada utilizando autoRICEWQ, tomando riego con volumen fijo (IRFLAG=2), con una tasa de riego de $1 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$. El inicio del riego se simula en la fecha 24/7/2021

En definitiva, la obtención de perfiles de resultados similares utilizando RICEWQ y autoRICEWQ sugiere la diferencia entre la simulación con lo acontecido en campo no se debería a un error de sintaxis en el ingreso de datos.

Sin embargo, surgen nuevas hipótesis para explicar las diferencias obtenidas con los resultados medidos en campo. Es probable que algún dato sobre el sitio de estudio sea gobernante en los cálculos realizados por el modelo, pero al ser de código cerrado no es posible chequear su estructura. Esto refuerza la necesidad de calibrar los modelos predictivos en base a datos experimentales del sitio donde se busca aplicar.

Por otro lado, al realizar una búsqueda bibliográfica sobre simulaciones realizadas con RICEWQ, en los casos encontrados la aplicación de plaguicidas se realizó luego del inicio

de la inundación (Tabla 6.4). El manual del modelo, para estos casos solo indica que la variable SNK (fracción de plaguicida interceptada por el agua e inmediatamente transformada a producto inocuo) sea cero (Williams et al., 2014), lo cual fue tenido en cuenta. Quizás sea necesario realizar ajustes en las fórmulas de cálculo de modelo para poder simular escenarios de barbecho químico que son previos a la inundación.

Tabla 6.3: Referencias bibliográficas donde se aplica el modelo RICEWQ

Trabajo	Lugar del estudio	Plaguicida simulado	Fecha de inicio del riego	Fecha de aplicación de plaguicida
Christen et al., 2006	Australia	Molinato	6/10/2001	17/10/2001
Pereira et al., 2017	Portugal	Imidacloprid	19/6/2013	16/7/2013
Williams et al., 2014	Manual	Ejemplo	4/6/1991	5/6/1991
Wang et al., 2019	Estados Unidos	Tiobencarb	11/5	30/5
Jin et al., 2016	Corea	Diazinon, Butaclor, 2,4-D, Carbaryl. Oxadiazona Clorpirifos metil	1/5	22/7

6.1.4 Conclusiones

Se realizaron pruebas de simulación para calibrar el modelo RICEWQ bajo las condiciones dadas en el ELP para la zafra 2019/2020, tanto utilizando su versión original como el gestor autoRICEWQ. En ambos casos, no se logró una concordancia adecuada con los resultados experimentales, ya que las simulaciones indican la presencia de lámina de agua y degradación de GLY antes del inicio del riego por inundación. Esto podría atribuirse a que las ecuaciones gobernantes del modelo no contemplan la aplicación directa de plaguicidas sobre el suelo, o también podría existir algún factor determinante en las condiciones del sitio que esté afectando los resultados simulados.

Dado que las simulaciones ofrecen la posibilidad de evaluar diversos escenarios al modificar la gestión del cultivo, se considera necesario seguir trabajando en el ajuste del modelo para simular de manera precisa el destino ambiental de plaguicidas utilizados

como barbecho químico. Otra vía para el ajuste podría implicar la calibración con plaguicidas aplicados luego de haber comenzado el riego, lo cual no ocurrió en la zafra estudiada.

Se reconoce la necesidad de obtener un mayor entendimiento sobre la implicancia de las variables empleadas por el modelo y establecer contacto con investigadores que hayan trabajado previamente con él, lo que podría contribuir significativamente al proceso de ajuste.

6.2 Presentaciones realizadas

6.2.1 Publicaciones

Alonso, B., Pérez-Parada, A., Escalante, F., Carrasco-Letelier, L., Martínez, S. (2020). Distribución ambiental de los plaguicidas en rotaciones arroceras del este. *Revista INIA*, 62, 55–59.

Alonso, B., Griffero, L., Bentos Pereira, H., Pareja, L., Pérez Parada, A. (2022). Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography - fluorescence detection and tandem mass spectrometry. *MethodsX*, 9, 101730.

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101730>

Alonso, B., Colazzo, M., & Parada, A. P. (2024). Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine). *Encyclopedia of Toxicology 4th Edition*, 5, 23–31.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00148-2s>

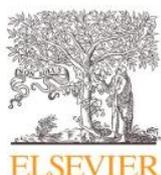
6.2.2 Presentaciones en eventos

Alonso, B., Griffero, L., Segura, A., Pérez A. Dinámica temporal de glifosato y AMPA en agua del cultivo de arroz. 7mo Encuentro Nacional de Química (ENACQUI) 2021. E-poster.

Alonso, B., Griffero, L., Pérez-Parada, A., Segura, A. Decaimiento de glifosato utilizado como barbecho en rotaciones arroceras. las VI Jornadas de Estadística Aplicada, 2021. Presentación oral.

Alonso, B., Griffero, L., Segura, A., Escalante, F., Martínez, S., Carrasco-Letelier, L., Terra, J., Roel, A., Pérez-Parada, A. Glyphosate dissipation in soil and flooded water during rice production cycle. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting, 2023. Presentación oral.

A continuación, se adjuntan, en primer lugar, la publicación realizada en la revista *Methods X* y en segundo lugar el capítulo recientemente publicado en *Encyclopedia of Toxicology 4th Edition*.



Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex



Method Article

Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography - fluorescence detection and tandem mass spectrometry[☆]



Beatriz Alonso^a, Luciana Griffero^a, Heinkel Bentos Pereira^a,
Lucía Pareja^b, Andrés Pérez Parada^{a,*}

^aDepartamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Uruguay

^bDepartamento de Química del Litoral, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay

A B S T R A C T

The herbicide glyphosate (GLY) and its metabolite aminophosphonic acid (AMPA) are troublesome compounds for analysis in the environment. Here we report a reliable technique for GLY and AMPA determination in freshwater and soils by means of derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) and further liquid chromatography with fluorescence detection (FLD) and tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis. Selected experiments were carried out to evaluate selectivity, sensitivity, repeatability, linearity and quantification performance in both matrices.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

A R T I C L E I N F O

Method name: Glyphosate and AMPA in freshwater and soil by FMOC derivatization and fluorescence and tandem mass spectrometry detection

Keywords: glyphosate, AMPA, environmental fate of pesticides, fluorescence detection (FLD), tandem mass spectrometry (MS/MS), liquid chromatography (LC), FMOC-Cl

Article history: Received 18 February 2022; Accepted 9 May 2022; Available online 13 May 2022

[☆] **Direct Submission or Co-Submission:** Co-submissions are papers that have been submitted alongside an original research paper accepted for publication by another Elsevier journal Please select Direct submission

^{*} Corresponding author.

E-mail address: aperez@cure.edu.uy (A. Pérez Parada).

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101730>

2215-0161/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Specification table

Subject Area;	<i>Environmental sciences</i>
More specific subject area;	<i>Pesticide residues in environment</i>
Method name;	<i>Glyphosate and AMPA in freshwater and soil by Fmoc derivatization and fluorescence and tandem mass spectrometry detection</i>
Name and reference of original method;	<i>ISO 21458:2008 (glyphosate and AMPA in water)</i>
Resource availability;	<i>Not applicable</i>

Method details

Chemicals and reagents

Glyphosate (GLY) (99.4%), aminophosphonic acid (AMPA) (99%) and glyphosate-FMOC (GLY-FMOC std) (98%) reference standards and the derivatizing reagent FMOC-Cl (9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride, 99%) were purchased from HPC Standards GmbH (Cunnersdorf, Germany). HPLC-grade dichloromethane (DCM) acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from a Smart2Pure 3 UV from Thermo Scientific (Massachusetts, EEUU). Stock solutions of GLY and AMPA were prepared with ultrapure water from the standard substances at 2000 mg L⁻¹. Working solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solutions in ultrapure water. The derivatizing solution was prepared in MeCN at 6 g L⁻¹ (23 mM) of FMOC-Cl. The working and derivatizing solutions were stored in darkness at 4 +/- 2°C. Sodium borate decahydrate (Na₂B₄O₇ · 10H₂O), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), ammonium acetate (NH₄CH₃CO₂) and ammonium hydroxide (NH₄OH) of analytical grade were supplied by Carlo Erba (Cornaredo, Italy). Solutions of these reagents were prepared separately in ultrapure water at the following concentration levels: 100, 10, 1.0, 0.50 mg L⁻¹.

Sampling, sample storage and blank samples

Blank samples of freshwater were obtained from a productive field located in a natural pasture livestock area (34°15'29"S 54°57'09.9"W). Soil blank samples were taken from an agricultural field (33°6'23"S, 54°10'24" W) where GLY applications have never been made. In addition, the absence of GLY and AMPA in both matrices was experimentally verified by both LC-FLD and LC-MS/MS. Full characterization of Eastern Uruguay soil matrix is described in previous works [1,2].

