

# Toxicidad del glifosato formulado (Glyphos®) y Cosmo-Flux® para ranas colombianas en estadio larvario 1. Toxicidad aguda de laboratorio

M H Bernal<sup>1</sup>, K R Solomon<sup>2</sup>, Gabriel Carrasquilla<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Laboratory of Herpetology, Eco-Physiology & Ethology, Universidad del Tolima, Barrio Santa Elena, Ibagué, Tolima, Colombia <sup>2</sup>Centre for Toxicology and Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada y <sup>3</sup>Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

---

En Colombia la aspersión de la coca (*Erythroxylum coca*) con glifosato ha despertado preocupación por su posible impacto sobre los anfibios. Se dispone de pocos datos de toxicidad en especies diferentes a las de regiones templadas y aún no se han producido para la combinación de glifosato formulado (Glyphos®) con el adyuvante Cosmo-Flux® (mezcla para la coca), tal como se utiliza en el control de la coca en Colombia. Para caracterizar la toxicidad de la mezcla de aspersión en las ranas de Colombia, fueron expuestos renacuajos en el estadio 25 de la escala de Gosner de *Scinax ruber*, *Dendrosophus microcephalus*, *Hypsiboas crepitans*, *Rhinella granulosa*, *Rhinella marina*, *Rhinella typhonius*, *Centrolene prosoblepon*, y *Engystomops pustulosus* a la mezcla para la coca a concentraciones de glifosato de 1 a 4,2 mg a.e./L diluida en agua potable libre de cloro, en recipientes de vidrio. Se adicionó Cosmo-Flux® (2,3% v/v) al Glyphos® en la proporción de 2,3% v/v, tal como se utiliza en la aplicación aérea para el control de la coca.

Las exposiciones fueron durante 96 h a  $23 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de luz oscuridad 12:12. Las soluciones de prueba fueron renovadas cada 24 h. Las concentraciones, medidas durante la primera hora, a las 24 h y a las 96 h utilizando ELISA (Abraxis, LLC), variaron de 70 a 130% de los valores nominales. Los valores de LC50 variaron de 1.200 a 2.780  $\mu\text{g}$  de glifosato a.e./L para las ocho especies evaluadas. Los valores mencionados sugirieron que la sensibilidad de estas especies a las formulaciones de glifosato tipo Roundup® es similar a la observada en otras especies tropicales y templadas. También, esa sensibilidad de los anfibios en estadio larvario a las formulaciones tipo Roundup® abarca un rango relativamente estrecho. Por último, es probable que la toxicidad de la mezcla empleada para la aspersión de la coca sea determinada por el surfactante en la formulación de glifosato, dado que la adición de Cosmo-Flux® no aumentó la toxicidad por encima de la reportada para Vision® = Roundup®.

---

Recibido x de Julio de 2008; aceptado xx yy de 2008

© Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 2009. Este trabajo fue preparado como parte del Estudio titulado "La Producción de Drogas Ilícitas, el Medioambiente y la Salud Humana," financiado con contribuciones de los Gobiernos de Colombia y de los Estados Unidos de América. Las conclusiones y opiniones expresadas en el mismo pertenecen a los autores y no necesariamente representan las de la Organización de los Estados Americanos o su Secretaría General, la cual, a la fecha de adquisición de los derechos de autor, no ha formulado ninguna opinión respecto de aquellas.

Dirección de correspondencia: Dr. MH Bernal. Laboratorio de herpetología, Ecofisiología y Etología. Universidad del Tolima, Barrio Santa Elena, Ibagué, Tolima, Colombia [mhbernal@ut.edu.co](mailto:mhbernal@ut.edu.co)

---

Amplias revisiones sobre los efectos del glifosato y sus productos formulados sobre los organismos acuáticos han concluido que el glifosato presenta un riesgo insignificante para los mismos (World Health Organization International Program on Chemical Safety 1994, Giesy et al., 2000, Solomon & Thompson 2003). Aunque los anfibios son fisiológicamente únicos y ecológicamente importantes, en la actualidad ninguna agencia regulatoria exige datos de toxicidad en anfibios como parte de sus requisitos de registro. La determinación de los efectos directos e indirectos de los agroquímicos en las especies anfibias continúa considerándose como una necesidad general de investigación (Linder et al., 2003).

