

A)- Lista de Laboratorios por departamentos identificados capaces de realizar la determinación de Glifosato mediante ELISA o con potencialidad para dicho fin:

Colonia:

- Laboratorio Agroindustrial Cooperativa Colaveco. <http://www.colaveco.com.uy/inicio/>

Soriano:

- LAVSA Laboratorio. <http://www.lavsa.com.uy/>

Paysandú:

- Laboratorio Analítico Agroindustrial. <https://www.laai.com.uy/servicios.asp>
- Departamento de Química del Litoral (UdelaR). Este laboratorio brinda el servicio pero mediante HPLC-MS/MS_ <https://dql.cup.edu.uy/index.php/investigacion/laboratorio-de-analisis-de-compuestos-traza/>

Tacuarembó:

- Denis Galarraga. <http://www.denisegalarraga.com.uy/analisis>

Instituciones que cuentan con personal calificado dentro del departamento para realizar determinación, pero no cuentan con lector de placas de Elisa:

- INIA: Laboratorio de Sanidad Animal. En este momento no cuenta con Lector de placas de ELISA
- UdelaR: Espacio de Biología Vegetal del Noreste y Espacio de Ciencia y Tecnología Química

Rivera:

Instituciones que cuentan con personal calificado para realizar determinación, pero no cuentan con lector de placas de Elisa en el Departamento de Rivera:

- UdelaR: Centro Universitario de Rivera

Canelones:

- NUTRAL. <https://www.agrifirm.uy/nutral/contacto-ubicacion/>
Actualmente brinda este servicio

Montevideo:

- LATU. <https://www.latu.org.uy/> Actualmente brinda este servicio

B)- Determinación de Glifosato mediante ELISA

El Kit de detección de glifosato en muestras de miel que existe comercialmente y más utilizado es de la marca Abraxis, este kit utiliza una variante compleja de la técnica de ELISA denominado ELISA competitivo o ELISA de inhibición. En el cual se utiliza un

antígeno de referencia que compite con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario.

Normalmente se utiliza esta variante de ELISA para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades. El procedimiento simplificado sería el siguiente:

- 1- El antígeno de referencia se inmoviliza sobre la placa.
- 2- Por otro lado, un exceso de anticuerpo primario sin marcar se incuba con la muestra que contiene el antígeno de interés, dando lugar a la formación de complejos antígeno-anticuerpo
- 3- Se añade la mezcla antígeno-anticuerpo a la placa, donde el antígeno de referencia competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo
- 4- Se lava la placa eliminando los complejos antígeno-anticuerpo solubles
- 5- Se añade a la placa un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario anclado al antígeno de referencia.
- 6- Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés presente en la muestra.

En el caso del kit de Abraxis el procedimiento estandarizado es el siguiente: se realiza una curva de calibración (CC) de glifosato que es proporcionada dentro del kit. La CC así como las muestras se derivatizan durante diez minutos. Luego las muestras y la CC se añaden junto con un anticuerpo específico para el glifosato a la placa de ELISA. La placa tiene pocillos que están recubiertos con anticuerpos y la misma es incubada durante treinta minutos con agitación. Luego se añade un conjugado de enzimas glifosato peroxidasa (glifosato marcado). En este punto se produce una reacción competitiva entre el glifosato presente en la CC o en las muestras, y el glifosato marcado con la enzima para los sitios de unión de anticuerpos en los pocillos de la placa. Se permite que la reacción continúe durante sesenta minutos. Después de un paso de lavado se añade un sustrato de enzima (peróxido de hidrógeno) y el cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). El glifosato marcado con enzimas unido al anticuerpo de glifosato cataliza la conversión de la mezcla sustrato/cromógeno en un producto coloreado. Después de un período de incubación, la reacción se detiene y se estabiliza mediante la adición de ácido diluido y se lee en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. Como el glifosato marcado (conjugado) compite con el glifosato no marcado (el de la CC o el que estaba presente en las muestras) por los sitios de los anticuerpos, el color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de glifosato en la muestra.

C) Equipamiento básico necesario de laboratorio:

El laboratorio donde se desarrolla la determinación de glifosato mediante ELISA debe contar con:

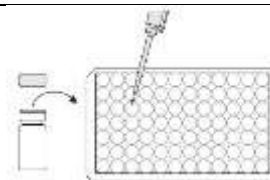
- Bortex
- Baño de agua
- Balanza analítica
- Micropipeta
- Micropipeta multicanal
- Timer
- Lector de Placas de ELISA

D)- Resumen de la preparación de muestra y desarrollo del test de ELISA para determinación de glifosato en matrices alimentarias.

1. Se pesa la muestra dentro de un tubo eppendorf o similar (0,05g). Se agrega en el tubo 0,5 mL de Ácido Clorhídrico 1N. Se agitar en bortex durante 2 minutos.
2. En un vial de 4 mL se agregan 3,96 mL de diluyente para mieles que se proporciona en el kit. El kit viene con una botella de 30 mL y se puede comprar aparte el diluyente.
3. Al vial de 4 mL con 3,96 mL de diluyente agregar 400 μ L de miel previamente pesada y acidulada en el paso 1.
4. En una gradilla disponer de 8 tubos de vidrio para la curva (cero más 5 puntos (control y muestra). Pipetear 0,25mL en cada tubo de lo que corresponda) agregar 1 mL de buffer de análisis de Glifosato en cada tubo (agitar inmediatamente después del agregado en el tubo).
5. Agregar 3,5 μ L de reactivo de derivatización en el vial para tal fin y bortexear inmediatamente.
6. Agregar 1 mL de esta mezcla en cada tubo de análisis. Agitar y dejar reposar durante 10 minutos bortexear y transferir a la placa de ELISA
7. Procedimiento en la placa de ELISA:

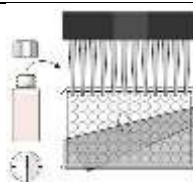
1- Agregado de estándares (CC) y muestras

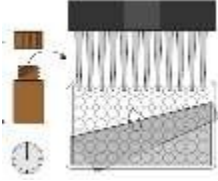

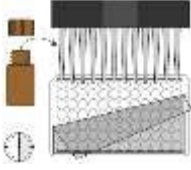
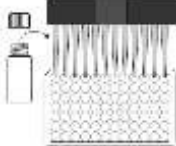
Añada 50 μ L de las soluciones estándar derivadas, control o muestras en los pocillos de las placas de prueba de acuerdo con el esquema de trabajo indicado. Se recomienda utilizar duplicados o triplicados.



2- Agregado de la solución de anticuerpo.

Añada 50 μ L de la solución de anticuerpos anti-Glifosato en los pocillos. Es recomendable realizar duplicados o triplicados de los análisis y curva de calibración. Cubra los pocillos con Parafilm o cinta adhesiva y mezcle el contenido moviendo el soporte de la placa con movimientos rápidos circulares sobre la mesa de trabajo durante 30 segundos. Incube durante 30 minutos.



<p>3- Agregado de enzima conjugada Añada 50 uL del conjugado de la enzima a los pocillos individuales sucesivamente usando una pipeta multicanal. Cubrir los pozos con Parafilm o cinta adhesiva y mezclar el contenido moviendo el soporte de la cinta en un rápido</p>	
<p>movimiento circular sobre la mesa de trabajo durante 30 segundos. Tenga cuidado de no derramar el contenido. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente.</p>	
<p>4- Lavado de la placa Después de la incubación, quite la cubierta y agite vigorosamente el contenido de los pocillos en una pileta. Lavar las placas tres veces con una pipeta multicanal o una piseta de lavado usando la solución buffer de lavado. Por favor, use al menos un volumen de 250 uL de buffer de lavado para cada pocillo y cada paso de lavado. El buffer restante debe ser removido de los pocillos secando la placa con palmaditas sobre toallas de papel.</p>	
<p>5- Adición de sustrato/solución de color Añada 150 uL de sustrato/solución de color a los pocillos individuales sucesivamente usando una pipeta multicanal o una pipeta. Cubra los pocillos con Parafilm o cinta adhesiva y mezcle el contenido moviendo el soporte de la placa con un movimiento rápido circular. Tenga cuidado de no derramar el contenido. Incube las placas durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.</p>	
<p>6- Adición de la solución de detención de la reacción Añada 100 uL de solución de detención de la reacción a los pocillos en la misma secuencia que para la solución de sustrato utilizando una pipeta multicanal o una pipeta.</p>	
<p>7- Medida de color Lea la absorbancia a 450nm usando un lector ELISA de microplacas. Calcule los resultados.</p>	