A representative portion sample of approximately 500 g soil sample is taken. The sample is reduced by grinding and quartering to obtain a homogeneous test sample of approximately 40 g which is freeze-dried and stored in polyethylene bags at -18°C until analysis. A representative test sample of 40 mL of water is obtained in 50 mL polypropylene centrifuge tubes and frozen at -18°C until analysis. All subsamples should be kept in darkness until analysis. No evidence of degradation was found when re-analyzing samples after 3 months of frozen storage.

Sample treatment for freshwater samples

- 1) Transfer a 3.0 mL aliquot of freshwater into a 50 mL centrifuge tube and sonicate in an ultrasonic bath for 3 min.
- 2) Add 0.5 mL of Na₂B₄O₇ 25 mM solution; 0.5 mL of FMOC-Cl 6.0 g L⁻¹ (0.023 M) and 0.5 mL of MeCN. Shake and vortex for 30 s.
- 3) Let it react for 1 hour at room temperature (22 +/- 3 °C)
- 4) Add 4.5 mL of DCM. Shake and vortex for 30 s.
- 5) Filter 1.0 mL of supernatant through a PVDF 0.45 µm filter and collect into a 2.0 mL screw-cap vial for LC-FLD and LC-MS/MS analysis

Sample treatment for soil samples

- 1) Weight 5.0 g of freeze-dried soil sample into a 50 mL centrifuge tube, add 10 mL of KH_2PO_4 0.1 M solution and sonicate in an ultrasonic bath for 30 min.
- 2) Centrifugate at 4000 rpm for 5 minutes, filter 2.0 mL of supernatant through a PVDF 0.45 μm filter and add 2.0 ml of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1M.
- 3) Transfer a 3.5 mL aliquot into a 50 mL centrifuge tube and add 0.5 mL of Fmoc-Cl 6 g L^{-1} and 0.5 mL of MeCN. Shake and vortex for 30 s.
- 4) Let it react for 1 hour at room temperature (22 +/- 3 °C)
- 5) Add 4.5 mL of DCM. Shake and vortex for 30 s.
- 6) Filter 1.0 mL of supernatant through a PVDF 0.45 μm filter and collect into 2.0 mL screw-cap vials for LC-MS/MS analysis

A general analytical workflow for both matrixes is found at Fig. S1.

Liquid chromatography-fluorescence detection

A Thermo Scientific Ultimate 3000 LC coupled to a fluorescence detector Thermo Scientific FLD 3400RS was used for LC-FLD analysis of GLY and AMPA in freshwater samples. A Thermo Scientific Hypersil Gold C18 (250 mm x 4.6 mm id. 5 μm) column was used. The column oven temperature was set at 30°C. The mobile phase consisted of (A) 5 mM ammonium acetate buffer (pH=9.5), pH is adjusted with a diluted solution of NH_4OH , and (B) LC grade MeCN. The separation was performed at 1 mL min^{-1} with the following elution program: starts at 5% B, gradually changing until 19% B at 6 minutes and stable for 4 minutes, then to 95% in 2 minutes and keep stable for 7 minutes. The program ends by decreasing the acetonitrile (B) to 5% for column stabilization. The injection volume was 10 μL . For syringe cleaning, we used a 1mL washing volume of MeOH after each injection. The detector was operated at fixed wavelengths (λ excitation: 270 nm, λ emission: 315 nm), the FLD acquisition was programmed from 5 to 10 minutes with a sensibility factor of 2 (for GLY) and between 10 and 13 minutes a sensibility factor of 3 (for AMPA). Chromeleon v.7.2.9 software from Thermo Scientific was used for instrument control and data processing.

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LC-MS/MS analysis was performed with an Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) system coupled to an AB Sciex 4000 QTRAP (Concord, Canada) quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometer operated in scheduled MS/MS mode. The system was equipped with an electrospray (ESI) source Turbo V operated on negative ionization mode. A ZORBAX Eclipse XBD-C18 (150 mm x 4.6 mm id. 5 μm) column from Agilent Technologies was used. The separation was performed at 20°C using the same mobile phase and gradient from LC-FLD analysis with a constant flow rate of 0.6 mL min^{-1} . The injection volume was 5 μL . Tandem MS detection was performed using the multiple reaction monitoring (MRM) mode with negative ESI- mode. The optimal MRM conditions were optimized using direct infusion in the ESI-. Source temperature was 500°C, ionization voltage was 5000V, curtain gas was nitrogen at 20 psi and the nebulizer gas was nitrogen at 50 psi. Scheduled MRM was used with a 90 s detection window covering the expected retention time (R_t (min)) of both analytes. Analyst v 1.7.1 was used for instrument control and data processing. Table 1 describes the spectrometric conditions.

Optimization of instrumental conditions

We tested LC-FLD and LC-MS/MS performance. LC-FLD is a highly disseminated analytical instrumentation whereas LC-MS/MS is a standard and robust technique in most residue laboratories.

Due to the amphoteric characteristics of GLY and AMPA, we evaluated different mobile phase conditions. In the bibliography, the use of gradients in an acidic medium with the addition of formic acid (FA) [3] or a basic medium such as ammonium acetate solutions can be found [4–6]. We

Table 1

LC-MS/MS conditions for both compounds. Rt: retention time; DP: declustering potential; CE: collision energy.

Analyte	Rt (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	CE (V)
GLY-FMOC	6.5	390	168	-35	-17
	6.5	390	150	-35	-36
AMPA-FMOC	10.5	332	110	-30	-11
	10.5	332	136	-30	-23

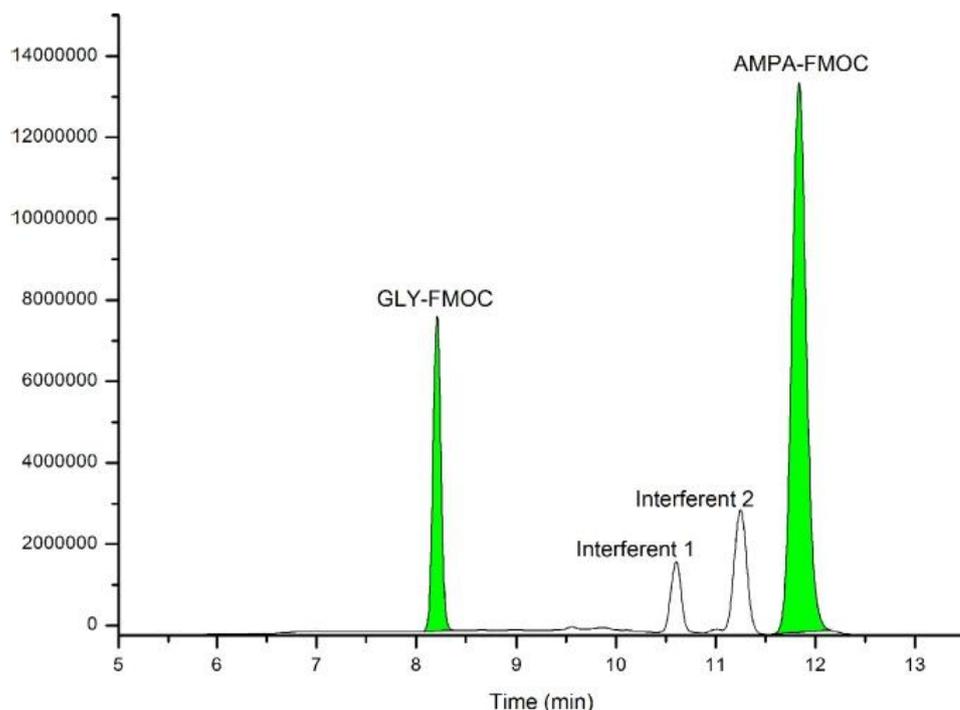


Fig. 1. LC-FLD chromatogram of a freshwater sample at $5 \mu\text{gL}^{-1}$ GLY (Rt=8.3 min) and AMPA (Rt=11.8)

selected mobile phase conditions proposed by Ramirez et al. [5], in which $\text{pH} = 9.5$ allows GLY-FMOC and AMPA-FMOC in their anionic form, ensuring an early elution of the compounds of interest and increasing the Rt (min) of neutral interferences and FMOC by-products. This mobile phase also obtained a good chromatographic resolution (R_s) with respect to the closest interferences of the signal peaks of GLY-FMOC ($R_s=13.97$) and AMPA-FMOC ($R_s=2.33$), as shown in Fig. 1.

Retention time is pH sensitive. A soft variation of the pH of the mobile phase and Rt (min) shift was found, probably due to the volatilization of NH_3 during prolonged analytical sequences (see Fig. S2). Therefore, the accuracy of pH adjustment of the mobile phase and its daily preparation is critical in reducing the variability in the Rt (min) of every analytical batch.