Algunas publicaciones recientes han reportado que el glifosato (ingrediente activo) es de baja toxicidad para los anfibios en estadio larvario. Los valores de LC50 a las 48 h de la sal isopropilamina (IPA) de glifosato grado técnico para las larvas de ranas australianas (*Litoria moorei*, *Crinia insignifera*, *Lymnodynastes dorsalis*, y *Heleioporus eyrei*) fueron reportados entre >343.000 a >466.000 µg de glifosato a.e./L (Mann & Bidwell 1999). La LC50 de IPA de glifosato a las 96 h en *Rana clamitans* fue reportada >38.900 µg a.e./L a partir de un estudio de exposición estática (Howe et al., 2001). A partir de este limitado conjunto de datos, parece que IPA de glifosato en esencia no es tóxica para los anfibios.

La toxicidad en los anfibios de algunos productos formulados de glifosato es mayor que la del ingrediente activo. Un estudio de Mann y Bidwell (1999) examinó la toxicidad aguda del Herbicida Roundup® (MON 2139) en renacuajos de *C. insignifera*, *H. eyrei*, *L. dorsalis*, y *L. moorei* y reportó valores de LC50 a las 48 h entre 2.900 y 11.600 µg a.e./L de glifosato. Empleando una formulación de glifosato (Vision® con contenido de glifosato y surfactante de tallow amina etoxilada –POEA y equivalente a Roundup®), se reportaron valores de LC50 a las 96 h tan bajos como 880 µg a.e./L en renacuajos de *Xenopus laevis*, *Bufo americanus*, *Rana clamitans*, y *Rana pipiens* (Edginton et al., 2004). Las etapas embrionarias fueron menos sensibles que las larvas en estadio Gosner 25 y la toxicidad estuvo afectada por el pH del medio de exposición, aunque no de una forma constante. Un estudio en *R. clamitans*, *R. pipiens*, *Rana sylvatica*, y *B. americanus* (Howe et al., 2004) reportó valores de LC50 a las 96 h para Roundup Original® de 2.200, 2.900 y 5.100 µg a.e./L, respectivamente. Un estudio en *Rana cascadae* reportó LC50 a las 48 h para Roundup® de 2.336 µg a.e./L utilizando exposiciones estáticas en tanques de vidrio (Cauble & Wagner 2005). En un estudio llevado a cabo con *R. catesbeiana*, *R. clamitans*, *Hyla versicolor*, *R. pipiens*, *B. americanus*, y *R. sylvatica*, las LC50 a las 384 h para Roundup® se reportaron entre 977-1.865 µg a.e./L (basadas en el supuesto de que la concentración reportada para el IA era el de IPA Relyea 2005). No es claro porqué se calcularon los valores de LC50 sólo para el día 16, cuando al parecer la mortalidad se presentó tempranamente en el periodo de exposición; no obstante, las LC50 reportadas no fueron muy diferentes de las reportadas por otros autores (como se discutió previamente).

La toxicidad de otras formulaciones de glifosato es menor que para el Roundup®. El Roundup® Biactive (MON 77920) prácticamente no fue tóxico para los renacuajos, produciendo valores de LC50 a las 48 h de

328.000 µg a.e./L para *L. moorei* y >360.000 µg a.e./L para *C. insignifera*, *H. eyrei*, y *L. dorsalis* (Mann & Bidwell 1999). Es claro que los componentes de la formulación, diferentes al ingrediente activo, son los determinantes de la toxicidad aguda.

