



## **“Degradación de los herbicidas Glifosato y 2,4-D por microorganismos usuales del ambiente”**

**Autores:**

**Alumnos:**

Castellani, Clara

Goya, Celina

Nobili, Sofía

Pagella, Milagros

Vazzoler, Valentina

**Docentes:**

Aguirre, Natalia.

Cabrera, Graciela

**Tutor:**

Álvaro, Tomás.

ESCUELA DE EDUCACIÓN SECUNDARIA N°3

Av. Maya y Cecilia Borja- Carlos Casares- Pcia. De Buenos Aires

Directora: Eulalia Ferreira

Teléfono de contacto: 2396432283



## Índice

Resumen-----	3
Introducción -----	4
Marco Teórico -----	6
Materiales y metodología -----	11
Resultados -----	14
Discusión-----	16
Conclusión-----	17
Bibliografía -----	18



## **Resumen**

Se ha registrado en este último tiempo un notorio aumento del uso de agroquímicos ya que permiten expandir los límites de siembra, incrementar los rendimientos, aplicar siembra directa, entre otras ventajas. Sin embargo, existe una gran controversia respecto a los efectos tóxicos agudos y crónicos sobre los seres vivos y el medio ambiente.

El glifosato y el 2,4-D son dos de los herbicidas más utilizados en nuestra zona agrícola. Si bien hay reportes que indican que no son persistentes en el suelo o que son degradados rápidamente en él, otros trabajos de investigación establecen numerosos efectos adversos y su permanencia en los suelos agrícolas.

Debido a esta gran discusión existente sobre los efectos de estos herbicidas, este grupo de trabajo se planteó como objetivo investigar si microorganismos habituales del ambiente son capaces de tolerar su presencia en medios de cultivo y si son competentes para degradarlos.

La hipótesis planteada fue: "Bacterias aisladas del suelo y hongos aislados de fruta en descomposición son capaces de degradar los herbicidas glifosato y 2,4-D en condiciones de laboratorio".

Los resultados obtenidos indican que tanto los hongos como las bacterias son capaces de tolerar la presencia de glifosato en el medio de cultivo y de degradarlo, utilizándolo como única fuente de carbono. En el caso del 2,4-D, los microorganismos son capaces de tolerarlo pero solo las bacterias de degradarlo.

Estos datos son interesantes porque demuestran la probabilidad de que estos agroquímicos puedan ser biodegradados en el suelo y que no resulten persistentes y recalcitrantes como se los ha denominado frecuentemente. Si bien estos datos han sido obtenidos bajo condiciones de laboratorio que pueden ser diferentes de las condiciones naturales. Por tal motivo se debe continuar con las investigaciones para poder determinarlo.

No obstante, estos datos podrían ser alentadores y abrir el camino a futuras investigaciones para poder utilizar estos microorganismos en zonas donde se ha producido una sobredosificación ya sea por desconocimiento o por falta de control.



## **Introducción**

El crecimiento de la producción agrícola ha provocado un aumento del uso de agroquímicos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes) ya que éstos permiten aumentar los rendimientos, disminuir los trabajos de laboreo, extender los cultivos a nuevas regiones, evitar o minimizar el ataque de plagas.<sup>1</sup>

Recientemente, CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) informó que el consumo de pesticidas aumentó 858% en los últimos 22 años.<sup>2</sup> El empleo de kilogramos/litro de agroquímicos aumentó verticalmente durante las últimas décadas. En 1990, por ejemplo, se utilizaron poco menos de 40 millones de kg/lit en el país.<sup>3</sup>

Este manejo de mayor cantidad de agroquímicos generan riesgos sobre la población y mayor presión sobre los ecosistemas.<sup>1</sup> En un estudio publicado por la Red Universitaria de Ambiente y Salud (REDUAS) se indica que se fumigan con esta enorme cantidad de productos químicos áreas de monocultivos intensivos donde viven más de 12 millones de personas. Estos mismos ciudadanos son expuestos continuamente a los mismos productos, pero todos los años se aumenta la dosis de los mismos y paulatinamente se los mezcla con otros tóxicos más peligrosos aún.<sup>2</sup>