Both GLY-FMOC and AMPA-FMOC are prone to carry-over effects at the injection module. This problem is minimized by using LC grade MeOH as cleaning solvent of the injection system. We also increased the flushing volume used for cleaning between injections to 1 mL after each injection. After the elution of analytes, the mobile phase gradient has a final stage in which the composition of organic solvent is maximized to wash the column and tubing of the derivatization by-products. The used FLD allows the use of different acquisition channels with variable wavelengths and sensitivity factors of the photomultiplier. These factors were adjusted for each analyte, being necessary to use a higher sensitivity factor for AMPA-FMOC detection compared to GLY-FMOC detection. Then, a good

detectability was obtained for both compounds. In the case of soil, FLD detection enables GLY-FMOC determination solely. Interferences of soil-matrix reaction by-products with the same R_t (min) as AMPA-FMOC were present. The chromatographic conditions for LC-MS/MS were identical to those selected for LC-FLD (See LC-MS/MS chromatogram in Fig. 2). In this case, due to the higher selectivity of MS/MS, the long-lasting washing stage of the LC column was shortened to reduce the running time. LC-MS/MS acquisition conditions for both compounds are shown in Table 1 for the ESI negative ionization mode. These MRM conditions were optimized using GLY-FMOC y AMPA-FMOC prepared separately at the laboratory with a concentration of 1 mg L^{-1} .

Optimization of sample preparation

The use of glassware is not recommended since documented losses by adsorption [7]. We used plastic disposable materials whenever possible and glass vials after derivatization.

Different methods for GLY and AMPA analysis using FLD detection have been reported [5,7,8]. These are generally based on fundamentals of two official methods for GLY and AMPA determination in water: (i) ISO 21458:2008 which proposes derivatization in basic medium prior to chromatographic separation, detecting GLY-FMOC and AMPA-FMOC derivatives [7] and (ii) US EPA Method 547 proposed in which derivatization is performed post-chromatographic separation followed by FLD detection [9]. In this work, optimization was inspired by ISO 21458:2008 scheme. Table 2 shows different reported methods in water and soil by means of FMOC derivatization. As seen, different reports use varied customizations in chemicals and experimental conditions of analysis but also instrumental techniques including chromatographic conditions such as chromatographic columns, mobile phases, pH of mobile phases ranging from acidic to basic media but also polarities of ESI.

Here, we combined sample preparation steps proposed by Demonte et al., 2018 for freshwater samples [3], the sample preparation proposed by Lupi et al., 2019 for soil samples [10] and combined LC-FLD and LC-MS/MSM analysis proposed by Ramirez et al., 2014 [5]. Demonte et al. 2018 proposed a methodology to determine GLY and AMPA in groundwater. In that case, a preconditioning step by strong acidification of sample with HCl is mandatory to reduce the interaction of multivalent cations with the amphoteric behavior of GLY and AMPA [3]. In our study, we tested superficial freshwater from rivers and finally we have avoided this tedious step. Furthermore, this simplified strategy was tested in different freshwater sources without evidence of matrix disturbance if avoiding acidification pretreatment. Other reports present some important differences, mainly in the time and temperature required for the derivatization reaction with FMOC-Cl. Some authors have performed the derivatization with FMOC-Cl from 30 min [6] to overnight reaction [10]. We evaluated optimal conditions for reaction at 3 different temperatures (22°C , 30°C and 45°C) and reaction times (30, 60 and 120 minutes). After 60 mins reaction, no significant differences were found in the areas obtained for treatments (ANOVA test, $p = 0.51$; $\alpha 0.05$). Then, the most favorable conditions for a laboratory workflow have been selected, leaving the reaction at room temperature ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) for 60 minutes (Fig. S2). These conditions are of paramount importance for a high throughput routine method for GLY determination. As clearly concluded from Table 2, most reports overestimate the derivatization duration.

The stability of GLY-FMOC and AMPA-FMOC derivatives has been reported for 10 days [11]. However, we evidenced soft losses in peak height and area when analyzing the vials day-to-day. After 7 days of reinjection of calibration curve vials stored at room temperature in the dark, we found a decrease in GLY-FMOC area of 5.0% while for AMPA-FMOC it was 10%.

Based on these results, we recommend making fresh batch sequences that include blanks, calibration standards, quality controls and testing samples and analyzing them in the same analytical sequence.

Other minor changes to ISO 21458:2008 includes the use of DCM instead of diethyl ether in the cleanup step [7]. DCM is denser than an aqueous solution. Therefore, it enables a rapid separation of layers and direct sampling of aliquots from the upper phase.

We performed the validation using external calibration. This can be successfully performed with proper representative blank samples. Instead, ISO 21458:2008 suggests a standard addition method. In preliminary experiments, we studied LC-FLD selectivity and specificity in natural freshwater and

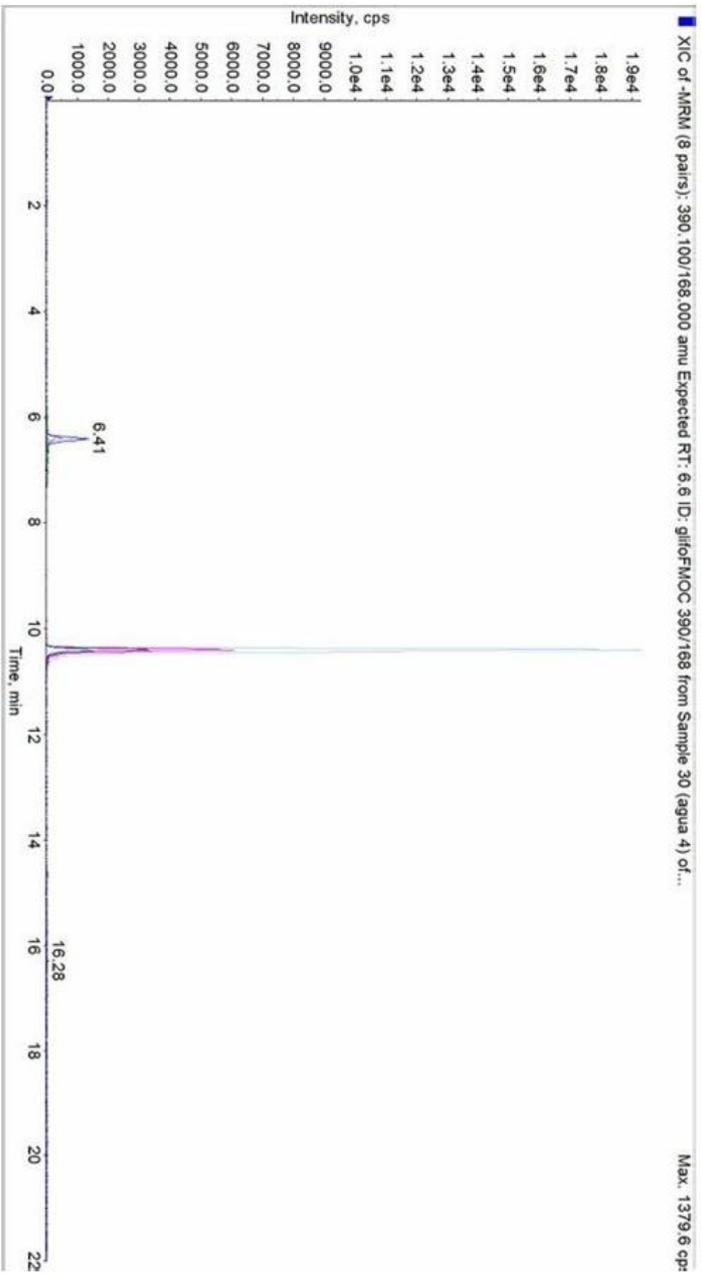


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of a freshwater sample fortified at 5 μgL^{-1} GLY (Rt=6.4) and AMPA (Rt=10.2)

Table 2
Comparison of analytical techniques for the detection of GLY and AMPA in soil and water by FMOC-Cl derivatization. DV: derivatization; FA: formic acid; NH₄Ac: ammonium acetate; Method validation