Las aplicaciones aéreas de glifosato para el control de los cultivos ilícitos de coca (*Erythroxylum coca*) y amapola (*Papaver somniferum*) se han realizado en Colombia desde 1997. Desde 2006, la amapola no ha crecido hasta una extensión significativa en Colombia y no se continuó asperjando. Se ha señalado que la mezcla de glifosato –Cosmo-Flux® tal como se emplea en el programa de aspersión en Colombia podría presentar riesgo para las especies nativas de ranas (Solomon et al., 2007). La LC50 a las 96 h para la mezcla de aspersión utilizada en Colombia en las larvas de *X. laevis* fue 1.300 y 1.100 µg a.e./L para las mezclas de amapola y coca (Solomon et al., 2007), respectivamente (Wildlife International 2006a, b). Estos valores no fueron muy diferentes de los reportados en la literatura para Roundup® en las mismas especies, lo cual sugiere que la adición del adyuvante Cosmo-Flux® no aumentó la toxicidad de la mezcla. No obstante, hay pocos datos en la literatura sobre la susceptibilidad de las especies de ranas tropicales a las formulaciones de glifosato y no hay datos para las especies nativas de Colombia. Por esta razón se llevaron a cabo pruebas agudas laboratorio en larvas de especies de rana nativas de Colombia. Este reporte describe la toxicidad aguda de la mezcla de Glyphos® y Cosmo-Flux® en renacuajos (estadio Gosner 25) de las especies de rana *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824), *Rhinella granulosa* (Spix, 1824), *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864), *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758), *Scinax ruber* (Laurenti, 1768), *Dendrosophus microcephalus* (Cope, 1886), *Rhinella typhonius* (Linnaeus, 1758), y *Centrolene prosoblepon* (Boettger, 1892), durante un periodo de exposición de 96 horas bajo condiciones de prueba estáticas-de renovación en el laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos de prueba

Las especies presentes en los lugares de producción de coca ( $\leq 1000$  m s.n.m.) fueron el foco de este estudio. Se recolectaron embriones de las especies de prueba en los lugares mencionados en la Tabla 1 y se transportaron a las Universidad del Tolima donde fueron criados hasta estadio Gosner 25 a una temperatura de 23-25°C en tanques que contenían agua del acueducto a la que se le retiró el cloro mediante aireación continua por lo menos 48 h antes de su uso. Los embriones no fueron alimentados mientras se desarrollaron hasta el estadio 25. Solamente los

TABLA 1.

Especies de ranas en estadio larvario empleadas en los estudios de toxicidad aguda y su lugar de recolección.

Especie	Estadio recolectado	Lugar	Altitud (m s.n.m.)
<i>Hypsiboas crepitans</i>	Gosner 10-11	Potrerrillo (4°14'N; 74°58'W)	430
<i>Rhinella granulosa</i>	Gosner 10-11	Payandé (4°19'N; 75°06'W)	630
<i>Engystomops pustulosus</i>	Gosner 10-11	Ibagué (4°21'N; 75°06'W)	827
<i>Rhinella marina</i>	Gosner 10-11	Payandé (4°19'N; 75°06'W)	630
<i>Scinax ruber</i>	Gosner 25	Potrerrillo (4°14'N; 74°58'W)	430
<i>Dendrosophus microcephalus</i>	Gosner 10-11	Potrerrillo (4°14'N; 74°58'W)	430
<i>Rhinella typhonius</i>	Gosner 25	Ibagué (4°25'N; 75°12'W)	1200
<i>Centrolene prosoblepon</i>	Gosner 10-11	Falán (5°07'N; 74°58'W)	1100

renacuajos de *typhonius* y *S. ruber* fueron capturados directamente en el campo en estadio 25. Los renacuajos no fueron alimentados durante 24 h antes o durante la prueba.

#### Procedimientos de la prueba

Se obtuvieron y almacenaron separadamente a temperatura ambiente y en la oscuridad, glifosato formulado (Glyphos®, un producto vendido en Colombia pero similar al Roundup® respecto al ingrediente activo y al surfactante POEA) y Cosmo-Flux® tal como se usan en el programa de aspersión. El Glyphos® contiene 360 g de glifosato a.e./L (como el IPA) y entre 10 y 15% del surfactante tallow amina etoxilada (POEA). El Cosmo-Flux® contiene una mezcla de polietoxilatos lineales y aril (17% w/v) e isoparafinas (83% v/v) (Cosmoagro 2004). El agua utilizada para las pruebas fue la misma utilizada para criar los renacuajos (descripción previa). Se midieron la conductancia específica, dureza, alcalinidad y pH del agua.