Existe una controversia creciente respecto de los efectos tóxicos a largo plazo de la exposición humana a agroquímicos de aplicación periurbana aérea o terrestre. Si bien la calidad y la cantidad de datos sobre el riesgo en humanos y otros seres vivos por pesticidas individuales varía considerablemente en distintos trabajos de investigación, se sabe que los agroquímicos producen efectos tóxicos agudos y crónicos.<sup>6,7,8</sup>

The Associated Press documentó decenas de casos en provincias agricultoras donde se emplean sustancias tóxicas en concentraciones que están señaladas por la ciencia como generadoras de efectos nocivos o que estuvieron específicamente prohibidas por la ley, y en un contexto de pocos controles estatales. Los médicos advierten que el uso descontrolado de pesticidas puede ser la causa de crecientes problemas de salud que vienen experimentando los 12 millones de personas que viven en la vasta región agrícola de Argentina.<sup>8</sup>



La expansión del cultivo de soja se ha producido, entre otros factores, por la implementación de un paquete tecnológico que involucra semillas transgénicas y el uso del herbicida glifosato, permitiendo un mayor control de malezas y la siembra directa. En 2011 Greenpeace publicó un informe científico sobre este herbicida donde se indica que el producto puede lixiviarse hacia aguas superficiales y subterráneas, donde puede dañar la vida silvestre y, posiblemente, terminar en el agua potable. Además, junto a otros trabajos de investigación publicados, se advierte que el glifosato puede causar varios efectos agudos como eczemas, problemas respiratorios, reacciones alérgicas y crónicos como: reproductivos, neurológicos (incluso implicado en causar el mal de Parkinson), cáncer y efectos agudos por el uso directo del producto por los agricultores o por la exposición de los habitantes. Si bien la principal empresa productora del herbicida indica que éste es rápidamente inactivado en el suelo, varios estudios indican que es muy persistente.<sup>6,7,9,10,11</sup>

Otro de los herbicidas más empleados en nuestro país es el 2,4 D. Éste combate las malezas, actuando selectivamente por la absorción de las hojas, de su principio activo, el éster butílico del 2,4 D. La susceptibilidad de las malezas al producto está relacionada al estado de crecimiento de las mismas, debiendo aplicarse mayor dosis cuanto más avanzado sea el desarrollo de las mismas.<sup>12</sup> La Red Universitaria de Ambiente y Salud indica que es uno de los herbicidas más tóxicos y cuestionado en todo el mundo. Aunque todavía hay vacíos en los estudios sobre la salud humana y el medio ambiente, al igual que el glifosato se han registrado efectos agudos y crónicos en distintos seres vivos y existe un amplio debate sobre su persistencia en los ecosistemas agrarios.<sup>2,13,14</sup>

Debido a la gran controversia existente sobre los efectos tóxicos de estos herbicidas ampliamente utilizados en nuestra zona agrícola, este grupo de trabajo se planteó como objetivo investigar si microorganismos habituales del suelo son capaces de tolerar su presencia en medios de cultivo y si son competentes para degradarlos.

La hipótesis planteada fue: “Bacterias aisladas del suelo y hongos aislados de fruta en descomposición son capaces de degradar los herbicidas glifosato y 2,4D en condiciones de laboratorio”.



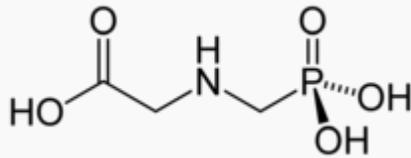
## Marco teórico

### 1-Herbicida glifosato

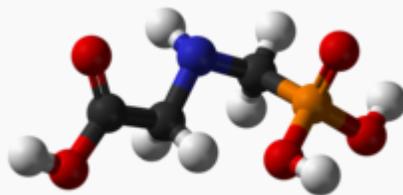
El glifosato (N-fosfonometilglicina,  $C_3H_8NO_5P$ , CAS 1071-83-6) es un herbicida no selectivo de amplio espectro. Es absorbido por las hojas y no por las raíces. El modo de acción del herbicida está relacionado con la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos por parte de la planta. El glifosato actúa inhibiendo la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), enzima responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano.

El glifosato se provee en varias formulaciones para diferentes usos: como sal de amonio, sal amina isopropil, glifosato ácido y como sal potásica <sup>15</sup>.