Matrix	Analyte	Sample preparation	Instrumental system	Chromatographic column and Mobile phase	Quantitation approach	LOQ	Occurrence in real samples	Reference
Soil	GLY	5 g sample + KH ₂ PO ₄ + Na ₂ B ₄ O ₇ 40 mM + FMOC-Cl (overnight DV)	LC-MS/MS positive	C18 (50 mm x 2.1mm i.d. 1.7µm) gradient of A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	IUS 1.2-13 C 15N (GLY)	10 µg kg ⁻¹	35 - 1502 µg kg ⁻¹	[4]
	AMPA	2 mL sample + KH ₂ PO ₄ + Na ₂ B ₄ O ₇ 40 mM + FMOC-Cl (overnight DV)	ESI			10 µg kg ⁻¹	299 - 2296 µg kg ⁻¹	
Fresh water	GLY	3 mL sample + HCl + KOH + Na ₂ B ₄ O ₇ 40 mM + FMOC-Cl + MeCN (2h DV) + DCM cleanup	LC-MS/MS positive	C18 (100 mm x 2.1 mm i.d. 18µm) gradient of A)H ₂ O:MeCN(98:2)+0.1%FA B)MeCN+0.1%HCO ₂ H	IUS 1.2-13 C 15N (GLY) 13 C 15N (AMPA)	0.5 µg L ⁻¹	0.5 - 2.6 µg L ⁻¹	[3]
Groundwater	GLY	3 mL sample + HCl + KOH + Na ₂ B ₄ O ₇ 40 mM + FMOC-Cl + MeCN (2h DV) + DCM cleanup	ESI			0.6 µg L ⁻¹	0.6 - 11.3 µg L ⁻¹	
	AMPA							
Freshwater, tap water and groundwater	GLY and AMPA	3 mL sample + HCl + KOH + Na ₂ B ₄ O ₇ 50mM + DEE + MeCN + FMOC-Cl (1h DV) + H ₂ PO ₃ (stop reaction), DEE cleanup	LC-FID	C18 (250 mm x 3 mm i.d. 5µm) gradient of A) KH ₂ PO ₄ 2mM (pH=7) B) MeCN	EC	Not reported	Not reported	[7]
	GLY	5g sample + KH ₂ PO ₄ 0.1M + Na ₂ B ₄ O ₇ 0.1M + FMOC-Cl (overnight DV), DCM cleanup	LC-MS/MS positive	C18 (50 mm x 2.1mm i.d. 1.7µm) gradient of A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	IUS 1.2-13 C 15N (GLY)	0.2 µg L ⁻¹	0.2 - 6.5 µg L ⁻¹	
Soil	AMPA		ESI			0.9 µg kg ⁻¹	0.9 - 1.3 µg kg ⁻¹	[10]
Rainwater	GLY	2mL sample + KH ₂ PO ₄ 0.1M + Na ₂ B ₄ O ₇ 0.1 mM + FMOC-Cl (overnight DV), DCM cleanup	LC-FID-MS/MS	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. 5µm) gradient of A) MeCN B) 5mM NH ₄ Ac	EC	0.75 µg L ⁻¹	0.75 - 2.5 µg L ⁻¹	
Water	AMPA	20 mL sample + freeze drying + Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM + EDTA + FMOC-Cl (3h DV), Without cleanup	LC-MS/MS	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. 5µm) gradient of A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	IUS 1.2-13 C 15N (GLY)	0.75 µg L ⁻¹	0.75 - 7.1 µg L ⁻¹	[5]
Fresh water	GLY	1 mL sample + Na ₂ B ₄ O ₇ 400 mM + FMOC-Cl + MeCN (overnight DV)	LC-MS	C18 (75 mm x 4.6 mm i.d. 3µm) gradient of A) MeOH B) NH ₄ Ac 5mM	IUS 1.2-13 C 15N (GLY)	1 µg L ⁻¹	175 - 125 µg L ⁻¹	[6]
Sub surface soil	AMPA	2 g sample + KOH 0.6 M + HCl + Na ₂ B ₄ O ₇ 5% + FMOC-Cl + MeCN (30 min) + FA conc.	LC-MS/MS negative	C18 (150 mm x 2.1mm i.d. 3.5µm) gradient of A) NH ₄ Ac 5mM (pH=9) B) MeOH:H ₂ O (9:1)	IUS 1.2-13 C 15N (GLY) 13 C 15N (AMPA)	50 µg kg ⁻¹	200 - 2129 µg kg ⁻¹	[12]
Tap water	GLY	1 mL sample + Na ₂ B ₄ O ₇ 5% + FMOC-Cl + MeCN (30 min) + FA	ESI			50 µg L ⁻¹	110 - 1270 µg kg ⁻¹	
Fresh water	AMPA	5 mL sample + Na ₂ B ₄ O ₇ 0.1M + FMOC-Cl (overnight DV) + online SPE	LC-MS/MS negative	C18 (150 mm x 2.0 mm i.d. 5µm) gradient of A) (NH ₄) ₂ CO ₃ B) MeOH	IUS 1.2-13 C 15N (GLY) 13 C 15N (AMPA)	10 µg L ⁻¹	170 - 2900 µg L ⁻¹	
Soil	GLY	5 g sample + KH ₂ PO ₄ 0.1 M + Na ₂ B ₄ O ₇ 0.1M + FMOC-Cl + MeCN (1h DV), DCM cleanup	LC-MS/MS negative	C18 (150 mm x 4.6 mm i.d. 5µm) gradient of A) MeCN B) NH ₄ Ac 1mM (pH=9.5)	EC	50 µg kg ⁻¹	50 - 825 µg kg ⁻¹	This work
Fresh water	AMPA	3mL sample + Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM + FMOC-Cl + MeCN (1h DV), DCM cleanup	LC-FID	C18 (250 mm x 4.6 mm. i.d. 5µm) gradient of A) MeCN B) NH ₄ Ac 1mM (pH=9.5)	EC	50 µg kg ⁻¹	238 - 1182 µg kg ⁻¹	
Fresh water	GLY		LC-MS/MS negative	C18 (150 mm x 4.6 mm. i.d. 5µm). gradient of A) MeCN B) NH ₄ Ac 1mM (pH=9.5)	EC	1 µg L ⁻¹	0.25 - 14.6 µg L ⁻¹	
	AMPA		ESI			1 µg L ⁻¹	1 - 36.6 µg L ⁻¹	

Table 3
Figure of merits in freshwater by LC-FLD

	Freshwater			
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dynamic range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matrix effect (%)	Repeatability RSD (%)
GLY	0.25	0.25 - 100	4	4
AMPA	1	1- 100	4	4

Table 4
Figure of merits in freshwater and soil by LC-MS/MS

	Freshwater				Soil			
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dynamic range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matrix effect (%)	Repeatability RSD (%)	LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Dynamic range ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Matrix effect (%)	Repeatability RSD (%)
GLY	1	1-100	0.3	5	50	50 - 1000	-90	12
AMPA	1	1-100	-1.6	3	50	50 - 1000	-88	12

ultrapure water samples. LC-FLD linearity was tested for GLY in the range 0.25 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and between 1 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AMPA. Calibration curves of GLY-FMOC and AMPA-FMOC are obtained by spiking GLY and AMPA at different levels. These calibration standards are subjected to the complete analytical procedure, so they are finally corrected by the recovery. For LC-FLD, the lowest calibration level (LCL) with a signal-to-noise ratio (S/N) > 10 was selected as the limit of quantification (LOQ). LOQ was 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for GLY and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AMPA. The matrix effect (ME (%)) in freshwater for both compounds was 4.0%. Instrumental repeatability was analyzed in triplicate at the 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ levels, obtaining a relative standard deviation (RSD, %) at the Rt (min) of 0.16% for both compounds. Intra-day repeatability was 4.0% for both compounds for one analyst. In the case of inter-day repeatability, the procedure was performed by two different analysts after one week. In this case, the RSD for GLY and AMPA were 5.0%. Table 3 shows the validation results obtained for water analysis by LC-FLD.

Here, we tested LC-FLD and LC-MS/MS in both freshwater and soil. LC-FLD identification is based on Rt (min) only. On the other hand, LC-MS/MS enables the identification of GLY and AMPA based on Rt (min) of highly specific ions of GLY-FMOC and AMPA-FMOC and their relative ion abundance. For freshwater analysis, detection by FLD was found to have higher sensitivity than MS/MS, reaching also lower LOQ values in the case of GLY.

For soil matrix, LC-FLD enabled GLY-FMOC analysis, but irresolvable chromatographic peaks overlap AMPA-FMOC peak. Different additional cleanup steps and chromatographic columns were tested without promising results. Considering the lack of specificity of AMPA-FMOC for soil analysis by LC-FLD, validation of GLY and AMPA residues in soil was performed by LC-MS/MS solely.

In the case of soil, linearity was tested for both analytes in the range 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LC-MS/MS. Similarly, to freshwater samples, the calibration curves are corrected by analytical recovery. Here, LCL was selected as LOQ at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The intra-day repeatability was evaluated for one analyst (n=4) being 4.0% for both compounds. The inter-day repeatability was performed by two different analysts with one week of difference obtaining an RSD of 12.0% for GLY and 13.0% for AMPA. Table 4 shows the validation results obtained for soil analysis by LC-MS/MS. Strong ion suppression is found in the soil matrix for both derivatives. ME (%) was estimated at -90% and -88% for GLY-FMOC and AMPA-FMOC, respectively. Based on these results we recommend the use of matrix matched calibration for soil analysis. One of the main difficulties is the use of GLY-FMOC and AMPA-FMOC standards. Only analytical grade GLY-FMOC standard is currently commercially available, which was additionally found to be unstable in aqueous solution. The sensitivity obtained with the reference standard was lower than that achieved by fresh derivatization of GLY.

Our approach relies on the use of external calibration of GLY and AMPA via a calibration function of FMOC derivatives prepared with blanks and spiked samples. On the other hand, other reports for MS/MS use isotopically labeled internal standard (ILIS) (see Table 2) [3,4,6,10,12].