Las cámaras de prueba fueron frascos de 2 L que contenían 1 L de la solución de prueba. Las cámaras se ubicaron indiscriminadamente por grupo de tratamiento en un área del laboratorio con aire acondicionado, diseñada para mantener la temperatura y el fotoperiodo durante el tiempo de la prueba. Se preparó una solución madre primaria disolviendo el Glyphos® y el Cosmo-Flux® en agua hasta obtener una concentración nominal de 100.000 µg de glifosato a.e./L. Todas las soluciones fueron preparadas utilizando una pipeta de desplazamiento directo. Se adicionó Cosmo-Flux® en una proporción de 0,023 µL por 1 µL de Glyphos® (2,3% v/v) para obtener la proporción de la mezcla de aspersión tal como se usa en el terreno. Las concentraciones nominales de prueba se seleccionaron con base en los resultados de las pruebas de toxicidad exploratorias para encontrar los rangos. Se prepararon dos réplicas de cada solución de prueba mediante dilución seriada de la solución madre con agua de

dilución para dar un rango de concentraciones nominales de 4.200 a 1.000 µg de glifosato a.e./L. en 1 L de solución. Todas las soluciones se mezclaron por inversión. Se colocaron imparcialmente diez renacuajos en cada una de las dos cámaras para un total de 20 renacuajos por concentración. La tasa de carga de biomasa (definida como el peso húmedo total de 10 renacuajos por litro de agua de prueba) estuvo por debajo de 0,6 g/L de acuerdo con las recomendaciones de las guías de ASTM (ASTM 1998), excepto para *S. ruber* que estuvo cercana a 0,7 g/L. Las soluciones de prueba se renovaron diariamente transfiriendo los organismos de prueba a soluciones recién preparadas. Las concentraciones medias de prueba se midieron a partir de muestras del agua de prueba obtenida de la combinación de las réplicas de cada grupo de tratamiento y de control al inicio de la prueba (0 h) y de las soluciones de prueba de cada grupo de tratamiento y de control a las 24 h y al finalizar (96 h). Todas las muestras fueron obtenidas a profundidad media y se analizaron inmediatamente, sin almacenamiento.

Para la iluminación de las cámaras se emplearon luces fluorescentes que emiten longitudes de onda similares a la luz natural (Phillips TLT 20W/54RS). Se controló un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad mediante un *timer* automático. La temperatura durante el estudio fue  $23 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . La temperatura se midió en cada cámara de prueba al inicio y al final de la prueba y con intervalos aproximados de 24 h durante la misma, inclusive antes y después de las renovaciones utilizando un termómetro líquido de vidrio. La temperatura también se midió continuamente durante la prueba en una cámara de prueba de control negativo utilizando un termómetro digital de máximos y mínimos. En cada cámara de prueba se midieron el oxígeno en solución y el pH al inicio y finalización de la prueba y a intervalos aproximados de 24 h durante la prueba, incluyendo antes y después de las renovaciones. El oxígeno en solución se midió utilizando un medidor portátil de oxígeno disuelto Hanna HI 8043 y las mediciones de pH

se hicieron utilizando un pH metro de membrana Hanna HI 8314. Se hicieron observaciones de la mortalidad y de otros signos de toxicidad, tal como una actividad de nadado inusual, a las 4, 24, 48, 72 y 96 horas después de iniciada la prueba. Para estimar los valores de LC50 a las 96 h se utilizó el porcentaje de mortalidad acumulativa observada en los grupos de tratamiento.

### Métodos analíticos

Para medir la concentración de glifosato en las soluciones de prueba se utilizó el kit de prueba ELISA fabricado por Abraxis, LLC (Warminster, PA, USA). Los estándares de calibración de las soluciones de glifosato, que variaron en concentración de 0,15 a 5,0 µg/L, se prepararon a partir de las soluciones estándar suministradas con el kit de prueba y se emplearon para construir la curva estándar. Con cada conjunto de muestras analizadas se preparó una curva estándar. La curva estándar se construyó graficando el %B/Bo (valor de absorbancia para cada valor estándar/absorbancia para el estándar cero) contra la concentración correspondiente de glifosato. Las concentraciones de glifosato se determinaron mediante interpolación de la curva estándar. La concentración final de glifosato en la solución de exposición se calculó corrigiendo el porcentaje de recuperación media del control de calidad (QC) con base en el análisis de 2 réplicas de una de las concentraciones (0.5 µg/L) del estándar. El ensayo de glifosato Abraxis tiene una concentración mínima detectable estimada basada en un 90% B/Bo de 0.1 µg/L. El límite de cuantificación (*LOQ-limit of quantitation*) del método para estos análisis fue definido como el menor estándar de calibración, 0,15 µg/L. Se analizaron dos muestras blanco de matriz para determinar las posibles interferencias. No se detectó ninguna interferencia por encima del LOQ durante el análisis de las muestras.