#### Glifosato



Fórmula química del glifosato



Modelo de bolas y enlaces del glifosato

#### Nombre (IUPAC) sistemático

*N*-(fosfonometil) glicina

#### General



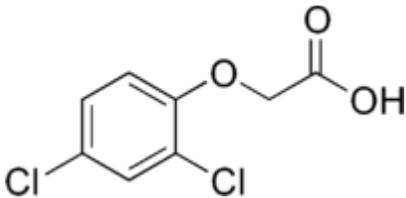
<b>Otros nombres</b>	2- [(fosfonometil) amino] ácido acético sal de isopropilamina de N(-fosfonometil) glycina
<b>Fórmula semidesarrollada</b>	1/C3H8NO5P/c5-3(6)1-4-2-10(7,8)9/h4H,1-2H2,(H,5,6)(H2,7,8,9)
<b>Fórmula estructural</b>	C=6 H=17 N=2 O=5 P=1
<b>Propiedades físicas</b>	
<b>Apariencia</b>	polvo cristalino blanco, inodoro
<b>Densidad</b>	1.704 kg/m <sup>3</sup> ; 0,001704g/cm <sup>3</sup>
<b>Punto de fusión</b>	184,5 °C (458 K)
<b>Punto de ebullición</b>	187 °C (460 K)
<b>Propiedades químicas</b>	
<b>Acidez</b>	<2, 2.6, 5.6, 10.6 pK <sub>a</sub>
<b>Solubilidad en agua</b>	1.01 g/100 mL (20 °C)
<b>Producto de solubilidad</b>	-2.8



## 2- Herbicida 2,4 D

El herbicida 2,4-D (abreviatura de ácido 2,4-diclorofenoxiacético) se presenta en forma de sal de amonio (amina) o de éster. Sus sales son absorbidas rápidamente por las raíces, en tanto que los ésteres son absorbidos rápidamente por las hojas; el ingrediente activo es transportado luego a través de toda la planta, actuando como un inhibidor del crecimiento, al imitar a la hormona auxina de la planta. Controla selectivamente las malezas de hoja ancha en los cereales (luego de que han brotado los cultivos), en los pastizales, los bosques, los parques y los jardines caseros; también se usa para controlar las malezas acuáticas de hoja ancha. 2,4-D es una auxina sintética, que es una clase de fitohormonas.

El 2,4-D se encuentra entre los plaguicidas más utilizados en el mundo. Apareció inicialmente en la década de 1940. Se vende en varias formulaciones bajo una amplia variedad de nombres registrados. Sigue usándose por su bajo costo, a pesar de disponerse de productos más selectivos, más efectivos, y menos tóxicos <sup>14,15</sup>.

2,4-ácido diclorofenoxiacético	
	
General	
Nombre químico	2-(2,4-diclorofenoxi) ácido acético
Otros nombres	2,4-D hedonal trinoxol
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
SMILES	OC(COC1=CC=C(Cl)C=C1Cl)=O
Masa molar	221,04 g/mol
Apariencia	polvo blanco a amarillo
Número CAS	[94-75-7]
Propiedades	



Solubilidad en agua	900 mg/L (25 °C)
Punto de fusión	140,5 °C (413,5 K)
Punto de ebullición	160 °C (0,4 mm Hg)
Acidez (pK <sub>a</sub> )	?

### 3- Medios de cultivo

Los medios de cultivo son el material alimenticio en el que crecen los microorganismos. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial se deben reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

#### 3.1- Agar Nutritivo

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

Es un medio de cultivo no selectivo en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen las fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes para el desarrollo bacteriano. El NaCl mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. La composición es la siguiente <sup>16</sup>:

Pluripeptona..... 5.0g/L

Extracto de carne....3.0g/L

Cloruro de sodio.....8.0 g/L

Agar..... 15.0 g/L

pH final: 7.3 ± 0.

#### 3.2- Medio Hongos y Levaduras

Medio utilizado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras.



Es nutritivo debido al extracto de levaduras y glucosa y selectivo debido a la presencia del antibiótico cloranfenicol que inhibe el desarrollo bacteriano. El agar es el agente solidificante. La composición es la siguiente <sup>16</sup>:

Extracto de levadura.....5.0 g/L  
Glucosa.....20.0g/L  
Cloranfenicol.....0.1 g/L  
Agar..... 15.0g/L  
pH final: 6.6 ± 0.2

### **3.3- Medio Mineral**

Es un medio que solo contiene sales minerales disueltas en agua y ninguna fuente de carbono. Este medio está diseñado para aportar a los microorganismos las sales necesarias para su crecimiento y para agregarle la fuente de carbono que se desee. La composición es la siguiente:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 10 g/l  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ..... 1 g/l  
NaCl ..... 1 g/l  
MgSO<sub>4</sub> ..... 0,4 g/l  
CaCl<sub>2</sub> ..... 0,1 g/l  
FeSO<sub>4</sub> ..... 0,018 g/l  
NH<sub>4</sub>Cl ..... 3 g/l

### **3.4. Caldo Tripteína Soya**

Es un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. La tripteína y la peptona de soya aportan péptidos, aminoácidos libres, hidratos de carbono, minerales y vitaminas<sup>16</sup>. En el caso del medio sólido se le adiciona agar para solidificarlo.



## **Materiales y Metodología**

### **1- Aislamiento de bacterias del suelo**

Se tomó una muestra de tierra del patio de la escuela, se suspendió en solución fisiológica estéril y se agitó bien para mezclar la muestra. Luego se tomó 1 ml de la suspensión con micropipeta y se colocó en una Caja de Petri conteniendo Agar Nutritivo. Se distribuyó con ansa de cultivo y se incubó en estufa a 32°C durante 2 días.

### **2- Aislamiento de hongos de frutas en descomposición**

Se recolectaron naranjas en descomposición, se llevaron al laboratorio y con un bisturí se cortaron muestras de la piel de las mismas. Éstas se colocaron en el centro de una Caja de Petri conteniendo Agar Hongos y Levaduras. Se incubó en estufa a 25 °C durante 48 hs.

### **3- Ensayos de tolerancia a herbicidas**

#### **3.1. Bacterias**

Una vez crecidas las bacterias en el Agar Nutritivo se procedió a este ensayo. Se colocaron 30 ml de caldo Tripteína Soya en erlenmeyers y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Luego, se agregaron las bacterias en este medio y por último se adicionaron distintas cantidades de glifosato: 0,6 y 1,2 ml. El control contenía solo medio Tripteína y glifosato. Todas las muestras se colocaron en estufa a 32°C y se registró la aparición de turbidez y su comparación con los controles. El desarrollo de turbidez indica el crecimiento microbiano.

El mismo desarrollo experimental se realizó con el herbicida 2,4-D pero las cantidades utilizadas fueron de 0,1 y 0,14 ml cada 30 ml de medio.

#### **3.2. Hongos**

Se prepararon Erlenmeyers conteniendo 30 ml de Caldo Tripteína Soya y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos. Luego, se cortaron tacos de agar de los cultivos de



hongos provenientes del Agar Hongos y Levaduras. Se obtuvieron tacos del agar de 1 cm<sup>2</sup> de superficie de la zona más joven del micelio (la parte más externa) y se colocaron en el interior de los erlenmeyers con el caldo. Se agregaron 0,6 y 1,2 ml de glifosato. El control se realizó con el caldo y el hongo sin el agregado del herbicida. Se incubó en estufa a 25°C y se registró el crecimiento del micelio en este medio líquido.

El ensayo con 2,4-D fue similar pero se utilizaron cantidades de 0,1 y 0,14 ml del herbicida en 30 ml de medio.

#### **4- Ensayos de degradación de herbicidas**

##### **4.1. Bacterias**

Para analizar si las bacterias aisladas del suelo eran capaces de degradar el glifosato se decidió plantear un ensayo donde el herbicida fuera la única fuente de carbono presente en el medio. Si los microorganismos desarrollaban, entonces estaban empleando el herbicida como fuente de energía y degradándolo.

En este caso se prepararon erlenmeyers conteniendo 30 ml de medio mineral y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos. Luego, se agregaron las bacterias y glifosato en las mismas cantidades que se describió anteriormente. El control se realizó con el medio mineral y el herbicida en la mayor concentración para comparar turbidez. Se incubaron en estufa a 32°C.

El mismo protocolo se siguió para el 2,4-D pero con las cantidades de 0,1 y 0,14 mencionadas más arriba.

##### **4.2. Hongos**

El ensayo con los hongos fue similar. Se colocaron 30 ml de medio mineral en erlenmeyers y se esterilizaron 15 minutos en autoclave. Luego, se colocaron tacos de agar conteniendo micelio del hongo crecido en el medio Hongos y Levaduras, y se agregaron las distintas



cantidades de glifosato. El control se realizó con el medio, el hongo y el agregado de glucosa (20 g/l). El control se diseñó de esta forma para analizar si el medio mineral utilizado frecuentemente en el laboratorio para bacterias también era útil para los ensayos con hongos. Se agregó glucosa para proporcionar la fuente de carbono.

Se colocaron en estufa a 25°C y se registró el desarrollo del micelio.

El ensayo con el 2,4 D se realizó de la misma manera y con las cantidades ya indicadas para este herbicida.



**Resultados:**

**1- Aislamiento de bacterias del suelo**

El crecimiento de bacterias en el agar nutritivo fue excelente y se replicaron periódicamente para mantener los cultivos en el laboratorio.

**2- Aislamiento de hongos**

Principalmente se desarrolló un hongo verde-parduzco y fue el que se repicó en el mismo medio para mantenerlo en el laboratorio y fue el seleccionado para los ensayos.

**3- Ensayos de tolerancia a herbicidas**

Los resultados de los cultivos tanto de hongos como de bacterias pueden observarse en la siguiente tabla:

Tabla N°1: Crecimiento en presencia de herbicidas glifosato y 2,4-D

Microorganismo	Glifosato		2,4-D	
	0,6ml	1,2 ml	0,1 ml	0,14 ml
Bacterias	****	*****	***	***
Hongos	***	****	**	**

Crecimiento \*\*\*\*\*excelente; \*\*\*\*muy bueno; \*\*\*bueno; \*\*Regular ; \*malo

Los datos se obtuvieron por turbidez del medio para el caso de las bacterias y por crecimiento del micelio para los hongos

Los datos indican que tanto los hongos como las bacterias son capaces de tolerar la presencia de los herbicidas en el medio de cultivo. Si bien, al tener nutrientes provenientes del caldo tripteína soya, se estarían alimentando de ellos, no les resultan letales los herbicidas en las distintas concentraciones.

Cabe destacar que en el caso del Glifosato los microorganismos desarrollaron más con la mayor concentración del compuesto. En el caso del 2,4 D crecen menos y menos aún lo hacen los hongos (ver fotos anexo).

**4- Ensayos de degradación de los herbicidas**

Los datos se muestran en la tabla N°2. Se puede observar que las bacterias y los hongos tuvieron un buen y muy buen crecimiento en las distintas cantidades de glifosato. Al igual



que ocurrió en el ensayo anterior, para la mayor concentración del herbicida hubo un mayor desarrollo tanto de hongos como de bacterias. En el caso del 2,4D, las bacterias pudieron utilizarlo como fuente de carbono pero no así los hongos.

Tabla N°2: Crecimiento de los microorganismos en medio mineral con las distintas cantidades de herbicidas

Microorganismo	Glifosato		2,4-D	
	0,6ml	1,2 ml	0,1 ml	0,14 ml
Bacterias	***	****	**	**
Hongos	***	****		

Crecimiento \*\*\*\*\*excelente; \*\*\*\*muy bueno; \*\*\*bueno; \*\*Regular; \*malo

Los datos se obtuvieron por turbidez del medio para los cultivos de bacterias y por crecimiento del micelio para el caso de los hongos.



### **Discusión:**

Existe una gran controversia sobre los efectos de los agroquímicos sobre la salud humana, de otros seres vivos y del medio ambiente. Si bien los trabajos científicos publicados hasta la fecha no son definitorios, se registran daños crónicos a distintos niveles en diferentes seres vivos, aunque muchas veces las concentraciones utilizadas de los herbicidas en los ensayos superan, y por mucho, las utilizadas a campo <sup>2,6,7,9</sup>.

Respecto a la permanencia de los agroquímicos en el suelo, algunos indican que se degradan rápidamente y otros que los compuestos son persistentes y recalcitrantes <sup>9,10</sup>.

El presente trabajo mostró que el herbicida glifosato, uno de los más controvertidos en el mundo, no es tóxico y es degradado, en concentraciones similares a las utilizadas a campo, por bacterias que habitan naturalmente el suelo, y por hongos, también habituales en el medio ambiente ya que fueron aislados de fruta en descomposición. Incluso, las bacterias y los hongos desarrollan mejor en presencia de la mayor concentración del compuesto.

En el caso del herbicida 2,4D, los resultados son diferentes. Los dos tipos de microorganismos pueden tolerarlo, pero solo las bacterias son capaces de utilizarlo como fuente de carbono y entonces degradarlo. Los hongos no desarrollan en ninguna de las dos concentraciones, indicando que no pueden usarlo como fuente de energía.

Los datos de este trabajo resultan interesantes desde el punto de vista de que seres vivos habituales del ambiente son capaces de degradar estos herbicidas considerados tóxicos y peligrosos por varias fuentes bibliográficas. Y podría abrir un camino hacia futuras investigaciones para aplicarlos en lugares contaminados por la sobreutilización de los mismos. No obstante, los resultados obtenidos son bajo condiciones de laboratorio y en el ambiente real podrían ser diferentes. Esto abre nuevos interrogantes y la necesidad de nuevas investigaciones. Se seguirá indagando sobre cuáles son las respuestas de estos hongos y bacterias frente a otros agroquímicos ampliamente utilizados en nuestra zona agrícola, se buscará la forma de realizar los ensayos simulando las condiciones naturales y se buscará realizar una caracterización de los mismos a modo de determinar si pueden actuar aislados o como consorcio de microorganismos.



## **Conclusión**

Los resultados de este trabajo muestran que hongos y bacterias habituales de nuestro medio ambiente no son dañados por los herbicidas glifosato y 2,4D y que pueden utilizar el glifosato como única fuente de carbono y, entonces, degradarlo. Solo las bacterias muestran aptitud para degradar el 2,4 D.

Estos datos son interesantes porque demuestran la probabilidad de que estos agroquímicos puedan ser degradados en el suelo y que no resulten persistentes y recalcitrantes como se los ha denominado frecuentemente, aunque, se debe continuar con las investigaciones para poder determinarlo.

No obstante, estos datos podrían ser alentadores y abrir el camino a futuras investigaciones para poder utilizar estos microorganismos en zonas donde se ha producido una sobredosificación ya sea por desconocimiento o por falta de control.



## Bibliografía

- 1-<http://www.ub.edu.ar/investigaciones>(consultado el 11/08/2017)
- 2-<http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar> (consultado el 19/08/2017)
- 3- <http://brujulacomunicacion.com> (consultado el 19/08/2017)
- 4-<http://www.grr.org.ar> (consultado el 20/08/2017)
- 5- <http://www.acopiadores.com> (consultado el 20/08/2017)
- 6- “Impactos sanitarios y ambientales del glifosato: Las implicaciones del aumento en la utilización de glifosato en asociación con cultivos genéticamente modificados”. Informe realizado por David Buffin y Topsy Jewell, miembros del Pesticide Action Network, UK. Julio de 2001. [www.inti.gov.ar](http://www.inti.gov.ar) (consultado el 21/06/2017)
- 7- <http://www.elpais.com> (consultado el 20/06/2017)
- 8-<http://www.diarionorte.com> (consultado el 20/08/2017)
- 9-<http://www.greenpeace.org> (consultado el 23/08/2017)
- 10- *Toxicology of Glyphosate and Roundup Herbicide*. Monsanto Company, Department of Medicine and Environmental Health, Missouri, USA; Monsanto Company, Web Site: [www.monsanto.com](http://www.monsanto.com)., 18th January 1998;
- 11- Monsanto Advertising Supplements in Farmers\*s Weekly, *Roundup 91*, 7 June 1991, and *Roundup 92*, 5th June 1992; Pesticide Outlook, Dec. 1997, Royal Society of Chemistry, Vol. 8, No. 6, pp3-4.
- 12- [http://www.valorzamba.com.ar/ValorZamba/detalle\\_herbicida\\_24d.aspx](http://www.valorzamba.com.ar/ValorZamba/detalle_herbicida_24d.aspx) (consultado el 5/09/2017)
- 13- <http://www.oocities.org> (consultado el 5/09/2017)
- 14- <http://rapaluruquay.org> (consultado el 2/09/2017)
- 15-<http://es.wikipedia.org> (consultado el 5/09/2017)
- 16-<http://www.britanialab.com> (consultado el 10/06/2017)