This study highlights the complementarity of FLD and MS/MS for freshwater analysis in terms of qualitative and quantitative capabilities. However, the lack of selectivity of FLD for AMPA analysis in soil represents the main drawback. FLD offers a sensitive, robust and cost-affordable approach for laboratories looking for GLY analysis under a routine environment.

Of potential interest, can be the serial detection by FLD and MS/MS in one single instrumental setup. Online serial detection will support FLD determination and rapid GLY confirmation via selective MS/MS ions. FLD presents additional benefits in GLY quantitation in freshwater offering lower LOQs which might be relevant for environmental research studies. However, both online and offline workflows should be supported by routine MS/MS based confirmation of residues. A comparison of reported LOQs for different reported techniques using FMOC derivatization is presented in Table 2. As seen, competitive and fit-for-the-purpose LOQs are obtained from this study under both FLD and MS/MS conditions.

Application to real samples

This analytical methodology was applied to soil and irrigation water samples from an experimental rice field with the objective of understanding the dynamics of glyphosate and its metabolite AMPA during the productive cycle (See exemplary Fig. S4). In this experimental field, GLY is applied before seeding. This method was employed to quantify GLY and AMPA in 153 freshwater samples and 75 soil samples, obtaining results in water ranging from LOQ to $14.6 \mu\text{g L}^{-1}$ for GLY and $36.6 \mu\text{g L}^{-1}$ for AMPA. In the case of agricultural soil samples, residues ranged from LOQ to $825 \mu\text{g kg}^{-1}$ for GLY and 238 to $1182 \mu\text{g kg}^{-1}$ for AMPA. From these results, it was possible to study and characterize the decay of GLY under experimental field conditions.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper

Acknowledgements

Authors acknowledge Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for Project FSA_PI_2018_1_148630 and POS_FSA_2019_1_100852. Financial support of PEDECIBA Química is acknowledged.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.mex.2022.101730](https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101730).

References

- [1] I. Macedo, J.A. Terra, G. Siri-Prieto, J.I. Velazco, L. Carrasco-Letelier, Rice-pasture agroecosystem intensification affects energy use efficiency, *J. Clean. Prod.* 278 (2021).
- [2] J. Terra, N. Saldain, J. Castillo, S. Martinez, G. Cantou, A. Bordagorri, J. Hernandez, Rotaciones, *Día Campo - Arroz*. (2013) 23.
- [3] L.D. Demonte, N. Michlig, M. Gaggiotti, C.G. Adam, H.R. Beldoménico, M.R. Repetti, Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method, *Sci. Total Environ.* 645 (2018) 34–43.
- [4] V.C. Aparicio, E. De Gerónimo, D. Marino, J. Primost, P. Carriquiriborde, J.L. Costa, Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins, *Chemosphere* 93 (2013) 1866–1873.
- [5] C.E. Ramirez, S. Bellmund, P.R. Gardinali, A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case study: Canals with influence on Biscayne National Park, *Sci. Total Environ.* 496 (2014) 389–401.
- [6] R.I. Bonansea, I. Filippi, D.A. Wunderlin, D.J.G. Marino, M.V. Amé, The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment, *Toxics* 6 (2017) 1–13.
- [7] International Organization for Standardization, Water quality - Determination of glyphosate and AMPA - Method using high performance chromatography (HPLC) and fluorometric detection (ISO 21458), (2008).

- [8] E. Mallat, D. Barceló, Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 129–136.
- [9] W.J. Winfield, W.J. Bashe, T.V. Baker, Method 547 - Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection, *Environ. Monit. Syst. Lab.* (1990).
- [10] L. Lupi, F. Bedmar, M. Puricelli, D. Marino, V.C. Aparicio, D. Wunderlin, K.S.B. Miglioranza, Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina, *Chemosphere* 225 (2019) 906–914.
- [11] C. Druart, O. Delhomme, A. De Vaufleury, E. Ntcho, M. Millet, Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1725–1732.
- [12] X. Yang, F. Wang, C.P.M. Bento, S. Xue, L. Gai, R. van Dam, H. Mol, C.J. Ritsema, V. Geissen, Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil - A flume experiment, *Sci. Total Environ.* 512–513 (2015) 406–414.
- [13] T. Poiger, I.J. Buerge, A. Bächli, M.D. Müller, M.E. Balmer, Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 1588–1596.

Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine)

Beatriz Alonso^a, Marcos Colazzo^b, and Andrés Pérez Parada^a, ^aDepartamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este (CURE), Universidad de la República, Rocha, Uruguay; ^bInstituto Tecnológico Regional Suroeste, Universidad Tecnológica (UTEC), Polo Tecnológico Paysandú, Paysandú, Uruguay

© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.

This is an update of K.N. Baer, B.J. Marcel, Glyphosate, Editor(s): Philip Wexler, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), Academic Press, 2014, Pages 767–769, ISBN 9780123864550, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00148-2s>.

Chemical profile	24
Introduction	24
Summary of physicochemical properties	24
Mass spectrometry identification	24
History/background	25
Uses	25
Exposure and exposure monitoring	25
Environmental exposure	26
Toxicokinetics	26
Mechanism of toxicity	26
Acute and short-term toxicity	27
Animals	27
Human	27
Chronic toxicity	27
Animals	27
Human	27
Immunotoxicity	27
Reproductive and developmental toxicity	27
Genotoxicity	27
Carcinogenicity	27
Organ toxicity	28
Clinical management	28
Environmental fate and behavior	28
Environmental persistence	28
Ecotoxicology	29
Exposure standards and guidelines	29
PubChem URL	29
References	30
Further reading	31

Abstract

Glyphosate is a non-selective herbicide of current controversial about toxicological safety for humans and the environment. Here, we present an updated chapter on glyphosate toxicological data and recent environmental concerns.

Keywords

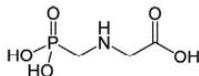
Acute toxicity; AMPA; Animal exposure; Aquatic environment; Carcinogenesis; Chronic toxicity; Ecotoxicology; Glyphosate; GMOs; Human exposure; Persistence; Risk assessment; Toxicology

Key points

- Glyphosate is broad-spectrum herbicide used in GMOs and non-GMOs production.
- Glyphosate is the most used herbicide worldwide.
- Main toxicological data of glyphosate in humans, animals, and environment
- Controversy over probable carcinogenic toxicity

Chemical profile

- Registry numbers: different registry numbers might be found for glyphosate and its salts.
- Synonyms: Glyphosate, N-(phosphonomethyl)glycine, glycine, N-(phosphonomethyl)-.
- Molecular Formula: $C_3H_8NO_5P$ (see Table 1 for additional details)
- Chemical structure:



Introduction

This chapter summarizes the main toxicological and ecotoxicological data on the broad-spectrum herbicide glyphosate. This compound has been extensively studied for acute and chronic toxicology to humans, animals, and non-target species. Glyphosate can be found in different chemical forms as free acid or salts shaping glyphosate-based herbicides (GBHs). Glyphosate was traditionally considered a relatively low toxicity pesticide. However, since its raised controversy in 2015 due to probable carcinogenesis a toxicological re-evaluation has been given by food safety and environmental agencies as well as independent researchers.

Summary of physicochemical properties

See Table 2

Mass spectrometry identification

Glyphosate behave as an ionic compound and its analysis is troublesome. It can be analyzed by LC-MS in both negative and positive electrospray ionization (ESI).

Ionization Mode and MS/MS transitions.

Table 1 Glyphosate and its salts. Data extracted from IUPAC Footprint, 2023.

Name	CAS	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)
Glyphosate (so-called glyphosate acid)	1071-83-6	$C_3H_8NO_5P$	169.07
Glyphosate isopropylamine salt	38641-94-0	$C_6H_{17}N_2O_5P$	228.19
Glyphosate sesquisodium salt	70393-85-0	$C_3H_{13}N_2Na_3O_{10}P_2$	404.09
Glyphosate-trimesium	81591-81-3	$C_6H_{16}NO_5PS$	245.23
Glyphosate-dimethylammonium	–	$C_5H_{15}N_2O_5P$	214.5
Glyphosate-diammonium	69254-40-6	$C_3H_{14}N_4O_5P$	203.13
Glyphosate-monoammonium	114370-14-8	$C_3H_{11}N_2O_5P$	186.10
Glyphosate-monopotassium	39600-42-5	$C_3H_7KNO_5P$	207.19
Glyphosate-sodium	34494-03-6	$C_3H_7NNaO_5P$	191.06

Table 2 Physicochemical properties of glyphosate. Data extracted from IUPAC Footprint Data Base, 2023.