No fue posible logísticamente medir las concentraciones de Cosmo-Flux®, sin embargo, las proporciones de Glyphos® y Cosmo-Flux® se mantuvieron constantes y fueron las mismas empleadas en el programa de aspersión aérea de la coca. Los resultados son, por consiguiente, representativos de las exposiciones reales en el terreno.

### Análisis estadístico

Para su consistencia con otros estudios, los datos de mortalidad se analizaron utilizando la Versión 1.5 del USEPA Probit Program (USEPA 1994). La LC1 se estimó como una aproximación derivada de la regresión de la concentración de efecto no observado y la LC50 se calculó por comparación con otros valores de la literatura. La LC1, derivada de los datos de respuesta, se prefirió como indicador de la concentración de bajo efecto por ser independiente del diseño del experimento

(Crane & Newman 2000). Cuando no se dispuso de datos suficientes para el programa Probit (ninguna o alguna concentración con una respuesta entre 0 y 100%), se estimaron los valores LC50 por interpolación, a partir de un gráfico de porcentaje de concentración vs. respuesta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Medición de las concentraciones de prueba y de la calidad del agua

En las muestras recolectadas al inicio de la prueba se habían medido concentraciones de glifosato que variaban de 75 a 125% de las concentraciones nominales. En las muestras recolectadas antes de la renovación de las soluciones de prueba a las 24 horas se habían medido concentraciones que iban de 74 a 112% de las concentraciones nominales. En las muestras recolectadas al final de la prueba se habían medido concentraciones que iban de 71 a 130% de las concentraciones nominales. Cuando se promediaron las concentraciones medidas en las muestras recolectadas a las 0, las 24 y las 96 horas, las medias de las concentraciones variaron de 85 a 105% de las concentraciones nominales. Debido a que los valores medidos estuvieron cerca de los nominales, se utilizaron las concentraciones nominales para determinar los valores de LC1 y LC50 para comparar las respuestas de los anuros en estadio larval reportadas bajo condiciones de campo (Bernal & Solomon 2008) con las de otros estudios. Las temperaturas del agua estaban en el rango establecido para la prueba, de  $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ . Las concentraciones medias de oxígeno disuelto estuvieron cercanas a 6,85 mg/L. En la Tabla 2 se resumen los intervalos de confianza del 95 % de las medidas de concentración de oxígeno, dureza, alcalinidad, conductancia específica y pH en el agua de dilución al inicio de la prueba.

Algunos signos de toxicidad como el nadado lento o el permanecer inmóvil en el fondo, se observaron generalmente a concentraciones de exposición bajas, y un nadado rápido descontrolado o permanecer en posición vertical, fueron más evidentes a concentraciones cercanas o superiores a la concentración LC50. En general, la mayoría de las respuestas tóxicas se expresaron entre las 24 y 48 h de comenzada la prueba.

**TABLA 2.**  
Dureza, alcalinidad, conductancia específica y pH en el agua de dilución al inicio de la prueba

Parámetro	Media	Intervalo de confianza 95%
Concentración de oxígeno (mg/L)	6.85 (N=96)	6.60-7.10
Dureza (mg/L de CaCO <sub>3</sub> )	112 (N=6)	97.1-126.8
Alcalinidad (mg/L de CaCO <sub>3</sub> )	89.3 (N=6)	70.2-108.4
Conductancia específica (mS/cm)	263.2 (N=6)	197.4-328.9
pH	8.23 (N=96)	8.20-8.25



La relativamente baja toxicidad de Cosmo-Flux® es consistente con los valores de LC50 reportados en el pez *Piaractus brachypomus*, la cual fue de 4.417 mg de formulación/L en especímenes jóvenes de 40 g de masa (Rondon-Barragan et al., 2007).