Chemical group	Glycine derivative
Appearance	Colorless crystals
Average Mass	169.1 g/mol
Density	1.71 g/mL
Water solubility	100,000 mg/L at 20 °C
Solubility in organic solvents	0.6 mg/L in acetone, xylenes and ethyl acetate at 20 °C
Dissociation constants	2.34; 5.73
Vapor pressure	0.0131 mPa at 20 °C
Henry's law constant	$2.10 \times 10^{-7} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$
Melting point	189.5 °C
Log K_{ow}	-6.28
Acidic/Basic properties	Acidic and basic properties (potentially cationic and anionic compound)

ESI(-)	$[M - H]^-$	168 > 63 168 > 150 168 > 81
ESI(+)	$[M + H]^+$	170 > 88 170 > 60 170 > 124

History/background

Glyphosate is a key component in multiple commercial herbicides utilized for controlling weeds. It was first synthesized in 1950 and initially patented as a chemical chelator, with the ability to bind metals like calcium, magnesium and manganese. Later on, it was discovered that its chelating properties could inhibit an enzyme involved in the biosynthesis of three important aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) in plants, which paved the way for glyphosate's use as a broad-spectrum herbicide (Richmond, 2018).

In 1974, Monsanto Company launched Roundup™, a product that contains glyphosate as the active ingredient. Initially, Roundup™ was employed for weed management in farming, landscaping, power lines and railway tracks. Other brands that contain glyphosate include WeatherMax, UltraMAX, Buccaneer, Razor Pro, Rodeo and AquaMaster. Glyphosate is available in different chemical forms, such as isopropylamine salt, ammonium salt, diammonium salt, dimethylammonium salt, and potassium salt. Some crops, such as soybeans and cotton, have been genetically modified (GMOs) to be resistant to glyphosate (Roundup Ready™), thereby increasing the use of glyphosate as a post-emergent herbicide (Gillezeau et al., 2019).

There are conflicting opinions among various regulatory bodies, such as the US Environmental Protection Agency (EPA), the European Food Safety Authority (EFSA), and the International Agency for Research on Cancer (IARC) regarding the potential of glyphosate-based herbicides (GBHs) to cause human cancer. IARC has classified glyphosate as "probably carcinogenic to humans (Group 2A)" in 2015. In February 2020, EPA published the Glyphosate Interim Registration Review Decision (ID) and concluded that there are no risks of concern to human health when used according to the label and that glyphosate is unlikely to be a human carcinogen (Benbrook, 2018; EPA, 2022).

However, glyphosate ID identified potential ecological risks to non-target organisms (primarily non-target plants through spray drift) and implemented interim risk mitigation measures. In March 2020, the glyphosate ID was challenged in court and the U.S. Court of Appeals for the Ninth Circuit eventually vacated the human health portion of the ID in June 2022 and imposed an Oct, 1, 2022 deadline for the EPA to issue a new ecological portion. EPA has determined that it is unable to finalize a new ecological portion by the imposed deadline due to the time needed to address the issues and comply with the Endangered Species Act (ESA). The EPA is currently undergoing formal ESA consultation with the U.S. Fish and Wildlife Service and the National Marine Fisheries Service and must complete this consultation and respond to an administrative petition before issuing a final registration review decision. The EPA's scientific findings regarding glyphosate's safety, including its conclusion that it is not likely to be carcinogenic to humans, remain unchanged. The EPA intends to revisit and better explain its evaluation of the carcinogenic potential of glyphosate and to address the issues raised in the remand, including analyzing the in-field effects of glyphosate on monarch butterfly habitats and determining if additional risk mitigation measures are necessary (EPA, 2022).

Uses

Glyphosate is a systemic, non-selective and broad-spectrum herbicide used in a wide range of cropping, utility, and industrial situations to for broad-spectrum control of weeds and grasses. It is used to control annual and perennial weeds, broad-leaved weeds, and grasses. It is used in GMO and non-GMO crop production. When used in glyphosate resistant GMO (particularly soybean, cotton, and maize) it is used as post-emergent herbicide.

Exposure and exposure monitoring

The main exposure pathways include:

1. Agricultural uses: glyphosate is widely used as an herbicide in agriculture to control weeds, and it can be released into the environment through spray drift, runoff into water sources, and soil erosion.
2. Residential and commercial uses: glyphosate is also used in residential and commercial settings to control weeds in lawns, gardens, and parks.
3. Manufacturing processes: the production and use of glyphosate-based products can contribute to environmental contamination through the release of the chemical during the manufacturing process.
4. Waste disposal: glyphosate can be released into the environment through improper disposal of waste containing the chemical.

The primary ways of exposure to glyphosate include:

1. Ingestion: Glyphosate can contaminate crops, food, and water sources, leading to oral exposure through consumption.
2. Dermal exposure: Direct skin contact with glyphosate can occur during the application process or when handling contaminated products.

3. Inhalation: Inhalation exposure to glyphosate can occur during the application process or when working in an environment where glyphosate is present.
4. Indirect exposure: Indirect exposure to glyphosate can occur through consumption of contaminated products, such as meat and dairy products from animals that have been fed glyphosate-treated crops.

Environmental exposure

Due to improper application practices and excessive spray, the widespread presence of glyphosate has been observed in both aquatic and terrestrial environments. In many studies, glyphosate has been detected in soil, crop products, animals consuming these products, humans, freshwater, and the organisms living therein.

When glyphosate is used as a foliar spray to control weeds, it can spread to various soil pools and unintended locations. This can happen through runoff from the foliage, accidental spray drift, the decay of plants treated with glyphosate, and exudation from the roots. Additionally, even undamaged roots of crops that are tolerant to glyphosate can release the substance as exudates (Kanissery et al., 2019).

The primary route for herbicide precipitation from the atmosphere is considered to be wet deposition. It can be by dissolution in rainwater for compounds in vapor phase or by particle washout.

The presence in the atmosphere of glyphosate through rain (main climatic phenomenon associated with wet deposition) was investigated in Argentina. In >80% of the rain samples ($n = 112$), glyphosate was found at levels ranging from 1.24 to 67.3 $\mu\text{g/L}$ (median-to-maximum concentration). It was also detected in soil samples ($n = 58$); 41% presented a concentration in the range 102–323 $\mu\text{g/kg}$. The maximum glyphosate concentrations quantified in rainwater exceeded the previously reported levels for USA and Canada (Alonso et al., 2018).

The fate of glyphosate in soil is complex and attributed to mineralization, degradation, immobilization, and leaching. It degrades at a relatively rapid rate in most soils, with a half-life estimated to be between 7 and 60 days. Glyphosate has the ability to dissolve in water, but under certain conditions, it also attaches to soil particles, particularly in clay soils. The degree to which glyphosate adheres to and is released from the soil varies depending on factors such as soil composition (clay, sand, or gravel), temperature, and moisture. In sandy soils, it may quickly be washed away, but in soils with high clay content, it may persist for over a year. Even when bound to soil particles, it may eventually dissolve back into the soil water, for instance, in the presence of phosphates.

In 2018, Silva published the first large-scale assessment of the distribution of glyphosate and its metabolite AMPA in the agricultural topsoil of the European Union. The study tested 317 EU topsoils and found that 21% of them contained glyphosate while 42% contained AMPA, with a maximum concentration of 2 mg/kg in both cases. The highest frequencies of both compounds were found in northern soils, while eastern and southern regions were generally free of glyphosate and AMPA, with concentrations below 0.05 mg/kg. The study also noted that some soils in areas vulnerable to water and wind erosion were contaminated (Silva et al., 2018).

The use of pesticides can have detrimental effects on the environment, particularly on aquatic species. They are accumulated into river sediments and water and finally, bioaccumulated in aquatic organisms such as fishes. Several studies showed the presence of pesticides residues in fish muscle. Lajmanovich et al. (2023) evaluated glyphosate and AMPA levels in *Prochilodus lineatus* fish (sabalo) of the Salado River (South America). They found glyphosate and AMPA in a maximum concentration of 187 and 3116 $\mu\text{g/kg}$ respectively, representing the world highest levels of polar herbicides recorded in fish muscle (Lajmanovich et al., 2023).

Toxicokinetics

There is little information regarding glyphosate's toxicokinetics. Zoller et al. (2020) published the first study on glyphosate's urinary excretion characteristics in humans after oral consumption of a defined dose (25% of the ADI (Acceptable Daily Intake), $\text{mg kg}^{-1} \text{bw}$). Glyphosate was administered as a real residue present in a foodstuff (homemade falafel dish). Urine excretion was 0.91% (mean 0.95%) of the administered dose and was 22 times lower than reported in animal studies (20% excretion). The human elimination half-life calculated was 9 h.

Mechanism of toxicity

The herbicidal mode action of glyphosate involves the inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), a plant enzyme implicated in the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan). Scarcity of the enzyme leads to the deficiency of aromatic amino acids, which affects various metabolic functions of the plant resulting in herbicidal activity (Gill et al., 2018; Williams et al., 2000). EPSPS is not available in animals resulting in a selective target to plants.

Acute and short-term toxicity

Animals

Reports on acute and chronic toxicity test of glyphosate, formulation and adjuvants in mussels is inconclusive (Bringolf et al., 2007). Glyphosate and its commercial formulations showed changes in gene expression that suggest damage to kidneys as well as immune and endocrine endpoints available in fish and mammals (De Maria et al., 2022). European Chemicals Agency (ECHA) classify glyphosate as toxic to aquatic life (ECHA, 2022). Its toxicological effects in animals have been traced from lower invertebrates to higher vertebrates (Gill et al., 2018). Glyphosate hits low to moderate acute toxicity to vertebrates and invertebrates (IUPAC Footprint, 2023).

Human

Acute toxicity of glyphosate for humans is very low. European Chemicals Agency (ECHA) classify glyphosate as causing serious eye damage (ECHA, 2022). Glyphosate hits as potential bladder and liver toxicant and potential endocrine issues via disruption of aromatase activity (IUPAC Footprint, 2023).

Chronic toxicity

Animals

Although the acute toxic effects of glyphosate on fish and mammals are low, the formulated products often are more toxic than glyphosate itself, and concerns have emerged about chronic effects of the formulated products on human and animal diseases, in particular various forms of cancer and mental disorders (Van Bruggen et al., 2018). Glyphosate hits low to moderate chronic toxicity to vertebrates and invertebrates (IUPAC Footprint, 2023).

Human

Glyphosate has a relatively low long-term dietary toxicity, being within the 10% of herbicides with higher ADI (0.5 mg/kg bw) (Tarazona et al., 2017).

Immunotoxicity

Potential endocrine issues via disruption of aromatase activity are reported (IUPAC Footprint, 2023).

Reproductive and developmental toxicity

Glyphosate status regarding reproductive and developmental toxicity is still not identified (IUPAC Footprint, 2023).

Genotoxicity

The IARC glyphosate monograph summarizes in-vivo and in-vitro genotoxicity findings in humans, human cells, other mammals and non-mammals. DNA damage was found in human populations exposed to glyphosate. In the case of in vitro human cell studies, it induced DNA strand breaks in liver Hep-2 cells, lymphocytes, GM38 fibroblasts among others (IARC, 2015).

Glyphosate cannot be considered as a potent DNA reactive tumor-initiating chemical (Tarazona et al., 2017).

Carcinogenicity

In 2015 glyphosate was categorized by IARC as "probably carcinogenic" (Group 2A). The working group concluded that so far there was limited evidence of carcinogenesis in humans but showing a relationship between exposure to this pesticide and non-Hodgkin lymphoma. In addition, animal experiments showed sufficient evidence for the carcinogenicity of glyphosate (IARC, 2015). The working group relied on peer-reviewed papers, using for the assessment an approach based on hazard identification of both community and occupational exposure to GBHs and its metabolite AMPA.

On the other hand, after a re-evaluation in 2016, the US EPA concluded glyphosate as not likely to be carcinogenic to humans (US EPA, 2016) and reiterated this conclusion in 2020 (US Environmental Protection Agency, 2020). This classification is similar to that provided by the European Food Safety Authority (EFSA) in 2015, also based on a peer review of glyphosate as an active substance, which concluded that it is unlikely to pose a carcinogenic risk to humans as the evidence does not support its classification as potentially carcinogenic (EFSA, 2015).

In summary, glyphosate is currently marked as IARC group 2A- probable carcinogen; US EPA states no evidence to support classification as human carcinogen and EFSA is still inconclusive to support cancer in humans. This classification is currently under review by EFSA, and its risk assessment is expected to finish in July 2023.

Organ toxicity

Glyphosate is not considered an endocrine disruptor (EFSA, 2017). Although agencies such as EFSA and EPA have declared no evidence of potential interaction between glyphosate and metabolic pathways, glyphosate use has been restricted in many countries. This is due to recent evidence suggesting that GBHs possess certain endocrine disrupting characteristics (Muñoz et al., 2021).

However, although many authors have evaluated its role as an endocrine disruptor over the past 30 years, there is no consensus on its effect on the human endocrine system. Nevertheless, there is evidence that it can induce epigenetic modifications and favor hormone receptor activity in mammary cell line models, presenting adverse effects on the production of steroid hormones (estrogens and testosterone) and alter the transport of thyroid hormones across cell membranes (Muñoz et al., 2021).

Clinical management

There is no specific antidote, so treatment is symptomatic and supportive. Since it is unlikely to cause systemic toxicity, intestinal decontamination is not necessary. If a potentially lethal amount has been ingested, oral activated charcoal may be considered. Upper gastrointestinal endoscopy should be considered in patients with significant gastrointestinal corrosive effects. Eye contamination should be treated as a chemical exposure by prolonged flushing of the eyes with clean water. Skin contamination should be treated promptly by washing with soap and water (Bradberry et al., 2004).

Environmental fate and behavior

Glyphosate, being a broad-spectrum herbicide, reaches the environment through both agricultural and residential use. The degradation pathways in the environment of glyphosate produces aminomethylphosphonic acid (AMPA), glycine and sarcosine, being AMPA the major metabolite (Fig. 1) (Roberts et al., 1998; la Cecilia and Maggi, 2018). Biological degradation is the main route, being possible in aerobic conditions by soil microorganisms. Degradation under anaerobic conditions is minimal and no degradation has been detected in sterilized soils (Sun et al., 2019).

Several studies have found glyphosate and AMPA in freshwater and sediments, mainly in basins associated with extensive GMOs cultivation, where glyphosate applications are repeated over time (Bonansea et al., 2017; Primost et al., 2017; Lupi et al., 2019). Maximum concentrations were found after rainfall events by runoff (Didoné and Evrard, 2021).

Environmental persistency

The persistence of glyphosate in soil depends on the physicochemical properties of the soil, mainly on the adsorption to the clay fraction. It is not considered persistent in soil. Glyphosate half-life in soil (DT50, aerobic) varies from 9 to 30 days (Aparicio et al., 2013; Simonsen et al., 2008; Sun et al., 2019). Glyphosate is stable to aqueous hydrolysis but suffers aqueous photolysis. Degradation (DT 50) in water ranges from 3 to 23 days (Desmet et al., 2016; Yadav et al., 2017). On the other hand, its metabolite AMPA dissipates slower in soil than glyphosate under the same conditions, with a longer half-life, between 23 and 419 days (Bento et al., 2016; Simonsen et al., 2008; IUPAC Footprint, 2023).

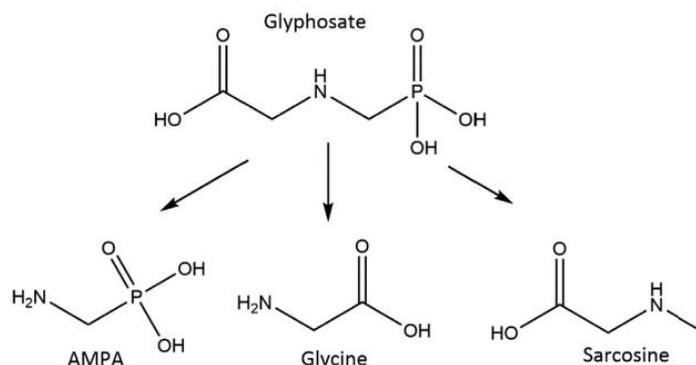


Fig. 1 Glyphosate transformation products.

Table 3 Terrestrial and aquatic toxicity (LD50) on selected species.

Endpoint	Concentration (mg L ⁻¹)	Exposure duration (Days)	Species	Level	Source
LC50	>100	4 (acute)	<i>Daphnia magna</i>	Crustacean	IUPAC Footprint (2023)
LC50	14.2	2 (acute)	<i>Artemia salina</i>	Crustacean	de Brito Rodrigues et al. (2017)
LC50	>100	4 (acute)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fish	IUPAC Footprint (2023)
LC50	>100	3 (acute)	<i>Apis</i> spp.	Honeybees	IUPAC Footprint (2023)
LD50	10	18 (chronic)	<i>Apis</i> spp.	Honeybees	Castelli et al. (2021)
LD50	>5600	14 (acute)	<i>Eisenia foetida</i>	Earthworms	IUPAC Footprint (2023)
LD50	>2000	4 (acute)	<i>Colinus virginianus</i>	Bird	IUPAC Footprint (2023)

Ecotoxicology

The toxicity of glyphosate to non-target organisms varies due to different causes. For example, due to its amphoteric characteristics, glyphosate has shown different effects, being more lipophilic at low pH, favoring cell entry, and may interfere with cell morphology and cellular absorption (Hedberg and Wallin, 2010).

Ecotoxicology of different glyphosate salts and formulations including its adjuvants is not usually available nor specifically described in reports. The adjuvants could facilitate penetration through the plasmatic membrane, enhancing the glyphosate action, and therefore its toxicity. The most common adjuvant of glyphosate commercial formulations is polyoxyethylene amine (POEA) (Annett et al., 2014). It has been suggested that the permeation of the cell membrane by POEA similar to that happened in plant cells, allows the entry of glyphosate into the cytoplasm of animal cells, combining the effects of glyphosate and the adjuvants present in the formulations. This difference between the toxicity of pure glyphosate and its formulations has also been reported in fungi. It was observed a significant reduction in spore germination and mycelial growth for the formulations, the results being variable between species and formulations. Meanwhile, no differences were observed in the effect of glyphosate as pure active ingredient and distilled water (Morjan et al., 2002).

Furthermore, studies on mesocosms showed that the effect between different formulations is variable, affecting phytoplankton and the abundance of heterotrophic phytoplankton (Sabioy García et al., 2022). It has also been observed that the acute toxicity of surfactants to aquatic invertebrates and fish may be similar to the formulations, while the acute toxicity of the technical glyphosate may be considerably lower (Folmar et al., 1979; de Brito Rodrigues et al., 2017; Delkash-Roudsari et al., 2020).

There have been studies on the effect of glyphosate on biofilms, observing a species selective pressure on diatoms significantly related to the concentration of glyphosate (Corrales et al., 2021). This leads to a potential effect of glyphosate toxicity in the long term, which may affect primary production and therefore the functioning of the ecosystem.

Several studies have reported the negative effect of glyphosate on honeybees, including detrimental effects on behavior, cognitive, sensory, and developmental abilities. Recently, glyphosate has been shown to affect the communities present in the gut microbiota of honeybees, which plays an important role in the growth, development, and defense against honeybee pathogens (Castelli et al., 2021). A summary of data is presented in Table 3.

Exposure standards and guidelines

Acceptable operator exposure level (AOEL): 0.1 mg/kg bw/day (EFSA, 2015; Tarazona et al., 2017).

Acceptable daily intake (ADI): 0.5 mg/kg bw/day (EFSA, 2015; Tarazona et al., 2017).

Acute Reference Dose (ARfD): 0.5 mg/kg (Tarazona et al., 2017).

WHO and US EPA maximum concentration in drinking water: 0.7 mg/L.

Not listed as priority EU pesticide for monitoring in natural waters (default maximum concentration in drinking water: 0.001 mg/L) (EU, 2013).

Maximum acceptable concentration in drinking water: 0.28 mg/L (Health Canada, 1987).

Maximum residue limits (MRL) examples:

- (1) Maize: 5 mg/kg (Codex Alimentarius, 2023)
- (2) Honey: 0.05 mg/kg (EC, 2023)
- (3) Rice: 0.1 mg/kg (EC, 2023)
- (4) Meat bovine (muscle): 0.05 mg/kg (EC, 2023)
- (5) Eggs: 0.05 mg/kg (EC, 2023)

PubChem URL

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496>.

References

- Alonso LL, Demetrio PM, Etchegoyen MA, and Marino DJ (2018) *Glyphosate and Atrazine in Rainfall and Soils in Agroproductive Areas of the Pampas Region in Argentina*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>.
- Annett R, Habibi HR, and Hontela A (2014) Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34(5): 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- Aparicio VC, et al. (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93(9): 1866–1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>.
- Benbrook CM (2018) How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environmental Sciences Europe* 31(2): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0184-7>.
- Bento C, Yang X, Gort G, et al. (2016) Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of the Total Environment* 572: 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>.
- Boransae RI, et al. (2017) The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment. *Toxics* 6(1): 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>.
- Bradberry S, Proudfoot A, and Vale J (2004) Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews* 23: 159–167. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00003>.
- Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC, and Shea D (2007) Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of Lampilids siliquidea (unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2094–2100. <https://doi.org/10.1897/06-519R1.1>.
- Castelli L, Balbuena S, Branchiccola B, Zunino P, Liberti J, Engel P, and Antúnez K (2021) Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms* 9: 845. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040845>.
- Codex Alimentarius (2023) FAO. International Food Standards. Glyphosate. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>.
- Corrales N, Meerhoff M, and Antoniadis D (2021) Glyphosate-based herbicide exposure affects diatom community development in natural biofilms. *Environmental Pollution* 284(February), 117354. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117354>.
- de Brito Rodrigues L, et al. (2017) Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(7): 1755–1763. <https://doi.org/10.1002/etc.3580>.
- De Maria M, Kroll KJ, Yu F, Nouri MZ, Silva-Sanchez C, Perez JG, and ... Denslow ND (2022) Endocrine, immune and renal toxicity in male largemouth bass after chronic exposure to glyphosate and Rodeo[®]. *Aquatic Toxicology* 246. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106142>.
- Delkash-Roudsari S, et al. (2020) Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204(February). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>.
- Desmet N, et al. (2016) A hybrid monitoring and modelling approach to assess the contribution of sources of glyphosate and AMPA in large river catchments. *Science of the Total Environment* 573: 1580–1588. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.100>.
- Didoné EJ and Evarad O (2021) Mobilization and transport of pesticides with runoff and suspended sediment during flooding events in an agricultural catchment of Southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 8212(1000). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13303-z>.
- ECHA (2022) Glyphosate: No Change Proposed to Hazard Classification. <https://www.echa.europa.eu/-/glyphosate-no-change-proposed-to-hazard-classification>.
- EFSA (2015) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.
- EFSA (2017) Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate. *EFSA Journal* 15(9). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4979>.
- EPA (2022) Glyphosate. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>.
- EU (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy Text With EEA Relevance. <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>.
- European Commission (2023) Database of pesticides: EU Reg. (EU) No 293/2013. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mr/s/details?lg_code=EN&pest_res_id_list=1208&product_id_list=
- Folmar LC, Sanders HO, and Julin AM (1979) Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8(3): 269–278. <https://doi.org/10.1007/BF01056243>.
- Gill JPK, Sethi N, Mohan A, et al. (2018) Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters* 16: 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>.
- Gillezeau C, van Gerwen M, Shaffer RM, et al. (2019) The evidence of human exposure to glyphosate: A review. *Environmental Health* 18(2): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>.
- Health Canada (HC) (1987) *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document—Glyphosate*. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch. 1–14. Available at: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semf/all_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/sum_guide-res_recom/summary-sommaire-eng.pdf.
- Hedberg D and Wallin M (2010) Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology In Vitro* 24(3): 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.020>.
- IARC. International Agency for Research on Cancer (2015) *IARC Monograph on Glyphosate*. WHO. Available at <https://www.iarc.fr/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>.
- IUPAC Footprint (2023) Pesticide Properties Database. Glyphosate. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/373.htm>.
- Kanissery R, Gairhe B, Kadyampakeni D, et al. (2019) Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants (Basel)* 8(11): 499. pp. 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants8110499>.
- la Cecilia D and Maggi F (2018) Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environmental Pollution* 233: 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.017>.
- Lajmanovich RC, Repetti MR, Cuzzio Boccioni AP, Michling MP, Demonte L, Attademo AM, and Peltzer PM (2023) Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. *Science of the Total Environment* 870(162019). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162019>.
- Lupi L, et al. (2019) Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere* 225: 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.090>.
- Morjan WE, Pedigo LP, and Lewis LC (2002) Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. *Environmental Entomology* 31(6): 1206–1212. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.6.1206>.
- Muñoz J, Bleak G, and Calaf G (2021) Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere* 270: 128619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619>.
- Primost JE, et al. (2017) Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution* 229: 771–779. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>.
- Richmond ME (2018) Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences* 8: 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>.
- Roberts T, et al. (1998) In: Roberts TR, et al. (ed.) *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, 1st edn. Cambridge: Royal Society of Chemistry <https://doi.org/10.1039/9781847551382>.
- Sabioy García C, et al. (2022) Rethinking the term “glyphosate effect” through the evaluation of different glyphosate-based herbicide effects over aquatic microbial communities. *Environmental Pollution* 292: 118382. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118382>.

- Silva V, Montanarella L, Jones A, Fernández-Ugalde O, Mol HGJ, Ritsema CJ, et al. (2018) Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment* 621: 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>.
- Simonsen L, et al. (2008) Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health—Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 43(5): 365–375. <https://doi.org/10.1080/03601230802062000>.
- Sun M, Li H, and Jaisi DP (2019) Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system. *Water Research* 163: 114840. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.007>.
- Tarazona JV, Court-Marques D, Tiramani M, et al. (2017) Glyphosate toxicity and carcinogenicity: A review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology* 91: 2723–2743. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>.
- US Environmental Protection Agency (2016) *Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential*. EPA's Office of Pesticide Programs.216. (12 December 2017). Available at: https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf.
- US Environmental Protection Agency (2020) *Glyphosate Interim Registration Review Decision Case Number 0178*. Environmental Protection Agency.<https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-01/documents/glyphosate-interim-reg-review-decision-case-num-0178.pdf>.
- Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, and Morris JG (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 616–617: 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.
- Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(2): 117–165. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>.
- Yadav V, Kaur P, and Kaur P (2017) Effect of light conditions and chemical characteristics of water on dissipation of glyphosate in aqueous medium. *Environmental Monitoring and Assessment* 189(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6334-3>.
- Zoller O, Rhyn P, Zarn JA, and Dudler V (2020) Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 228: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113526>.

Further reading

- Battaglin WA, et al. (2014) Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *Journal of the American Water Resources Association* 50(2): 275–290. <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>.
- Office of Water U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC (2018) *2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables*. (March).