La extrapolación directa de estos valores de toxicidad al medio ambiente es inapropiada excepto para una clasificación simple de riesgo. En condiciones ambientales reales en las cuales hay presencia de sedimentos y residuos orgánicos en los reservorios habitados por las larvas de anfibios, las concentraciones de glifosato y el surfactante POEA disminuirán rápidamente debido a su unión con los sedimentos (Solomon et al., 2007) y esto probablemente reducirá la exposición y los riesgos para los anfibios. Estas hipótesis han sido probadas y sus resultados se reportan en un artículo complementario de éste (Bernal & Solomon 2008).

#### REFERENCIAS

- ASTM. 1998. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus*, (Vol. E 1439-91), West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, pp. 825-836.
- Bernal, M. H., and Solomon, K. R. 2008. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux® to larval and juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, In this volume.
- Brain, R. A., and Solomon, K. R. 2008. Comparative hazards of glyphosate, other pesticides, and other human activities to amphibians in the production of coca, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, Accepted 2008 08 25.
- Cable, K., and Wagner, R. S. 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 75:429-435.
- Cosmoagro. 2004. Cosmo-Flux® 411F Label, Cosmoagro S.A., Accessed, October 20, 2004, [www.cosmoagro.com](http://www.cosmoagro.com)
- Crane, M., and Newman, M. C. 2000. What level of effect is a not observed effect, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:516-519.
- Dorn, P. B., Salanitro, J. P., Evans, S. H., and Kravetz, L. 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear surfactants by biodegradation and toxicity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:1751-1762.
- Edgington, A. N., Sheridan, P. M., Stephenson, G. R., Thompson, D. G., and Boermans, H. J. 2004. Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:815-822.
- Giesy, J. P., Dobson, S., and Solomon, K. R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167:35-120.
- Howe, C., Berrill, M., and Pauli, B. D. 2001. The acute and chronic toxicity of glyphosate-based pesticides in northern leopard frogs, in *SETAC Annual Meeting*, Baltimore, MD, USA: SETAC, p. Abstract PH058.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., and Veldhoen, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:1928-1938.
- Linder, G., Krest, S. K., and Sparling, D. W. (eds.) 2003. *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*, Pensacola, FL, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Maltby, L., Blake, N. N., Brock, T. C. M., and van den Brink, P. J. 2005. Insecticide species sensitivity distributions: The importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.*, 24:379-388.
- Mann, R. M., and Bidwell, J. R. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:193-199.
- Perkins, P. J., Boermans, H. J., and Stephenson, G. R. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:940-945.
- Relyea, R. A. 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48:351-357.
- Rondon-Barragan, I. S., Ramirez-Duarte, W. F., and Eslava-Mocha, P. R. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmo-Flux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 20:431-446.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., and Sanin, L.-H. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 190:43-125.
- Solomon, K. R., and Takacs, P. 2002. Probabilistic risk assessment using species sensitivity distributions, in *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*, eds. Posthuma, L., et al., Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 285-313.
- Solomon, K. R., and Thompson, D. G. 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate, *J. Toxicol. Environ. Hlth. B*, 6:211-246.
- USEPA. 1994. Probit Program, Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htmS>
- Wildlife International. 2006a. Glyphosate-Cosmo-Flux® - Coca Mix: A 96-Hour Static-Renewal Acute Toxicity Test with the African Clawed-Frog Tadpole (*Xenopus laevis*). Final Report, Technical Report 628A-101, Wildlife International.
- Wildlife International. 2006b. Glyphosate-Cosmo-Flux® - Poppy Mix: A 96-Hour Static-Renewal Acute Toxicity Test with the African Clawed-Frog Tadpole (*Xenopus laevis*). Final Report, Technical Report 628A-102, Wildlife International.
- Wong, D. C. L., Dorn, P. B., and Chai, E. Y. 1997. Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1970-1976.
- World Health Organization International Program on Chemical Safety 1994. *Glyphosate* (Vol. 159), Geneva:

