

Taller Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato



Estación Experimental Agropecuaria
Balcarce, 23 y 24 de noviembre de 2010

Taller Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato

Editoras:

Myriam Camino

Técnico del grupo
Manejo y Calidad de Suelos y Aguas
Área de Investigaciones en Agronomía
INTA, EEA Balcarce

Virginia Aparicio

Investigadora del grupo
Manejo y Calidad de Suelos y Aguas
Coordinadora de PE de INTA
INTA, EEA Balcarce

Introducción

Con satisfacción desde el Área Estratégica Gestión Ambiental de INTA damos la bienvenida a los especialistas convocados al Taller Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato. Este herbicida, de amplia y dominante utilización en la agricultura de Argentina, con varios millones de litros aplicados en asociación con diversos cultivos, principalmente la soja, está en la mira de la sociedad por preocupaciones para la salud, tanto del ambiente como humana.

Sin dudas, es una actitud responsable de las instituciones contribuir con información científica y metodologías precisas para comprender su destino en el ambiente. Estimar los riesgos potenciales de contaminación en cuerpos de agua superficial, subterránea y en el suelo es fundamental para establecer recomendaciones de manejo de los agroquímicos utilizados en los sistemas productivos del país. Estas estimaciones deberán basarse en la información generada en las investigaciones del país así como las generadas a nivel internacional.

En general, los principios activos tienen dos componentes en su toxicidad, una es la inherente a la molécula y otra a la posible exposición de los organismos vivos. Siempre hay riesgo, aún en los productos menos tóxicos, y en la mayoría de los casos, los problemas de toxicidad en el ambiente se magnifican si el uso de la sustancia no se hace en forma adecuada o siguiendo las indicaciones de los marbetes.

En el caso específico del glifosato, quizás uno de los problemas asociados es la simplificación del paisaje que tiene lugar como resultado de la desaparición de las coberturas vegetales circundantes a los campos de cultivos, y que afectan el hábitat para la diversidad de especies y los procesos ecológicos que estas desempeñan en el ecosistema. Por esta razón, no solo debemos considerar los aspectos toxicológicos asociados a los agroquímicos, sino todos los efectos secundarios que pueden resultar de sus aplicaciones, sobre todo, si estas ocurren a grandes escalas espaciales y con repetición en el tiempo.

Sin dudas, este taller interinstitucional e interdisciplinario, arrojará luz sobre los aspectos metodológicos para la detección de residuos de glifosato en muestras ambientales y contribuirá a reunir los resultados relevantes generados en Argentina. Por otra parte, el aporte de especialistas internacionales brindará nuevas capacidades y relaciones para ahondar en la generación de conocimientos científicos. Sin embargo, estimulamos a los especialistas a pensar en forma integral, y aportar las mejores recomendaciones desde lo científico para minimizar los impactos ambientales y maximizar los beneficios en el uso de esta tecnología.

María Elena Zaccagnini

Coordinadora Nacional INTA
Área Estratégica Gestión Ambiental

El proceso de intensificación productiva de las últimas décadas, que acompañó a los cambios de contexto socio-económico de nuestro país, produjo un incremento notable de la producción de granos. Su continuidad puede conducir a alteraciones ambientales de magnitud global, no sólo sobre la calidad de vida de la población rural y consumidores en general, sino también sobre las oportunidades de exportación de productos diferenciados y sobre la propia capacidad productiva de los sistemas agropecuarios, a mediano y largo plazo.

Dicho proceso conlleva la incorporación creciente de productos fitosanitarios, siendo los herbicidas los que ocupan la parte mayoritaria del volumen comercializado. Ellos reemplazaron el uso de energía mecánica por la química para el control de malezas y acompañaron la introducción de soja transgénica cultivada bajo siembra directa, cuya adopción masiva transformó al glifosato en el herbicida más utilizado, y fuente de controversias actuales sobre su potencial carcinogénico.

Nuestra institución, tempranamente, y en concordancia con los grandes cambios enunciados, incluyó el estudio de la variable ambiental en el proceso de intensificación productiva. Es así que algunos grupos de trabajo, particularmente los vinculados con proyectos de contaminación de suelos y aguas por agroquímicos, decidieron asociarse intra e inter institucionalmente para ocuparse de dicha problemática. Desde la coordinación del Proyecto Propio

de la Red del Área Estratégica de Gestión Ambiental (Desarrollo de conocimiento y tecnologías para mitigar la contaminación de suelo y agua bajo producción agropecuaria) consideramos prioritario designar a la Unidad Integrada FCA-INTA Balcarce encargada de coordinar los temas vinculados con los herbicidas y para ello, resultaba imprescindible que este nodo se dotase del instrumental más avanzado y que incorporara personal especializado para poder asistir a todos aquellos nodos que integran la red de mediciones actuales. Varios años después de esos primeros logros, con gran satisfacción, asistimos a la realización de este Taller sobre Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato, el cual, nos permitirá ir más lejos en la comprensión de sus vías de degradación ambientales y en las gestiones necesarias para disminuir su impacto. Por otro lado, sentará las bases para actualizar la información a nivel nacional y hará posible la integración y articulación necesarias para llevar adelante los futuros trabajos de investigación.

Adrián Andriulo

Coordinador interino PPR Contaminación
INTA, EEA Pergamino

Índice

Análisis de Residuos de Plaguicidas Polares, con especial énfasis en el Herbicida Glifosato: Problemática Analítica. <i>Félix Hernández</i>	8
Comportamiento del Glifosato en la interfase agua: sólido. Una aproximación al estudio en suelos. <i>María dos Santos Afonso.</i>	15
Competencia Glifosato – Fosfato por la Superficie de Minerales. Estudio por ATR – FTIR. <i>Carolina Waiman, Carina Luengo y Graciela Zanini</i>	22
Análisis de Residuos de Glifosato en Muestras Ambientales y Alimentos. <i>Maitre, María Inés., Eduardo. Lorenzatti; Argelia. Lenardon; Susana. Enrique.</i>	27
Análisis de Glifosato y AMPA en Balcarce: Cromatografía Líquida y Espectrometría de masas. <i>Manuel J. Zelaya, José L. Costa, Francisco Bedmar, Virginia Aparicio, Valeria Gianelli, Elena Okada, María Eugenia Kloosterman Ana María Gómez Ortiz</i>	31
Toxicidad de Glifosato en Peces Autóctonos: Estudios de Laboratorio y Campo. <i>Pedro Carriquiriborde</i>	53
La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios. <i>Julie C. Brodeur</i>	65
Efecto del Herbicida Glifosato sobre el Estado Oxidativo en Hígado de Ratas Preñadas y sus Fetos. <i>Beuret Cecilia., Daurich Jorgelina, Zirulnik Fanny, Giménez Sofía.</i>	72
The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme a post registration monitoring programme. <i>Preben Olsen, Jeanne Kjær and Walther Brüsich, Ruth Grant</i>	74
Impacto de plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: Integración de estudios químico ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis al caso del glifosato. <i>Alicia E. Ronco</i>	80

Transporte de glifosato en el perfil un suelo del sudeste Bonaerense . <i>José Luis Costa, Virginia Aparicio, Manuel Zelaya, Valeria Gianelli y Francisco Bedmar</i>	90
Pérdidas de Glifosato por Drenaje y Escurrimiento y Riesgo de Contaminación de Aguas. <i>Carolina. Sasal, Adrian. Andriulo, Marcelo. Wilson, Silvina Portela</i>	97

Análisis de Residuos de Plaguicidas Polares, con especial énfasis en el Herbicida Glifosato: Problemática Analítica.

Félix Hernández

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas
Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas
Universidad Jaume I, Castellón, España

La determinación de residuos de plaguicidas se ha llevado tradicionalmente a cabo mediante técnicas cromatográficas, tanto GC como LC, usando diferentes tipos de detectores. El acoplamiento GC-MS ha sido, sin duda, la técnica de referencia durante muchos años en este campo. Sin embargo, la retirada paulatina de la mayoría de plaguicidas tradicionales (ej.- OCs y muchos OPs) por motivos de toxicidad y persistencia en el medio ambiente, ha provocado la introducción de nuevas materias activas, de menor toxicidad y más fácilmente degradables. La mayoría de estos nuevos pesticidas son más polares, incluso de tipo iónico, y su determinación mediante GC-MS resulta problemática. Este hecho, junto con los grandes avances producidos en el acoplamiento LC-MS en los últimos años, ha provocado que la técnica LC-MS sea cada vez más utilizada, de modo que en la actualidad se ha convertido en imprescindible en los laboratorios especializados en análisis de residuos de plaguicidas (ARP).

A diferencia de GC-MS en donde el analizador de cuadrupolo permite obtener buenos resultados analíticos, en LC-MS este analizador resulta menos adecuado por el elevado ruido de fondo y, especialmente, por la suave ionización producida en las interfases API, lo que conduce a una pobre fragmentación y espectros MS con pocos iones (generalmente $[M+H]^+$). Hoy en día, el analizador más atractivo en ARP es el de triple cuadrupolo (QqQ), que permite trabajar en modo tándem MS, con excelente sensibilidad y selectividad gracias a la adquisición de transiciones específicas (modo de trabajo SRM), que difícilmente son compartidas por otros componentes de la matriz. LC-MS/MS QqQ es una técnica muy poderosa, con un excelente potencial para el análisis rápido,

sensible y fiable de la gran mayoría de plaguicidas y sus metabolitos, con la excepción de los compuestos más apolares y/o volátiles, como piretroides y algunos OPs **(1,2,3)**. Con el uso de, al menos, dos transiciones específicas (se debe evitar, en lo posible, la selección de transiciones genéricas, como pérdidas de H_2O , CO_2 , NH_3 , HCl), se consigue una alta selectividad y especificidad, además de una disminución notable del ruido de fondo, lo que redundaría en muy bajos límites de detección. Por otro lado, con dos transiciones y la evaluación de la relación de intensidades (Q/q ratio), se minimizan los riesgos de reportar falsos positivos o falsos negativos en las muestras analizadas **(4)**.

En este trabajo, se presentan las principales aplicaciones de LC-MS/MS QqQ en ARP, prestando especial atención a plaguicidas particularmente problemáticos desde el punto de vista analítico, como fosetil, etefon, melamina (metabolito de la cirmazina), abamectina y azadiractina, o glifosato. La exposición se centra en la problemática analítica del glifosato, especialmente en muestras de aguas y suelos.

El glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine] (GLY) es un herbicida no selectivo, de post-emergencia, de amplio espectro, ampliamente utilizado para el control de las malas hierbas. Introducido por Monsanto en la década de los 70 como principio activo del formulado Round Up®, es posiblemente el herbicida más utilizado en la actualidad en todo el planeta. Diversos estudios han demostrado que una vez aplicado el GLY, éste es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos. Además, sufre una importante degradación, principalmente de tipo biológico, siendo su metabolito mayoritario el ácido aminometilfosfónico (AMPA). De acuerdo con estos datos, no sería previsible su presencia en altas concentraciones en las aguas subterráneas y/o superficiales. Sin embargo, diversos autores han reportado niveles de GLY y AMPA del orden de ppb en aguas, especialmente en las superficiales.

Nuestro propio grupo de investigación ha realizado controles periódicos de GLY y AMPA en aguas, habiendo detectado habitualmente ambos compuestos. Así, en un estudio realizado sobre 50 muestras de aguas subterráneas y superficiales de la Comunidad Valenciana (España), en entornos con fuerte actividad agrícola, se detectó GLY en el 25% de las muestras analizadas, en

concentraciones que variaron entre 0.06 y 0.48 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que el AMPA se detectó en el 40% de las muestras, con niveles entre 0.05 y 0.18 $\mu\text{g L}^{-1}$. La frecuente detección de AMPA, tanto en aguas como en suelos, es indicativa de la degradación del GLY en el medio ambiente.

Las características físico-químicas del GLY son muy diferentes a las de la mayoría de herbicidas, debido a su carácter anfotérico y elevada polaridad. Sus propiedades anfotéricas se deben a la presencia de grupos ácidos y básicos en su molécula. Con cuatro pK característicos ($pK_1=0.8$, $pK_2=2.2$, $pK_3=5.5$, $pK_4=10.1$) **(5)** se encuentra normalmente en forma iónica (generalmente con carga neta negativa en casi toda la escala de pH, aunque puede presentar carga positiva a $pH<1$), a excepción de un margen estrecho de pH, en medio ácido, en el que se encuentra con carga neta neutra, aunque presentado cargas parciales negativas (pérdida del protón más ácido del grupo fosfónico) y positivas (protonación del grupo amino). Estas particulares características afectan de modo importante a su comportamiento en el medio ambiente suelo-agua, así como a su determinación analítica, la cual resulta extraordinariamente dificultosa, especialmente a niveles de sub-ppb. Como consecuencia del valor negativo de su $\log K_{ow}$ (-3.4), no cabría esperar que el GLY se adsorbiera sobre la materia orgánica del suelo (SOM) y, de hecho, en algunos estudios se indica que la SOM no es importante en la adsorción del herbicida. Sin embargo, otros datos de la bibliografía indican exactamente lo contrario **(5)**. En cualquier caso, su comportamiento ambiental está sujeto a controversia, con muchos datos contradictorios y, en ocasiones, poco fiables.

Además de las especiales características, ya mencionadas, del GLY, una de las principales causas de esta controversia es, sin duda, la dificultad del análisis a nivel de residuos. Esto hace que, muchas veces, los datos sobre concentraciones reportados no sean fiables, lo que supone una incertidumbre añadida en el estudio de su comportamiento.

A pesar de que el GLY tiene baja toxicidad y presenta menor riesgo ecotoxicológico que otros herbicidas, resulta necesario estudiar su presencia en el medio ambiente acuático, debido a su amplio uso en todo el planeta. La falta general de datos sobre niveles de GLY en aguas y suelos, en comparación con otros

herbicidas bien conocidos, como las triazinas, fenil y sulfonilureas, o uracilos, sobre los que existe mucha más información al respecto, es motivo de preocupación sobre todo en países del ámbito latinoamericano, en los que existen amplísimas áreas dedicadas al cultivo de variedades transgénicas de soja o maíz, resistentes al glifosato. El uso de este herbicida en estas circunstancias es muy elevado, pero a pesar de ello, existen pocos programas eficaces de control en las aguas y suelos.

La mayoría de los métodos analíticos reportados son complicados, con una preparación de la muestra larga y compleja. LC-MS/MS es una técnica muy poderosa y se muestra como la más atractiva actualmente para el análisis de residuos de este compuesto. A pesar de sus excelentes características analíticas, los métodos basados en LC-MS/MS requieren normalmente una etapa de derivatización previa, con el fin de mejorar la separación cromatográfica y facilitar la retención de GLY y AMPA en el proceso de pre-concentración (ejemplo, SPE en análisis de aguas). Se han propuesto varios reactivos para su derivatización, pero sin duda los más usados son OPA y FMOC. En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha desarrollado varias metodologías, todas ellas basadas en la derivatización previa con FMOC. En los métodos inicialmente propuestos se utilizó acoplamiento LC-LC (column switching) con detección por fluorescencia, para el análisis de estos compuestos en aguas **(6,7)**, suelos **(8)** y productos vegetales **(9)**. La técnica LC-LC-FD proporcionó excelentes resultados y supuso un notable avance en el análisis de residuos de glifosato, llegando a alcanzar los bajos LODs requeridos en este tipo de análisis.

Con la irrupción de LC-MS/MS, la metodología desarrollada en la década de los 80 y 90 se pudo renovar y actualizar, de modo que esta técnica ha sido la base de nuevos métodos, con excelente sensibilidad y selectividad, que se han aplicado con éxito a aguas y suelos **(10,11)**. Estos métodos permiten la determinación de GLY y AMPA en aguas, previa derivatización con FMOC en medio borato, usando una pre-concentración en línea (SPE-LC-MS/MS). Mediante esta aproximación analítica es posible determinar de modo fiable niveles de GLY y AMPA del orden de unos pocos ng L^{-1} , usando menos de 5mL de muestra. Para la determinación en suelos, no fue necesaria la pre-concentración en línea, sino más bien al contrario, la dilución de los extractos alcalinos antes de la derivatización. Otros

autores han usado una metodología similar para determinación de GLY y AMPA en lodos de depuradora, pero realizando la derivatización sobre soporte sólido con resina intercambiadora aniónica fuerte (12).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en los suelos y aguas analizados en España, hemos encontrado dificultades añadidas en suelos con elevada carga orgánica, característicos de algunas áreas de cultivo de países latinoamericanos. La mayor complejidad de estos suelos obliga a realizar un estudio analítico muy detallado, con el fin de encontrar una solución satisfactoria para este tipo de muestras. Además de evaluar la eficiencia de la etapa de extracción (generalmente se lleva a cabo en medio alcalino, típicamente con KOH), parece necesario aplicar una etapa de purificación en suelos de matriz compleja para reducir el fuerte efecto matriz observado y facilitar la cuantificación a bajos niveles. El uso de columnas cromatográficas especiales, diseñadas para la separación de compuestos iónicos, es otra de las alternativas que se está actualmente investigando pues esto permitiría determinar GLY sin necesidad de llevar a cabo una etapa de derivatización.

Bibliografía

- (1) F.Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F. J. López, J.M. Marín, M. Ibáñez, Strategies for Quantification and Confirmation of Multi-class Polar Pesticides and Transformation Products in Water by LC-MS/MS Using Triple Quadrupole and Hybrid Quadrupole-Time of Flight Analysers", *TRAC Trends Anal Chem*, 24, 596-612 (2005).
- (2) J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1133, 204-214 (2006)
- (3) J.M. Marín, E. Gracia-Lor, J. V. Sancho, F. J. López, F. Hernández, Application of ultra-high-pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and

- wastewater samples: Study of matrix effects", *J Chromatogr A*, 1216, 1410-1420 (2009)
- (4) O. J. Pozo, J. V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández, W. M. A. Niessen, Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Achievements and pitfalls, *TRAC Trends Anal Chem*, 25, 1030-1042 (2006)
 - (5) C.N. Albers, G.T. Banta, P.E. Hansen, O.S. Jacobsen, The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil. Comparing different soils and humic substances, *Env Pollut*, 157, 2865-2870 (2009)
 - (6) J.V. Sancho, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. van Zoonen, Rapid determination of glufosinate, glyphosate and AMPA in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 737, 75-83 (1996)
 - (7) "Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters", C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvadó, J.V. Sancho, F. Hernández, *J Chromatogr A*, 1035, 153-157 (2004)
 - (8) J. V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, Rapid determination of residues of glyphosate and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography", *Int J Environ Anal Chem*, 62, 53-63 (1996)
 - (9) F. Hernández, C. Hidalgo, J. V. Sancho, Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatisation and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection", *JAOAC Intern*, 83, 728-734 (2000).
 - (10) M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethyl phosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1081, 145-155 (2005)
 - (11) M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1134, 51-55 (2006)

- (12) A. Ghanem, P. Bados, L. Kerhoas, J. Dubroca, J. Einhorn, Glyphosate and AMPA analysis in Sewage Sludge by LC-MS/MS after FMOOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support, *Anal Chem*, 79, 3794-3801(2007)

Comportamiento del Glifosato en la interfase agua: sólido. Una aproximación al estudio en suelos.

Maria dos Santos Afonso

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Los fosfonatos son sustancias que poseen una gran afinidad para la formación, en solución acuosa, de complejos con los metales de transición (Barja et al., 2001, and references cited therein) pero también tienen una gran afinidad por la superficie de los óxidos de hierro y aluminio (Nowack and Stone, 1999; Sheals et al., 2001; Barja and dos Santos Afonso, 2005). Estas propiedades juegan un rol muy importante a la hora de evaluar el comportamiento y el transporte de estos compuestos en el medio ambiente.

Los fosfonatos son utilizados mundialmente en muchísimas aplicaciones, que van desde el tratamiento de aguas hasta los plaguicidas. En este sentido el componente activo del herbicida más utilizado a nivel mundial, herbicida no selectivo, de amplio espectro y de aplicación en postemergencia, comúnmente conocido como glifosato, es la N-fosfonometilglicina (PMG) (Barja et al., 2001).

Una vez que es aplicado, el PMG puede alcanzar el suelo y ser transportado a otras áreas o ser inmovilizado en el suelo.

La tendencia del PMG a la formación de compuestos de coordinación es conocida. PMG forma complejos estables con los cationes en solución acuosa (Barja and dos Santos Afonso, 1998; Barja et al., 2001; Sheals et al., 2001, Gimsing and dos Santos Afonso, 2005) y sus constantes de estabilidad han sido publicadas previamente (Madsen et al., 1978; Appleton et al., 1986; Smith and Raymond, 1988; Dhansay and Linder, 1993, Popov et al., 2001).

La inmovilización en suelos ocurre por adsorción (Piccolo et al., 1994; Gerritse et al., 1996; Morillo et al., 2002; Gimsing et al., 2004), a través de la coordinación del PMG a los metales que constituyen los minerales que lo componen (óxidos y arcillas) llevando a la formación de complejos superficiales. Así, el tiempo de residencia de este compuesto en el suelo es una función de su retención en el mismo y está afectada por la composición mineralógica del suelo.

El contenido de arcillas en suelos, el tipo de arcilla y su capacidad de intercambio cationico, son parámetros importantes a la hora de evaluar la adsorción (Glass, 1987; Dion et al., 2001; de Santana et al., 2006). Usualmente, las isotermas de adsorción son ajustadas mediante los modelos de Freundlich (Glass, 1987; McConnell and Hossner, 1989; Dion et al., 2001), Freundlich extendido (de Jonge et al., 2001) o Langmuir (Piccolo et al., 1994; Dion et al., 2001; Pessagno et al., 2005).

Los coeficientes de adsorción en suelos y minerales obtenidos a partir de los experimentos en batch pueden ser utilizados para predecir la movilidad y el destino de los contaminantes en los ambientes naturales.

Resultados y discusión

Se obtuvieron las isotermas de adsorción de PMG sobre fracciones de suelos de las provincias de Santa Cruz, Misiones y Corrientes.

Los principales componentes de los suelos de Misiones y Corrientes son cuarzo, caolinita y óxidos de hierro mientras que para el suelo de Santa Cruz son cuarzo, feldespatos y montmorillonita. Entre todos estos minerales el cuarzo es el que tiene menor área superficial y menor afinidad por el PMG.

Los resultados experimentales se ajustaron utilizando los modelos mencionados previamente. Se calcularon los recubrimientos máximos, normalizados con respecto a la superficie específica y las constantes de afinidad del ligando por la superficie y se compararon los resultados con los obtenidos para los minerales puros.

Los minerales arcillosos muestran que el proceso de adsorción ocurre en pasos sucesivos (Damonte et al., 2007) que corresponden a adsorción en sitios superficiales estructuralmente diferentes. A bajas concentraciones de PMG la adsorción solo ocurre en un tipo de sitio y a medida que la concentración de PMG aumenta los otros sitios contribuyen a la adsorción.

Se encontró la secuencia goetita > caolinita > illita > montmorillonita para la adsorción. También se encontró que la materia orgánica (OM) contribuye a la adsorción es decir que el

recubrimiento superficial, $\square$, aumenta con el aumento en el contenido de OM y de hierro.

La adsorción disminuye con el incremento en el pH lo que está indicando que el proceso es anionico, similares resultados fueron encontrados por algunos autores (McConnell and Hossner, 1985; Nicholls and Evans, 1991; Morillo et al., 1997; de Jonge and de Jonge, 1999; de Jonge et al., 2001; Gimsing et al., 2004). Sin embargo otros autores indican que la adsorción de PMG en suelos no depende del pH (Sprankle et al., 1975a,b; Glass, 1987; Cheah et al., 1997). El efecto del pH puede atribuirse a las variaciones de carga sobre la molécula de PMG debido a los procesos de disociación ácido-base y a la carga superficial de los adsorbentes (Pessagno et al., 2005; Gimsing et al., 2007), lo que lo correlaciona con la composición mineralógica del suelo.

Por otra parte las medidas de potencial zeta realizadas en función del pH utilizando sólidos con y sin PMG adsorbido muestran que el punto de carga cero se corre a valores de pH más ácidos debido al incremento de la carga sobre la superficie. El incremento de la carga se vuelve más negativa y aumenta con la concentración de PMG indicando que los complejos superficiales contienen una mayor densidad de carga que los formados por la interacción de la superficie con el agua.

La extensión de la coordinación superficial y su dependencia con el pH puede ser explicada considerando la afinidad de los sitios superficiales por los ligandos y la dependencia de ellos con el pH. Dado que la adsorción de aniones esta acoplada a la liberación de iones OH^- , la adsorción se encuentra favorecida a pH bajos.

Las diferencias en los valores de las constantes de afinidad de PMG por la superficie de los sólidos, K_L , son atribuidas, principalmente, a las diferencias en el contenido de óxidos de hierro.

Para ajustar las curvas de adsorción se utiliza el modelo de Langmuir, suponiendo que no hay interacción entre los componentes de los sólidos y que la fase mineral está compuesta de dos adsorbentes o dos clases diferentes de sitios superficiales. Considerando estas aproximaciones los valores calculados y los experimentales tienen una buena aproximación. Sin embargo los recubrimientos máximos son sobreestimados para el suelo de Misiones y subestimado para el suelo de Corrientes. Estas diferencias se pueden asignar a la cantidad de hierro incorporado en

la estructura de la caolinita (28 y 40% respectivamente). Este hierro estructural presente en algunos minerales de las arcillas puede afectar el grado de adsorción y degradación de los plaguicidas (Xu et al., 2001). La sustitución de Al(III) por Fe(III) tiene un mayor efecto sobre la reactividad de la caolinita (1:1) que en las smectitas (2:1).

Para el suelo de Santa Cruz las isotermas de adsorción se modelaron utilizando la isoterma de Langmuir de dos términos, encontrándose un buen ajuste. En este caso el grado de adsorción debe atribuirse mayoritariamente al contenido en montmorillonita.

Conclusiones

PMG forma complejos superficiales con goetita, caolinita, illita, montmorillonita y suelos con recubrimientos superficiales máximos similares siendo el grado de complejación dependiente de la concentración del ligando y del pH de la suspensión. La extensión de la adsorción sobre goetita es mayor que en suelos y en los minerales arcillosos. Los resultados encontrados sugieren que el grupo fosfonato del PMG se coordina a los sitios superficiales externos de los sólidos con formación de complejos de esfera interna. La complejación con los iones metálicos y la adsorción sobre superficies minerales puede afectar la persistencia, la distribución y la biodisponibilidad del PMG en suelos y aguas naturales.

Bibliografía

- Appleton, T.G., Hall, J.R., McMahon, I.J., 1986. NMR spectra of iminobis(methylenephosphonic acid), $\text{HN}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2)_2$, and related ligands and of their complexes with platinum(II). *Inorg. Chem.* 25, 726-734.
- Barja, B.C., dos Santos Afonso, M., 1998. An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3331-3335.
- Barja, B.C., Herszage, J., dos Santos Afonso, M., 2001. Iron(III)-phosphonate complexes. *Polyhedron* 20, 1821-1830.
- Barja, B.C., dos Santos Afonso, M., 2005. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: A comparative study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 585-592.

- Beltran, J., Gerritse, R.G., Hernandez, F., 1998. Effect of flow rate on the adsorption and desorption of glyphosate, simazine and atrazine in columns of sandy soils. *Eur. J. Soil Sci.* 49, 149-156.
- Cheah, U.B., Kirkwood, R.C., Lum, K.Y., 1997. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. *Pestic. Sci.* 50, 53-63.
- Damonte, M., Torres Sánchez, R.M., dos Santos Afonso, M., 2007. Some aspects of the glyphosate adsorption on montmorillonite and its calcined form. *Appl. Clay Sci.* 36 (1e3), 86-94.
- de Jonge, H., de Jonge, L.W., 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere* 39, 753-763.
- de Jonge, H., de Jonge, L.W., Jacobsen, O.H., Yamaguchi, T., Moldrup, P., 2001. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Sci.* 166, 230-238.
- de Santana, H., Toni, L.R.M., Benetoli, L.O.de B., Zaia, C.T.B.V., Rosa Jr., M., Zaia, D.A.M., 2006. Effect in glyphosate adsorption on clays and soils heated and characterization by FT-IR spectroscopy. *Geoderma* 136, 738-750.
- Dhansay, M.A., Linder, P.W., 1993. Organophosphorus herbicides and plant growth regulators, part 2. Equilibrium studies in aqueous solution of the complexation of transition metal(ii) ions by n-(phosphonomethyl)iminodiacetic acid and related compounds. *J. Coord. Chem.* 28, 133-145.
- Dion, H.M., Harsh, J.B., Hill, H.H., 2001. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 249, 385-390.
- dos Santos Afonso, M., Barja, B.C., Pessagno, R.C., Tevez, H.R., 2003. Biogeochemistry of Chelating Agents Symposium. Extended Abstracts of 226th ACS National Meeting. New York, USA.
- Gerritse, R.G., Beltran, J., Hernandez, F., 1996. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of the Gnangara Mound, Western Australia. *Aust. J. Soil Res.* 34, 599-607.
- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K., Bang, M., 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *Eur. J. Soil Sci.* 55, 183-191.

- Gimsing, A.L., dos Santos Afonso, M., 2005. Glyphosate. In: Van Briesen, J.M., Nowack, B. (Eds.), *Biogeochemistry of Chelating Agents*. ACS Symposium Series, Volume 910, pp. 263-277.
- Gimsing, A.L., Szilas, C., Borggaard, O.K., 2007. Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania. *Geoderma* 138, 127-132.
- Glass, R.L., 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *J. Agric. Food Chem.* 35, 497-500.
- Madsen, H.E.L., Christensen, H.H., Gottliebpetersen, C., 1978. Stability constants of copper (II), zinc, manganese (II), calcium, and magnesium complexes of N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). *Acta Chem. Scand. Ser. A Phys. Inorg. Chem.* 32, 79-83.
- McConnell, J.S., Hossner, L.R., 1985. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 33 (6), 1075-1078.
- McConnell, J.S., Hossner, L.R., 1989. X-ray diffraction and infrared spectroscopic studies of adsorbed glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 37, 555-560.
- Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C., 1997. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3588-3592.
- Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C., Ramos, A., 2002. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soils. *Chemosphere* 47, 747-752.
- Nicholls, P.H., Evans, A.A., 1991. Sorption of ionisable organic compounds by field soils. Part 2: cations, bases and zwitterions. *Pestic. Sci.* 33, 331-345.
- Nowack, B., Stone, A.T., 1999. Adsorption of phosphonates onto the goethite/water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 214, 20-30.
- Pessagno, R.C., dos Santos Afonso, M., Torres Sanchez, R.M., 2005. N-(phosphonomethyl)glycine interactions with soils. *J. Argentine Chem. Assoc.* 93 (4/6), 97-108.
- Piccolo, A., Celano, G., Arienzo, M., Mirabella, A., 1994. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 29, 1105-1115.

- Popov, K., Ronkkomaki, H., Lajunen, L.H.J., 2001. Critical evaluation of stability constants of phosphonic acids: (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 73, 1641-1677.
- Sheals, J., Persson, P., Hedman, B., 2001. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper(II) complexes of glyphosate in aqueous solution. *Inorg. Chem.* 40, 4302-4309.
- Smith, P.H., Raymond, K.N., 1988. Solid-state and solution chemistry of calcium N-(phosphonomethyl)glycinate. *Inorg. Chem.* 27, 1056-1061.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975a. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23, 229-234.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975b. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23, 224-228.
- Xu, J.C., Stucki, J.W., Wu, J., Kostka, J.E., Sims, G.K., 2001. Fate of atrazine and alachlor in redox-treated ferruginous smectites. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2717-2724.

Competencia Glifosato – Fosfato por la Superficie de Minerales. Estudio por ATR – FTIR.

Carolina Waiman, Carina Luengo y Graciela Zanini

INQUISUR (UNS-CONICET)- Departamento de Química
Universidad Nacional del Sur

Los beneficios que los plaguicidas han brindado a la producción de los cultivos son incuestionables, pero es importante resaltar que solamente una parte de lo que se aplica ejerce su función, el resto es distribuido en el ambiente. La presencia de estas especies en aguas subterráneas y cuerpos de agua natural es un tema que nos preocupa desde varios puntos de vista: desde la salud, desde lo ecológico, desde lo ambiental, desde lo productivo, etc.

En nuestro país, el control de malezas es casi exclusivamente químico y uno de los pesticidas más utilizados es el glifosato. Luego de su aplicación, el destino del glifosato en el ambiente va a depender de su capacidad de interactuar con el medio natural. El suelo es uno de los principales responsables de la movilidad de este tipo de sustancias ya que la mayoría de los procesos químicos y biológicos que determinan la retención y el transporte de los plaguicidas ocurren en la superficie del suelo. Estos procesos incluyen fenómenos de adsorción, degradación química, degradación biológica, etc. (Cheng, 1990)

El estudio de la interacción del glifosato con los componentes orgánicos e inorgánicos del suelo puede brindar información importante para predecir y comprender su comportamiento en el ambiente. Los constituyentes de la fase sólida del suelo tales como las arcillas y los óxidos de aluminio, hierro y manganeso, juegan un rol extremadamente importante. Aunque no se encuentren en grandes cantidades, tienen efectos significativos en los procesos de adsorción-desorción debido a su gran superficie específica y a su reactividad (Spark, 2003).

Los procesos de adsorción están íntimamente relacionados con los sitios que la superficie del mineral posee. De esta manera,

hay una alta probabilidad de que en un medio natural existan muchas sustancias compitiendo con glifosato por los mismos sitios de adsorción y así puedan modificar su movilidad en el ambiente. Por lo tanto, un punto muy importante a considerar en el estudio de las interacciones con los componentes del suelo es la influencia de las especies que co-habitan con glifosato en el ambiente y que pueden competir con él por los sitios de adsorción. Dentro de esas especies se encuentran los iones del tipo fosfato, naturalmente existentes en los suelos y en muchos casos en aumento por la aplicación excesiva de fertilizantes (Gimnsing, 2004; Bogaard, 2008).

Este trabajo presenta un estudio de cómo el fósforo, como ion fosfato (PO_4^{3-}), afecta la adsorción de glifosato sobre la superficie de goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$) sintética, usada como modelo del mineral goethita presente en suelos. Esto se determinó por medio de espectroscopia ATR-FTIR.

La espectroscopía ATR-FTIR permite registrar “in situ” cómo varía la cantidad de glifosato adsorbido a medida que transcurre el tiempo y además tiene la ventaja de permitir identificar a las especies adsorbidas sobre la superficie del sólido. De esta manera, también hace posible registrar cuando el glifosato es desorbido por la presencia de iones fosfato.

Se realizaron estos estudios a pH = 4,5; 6 y 8. En la figura 1 se muestra la información que brindan los espectros de ATR-FTIR cuando se adiciona una solución de fosfato al glifosato adsorbido sobre goethita a pH: 4,5.

En esta figura puede verse como una vez agregada la solución de fosfato, la bandas que corresponden al adsorbido van disminuyendo a medida que transcurre el tiempo (flechas hacia abajo en la figura 1) y comienza a observarse el aumento de las bandas correspondientes al fosfato adsorbido (flechas hacia arriba en la figura 1), indicando que una especie va desplazando a la otra de sus sitios de adsorción.

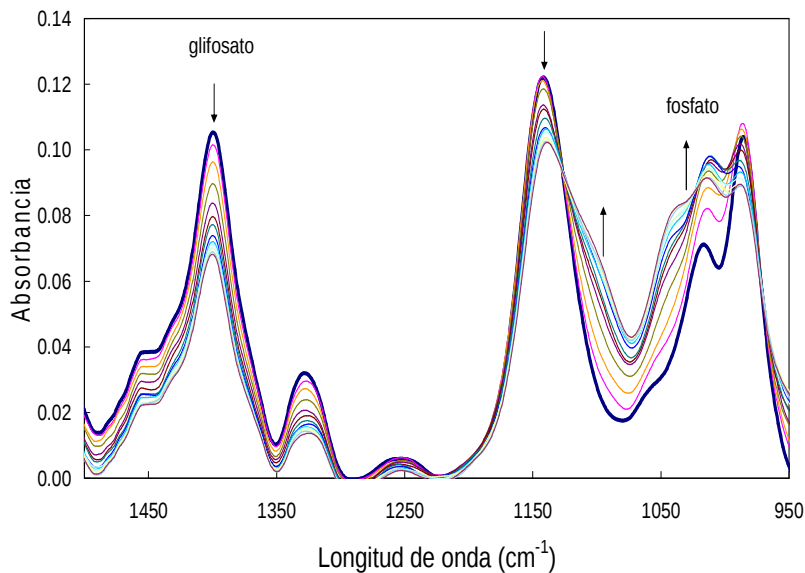


Figura 1: Espectros ATR-FTIR de glifosato y fosfato adsorbidos sobre goethita.

La figura 2 muestra la variación de la cantidad adsorbida de glifosato y fosfato a medida que transcurre el tiempo de reacción, datos que pueden obtenerse del análisis de los espectros de la figura 1.

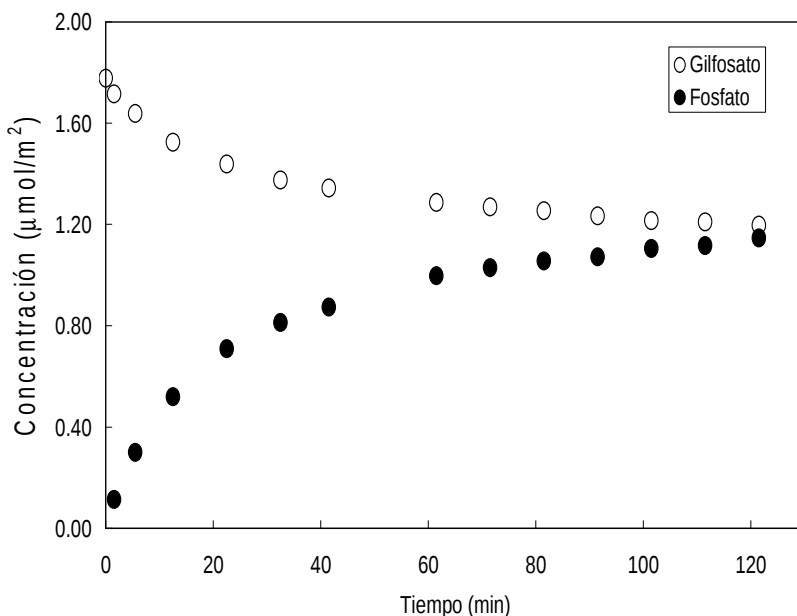


Figura 2: Desorción de glifosato en goethita debido a la adsorción de fosfato a medida que transcurre el tiempo. $\text{pH}=4,5$

Como puede observarse el fosfato desplaza al glifosato adsorbido durante las 2 horas del ensayo. Esta competencia es seguramente debida a la similitud en las estructuras químicas de ambas especies, que hace que compitan por los mismos sitios de adsorción. El desplazamiento ocurre a los tres pH estudiados.

Estos minerales de hierro son muy reactivos, y aunque se encuentren en poca proporción en el suelo pueden ser responsables de este tipo del comportamiento del glifosato en el ambiente. Así, los resultados sugieren que en sistemas naturales una vez que el glifosato ha sido inmovilizado por adsorción en los componentes inorgánicos del suelo, la fertilización con especies fosforadas del tipo PO_4^{3-} podría ser responsable de que el herbicida retorne a la solución del suelo pudiendo facilitar su transporte en el ambiente.

Referencias

- Borggaard O. K and Gimsing A. L., 2008 Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci* 64(4): 441-456.
- Cheng, H.H. 1990. Pesticides in the soil environment-An Overview. Chapter 1: 1-5. In: *Pesticides in the soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Ed. Cheng, H.H. SSSA, Inc. Madison, USA, 530p.
- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K., Sestoft, P., 2004. Modeling the kinetics of the competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on goethite and gibbsite and in soils. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 1718-1722.
- Sparks, D.L., 2003. *Environmental soil Chemistry*. Ed. Academic Press, Inc. Londres.

Agradecimientos: *Este trabajo es financiado por SECyT, UNS, INTA y CONICET.*

Análisis de Residuos de Glifosato en Muestras Ambientales y Alimentos

María I. Maitre, Eduardo A. Lorenzatti, María A. Lenardon, Susana N. Enrique .

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
(INTEC) UNL-CONICET

En este trabajo se hace referencia a estudios realizados por el Grupo de Medioambiente del INTEC (UNL-CONICET) sobre residuos de glifosato durante el período 1997-2008

La detección y cuantificación de residuos se realizó en todos los casos por HPLC con derivatización pos-columna., utilizando un cromatógrafo Waters TM 600 con detector de fluorescencia (470: λ Ex 339 nm; λ Em. 445 nm), columna de Exclusión Iónica IC-Pak (Water) a 55°C de temperatura y ácido fosfórico al 0,5% como fase móvil. Como solución oxidante se utilizó una mezcla de fosfato monobásico de Potasio, Cloruro de Sodio, Hidróxido de Sodio e Hipoclorito de calcio, siendo el complejo oftaldehído-2-mercaptoetanol el reactivo de derivatización. La temperatura de reacción fue 38°C. (EPA 1990, Fabre M. Bordey T ,1992). Téngase en cuenta que el glifosato es un analito muy difícil de analizar, ya que es inactivo en detección U.V (excepto en muy altas concentraciones), siendo necesaria la derivatización de la molécula para detección por HPLC.

En el período 1997-1999 se monitorearon tres campos de la provincia de Santa Fe con dos y tres aplicaciones de glifosato isopropilamina en distintas concentraciones obteniéndose residuos entre 0,3 - 4 mg kg⁻¹ para glifosato y 0,2-0,9 mg kg⁻¹ de AMPA (Acido Aminometilfosfónico) en plantas y granos de soja (Arregui y col 2003). Estos resultados indican una detección de residuos de glifosato en todo el ciclo de cultivo, a niveles relacionados al tiempo de aplicación. Las concentraciones fueron mayores cuando se pulverizó el herbicida cerca de la cosecha y no se encontraron relaciones con respecto a las dosis de aplicación.

Estudios similares se realizaron durante los años 2000-2001 en la Provincia de Entre Ríos; en este caso sobre granos de soja

verde (utilizada para consumo humano en los países asiáticos como alimento de alto contenido nutricional) en los que se encontraron pequeñas concentraciones de ambos plaguicidas. Algunos alimentos procesados a partir de los granos de soja presentaron también residuos de glifosato.(Lorenzatti y col 2004).

Asimismo Lorenzatti (2006) propuso una técnica para extracción simultánea de residuos de endosulfan, sulfato de endosulfan, glifosato y AMPA , en granos de soja, consiguiendo la extracción de metabolitos hidro y liposolubles a través de un mismo procedimiento.

El glifosato es considerado como de rápida degradación en suelos y aguas por los microorganismos y con alta capacidad para adsorberse a las partículas de suelo. Sin embargo hemos detectado una cierta capacidad de desorción en suelos de nuestra zona, lo que permitiría (dadas condiciones de precipitaciones abundantes) lixiviar a través del suelo con la consiguiente contaminación de los mismos.

Se trabajó con dos Argiudoles pertenecientes a las Provincias de Santa Fe y Entre Ríos, en los que se efectuaron ensayos de adsorción y desorción del glifosato puro y el producto Técnico. Se estudiaron asimismo las diferencias de adsorción a diferentes pH.

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en laboratorio con el empleo de glifosato puro y con glifosato comercial.

Tabla I: Cuadro Comparativo de la adsorción del glifosato (ácido) y un producto comercial (sal de isopropilamonio)

Suelos	Kd	Kf
Argiudol Típico99%	6,87	24,63
Argiudol TípicoProd.Com.	57,00	23,00
Argiudol Acuico 99%	9,66	13,83
Argiudol Acuico Prod. Com.	41,74	17,55

En lo referente a estudios de desorción y movilidad de glifosato en suelo la información es menor y con mayores controversias que en el caso de adsorción. Los resultados obtenidos a partir de las experiencias realizadas en el INTEC indicaron desorciones promedios entre el 51 y el 69% utilizando el producto puro y el comercial.

Nuestros resultados indican porcentajes relevantes de glifosato desorbido. Esta información es importante ya que, si el glifosato se desorbe y es lixiviado a horizontes inferiores, existiría menos posibilidad de que sea degradado en condiciones anaeróbicas y aumentaría el peligro de contaminación.

En nuestra región hemos efectuado asimismo estudios de toxicidad comparada del glifosato comercial en anuros (Lajmanovich y col 2003). Se investigó el efecto del herbicida antes mencionado sobre renacuajos (*Scinax nasicus* (ANURA: HYLIDAE)) y la influencia de la degradación del glifosato en agua en test de renovación y de no renovación.

Respecto al período 2008-2009, en el último año se han analizado en nuestro laboratorio 20 muestras de agua subterráneas y en sólo una se encontraron vestigios de glifosato.

Para conocer la persistencia del glifosato comercial en el medio de dilución (medio "Daphnia"), paralelamente a los ensayos crónicos con cladóceros, se prepararon 8 muestras colocando el tóxico en el medio de dilución dentro de vasos de precipitado sin la presencia de neonatos ni el agregado de alimento. Éstas se mantuvieron en las mismas condiciones que las de los tratamientos, extrayéndose una muestra cada día en que se efectuó la renovación de los recipientes de experimentación (3 veces por semana). En cada muestra se midió la concentración del glifosato para evaluar su degradación durante el tiempo y la posible aparición del principal metabolito (AMPA). A las concentraciones utilizadas al final del tiempo establecido se observó una degradación del glifosato entre 34,8% y 74,53%, sin detección del metabolito AMPA.

Se han efectuado asimismo experiencias de absorción del glifosato en las macrófitas acuáticas (*Pistia stratiotes* L y *Salvinia herzogii* De La Sota), autóctonas de América Tropical y Subtropical observándose bajos niveles de captación (3,37%, para *P. Stratiotes* y 1,16%. en *S. Herzogii*). Esto posiblemente se deba al bajo factor de

bioconcentración del glifosato y a la posibilidad que haya sido adsorbido por los sedimentos.

Por último se han determinado los efectos subletales en la lombriz *Eisenia fetida* expuesta al glifosato, a concentraciones de 0, 7, 11, 18, 30 y 50 mg kg⁻¹. No se observaron efectos sobre la sobrevivencia ni la biomasa, pero sí la movilidad y la reproducción.

Bibliografía

- Arregui, C. A., Lenardón D. Sánchez, M.I. Maitre, R. Scotta & S. Enrique (2003): "Monitoring Glyphosate Residues in Transgenic Glyphosate Soybean." *Pest Mang. Sci* 163-167.
- Environmental Protection Agency (USA) (1990). "Method 547. determination of Glyphosate in Drinking Water by Direct-Aqueous HPLC, Post Column Derivatization and Fluorescence Detection" 63-79.
- Fabre M, T. Bordey (1992). Glyphosate in Drinking Water. *Environmental Testing & Analysis*, May/June 35-37
- Lajmanovich, R., E. Lorenzatti, M.I. Maitre, S. Enrique and P. Pelzer (2003). "Comparative Acute Toxicity of the Commercial Herbicides Glyphosate to Neotropical Tadpoles *Scinax nasicus* (ANURA:HYLIDAE)." *Fresenius Environmental Bulletin* 12, nº 4, pp 364-367.
- Lorenzatti E.; M.I. Maitre. A. Lenardón, R. Lajmanovich; P. Pelzer; M. Anglada (2004) "Pesticides Residues in Immature Soybeans of Argentina Croplands" *Fresenius Environmental Bulletin*: 13, 7, 675-678.
- Lorenzatti E (2006). "Estudio de Residuos de Endosulfán y Glifosato en la Producción y Procesado de Soja Transgénica (*Glycine max*). Tesis Doctoral. Univers. Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. España 216 pag.
- Maitre, M.I.; E. Lorenzatti; A. Lenardón, S. Enrique (2008) "Adsorption and desorption of Glyphosate in Two Argentinian Soil." *Natura Neotropicalis* 39, 1 y 20-31

Análisis de Glifosato y AMPA en Balcarce: Cromatografía Líquida y Espectrometría de masas.

**Manuel J. Zelaya¹, José L. Costa¹, Francisco Bedmar², Virginia
Aparicio¹, Valeria Gianelli¹, Elena Okada³, María Eugenia
Kloosterman⁴, Ana María Gómez Ortiz⁴**

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Balcarce. ² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas⁴ PICT 2007 -00448- FONCYT – Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

a.- Cromatografía Líquida y Espectrometría de masas

Introducción

La detección y cuantificación de residuos de plaguicidas en suelo y agua requiere el empleo de métodos validados que involucren técnicas de pretratamiento de las muestras y el desarrollo y/o adaptación de métodos cromatográficos según las necesidades de análisis del laboratorio.

Por las características químicas de las moléculas de **glifosato (GLY)** y su principal metabolito el **ácido aminometilfosónico (AMPA)**, se necesitan modificaciones previas de la estructura molecular mediante reacciones químicas que reciben el nombre de derivatización. Una de las más empleadas es la que utiliza como reactivo el **9-fluorenilmetil cloroformato (Fmoc-Cl)**, con la cual mediante una sustitución nucleofílica a nivel del grupo amino secundario, en un medio con buffer borato a pH 9 y a temperatura ambiente, se obtienen a partir del GLY y el AMPA unos productos fluorescentes, menos polares y estables, los cuales pueden ser detectados y cuantificados por métodos cromatográficos con diferentes tipos de detectores: ultravioleta, conductividad, fluorescencia y espectrómetros de masas **(3)**.

Dado que en las etapas de derivatización, separación y detección, las condiciones citadas en la bibliografía difieren ampliamente **(3, 4, 5, 6, 7, 8)**, se realizaron ensayos con el objetivo de adaptar dicha técnica en función de la conveniencia del laboratorio.

Materiales y métodos

El equipamiento utilizado fue un cromatógrafo líquido de ultra-performance (UPLC Waters ®) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Quattro Premier XE) (UPLC-MSMS), el cual permite la cuantificación y confirmación de los analitos que se están investigando **(1,2)**. El software operativo utilizado fue el Masslynx 4.1 y su paquete Targelynx.

Derivatización

Las condiciones de derivatización estuvieron basadas en los métodos descritos en la literatura **(4, 5, 6, 7, 8)**. Las cantidades de los diferentes compuestos fueron optimizadas, así como el tiempo de reacción, empleando muestras de aguas fortificadas artificialmente con GLY y AMPA **(17)**.

Los parámetros evaluados fueron: concentración de FMOC_CL, porcentaje de acetonitrilo en el producto final, tiempo de reacción, extracción líquido-líquido para la eliminación de interferentes orgánicos y modificaciones de la muestra antes de la inyección.

Cromatografía y espectrometría

Los parámetros evaluados fueron:

- a. **Condiciones instrumentales del espectrómetro de masas:** Intensidades de los iones producidos en ambos modos de ionización por Electro spray (ESI) positivo y negativo, voltajes de cono y capilar, flujo de los gases de desolvatación y de cono, Temperaturas de la fuente y de desolvatación y Dwell time.
- b. **Condiciones del UPLC:** Se estudiaron el efecto de los modificadores orgánicos (metanol y acetonitrilo) y buffer (acetato y formiato de amonio), volumen de inyección, gradiente de

separación, temperatura de columna, linealidad, límite de cuantificación y detección, efecto matriz y repetibilidad.

Resultados y discusión

Derivatización

1. Concentración de FMOC-CL

En la literatura en general se citan valores que van desde 0,1 g L⁻¹ (9) hasta 12 g L⁻¹ (6). En nuestro ensayo se obtuvo como concentración más adecuada 6 g L⁻¹, (Figura 1), evidenciándose además un efecto importante cuando la solución de FMOC se preparó en forma reciente respecto de una almacenada a 24 hs a 5°C.

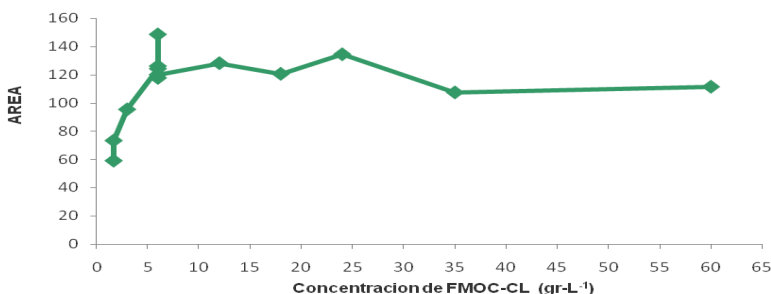


Figura1. Efecto de la concentración del FMOC-CL.

2. Porcentaje de acetonitrilo en el producto final

Debido a que el FMOC-CL es casi insoluble en agua, y el GLY es insoluble en solventes tales como acetonitrilo o acetona, se debería encontrar la relación Acetonitrilo/agua más adecuada (12). En la literatura se mencionan niveles de acetonitrilo que oscilan

entre 12 % y 50 % **(9, 10, 11)**. En nuestra experiencia no se observó un cambio en la respuesta de la derivatización al variar el % de acetonitrilo, partiendo desde un 10 % hasta un 65%, por lo que se decidió trabajar con un 12 % de acetonitrilo (Figura 2).

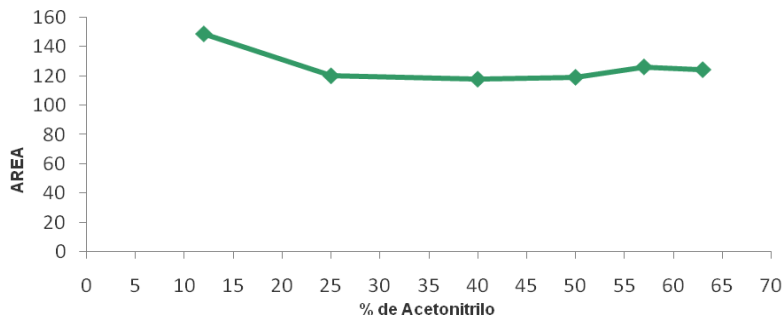


Figura 2. Efecto del % de acetonitrilo en la derivatización del Glifosato con FMOC_CL.

3. Tiempo de reacción

Los datos de literatura con respecto al tiempo de reacción difieren ampliamente, variando desde 30 segundos **(13)**, 0.5-1 hora **(4)** e incluso hasta varias horas **(11)**. En la Figura 3, se puede observar que en las condiciones de nuestro ensayo, la reacción se completaría después de las 10 horas.

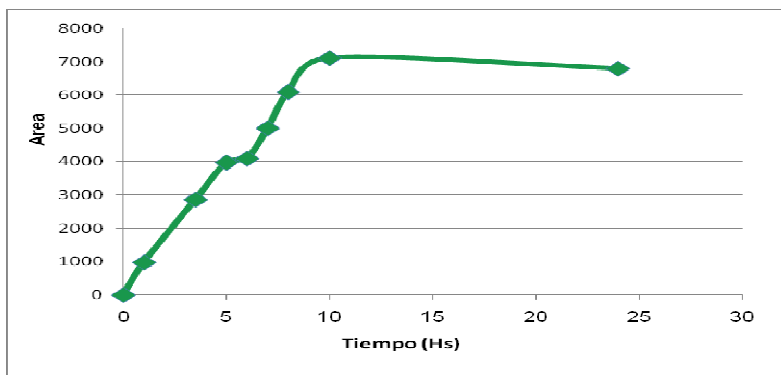


Figura 3. Efecto del tiempo en la derivatización del Glifosato con FMOC-CL.

4. Extracción líquido-líquido para la eliminación de interferentes orgánicos

Se estudiaron 3 de los extractantes reportados en la literatura: etilacetato, hexano y diclorometano **(4,14)**. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó diclorometano, con una mejora considerable de la forma, intensidad y relación señal/ruido de los picos, además de facilitar la decantación (Figura 4).

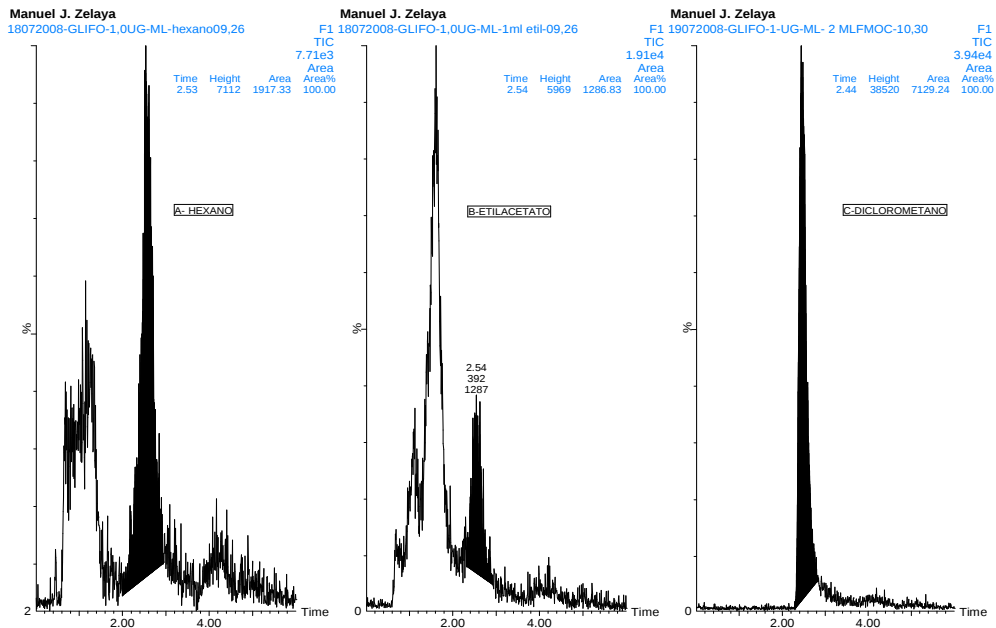


Figura 4. Efecto del extractante orgánico en la respuesta obtenida del sistema UPLC-MSMS.

5. Modificaciones de la muestra antes de inyectar

Las mismas fueron realizadas en varios trabajos, por ejemplo Ibáñez et al. (5) utilizaron HCL mientras que otros autores (4,11) utilizaron buffer fosfato para acidificar. En nuestro ensayo se empleó ácido clorhídrico y ácido fórmico, sin obtener mejoras significativas en la respuesta del sistema UPLC-MSMS.

Cromatografía y espectrometría de masas

a. Condiciones instrumentales del espectrómetro de masas

Al igual que en la derivatización, las condiciones instrumentales varían ampliamente en la literatura científica (3, 5, 7, 11, 22). GLY-FMOC y AMPA-FMOC fueron analizados mediante una infusión directa en el espectrómetro de masas, de una solución acuosa con una concentración de 10 mg L^{-1} . La intensidad de los iones fue siempre mayor en ESI +, utilizando metanol como fase orgánica y 5 mM de acetato de amonio como fase acuosa. El voltaje de cono fue optimizado y se ajustaron los valores de Dwell time de manera de obtener como mínimo 15 puntos por pico. Para la optimización MS/MS se estudió la fragmentación del $[M + H]^+$ y, en función de la energía de colisión, se seleccionaron 2 fragmentos hijas de los cuales el más intenso se utilizó para la cuantificación (M/Z: 88) mientras que el de menor intensidad para la confirmación (M/Z: 213.9) (Figuras 5 y 6, y Tabla 1).

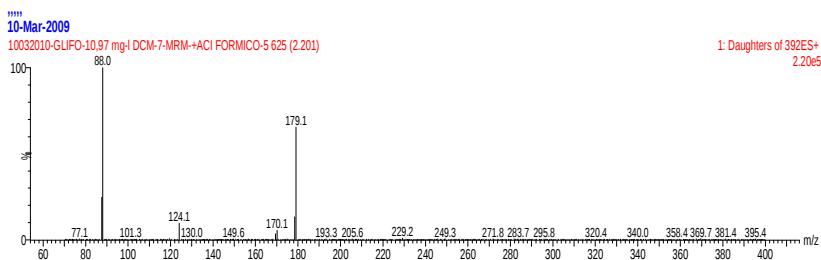


Figura 5. Hijas de la molécula GLY-FMOC + H (392) a un voltaje de cono y capilar de 20.

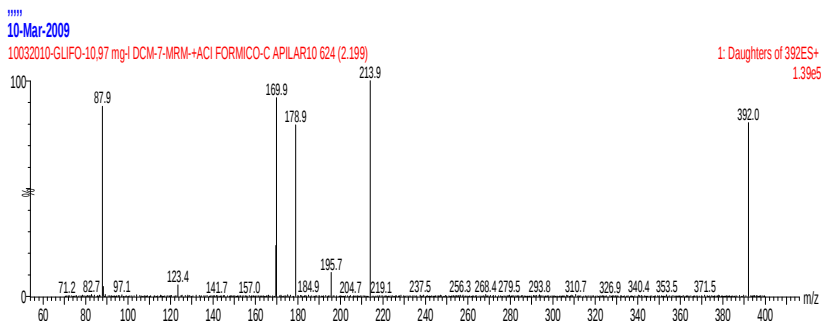


Figura 6. Hijas de la molécula GLY-FMOC +H (392) a un voltaje de cono y capilar de 10.

b. Condiciones Instrumentales del UPLC:

Se seleccionó como fase orgánica el metanol y como fase acuosa una solución de 5 mM de acetato de amonio, debido a que fueron las que generaban mayor intensidad en la respuesta del espectrómetro de masas. Como consecuencia de la mayor viscosidad del metanol respecto al acetonitrilo, se trabajó a una temperatura de columna de 50 °C. El gradiente de corrida comenzó con un bajo % de solvente orgánico, de manera que los analitos se concentren en la cabeza de columna, con el objeto de disminuir el efecto de ensanchamiento de banda extracolumnar y mejorar a su vez las formas de los picos en los cromatogramas. A las concentraciones estudiadas y al volumen de inyección empleado (20 µl) no se observaron deformaciones (tailing) en los picos que sugieran sobrecarga de la columna (**15, 19, 20, 21**).

En la Tabla 1 se presentan las condiciones instrumentales optimizadas tanto del espectrómetro de masas como del sistema UPLC, mientras que en la Figura 7, se presentan uno de los cromatogramas obtenidos, donde se puede observar los picos resueltos de GLY y AMPA.

2. Linealidad, límite de detección y de cuantificación

La linealidad se estudió en el rango de 0,10 a 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el análisis de muestras ambientales y de 1,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el estudio de isothermas en sus respectivas matrices. Los valores obtenidos de los coeficientes de determinación (r^2) fueron mayores a 0,99, con desvío de los residuales menores al 20 %, aplicando una ponderación de $1/X$ (Figuras 8 y 9) **(3, 4, 5, 15)**. Los límites de detección obtenidos para GLY y AMPA fueron de 0.5 y 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, con una relación señal/ruido mayor a 4 (peak to peak). A su vez los límites de cuantificación fueron de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos compuestos, con una relación señal/ruido mayor a 9 (peak to peak) **(23)**. Estos valores varían según la matriz utilizada.

Tabla 1- Condiciones Instrumentales

Condiciones instrumentales	Sistema UPLC	-Gradiente con fase móvil A: 5 mM de Acetato de amonio y B: Metanol. -Flujo de 0.500 ml min⁻¹. -Volumen de inyección 20 ul. -Columna ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 um 2.1 x 50 mm. -Temperatura de columna (°C) 50. -Tiempo de corrida 5min. -Tiempo de retención de glifosato 1.40 minutos y AMPA 1,59 minutos.																															
	Gradiente	<table><tr><td></td><td>Flujo ml</td><td>% A</td><td>%B</td></tr><tr><td>inicial</td><td>500</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>0,5</td><td>500</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>1,5</td><td>500</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>1,6</td><td>500</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>2,6</td><td>500</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>2,7</td><td>500</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>					Flujo ml	% A	%B	inicial	500	90	10	0,5	500	90	10	1,5	500	5	95	1,6	500	0	100	2,6	500	0	100	2,7	500	90	10
		Flujo ml	% A	%B																													
	inicial	500	90	10																													
	0,5	500	90	10																													
1,5	500	5	95																														
1,6	500	0	100																														
2,6	500	0	100																														
2,7	500	90	10																														
Espectrómetro de masas (Quattro Premier XE)	Modo: MRM ESI + Glifosato: 392 > 87.9 Volt Cono (v): 20 E.de collision: 20 v Dwell time (seg): 0.01		392 > 213.9 Volt Cono(v): 20 E.de collision (v): 10 Dwell time (seg): 0.01																														
	Modo: MRM ESI + AMPA: 334 > 155.8 (cuantificador) Volt Cono (v): 20 E.de colisión (v): 10 Dwell time (seg): 0.02		Modo: MRM ESI + 334 > 179 (confirmador) Volt Cono(v): 20 E.de collision (v): 16 Dwell time (seg): 0.02																														
	Voltaje del capilar (Kv) 2 Temperatura de la fuente (°C) 120 Temperatura de desolvatación (°C) 400 Flujo del gas de cono (L/Hr) 5 Flujo del gas de desolvatación (L/Hr) 800																																
	Software	Masslynx 4.1 y Targelynx 4.1																															

Manuel J. Zelaya
2010-05-02-EK-CCA 3

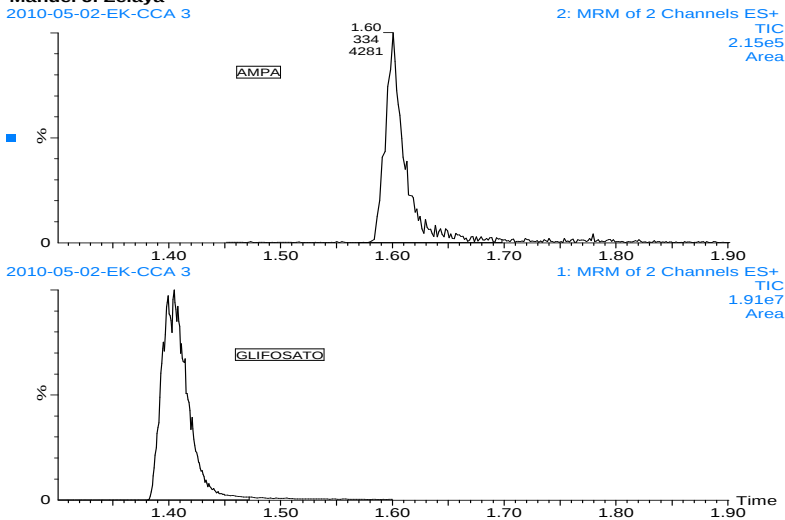


Figura 7. Cromatograma de GLY y AMPA.

Compound name: AMPA
Correlation coefficient: $r = 0.999016$, $r^2 = 0.998033$
Calibration curve: $690.887 \cdot x + -12.8841$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None

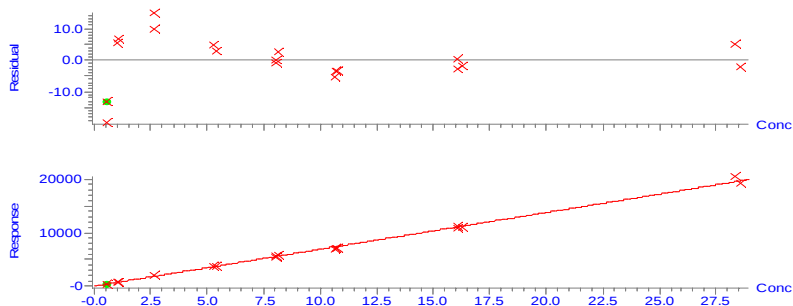


Figura 8. Curva de calibración obtenida para glifosato.

Compound name: AMPA
 Correlation coefficient: $r = 0.999016$, $r^2 = 0.998033$
 Calibration curve: $690.887 * x + -12.8841$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

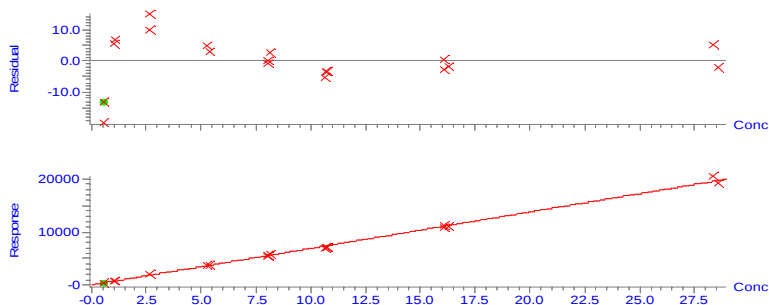


Figura 9. Curva de calibración obtenida para AMPA.

3. Efecto matriz

En todas las matrices analizadas, se investigó la presencia o ausencia de efecto matriz, por medio de la técnica del agregado de una cantidad conocida del analito y su posterior comparación con las áreas obtenidas en una muestra de agua nanopure fortificada artificialmente. En la Tabla 2 se muestran las ecuaciones de regresión lineal obtenidas a partir de las curvas de calibración, realizadas con diferentes matrices (CaCl_2 , suelos de Anguil, Balcarce y Cerro Azul). Se realizó un análisis de varianza de las mismas, y se obtuvo que existieron diferencias significativas entre las rectas, por lo que la respuesta y la concentración varían según la matriz ($\alpha=0,05$).

Tabla 2. Regresión lineal de curvas de glifosato realizadas para 4 matrices diferentes

Matriz	Ecuación	r^2
Suelo de Anguil	$Y = 146.41X - 47.06$	0.99
Suelo de Balcarce	$Y = 123.93X - 43.06$	0.99
Suelo de Cerro Azul	$Y = 4.81X + 12.09$	0.77
Cloruro de calcio	$Y = 185.02X - 164.92$	0.99

4. Repetibilidad

Antes de comenzar una secuencia, como control del funcionamiento del equipo, se estudia la repetibilidad de las aéreas obtenidas a partir de inyecciones repetitivas de un mismo vial.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de uno de los controles diarios mencionados. Mientras que en la Tabla 4 se encuentran los resultados de la repetibilidad intermedia, calculada a partir de 9 inyecciones de un mismo vial en un lapso de 10 horas. En todos los casos se obtuvieron coeficientes de variación (CV) menores al 17 %, mostrando la buena performance del sistema UPLC MSMS siempre que las condiciones ambientales estén controladas (temperatura de cuarto).

Tabla 3. *Repetibilidad de GLY y AMPA*

Analito	g L⁻¹	CV%	n
AMPA	0,201	16	6
AMPA	1,272	7	6
AMPA	10,301	2	6
GLY	0,194	17	6
GLY	1,108	3	6
GLY	10,234	1	6

Tabla 4. *Repetibilidad intermedia de GLY y AMPA.*

Analito	g L⁻¹	CV%	n
AMPA	1.123	4	9*
AMPA	5,189	8	9
AMPA	7,593	3	9
AMPA	10,122	6	9
GLY	1,023	13	9
GLY	5,120	9	9
GLY	7,587	8	9
GLY	10,002	7	9

**9 inyecciones con una diferencia de 1 hora entre las mismas en un lapso total de 10 horas*

Conclusiones:

Se optimizaron las condiciones tanto de derivatización como las instrumentales, los límites de cuantificación obtenidos son adecuados para los trabajos planificados en el laboratorio. El proceso es chequeado mediante el empleo de controles de calidad internos en la secuencia e inyecciones intercaladas de muestras y estándares. Valores menores del límite de cuantificación ($< 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) se pueden llegar previo a un proceso de concentración de la muestras antes o después de la derivatización. Y el empleo de un estándar interno mejoraría la precisión.

b.- Puesta a punto de la técnica de extracción de glifosato y AMPA en muestras de suelo

Se utilizó la técnica propuesta por Ibáñez et al. (6), además se evaluaron diversas adaptaciones para comparar el porcentaje de recuperación de cada una, debido a que está comprobado que el mismo varía de acuerdo al tipo de suelo y metodología empleada.

Si bien está prevista la puesta a punto de la técnica con distintos suelos, hasta el momento, se utilizó suelo superficial (0-15 cm) proveniente de un campo experimental de Tandil, provincia de Buenos Aires ($37^{\circ}34'S$; $59^{\circ}04'O$) descripto en la Tabla 5. Se tomaron 5 g de suelo y se les agregó 1 ml de 250, 1000 o $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato 24 h previas a la extracción. En el caso del suelo blanco solo se agregó 1 ml de agua destilada. Las muestras se realizaron por triplicado.

La extracción se realizó agregando 10 ml de KOH 0.6 M, se agitó por 30 minutos y luego se centrifugó. Se muestra un esquema de los procedimientos utilizados en la Figura 10.

Tabla 5. Profundidad, distribución del tamaño de partículas, contenido de materia orgánica y carbono orgánico y pH del horizonte superficial del suelo de Tandil.

Textura	Profundidad	Arcilla	Limo	Arena	Materia orgánica	Carbono orgánico	pH
	Cm	%	%	%			
Franco	0-10	36,27	40,43	23,31	6,10	3,55	5.2

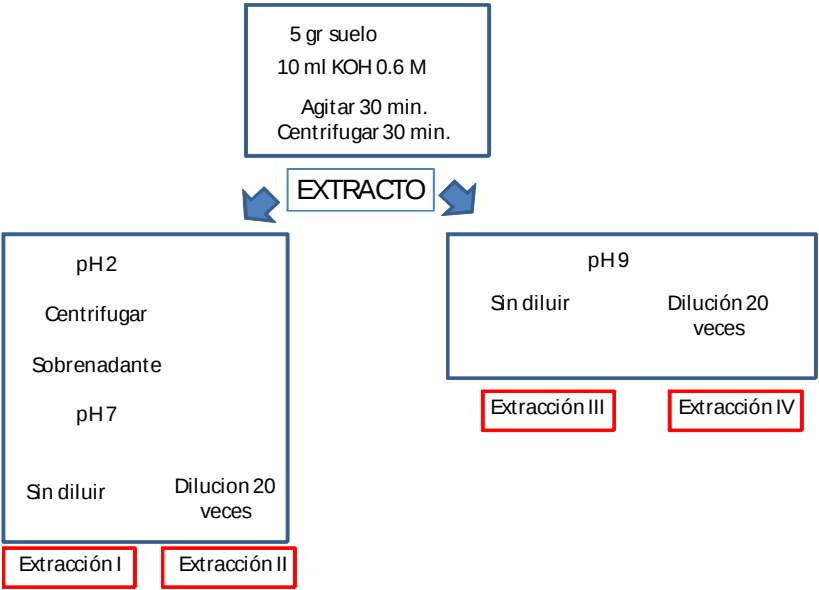


Figura 10. Esquema de la metodología utilizada

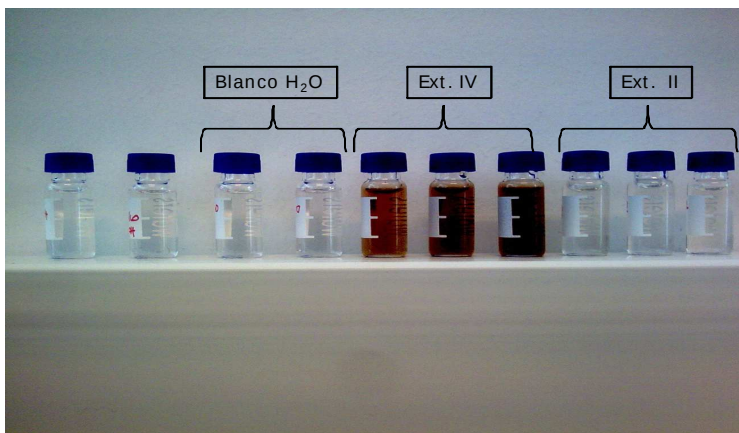


Figura 11. Muestras de extracción de glifosato en suelo de Tandil previo a la inyección en HPLC MS MS. El blanco de H_2O indica una muestra de agua destilada derivatizada. Ext. IV: el sobrenadante de la extracción se llevó a pH 9 y luego se diluyó 20 veces. Ext. II: se llevó el sobrenadante de la extracción a pH 1 y luego se diluyó.

Se observó que luego de la extracción con KOH 0.6 M se obtenía una muestra coloreada con alto contenido de materia orgánica (Figura 11). Para separar las sustancias húmicas de la solución se llevó a pH 1 con HCl (0.6 M y 6 M). Luego se centrifugó y se recuperó el sobrenadante obteniéndose una solución límpida y transparente. Previo al paso de derivatización se neutralizó a pH 7 y se diluyó 20 veces, como indica la técnica original (Extracción I). Se realizó el mismo procedimiento omitiendo el paso de la dilución (Extracción II). La extracción también se analizó dejando el sobrenadante a pH 9 sin diluir (Extracción III) y diluyendo 20 veces (Extracción IV). Luego de la extracción, las muestras fueron derivatizadas y analizadas por UPLC-MSMS.

Los resultados de recuperación mediante la técnica de extracción IV (83% en promedio), indican que la extracción de glifosato utilizando KOH 0,6 M, llevando el sobrenadante a pH 9 y diluyendo previo al paso de derivatización, es efectiva para el tipo de

suelo estudiado (Tabla 6). En lo referente a AMPA, una extracción realizada mediante la misma técnica, alcanzó la mayor recuperación del ensayo (94.8%). Si bien los resultados obtenidos hasta el momento resultan auspiciosos, deben ser confirmados con otros suelos.

Tabla 6. *Recuperación de distintas concentraciones en el suelo de glifosato.*

Método	Compuesto	Concentración (µg kg ⁻¹ suelo)	Recuperación (%)	CV (%)
Extracción I	GLY	50	55,8	95,5
		500	3,7	21,3
Extracción II	GLY	50	36,0	111,4
		500	48,0	70,9
Extracción III	GLY	50	-	
		500	12,7	155,8
Extracción IV	GLY	50	80,6	12,7
		200	91,3	9,5
		500	77,8	0,9
	AMPA	0,178	94,8	4,6

c.- Isotermas de Adsorción en Suelo

Uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo es la obtención de los parámetros de adsorción de glifosato para diferentes tipos de suelos agrícolas de Argentina. Tal información permitirá establecer, conjuntamente con la determinación de la vida media y el transporte en columnas de suelo sin disturbar, el riesgo de contaminación de suelos y aguas subterráneas debida a la aplicación de glifosato. Para ello se comenzó a estudiar un suelo de Tandil cuyas principales características se presentan en la Tabla 5.

Se siguió la metodología establecida por OECD (1995) (18) para la determinación de los parámetros de ensayo y la realización de la isoterma de adsorción mediante el método de equilibrio por tanda

(Batch Equilibrium Method). Todos los ensayos se determinaron en muestras por triplicado. Las concentraciones utilizadas fueron: 0, 0.5, 2, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg L⁻¹. Se tomaron 2 g de suelo los cuales se agitaron con 40 ml de solución de CaCl₂ 0.01 M durante 24 h a 20°C, agregándose posteriormente las diferentes concentraciones de glifosato. Luego de agitar otras 24 hs, las muestras obtenidas fueron centrifugadas y filtradas con filtro jeringa de nylon de 0.2 um de tamaño de poro y luego 3 ml de las soluciones obtenidas fueron sometidas al proceso de derivatización ya descrito anteriormente.

A partir de los ensayos en tandas se determinó el coeficiente de partición K_d (relación entre la concentración de glifosato en la fase acuosa y la adsorbida por el suelo).

Para el adecuado procesamiento de los datos y realización de la isoterma de adsorción se utilizó el modelo de Freundlich, definido como: $C_s = K_f \cdot C_e^n$

cuya expresión lineal es: $\ln C_s = \ln K_f + n \ln C_e$,

donde C_s (mg/kg) es la cantidad de herbicida adsorbido en el suelo en la concentración de equilibrio, C_e (mg/l) es la concentración de herbicida en la solución, K_f y n son coeficientes empíricos que indican el grado de adsorción y la curvatura de la regresión.

La retención de glifosato en el suelo fue del 98 %, observándose que en el intervalo de concentraciones evaluadas (0,1 a 20 mg L⁻¹) no se alcanzó la capacidad de saturación del suelo. Dadas estas características y el K_f obtenido (709 l kg⁻¹), la adsorción del glifosato para un suelo Argiudol típico como el estudiado, permite establecer que el grado de retención resultante es muy elevado (Figuras 12 y 13).

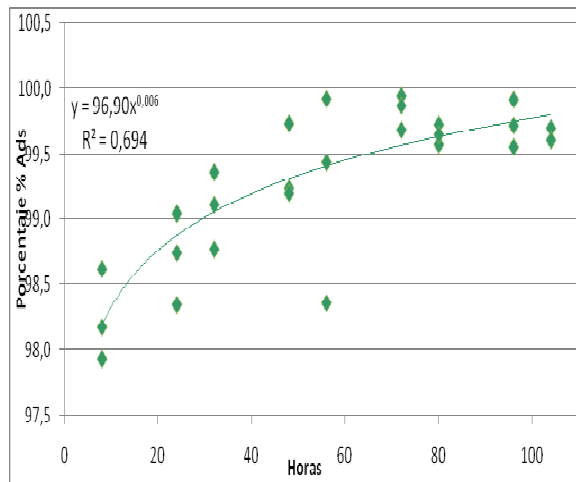


Figura 12. Curva de equilibrio

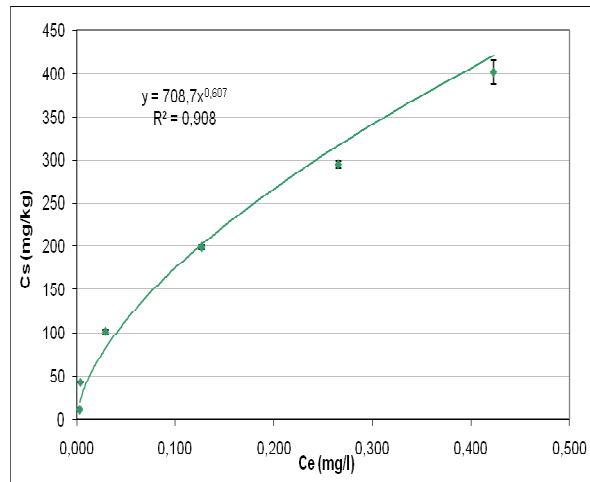


Figura 13. Isoterma de adsorción de glifosato

Agradecimientos:

Estos estudios se realizaron gracias a INTA a través del proyecto de investigación AEGA 221641, a la AGENCIA-SECYT a través del PICT 2007-00448 y a CONICET por el otorgamiento de una beca doctoral.

Bibliografía:

- (1) Lehotay, S.J., Kok, A., Hiemstra, M. and Van Bodegraven, P. 2005, J. AOAC Int. 88. 595p.
- (2) Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi. 2006. Quantitative Applications of Mass Spectrometry. ISBN: 9780470025161.
- (3) Stalikas, C. D.; Konidari. C. N. 2001. Analytical methods to determine phosphonic and 1-amino acid group-containing pesticides. Journal of Chromatography A 907.
- (4) Le Fur E, Colin R, Charretier C, Dufau C, Peron JJ. 2000 Analisis 28:813–818.
- (5) Ibañez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ, Hernandez F. 2006. Chromatogr A 1134:51–55.
- (6) Ibañez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ, Hernandez F. 2005. J Chromatogr A 1081:145–155.
- (7) Hanke, I.; Singer H. and Hollender, J. 2008. Anal. Bioanal. Chem. 391. p. 2265-2276.
- (8) Freuze I, Jadas-Hecart A, Royer A, Communal P-Y. 2007. J Chromatogr A 1175:197–206.
- (9) Miles, C.J.; Moye, H.A. 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.36, p.486-491.
- (10) Lee EA, Zimmerman LR, Bhullar SS, Thurman EM. 2002. Anal Chem 74:4937–4943.
- (11) Lee EA, Strahan AP, Thurman EM. 2002 USGS Open-File Rep 01–454.
- (12) Nedelkoska TV, Low GKC. 2004. Anal Chim Acta 511:145–153.
- (13) Schuster R, Gratzfeld-Hüsken A. 1992. Hewlett-Packard Application.

- (14) Veiga, F., Zapata, J. M., Fernandez Marcos, M. L., and Alvarez, E. 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Sci. Total Environ.* 271:135-144.
- (15) R.E. Ardrey. *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*. Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd..ISBNs: 0-471-49799-1 (HB); 0-471-49801-7 (PB).
- (16) Nagaraja, N.V.; Paliwal, J. K. And Gupta R.C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20. 1999. 433–438.
- (17) Document N° SANCO/2007/3131.
- (18) OECD. 1995. Test guideline programme, final report of the OECD. Guideline 106. Workshop on selection of soils/sediments, Belgirate, Italy.
- (19) Aeresenault J.C and McDonald, P.D. 2009. *Beginners Guide to Liquid Chromatography*, Waters (2009).
- (20) Niessen, W.F.A.. 2006. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, 3rd Editio. ISBN 0824740823.
- (21) Neue, U. D..2001. *HPLC Troubleshooting guide*. Rev. 1.
- (22) Ghanem A, Bados P, Kerhoas L, Dubroca J, Einhorn J 2007. *Anal Chem* 79:3794–3801.
- (23) Masslynx 4.1. 2006. *Peak Integration and Quantitation Algorithm Guide*. 71500122009. Revision A.

Toxicidad de Glifosato en Peces Autóctonos: Estudios de Laboratorio y Campo

Pedro Carriquiriborde

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente
Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de la Plata.

Introducción:

El glifosato (CAS No. 1071–83–6) es un herbicida post emergente, sistémico y de amplio espectro utilizado en agricultura, horticultura, silvicultura e incluso uso domestico en jardinería.

Químicamente, el glifosato (N-(fosfonometil) glicina) es un análogo aminofosfonado del aminoácido natural, glicina, y su nombre proviene de la contracción gly(cina)-fos(fono)-ato. El glifosato es soluble en agua ($11,6 \text{ g L}^{-1}$, 25°C) y una baja presión de vapor ($7,5 \times 10^{-8} \text{ mmHg}$). Por tanto posee un valor de constante de Henry bajo ($1,44 \times 10^{-12} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$), indicando que se distribuirá preferentemente en el compartimiento acuático. Sus valores de Koc (21699 mm g^{-1}) y Kd (61 g m^{-3}) elevados permiten estimar que este compuesto se halle mayormente adsorbido al sedimento y posea baja movilidad. La presencia de 4 grupos ionizables, le da carácter anfótero y hace que la molécula se encuentre cargada negativamente a pH neutros (pKa: 2; 2,6; 5,6; 10,6). Esto sumado a su bajo valor de Kow ($3,3 \times 10^{-4}$) indican que su biodisponibilidad en ambientes acuáticos y capacidad de acumulación se verá limitada, explicando los bajos factores de bioconcentración (BFC = 0.04) publicados. En agua, la persistencia del glifosato es baja con una vida media (DT50) de 2,5 d. (UN-ILO-WHO, 1994; Schuette, 1998; Giesy et al., 2000)

El modo de acción del glifosato como herbicida es a través de la inhibición de la enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato sintetasa (EPSPS), que se encuentra implicada en la síntesis de los aminoácidos aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina (Schönbrunn et al., 2001). La vía del shiquimato no está presente en los animales, que en su lugar obtienen aminoácidos aromáticos de su dieta.

El glifosato es un herbicida especialmente diseñado para el control de malezas en cultivos genéticamente modificados que poseen una versión de la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) resistente a la inhibición por glifosato. En Argentina, el empleo de soja transgénica resistente a este herbicida ha crecido sistemáticamente desde la década del 70 superando las 16 millones de hectáreas en la campaña 2007/2008 (James, 2007). Ello ha motivado una preocupación general en la opinión pública y las autoridades respecto a los posibles efectos adversos del glifosato para el medioambiente y la salud humana.

Con motivo de dicha intensificación agrícola, desde el año 2001 en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, se ha venido trabajando en el estudio de los posibles efectos adversos sobre los ecosistemas acuáticos asociados al uso de plaguicidas en las prácticas agrícolas de nuestro país (Carriquiriborde et al., 2003; Marino and Ronco, 2005; Martin and Ronco, 2006; Carriquiriborde et al., 2007; Sobrero et al., 2007; Peruzzo et al., 2008; Rimoldi et al., 2008; Ronco et al., 2008; Carriquiriborde et al., 2009; Mugni et al., 2010). El objeto del presente trabajo es resumir algunos de los estudios dirigidos a evaluar el impacto del glifosato, y de los insecticidas que suelen utilizarse junto a él para el control de plagas en el cultivo de soja transgénica por la modalidad de siembra directa, sobre poblaciones experimentales de peces autóctonas expuestas en condiciones de laboratorio y campo.

Metodología

Bioensayos de Toxicidad Aguda

Los bioensayos de toxicidad aguda se realizaron de acuerdo a los métodos normalizados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2002).

Las especies ensayadas fueron el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y la madrecita (*Cnesterodon decemmaculatus*).

Los alevines de pejerrey se obtuvieron de la Estación Hidrobiológica de Chascomús. Las madrecitas de a partir de reproductores criados en el laboratorio. Los ensayos se realizaron con alevinos de 15 días de vida. Los bioensayos fueron estáticos con renovación del 100% del medio de ensayo cada 24h. Se ensayaron

en cada caso 5 concentraciones del tóxico y un grupo control por triplicado. En los casos que se utilizó una sustancia vehiculizante, se empleó la misma contracción de esta en todos los tratamientos, incluidos los controles. Se utilizaron recipientes de vidrio de 250 ml conteniendo 200 ml de medio de ensayo. Como medio de dilución, se empleó agua de red de clorinada y filtrada por carbón activado. A los pejerreyes se los alimentó con 2 ml de concentrado de nauplii de *Artemia* sp. de 24h de vida cada 48h.

Las crías de madrecita no se alimentaron durante el ensayo. En ningún caso se suministró aireación. La temperatura se mantuvo a 22 ± 1 °C y el fotoperíodo a 16h luz: 8h oscuridad. Se registró el número de organismos vivos y muertos cada 24h, retirando estos últimos del recipiente de ensayo. Las LC50 se estimaron mediante el método Probit utilizando el programa informático desarrollado por la USEPA (1995).

Los datos de toxicidad aguda (LC50 96h) para la construcción de la curva de distribución de sensibilidad de las especies de peces se obtuvieron de la base de datos ECOTOX de la USEPA.

Ensayos de Campo

Los ensayos de campo se realizaron entre los años 2002 y 2005 en 2 explotaciones agropecuarias privadas situadas en la Provincia de Buenos Aires, una localizada en el Partido de Arrecifes y la en el Partido de La Plata. En ambas explotaciones los lotes en los cuales se llevaron a cabo los estudios tuvieron una extensión de aproximadamente 100 ha y eran atravesados por un arroyo de primer orden. En ambos casos se cultivó soja de acuerdo a las prácticas convencionales para este cultivo en la modalidad de siembra directa. El manejo de agroquímicos durante el período estudiado consistió en tres aplicaciones de plaguicidas en cada ciclo de cultivo. Una aplicación preemergente de glifosato (Roundup®), luego una aplicación de una mezcla de glifosato (Roundup®) y cipermetrina (Sherpa®) en la etapa que la plántula adquiría sus primeras hojas (V2) y finalmente una aplicación de una mezcla de glifosato (Roundup®), cipermetrina (Sherpa®) y clorpirifos (Lorsban® ó Shooter®) ó endosulfán (Thionex®), dependiendo el caso, cuando la planta desarrolla la vaina y los granos (R5-R6) y el número de chinches por planta lo indicaba necesario.

Las dosis de aplicación utilizadas por hectárea fueron 1000-2000 g de glifosato, 100-150 ml del formulado Sherpa (25 mg de cipermetrina p.a./ml), 800-1000 ml del formulado de clorpirifos (48 mg de clorpirifos p.a./ml), 700 ml de Thionex (35 mg de endosulfán p.a./ml). Las aplicaciones se realizaron con medios terrestres a excepción de la aplicación de la mezcla de formulados de glifosato, cipermetrina y endosulfan que fue realizada por avión.

En cada arroyo se seleccionaron 2 o 3 sitios en los cuales se ubicaron de 3 a 8 limnocorrales construidos con tubos de PBC de 100 cm de longitud y 20 cm de diámetro, perforados en su mayor parte por 4 ventanas rectangulares, forrados con una malla de nylon de 0,1 cm de abertura de trama y 2 tapas en los extremos con malla de acero de 0,1 cm de trama. Los limnocorrales se sostuvieron verticalmente con una estaca de hierro manteniendo un extremo apoyado en el sedimento y el otro 20 a 30 cm sobre la superficie del agua. En cada limnocorral se colocaron de 30 a 50 crías de *Cnesterodon decemmaculatus* de 15 días de vida llevadas desde el laboratorio una semana previa a la aplicación de plaguicidas.

Diariamente desde 48 o 96 h previo a la aplicación y hasta 96 h luego de la aplicación o de la primera lluvia, se controló el número de peces sobrevivientes en cada limnocorral.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1. se muestran las LC₅₀ 96h obtenidas para las dos especies autóctonas expuestas a los principios activos del glifosato y los demás insecticidas utilizados junto a este herbicida en el cultivo de soja.

Tabla 1. Toxicidad Aguda Pesticidas Soja

Pesticida	C. decemmaculatus		O. bonariensis	
	LC ₅₀ 24h	LC ₅₀ 96h	LC ₅₀ 24h	LC ₅₀ 96h
	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)
Glifosato	> 225.000,00	> 225.000,00	> 150.000,00	163.000,00
Clorpirifos	300,00	75,00	SD	SD
Endosulfan	1,70	0,65	1,50	0,30
Cipermetrina	2,50	0,40	1,20	0,24

SD: sin datos

Los datos muestran que la toxicidad letal aguda del glifosato es por lo menos entre mil a un millón de veces menor que la de los insecticidas. De acuerdo a la curva de distribución de sensibilidad de especies (Figura 1), las dos especies ensayadas se encuentran dentro del grupo de especies poco sensibles al glifosato. Esto es particularmente llamativo para el pejerrey que es una especie sensible a los contaminantes. Para otros compuestos ha mostrado valores de sensibilidad comparable al de los salmónidos, particularmente las truchas (*Oncorhynchus mykiss*). Los niveles de toxicidad reducidos observados para el glifosato son consistentes con las características fisicoquímicas y biológicas del glifosato que estiman una baja biodisponibilidad y bioacumulación. Además, concuerda con el modo de acción tóxica que posee que es específico para el metabolismo de los vegetales.

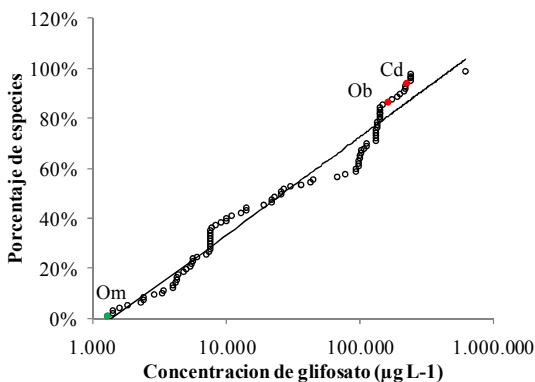


Figura 1. Curva de distribución de valores de toxicidad aguda para especies de peces mostrando la posición relativa para las especies autóctonas estudiadas y la del salmónido mas sensible. Om: *O. mykiss*, Ob: *O. bonariensis*, Cd: *C. decemmaculatus*.

La Figura 2 muestra la supervivencia a lo largo del tiempo en los ensayos de campo realizados bajo prácticas convencionales de cultivo de siembra directa. Los datos muestran que durante los tratamientos del cultivo con el formulado de glifosato (Roundup®) no se observó una reducción significativa de la supervivencia a lo largo del ensayo ni tampoco un incremento de la mortalidad instantánea luego de la aplicación (Figura 2 A). En el caso de las aplicaciones con la mezcla de los formulados de glifosato (Roundup®) y cipermetrina (Sherpa®), si bien se observó un descenso de la supervivencia con el

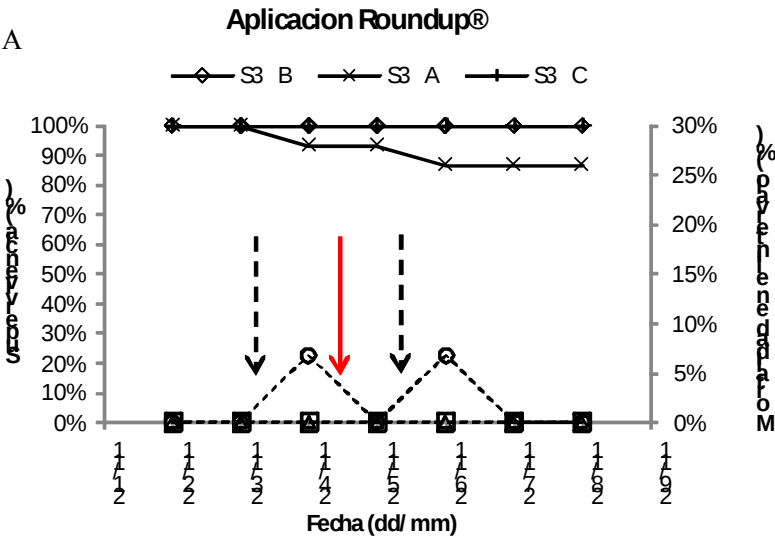
tiempo, ésta fue similar tanto en el sitio dentro del cultivo (S1) como fuera del cultivo (S2). La mortalidad instantánea tampoco mostró una clara correspondencia con el evento de aplicación (Figura 2 B). En ambos casos sólo se observó un incremento de la mortalidad instantánea luego de las lluvias, independientemente si esta ocurriera previa o posteriormente a una aplicación. Cuando se aplicó la mezcla de los formulados de glifosato (Roundup®), cipermetrina (Sherpa®) y clorpirifos (Lorsban®), se observó un claro descenso de la supervivencia y un marcado aumento de la mortalidad instantánea en relación a la aplicación (Figura 2 C). Ello fue consistente con la observación de peces con nado errático asociada a un evento de mortandad en el arroyo.

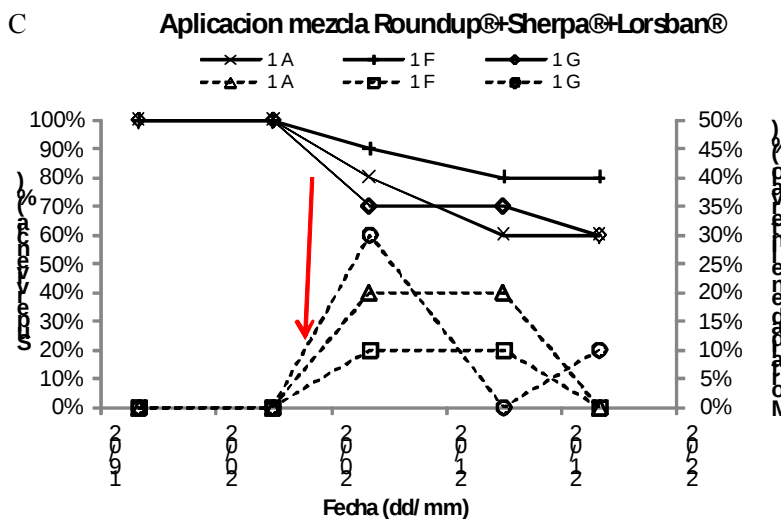
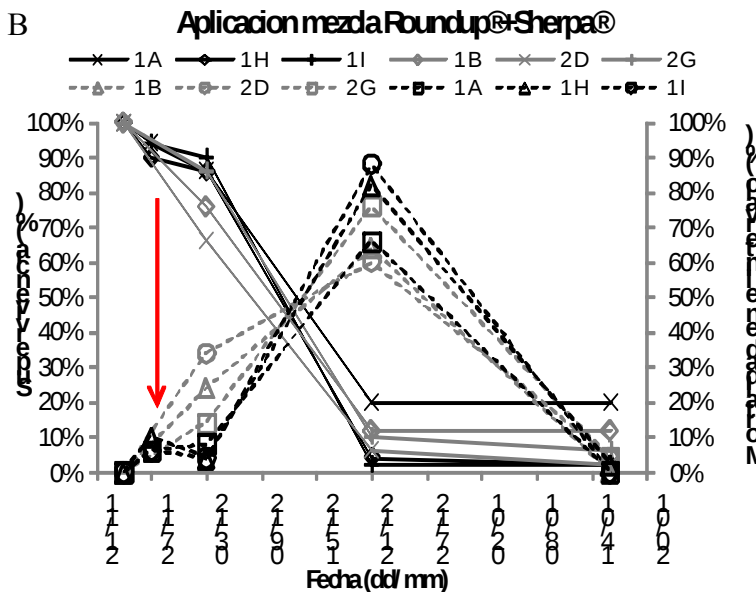
Finalmente, durante la aplicación aérea de la mezcla de los formulados de glifosato (Roundup®), cipermetrina (Sherpa®) y endosulfán (Thionex®) se observó un efecto adverso severo sobre la supervivencia y la mortalidad instantánea que pudo ser claramente relacionado con el evento de fumigación (Figura 2 D).

Desde el punto de vista metodológico, los resultados muestran que si bien todas las estrategias de seguimiento de la supervivencia en los limnocorrales permitieron discriminar la existencia, o no, de efectos inducidos por la aplicación de agroquímicos, la estrategia que mejor lo hizo fue la llevada a cabo durante las aplicaciones de glifosato y de la mezcla de glifosato + cipermetrina + endosulfan. Por consiguiente, en este tipo de estudios se recomienda utilizar un control periódico del número de individuos vivos en los limnocorrales con al menos cuatro observaciones previas a la aplicación y cuatro posteriores a ella en un período de 96 h previo y posterior a la fumigación. La comparación con un sitio control y el relevamiento espaciado en el tiempo (ej. aplicación de glifosato + cipermetrina) generaron el mayor grado de incertidumbre.

Por otro lado, debe considerarse que los eventos de lluvia causan incrementos en la mortalidad, que pueden generar confusión al momento de interpretar los efectos inducidos por los pesticidas. Ello es consistente con eventos de mortalidad de peces informados para diferentes cursos de agua de la región pampeana luego de precipitaciones intensas. Las explicaciones que han sido dadas a este fenómeno son especulativas y van desde el descenso del oxígeno disuelto por aumento de los niveles de materia orgánica en

suspensión producto del lavado de los campos, a obstrucción de las branquias de los peces por el material en suspensión.





D Aplicación mezcla Roundup® + Sherpa® + Thionex®

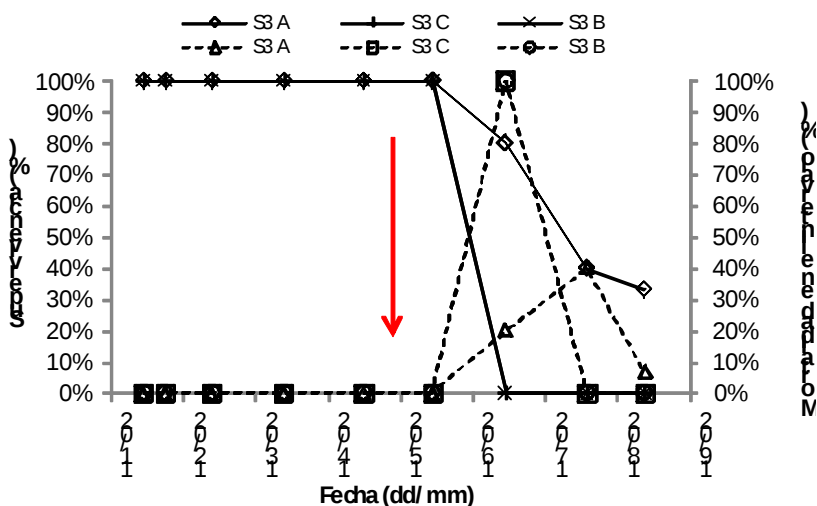


Figura 2. Supervivencia (línea continua) y mortalidad en el intervalo (línea punteada) observada en poblaciones experimentales de *Cnesterodon decemmaculatus* dentro de limnocorales (cada símbolo indica una réplica) ubicados en arroyos de primer orden contiguos a parcelas cultivadas con soja de acuerdo a prácticas convencionales de siembra directa en la región pampeana. Líneas negras: limnocorales en secciones del arroyo dentro de los lotes de cultivo, líneas grises (panel B): limnocorales en lote no cultivado. Flecha roja: eventos de aplicación de plaguicida, flecha punteada: eventos de lluvia.

Como resultado del estudio realizado puede concluirse que de acuerdo a los efectos letales agudos inducidos por el glifosato, este herbicida ha mostrado, en condiciones de laboratorio, poseer una muy baja toxicidad para las especies ensayadas de peces autóctonos. Por otro lado, el empleo agrícola de su formulación (Roundup®) ha representado un riesgo mucho menor para las poblaciones de peces autóctonos que el empleo de otros plaguicidas comúnmente utilizados en esta práctica. Futuros estudios serán sin

embargo necesarios para la evaluación de posibles efectos subletales y crónicos.

Dado el marcado efecto adverso observado sobre los peces, las mezclas de aplicación que incluyen formulaciones de clorpirifos y endosulfan debieran evitarse, buscando su remplazo por productos que sean menos nocivos para el ambiente.

Agradecimientos:

Este estudio estuvo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la Nación Argentina, ANPCyT (PICT2001, PICT2005). Los alevinos de pejerrey fueron gentilmente cedidos por la Estación Hidrobiológica de Chascomús del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires y a cargo del Lic. Gustavo Berasain. Se agradece la asistencia en los trabajos de campo y experiencias de laboratorio a los pasantes alumnos de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de la Plata, Juan Pablo Streitenberger, Juan Díaz, Michelle Arnal y Cala Berhoff.

Bibliografía:

- Carriquiriborde, P., Díaz, J., López, G.C., Ronco, A.E., Somoza, G.M., 2009. Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere* 76, 374-380.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68, 613-621.
- Carriquiriborde, P., Streitenberger, J.P., Arnal, M., Ronco, A.E., 2003. Efecto de plaguicidas asociados al cultivo de soja sobre peces: estrategia para su evaluación integrando información de diferentes niveles de análisis. In: Herkovits, J. (Ed.). 2do Libro SETAC, Salud Ambiental y Humana: una Visión Holística. SETAC Press, Buenos Aires.

- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35-120.
- James, C., 2007. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. pp. - 12 p.
- Marino, D., Ronco, A., 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 820-826.
- Martin, M.L., Ronco, A.E., 2006. Effect of mixtures of pesticides used in the direct seeding technique on nontarget plant seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77, 228-236.
- Mugni, H., Demetrio, P., Marino, D., Ronco, A., Bonetto, C., 2010. Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in pampasic surface waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84, 524-528.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61-66.
- Rimoldi, F., Schneider, M.I., Ronco, A.E., 2008. Susceptibility of *Chrysoperla externa* Eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environmental Entomology* 37, 1252-1257.
- Ronco, A.E., Carriquiriborde, P., Natale, G., Martin, M.L., Mugni, H., Bonetto, C., 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. In: Columbus, F. (Ed.). *Ecosystem Ecology Research Developments*. NOVA Publishers, New York, pp. 209-239.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N.S., Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1376-1380.
- Schuette, J., 1998. Environmental fate of glyphosate. *Environmental*

- Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation, , Sacramento,.
- Sobrero, M.C., Rimoldi, F., Ronco, A.E., 2007. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 537-543.
- UN-ILO-WHO, 1994. Environmental health criteria 159. Glyphosate. International Programme on Chemical Safety (IPCS). United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, and the World Health Organization, Geneva.
- USEPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, EPA-821-R-02-012, Washington D.C., p. 266.

La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios.

Julie C. Brodeur

Investigadora CONICET

Instituto de Recursos Biológicos

Ecología y Gestión ambiental de la Biodiversidad

Según la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), los anfibios representan el grupo de vertebrados más amenazados, con 32% de las especies en peligro de extinción y 43% en situación de declive (Stuart et al. 2004). Asimismo, se estableció recientemente que la tasa actual de extinción de los anfibios es 200 veces más alta que la tasa histórica (Roelants et al., 2007). Dentro de las diversas actividades humanas, la agricultura ha sido especialmente inculpada en el fenómeno de la desaparición de los anfibios.

Si se consideran las extensas superficies que se utilizan para la agricultura, la expansión agrícola representa indudablemente la actividad humana que genera las mayores pérdidas de hábitat utilizable para los anfibios (Mann et al., 2009). Por otro lado, la transformación de la agricultura en un sistema de alta tecnología, orientado a la mejora constante del rendimiento, ha resultado en un incremento de la cantidad de agroquímicos desperdigados en el medio ambiente en las últimas décadas (Tilman, 2001). Conjuntamente, los agroquímicos están cada vez más involucrados en el declive de los anfibios, ya sea por su acción directa o por su interacción con otros factores, y se ha demostrado que existe una correlación entre el declive de poblaciones de anfibios y su proximidad a zonas agrícolas (Bishop et al., 1999; LeNoir et al., 1999; Sparling et al., 2001; Davidson et al., 2002; Houlahan and Findlay, 2003; Davidson, 2004)

La palabra “Anfibio” es una construcción griega que significa “vida doble”, una referencia al hecho de que su ciclo de vida típico es en parte acuático y en parte terrestre. Eso los hace doblemente vulnerables: la perturbación tanto del agua como de la tierra puede afectarlos. Por eso, los anfibios son considerados unos de los mejores indicadores de la salud ambiental general de la naturaleza y

la declinación de las poblaciones de anfibios que se ha notada a escala mundial en la última década sirve como una señal de la degradación ambiental. A pesar del uso extenso de los agroquímicos en la agricultura moderna y de su posible rol en el declive de los anfibios, se conoce relativamente poco respecto a la toxicidad y el efecto de los pesticidas sobre este grupo de animales. Efectivamente, la cantidad de estudios de toxicidad realizados en anfibios a nivel internacional ha sido históricamente inferior a los realizados en otras clases de organismos (Mann et al., 2009). Además, tanto en la Argentina como en el resto del mundo, la mayoría de la información disponible se origina principalmente en ensayos realizados en laboratorio y con estadios larvales, mientras que son muy pocos estudiados los estadios adultos responsables de la reproducción y del reclutamiento de juveniles en la población (Hayes et al., 2010).

Considerando la importancia de la agricultura en la economía Argentina y las amplias extensiones rurales que son tratadas con agroquímicos anualmente, especialmente en la región pampeana, resulta claro que el análisis de la situación de las especies locales de anfibios es fundamental para cualquier estrategia de preservación de la biodiversidad. Efectivamente, en los últimos 20 años, el área sembrada en la República Argentina se extendió cerca del 35% y la producción de trigo, maíz, girasol y soja aumentó de 40 a 67 millones de toneladas, cerca del 66% (Satorre, 2005). El cambio de la actividad agrícola sobrellevado por la Argentina no fue parejo para todos los cultivos, sino que se concentró en la soja, que se convirtió en el cultivo dominante. Desde 1996, la superficie sembrada con maíz, girasol y trigo se mantuvo estable o cayó, mientras que la superficie destinada a la soja se triplicó, de 6 a 18 millones de hectáreas (MAG&P, 2010). De los aproximadamente 29 millones de hectáreas sembradas el año pasado con granos, el 61% corresponde a soja (MAG&P, 2010). Uno de los factores que explica la enorme expansión de la soja fue la introducción en 1998 de variedades transgénicas de soja resistentes al herbicida glifosato, que permiten una gran reducción de los costos de producción debido al eficiente control de malezas. Esta extensa siembra de soja transgénica ha producido un amplio incremento del uso de glifosato, de 1 a 150 millones de litros entre 1994 y 2003 (Maarten Dros, 2004). Mientras que es muy discutido el tema del uso intensivo del glifosato en la soja,

es poco conocido el hecho de que cada lote de soja recibe aplicaciones de varios otros agroquímicos en una rotación. Efectivamente, junto con 2 o 3 aplicaciones de glifosato, un lote de soja transgénica de la región pampeana recibe normalmente aplicaciones de los insecticidas cipermetrina, clorpirifós, y endosulfán, además de aplicaciones de fungicidas tales como los triazoles o la estrobirulina. Estos agroquímicos pueden ser aplicados individualmente o, más comúnmente, en combinaciones varias (Rennella y Quirós 2000; Perez Leiva y Anastasio 2003; Bindraban et al. 2009).

Tomando en cuenta esta realidad, es sumamente importante considerar, además de la toxicidad propia del glifosato, sus posibles interacciones con otros pesticidas al momento de estudiar potenciales impactos en las poblaciones de anfibios. Tal evaluación de la toxicidad de las mezclas de pesticidas típicamente asociadas a los cultivos de soja constituye uno de los objetivos de trabajo de nuestro grupo. Integramos ese factor, junto con el estudio del impacto general que pueden llegar a tener sobre los anfibios adultos las varias aplicaciones de pesticidas y prácticas de manejo normalmente asociadas al cultivo de la soja. Para ilustrar las actividades realizadas por nuestro grupo se presentaran los resultados de tres trabajos testigos:

1) Evaluación de la condición corporal y de la salud general de ranas de campos cultivados.

La salud de ranas que habitan campos utilizados para la producción de granos fue comparada con la de ranas provenientes de campos sin cultivar (sitios control) a través de la determinación de una serie de parámetros enzimáticos y corporales. Mientras no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de malformaciones (entre 0 y 14%) y de infección por parásitos (entre 0 y 15%) entre las ranas provenientes de los dos tipos de ambientes, se demostró la presencia de un índice de condición corporal reducido en individuos capturados en campos cultivados. Este resultado fue obtenido para cuatro especies de ranas con distintos hábitos de vida: *Rhinella fernandezae* (terrestre), *Leptodactylus latinasus* (terrestre), *Leptodactylus ocellatus* (semi-acuática) y *Hypsiboas pulchellus* (arborícola). Además, se detectó la presencia de un patrón

de alteraciones enzimáticas específico en *L. ocellatus* y *H. pulchellus* capturadas en campos cultivados. El patrón detectado consiste en una inhibición de la actividad de la glutatión-S-transferasa hepática (hasta el 30%) combinada con una elevación de la actividad de la catalasa (hasta el 30%) y de la colinesterasa hepática (hasta el 45%). Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de determinar las causas y consecuencias de la baja condición corporal detectada en las ranas de zonas agrícolas.

2) Evaluación de campo del impacto de una aplicación de glifosato sobre la rana *Hypsiboas pulchellus* en condiciones de sequía.

El impacto de una aplicación del herbicida glifosato y de una sequía subsiguiente fue evaluado en especímenes de la rana *Hypsiboas pulchellus* provenientes de una zona agrícola. Los parámetros evaluados incluyen una serie de índices corporales (índice del contenido estomacal, índice hepatosomático, índice de grasa corporal, índice gonadosomático) además de biomarcadores de estrés oxidativo (actividad de la catalasa hepática y contenidos hepáticos de glutatión), de exposición a contaminantes (actividad de la glutatión-S-transferasa hepática) y de genotoxicidad (frecuencia de micronúcleos). No se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre las ranas capturadas antes y 2 y 15 días después de la aplicación de glifosato. Sin embargo, las ranas capturadas en el mismo sitio dos meses después de la aplicación de glifosato al momento de una sequía presentaron una disminución de los índices hepatosomático y de contenido estomacal, además de una elevación de la actividad de la catalasa hepática, del contenido hepático de glutathion y de la frecuencia de micronúcleos en la circulación periférica. Estos resultados sugieren que la sequía indujo una disminución del consumo de alimento, junto con una deshidratación generadora de estrés oxidativo en la rana *Hypsiboas pulchellus*.

3) Evaluación de la toxicidad individual y en mezcla del herbicida glifosato y del insecticida cipermetrina en renacuajos del sapo *Rhinella arenarum*.

Se considera de primer importancia la detección de posibles interacciones entre el herbicida glifosato y el insecticida piretroide cipermetrina dado la amplitud del uso en conjunto que se hace de estos dos agroquímicos en lotes de soja transgénica. En este contexto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la toxicidad individual y en mezcla de formulaciones comerciales de glifosato y cipermetrina en renacuajos del sapo *Rhinella arenarum*. La concentración letal 50 mediana obtenida después de exponer a glifosato (glifosato 48% - Atanor S.C.A) 9 camadas diferentes de renacuajos (estadio 25) por separado y durante 96h (CL50-96h) fue de 19.38 mg L⁻¹ con un intervalo de confianza (I.C. 95%) extendiéndose entre 18.85 y 19.93 mg L⁻¹. En cuanto a la cipermetrina (cipermetrina 25% - Icona S.A.), utilizando 9 camadas de renacuajos diferentes se determinó una CL50-96h de 6.754 mg L⁻¹ con un I.C. 95% entre 6.061 y 7.526 mg L⁻¹. Por otro lado, la realización de exposiciones subcrónicas a cipermetrina (3 camadas de renacuajos en estadio 25) permitió detectar un rápido descenso de la CL50 entre 7 y 14 días de exposición: de más de 4 mg L⁻¹ después de 7 días a 111 µg L⁻¹ (I.C. 95% 30.2 – 407 µg L⁻¹) después de 14 días. Finalmente, se demostró que, cuando presentes en mezclas equitoxicas, los efectos de cipermetrina y glifosato se sinergizan y la mortalidad de renacuajos (estadio 25, 5 camadas) observada es superior a la mortalidad que se esperaría por una suma de efectos.

Bibliografía

- Bindrabán PS, Franke AC, Ferrar DO, Ghera CM, Lotz LAP, Nepomuceno A, Smulders MJM, van de Wiel CCM. 2009. *GM-related sustainability: agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil*. Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands.
- Bishop, C.A., Mahony, N.A., Struger, J., Ng, P., Pettit, K.E., 1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990–1992). *Environ. Monitor. Assess.* 57: 21–43.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Cons. Biol.* 16, 1588–1601.

- Davidson, C., 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 14, 1892–1902.
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 921-933.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., and Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752–755.
- LeNoir, J.S., McConnell, L.L., Fellers, G.M., Cahill, T.M., Seiber, J.N., 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada mountain range, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2715–2722.
- Maarten Dros, J. 2004. Manejo del boom de la soya: Dos escenarios sobre la expansión de la producción de la soya en América del Sur, AIDEnvironment, Amsterdam. Comisionado por el World Wildlife Fund.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ. Pollut.* 157: 2903-2927.
- MAP&G 2010. Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Pérez Leiva, F., Anastasio MD. 2003. *Consumo de fitosanitarios en el contexto de expansión agrícola*. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. www.agro.uba.ar/apuntes/no_5/agroquimicos.htm.
- Rennella, A. Quirós, R. 2000. *Relevamiento del uso de pesticidas agrícolas en la alta cuenca del río Salado (Provincia de Buenos Aires)*. Area de Sistemas de Producción Acuática, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Roelants, K., Gower, D. J., Wilkinson, M., Loader, S. P., Biju, S. D., Guillaume, K., Moriau, L. and Bossuyt, F. (2007). Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 887-892.
- Satorre EH. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 15: 24-31.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M., McConnell, L.L., 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ.*

- Toxicol. Chem. 20: 1591–1595.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., and Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1785.
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Dobson A, Howart R, Schingler D, Schlesinger WH, Simberloff D, Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292: 281-284.

Efecto del Herbicida Glifosato sobre el Estado Oxidativo en Hígado de Ratas Preñadas y sus Fetos.

Cecilia Beuret, Jorgelina Daurich, Fanny Zirulnik, Sofía Giménez

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional de San Luis

El glifosato (N- phosphonometil- glicina, también conocido por los nombres comerciales de Roundup, Herbicygon, y Rodeo entre otras) es un herbicida usado para controlar malezas antes de la siembra. Este herbicida no selectivo se utiliza ampliamente en aplicaciones agrícolas. La exposición de animales de laboratorio al glifosato puede llevar a la producción excesiva de malonaldehído (MDA), a la generación de especies oxígeno reactivo (ROS), tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singulete. Niveles excesivos de ROS pueden comprometer la integridad celular a través del daño oxidativo de los lípidos, proteínas o ADN modificando la expresión de genes críticos para el desarrollo, diferenciación y el envejecimiento. Así mismo puede alterar la expresión de genes que codifican las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y la actividad de enzimas generadoras de NADPH₂.

Nuestro objetivo fué determinar los niveles de Sustancias Reactivas al Acido Thibarbitúrico TBARS y la actividad de enzimas antioxidantes en ratas preñadas a término y sus fetos como biomarcadores del estado oxidativo y defensa antioxidante ante estímulos provocados por xenobióticos.

El glifosato utilizado en nuestros experimentos responde al nombre comercial de Herbicygon. Los animales experimentales fueron ratas hembras Wistar del bioterio de la Universidad Nacional de San Luis. Las mismas fueron apareadas en el estadio de pro-estro del ciclo y colocadas en cajas individuales. La presencia de espermatozoides en el tracto vaginal se consideró día 1 de gestación, momento a partir del cual comenzó a administrarse glifosato al 1%. Las ratas fueron sacrificadas al día 21 de gestación. Los fetos fueron extraídos mediante histerectomía. Las ratas madres y los fetos fueron

pesados, se extrajo sangre a los fines de obtener el suero como así también el hígado. Si observó que la ingesta de glifosato en el agua de bebida produjo: significativa disminución en la cantidad de dieta consumida, agua bebida, en la ganancia de peso, y peso del hígado de las ratas preñadas, en relación a los controles que bebieron agua potable. En los fetos a término no se observaron cambios en el peso corporal ni en el del hígado. No se observaron diferencias de TBARS en el suero materno. Cuando se determinaron parámetros de daño oxidativo en hígado se observó que la administración de glifosato en el agua de bebida determinó un incremento significativo de TBARS tanto en ratas preñadas como en sus fetos. No se observaron cambios en las actividades de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, ni G6PD pero sí se observó un aumento significativo de la actividad de ICDH en el hígado de la rata preñada. En los fetos se observó un incremento significativo en la actividad de glutatión peroxidasa y una disminución de la actividad de ICDH. Los resultados sugieren que la exposición materna a glifosato durante la preñez induce una variedad de anormalidades en las actividades de enzimas relacionadas con la capacidad de protección frente al estrés oxidativo, tanto en la rata madre como en sus fetos.

The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme - a post registration monitoring programme.

***Preben Olsen¹, Jeanne Kjær and Walther Brüsch²,
Ruth Grant³***

Aarhus University, Research Centre Foulum¹, Geological Survey of Denmark and Greenland², Aarhus University, National Environmental Research Institute³

Introduction

In 1998, the Danish Government initiated the Pesticide Leaching Assessment Programme (PLAP), an intensive monitoring programme aimed at evaluating the risk of pesticide leaching under field conditions. The PLAP is intended to serve as an early warning system providing decision makers with advance warning if approved pesticides leach in unacceptable concentrations. The programme focuses on pesticides used in arable farming and monitors leaching at 5 agricultural test sites representative of Danish conditions. The objective of the PLAP is to improve the scientific foundation for decision making in the Danish registration and approval procedures for pesticides, enabling field studies to be included in risk assessment of selected pesticides. The specific aim of the programme is to analyse whether pesticides applied in accordance with current regulations leach at levels exceeding the maximum allowable concentration of 0.1 µg/l.

The Danish Government funded the first phase of the programme from 1998 to 2001, while the Ministry of the Environment and the Ministry of Food, Agriculture and Fisheries funded a prolongation from 2002 to 2009. From 2010-15 the programme is financed by The Danish Environmental Protection Agency.

The work is conducted by the Geological Survey of Denmark and Greenland (GEUS), the Danish Institute of Agricultural Sciences (DIAS) and the National Environmental Research Institute (NERI) under the direction of a management group comprising members from the participating institutions as well as the Danish Environmental Protection Agency.

Extent of the programme

The PLAP initially included six locations representing a range of Danish soil and climate conditions (Figure 1). Monitoring started 1999 on Tylstrup, Jyndevad and Faardrup and in 2000 at Silstrup Estrup and Slæggerup. Monitoring at the loamy site Slaeggerup was ended on 1 July 2003.

Agricultural management:

Cultivation of the sites is in line with conventional agricultural practices applied in the regions, whereas pesticides are applied in the maximal permitted dose in accordance with the regulations. In order to describe water transport and especially to assure that the water being sampled had infiltrated on the test field, a bromide tracer (30 kg KBr/ha) was applied on each field. In addition to data on pesticide use (dose, substance) numerous information related to the soil and crop management is being registered e.g. tillage depths, phenological crop development whenever a farming operation is conducted, local conditions regarding climate and soil at time of a pesticide application. As of now 40 pesticides and 27 relevant metabolites are included in the programme.

Monitoring:

To avoid artefact leaching of pesticides, all installation as well as soil sampling deeper than 20 cm b.g.s. have been restricted to a buffer zone surrounding the treated area (Figure 1). Precipitation is measured on all sites using a tipping bucket rain gauge as well as soil moisture (TDR) and soil temperature in various depths. Concentrations of bromide and pesticide are measured in drainage water, ground water and soil water from the unsaturated zone:

Soil water samples are collected monthly using 16 Teflon suction cups clustered in four groups installed 1 and 2 m b.g.s. at two downstream locations (see Figure 2). Each group of suction cups thus consists of four individual cups covering a horizontal distance of 2 m. The chemical analyses were performed on a single, pooled water sample for each of the four groups.

Groundwater samples are collected monthly from several monitoring wells installed in the surrounding buffer zone (Figure 2). Each monitoring well consists of four 1 m screens covering the upper approx. 4 m of the saturated zone. In addition, horizontal monitoring wells were installed 3.5 m beneath the loamy test sites. Each horizontal monitoring well consisted of 18 m screens providing integrated water samples that characterise groundwater quality just beneath the test site (Figure 2).

At the loamy sites drainage water was originally sampled by means of both flow- and time proportional sampling. From July 2004 only flow proportional samples are taken. Now sample collection starts when the accumulated flow rate exceeds a predefined volume of runoff, being dependent on the season e.g. a 200 ml sample is collected for every 3000 l of runoff during the “winter” period (1 September to 31 May) whereas only 2000 l of runoff is needed for the taking of a sample during the “summer” period (1 June to 31 July). Chemical analysis is then performed on a weekly basis on a pooled sample.

Analytical methods and quality assurance procedures:

The analyses of pesticides were all performed in commercial laboratories, accredited for analysis of pesticide by the Danish EPA. The field monitoring work has been supported by intensive quality assurance entailing continuous evaluation of the analyses employed. Every fourth month, two external control samples were analysed at the laboratories along with the various water samples from the test sites. Two stock solutions of different concentrations (0.05 µg/L and 0.117 µg/L) were prepared from two standard mixtures in ampoules prepared by Promochem, Germany. Blank samples consisting of HPLC-grade water (Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Scotland) were sent to the laboratory each month together with the water samples. All samples included in the control were labelled with coded reference numbers so that the laboratories were unaware of which samples were controls and blanks. In addition to specific quality control under the PLAP, each of the laboratories takes part in the proficiency test scheme employed by the Danish Environmental Protection Agency when approving laboratories for the Nationwide Monitoring and Assessment Programme for the Aquatic and Terrestrial Environments (NOVANA).

Data management and reporting

Data are stored in a database held at The Geological Survey of Denmark and Greenland. Once a year data are evaluated and published in an annual report available (free of charge) on www.pesticidvarsling.dk. In addition, this website most of the publications issued in relation with the monitoring programme.

Economy

Total annual cost of the programme amounts to approximately 1.100.000 €, of which one half is used for salaries and the other for working expenses (tenancy fee, analysis etc.). Pesticide analyses alone amount to 350.000 - 400.000 per year.

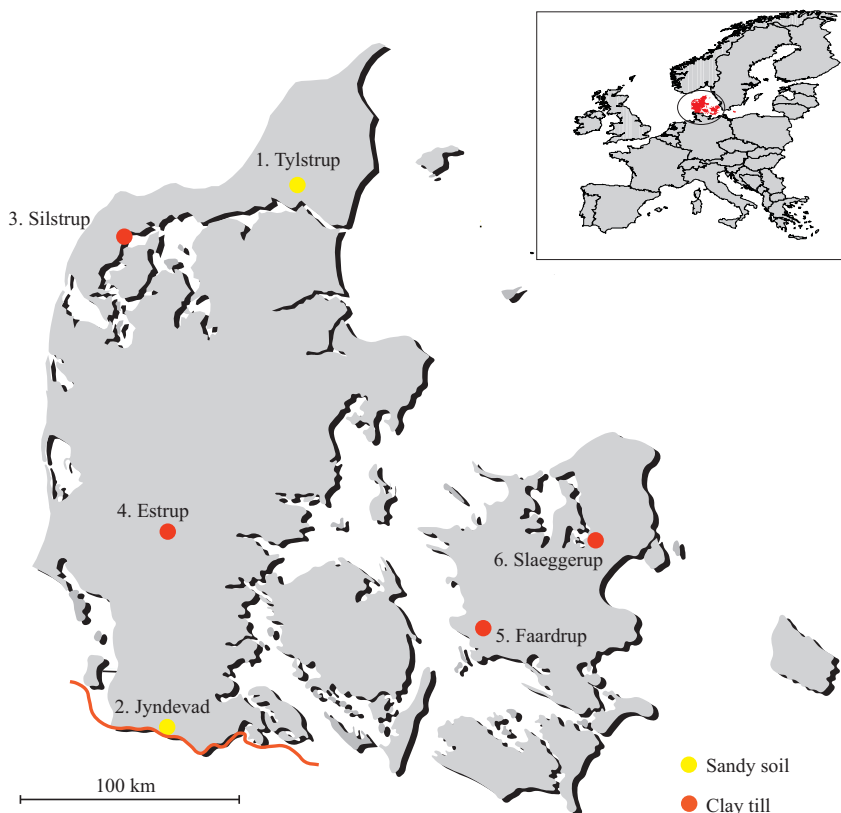


Figure1. Location of the PLAP sites Tylstrup, Jyndevad, Silstrup, Estrup and Faardrup. Monitoring at Slaeggerup was terminated on 1 July 2003.

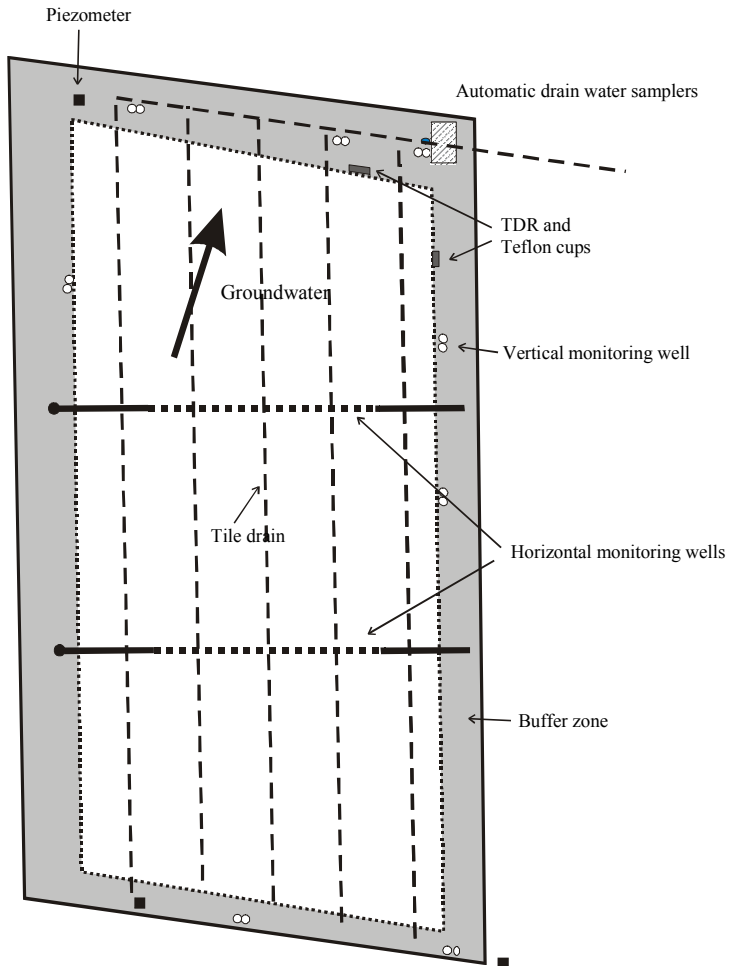


Figure 2. Overview of a tile-drained PLAP-site. The innermost area indicates the cultivated area, while the grey area indicates the surrounding buffer zone. The positions of the various installations are indicated, as is the direction of the groundwater flow (by an arrow).

Impacto de plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: Integración de estudios químico ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis al caso del glifosato

Alicia E. Ronco

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

El conocimiento sobre los impactos adversos del uso de plaguicidas en agroecosistemas de la Región Pampeana se incrementó notablemente en la última década, particularmente en relación con la expansión de cultivos genéticamente modificados, resistentes al herbicida glifosato. Sin embargo el sistema productivo se desarrolló a una velocidad mucho mayor que la generación de información científica sobre el comportamiento ambiental de los plaguicidas aplicados en los cultivos. En algunos casos con un vacío inexplicable de información. El grupo de investigación del CIMA, integradamente con otros equipos de investigación local, inició estudios sistemáticos a partir del año 2002, en el marco de un proyecto de investigación y desarrollo aprobado y financiado por la Agencia Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, titulado impacto de agroquímicos en cuencas del Bajo Paraná y Río de la Plata; proyecto disparador de diversas líneas de investigación relacionadas con la química ambiental y ecotoxicología acuática y terrestre del herbicida glifosato e insecticidas convencionales y biorracionales utilizados en el control químico de plagas. Se consolidó un grupo de investigación, con la formación de recursos humanos especializados en diversas líneas, que continua en la actualidad estudiando esta problemática por medio de diversos proyectos financiados por la misma Agencia, además de otros organismos.

Las estrategias abordadas cubrieron varios aspectos. Por una parte el desarrollo o la implementación de métodos analíticos de extracción, purificación y determinación del herbicida glifosato e insecticidas asociados al paquete tecnológico de la soja RR, en varias matrices ambientales (agua, sedimentos, suelos, material biológico), con técnicas instrumentales tradicionales y de última generación (Peruzzo et al., 2003; Marino and Ronco, 2005; Peruzzo et al., 2008; Ronco et al., 2009; Marino, 2009; Mugni et al., 2010 a y b); métodos predictivos (Marino, 2009); junto al desarrollo de estrategias integradas para la evaluación de impactos sobre la biota no blanco asociada a agroecosistemas, tanto en estudios de campo (poblaciones naturales, experimentos controlados en encierros), como en laboratorio (Ronco et al., 2009). Se han venido evaluando efectos letales y subletales sobre organismos no blanco, tales como invertebrados acuáticos (Mugni et al., 2010), peces (Carriquiriborde et al., 2007; 2009), anfibios (Natale y Ronco, 2003; Agostini et al., 2009; 2010; Vera Candioti et al., 2009) y plantas vasculares (Martin et al., 2003; Martin and Ronco, 2005; Sobrero et al., 2006; 2007 a y b; Martin and Ronco, 2009; Sobrero y Ronco, 2009), además de insectos plaga y enemigos naturales, teniendo en cuenta sistemas específicos de diagnóstico de relevancia regional (Rimoldi et al., 2008; 2009; Schneider et al., 2009).

La pampa ondulada se caracteriza por gradientes longitudinales con pendientes suaves, entre 0,4 y 0,1 %, con ríos y arroyos que atraviesan suelos bien drenados. Los sitios de estudio en esta región se seleccionaron teniendo en cuenta dos niveles de detalle. En primer lugar correspondieron a cuerpos de agua superficial de primer o segundo orden (escasa y variable profundidad entre 0,2 a 2 m, dependiente de aportes pluviales), que nacen y atraviesan zonas de cultivo de soja, con rotación de maíz o trigo, en los cuales se esperarían escenarios de alto impacto asociados a aplicaciones terrestres o aéreas de plaguicidas, ya sea por deriva o escorrentía. Estos estudios se llevaron a cabo en un afluente del Río Arrecifes y del Arroyo del Pescado (Provincia de Buenos Aires). En este caso se monitorearon sincrónicamente escenarios previos, durante y/o inmediatamente después de aplicaciones de formulaciones de glifosato y en mezclas con uno o varios insecticidas, y luego de las posteriores primera y segunda lluvias. Estos estudios se realizaron bajo una estrategia de monitoreo químico-ecotoxicológico. Otro nivel

cubrió el monitoreo de concentraciones de plaguicidas en los tramos inferiores de arroyos y ríos que desembocan en el Río Paraná inferior (del Medio, Ramallo, Arrecifes, Areco) y en la planicie costera sur del Río de la Plata (del Pescado, Arregui, Juan Blanco, el Destino).

Un diagrama de monitoreo realizado para el estudio de niveles de concentración en el ambiente (agua superficial y sedimentos) del herbicida glifosato y los insecticidas cipermetrina, clorpirifos y endosulfan en arroyos de primer orden y la valoración de efectos biológicos en poblaciones nativas y confinadas se resume en tabla 1. Los resultados de mediciones de concentración de glifosato e insecticidas permitieron detectar un comportamiento ambiental diferente en estos dos tributarios. En el del Río Arrecifes, las concentraciones de los insecticidas en agua estuvieron mayoritariamente por debajo de los límites de detección, ocasionalmente alcanzando valores cercanos entre 5 y 19 µg/l.

Un comportamiento similar se detectó para el glifosato, con niveles debajo de 1 mg/l del herbicida. Sin embargo se detectaron concentraciones de insecticidas en la mayoría de las muestras de sedimento de ese tributario (2 a 1075 µg/kg de cipermetrina; 1 a 15 µg/kg de clorpirifos; glifosato □0,5 a 5 mg/kg) (Marino and Ronco, 2005; Peruzzo et al., 2008).

Contrariamente, el tributario del A° del Pe scado, que contenía elevados niveles de material en suspensión (en coincidencia con período de sequía durante los estudios), evidenció una diferente partición de los plaguicidas. Los niveles de cipermetrina oscilaron entre 0,3 and 94 µg/l en agua total y por debajo de 1 µg/kg en sedimentos. Este insecticida permanece asociado al material en suspensión al alcanzar el cuerpo de agua en relación con la deriva durante la aplicación.

Por otra parte, en diferente estado de régimen, se detectaron concentraciones de clorpirifos entre 2,0 y 12,8 µg/kg en sedimentos y niveles desde no detectables y hasta 0,15 µg/l en agua. En este tributario, la concentración de glifosato medida asociada a los escenarios de aplicación varió entre 1,8 y 10,9 mg/l en agua sin filtrar. En general se observó buen acuerdo con las estimaciones de concentraciones esperadas en el ambiente, teniendo en cuenta cálculos de dosis de aplicación y porcentaje esperable de deriva (Sobrero et al., 2007). Por otra parte, los estudios en los sectores inferiores de cuencas que desembocan en el Río Paraná y Río de la

Plata, evidencian concentraciones detectables de cipermetrina, clorpirifos y glifosato, en relación con épocas de cultivo. Para el caso de glifosato, durante el período de estudio, los niveles detectados en agua fueron menores a 1 mg/l y cercanos a 2 mg/kg en sedimentos.

Los impactos sobre la biota en estudios de campo para peces y anfibios según resumen en la tabla 1, permitieron determinar los siguientes escenarios. No se observaron muertes generalizadas de peces en arroyos, asociados con la aplicación terrestre de glifosato o de la mezcla glifosato+cipermetrina; siendo moderados y severos para la aplicación terrestre de la mezcla glifosato+cipermetrina+clorpirifos y en la aplicación de endosulfán+glifosato, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en simultáneo de los experimentos en encierros con la especie *Cnesterodon descenmaculatus*. Otra observación adicional, indica que no se detectan cambios en parámetros poblacionales de esa especie, asociados con aplicación de glifosato y la mezcla de éste con cipermetrina (Carriquiriborde et al., 2007; Ronco et al., 2008).

Sin embargo, investigaciones de campo con anfibios indican efectos leves, moderados y severos en relación con la aplicación de glifosato sólo, la mezcla de éste con cipermetrian y clorpirifos, y la correspondiente a endosulfan, respectivamente. Estos resultados, cuentan con buen acuerdo con los experimentos en encierros con *Hypsiboas pulchellus* y *Chaunus arenarum*, tanto un día después de la aplicación como luego de la primera lluvia (Natale y Ronco, 2003; Agostini et al., 2010 a y b). Los estudios con invertebrados

Evento de aplicación en relación a tributario	Plaguicidas aplicados en cultivo				Días después de la primera lluvia luego de aplicación (mm)	Tipo de evaluación realizada
	Glifosato	Cipermetrina	Clorpirifos	Endosulfan		
Tributario del Río Arrecifes						
Primer año						
Primavera, post-emergencia	1500 g/ha	100 ml/ha	-	-	17; 57	Poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas. Invertebrados confinados.
Verano, pre-fructificación	1000 g/ha	-	1000 ml/ha	-	8; 67	Flora y poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas. Invertebrados confinados.
Segundo año						
Verano, post-emergencia	1000 g/ha	100 ml/ha	-	-	20; 80	Poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas.
Verano, post-fructificación	1000 g/ha	100 ml/ha	800 ml/ha	-	9; 34	Flora y poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas.
Tributario del A° del Pescado						
Primer año						
Primavera, pre-emergencia	2000 ml/ha				Sin evaluación escorrentía (**)	Poblaciones de peces nativas y confinadas.
Verano, post-emergencia			800 ml/ha		Sin evaluación escorrentía (**)	Poblaciones de anfibios nativas y confinadas.
Verano, post-emergencia	1000 g/ha				Sin evaluación escorrentía (**)	Flora nativa y confinada.
Verano, post fructificación (*)		150 ml/ha		700 ml/ha	Sin evaluación escorrentía (**)	Poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas.
Segundo año						
Verano, post fructificación (*)		150 ml/ha		700 ml/ha	Sin evaluación escorrentía (**)	Poblaciones de peces y anfibios nativas y confinadas.

Tabla 1: Tipo de estudio en tributarios asociado con aplicaciones específicas de plaguicidas en sitios de cultivo y eventos de lluvia. Las formulaciones de plaguicidas utilizados fueron Roundup®Max o Roundup®Full para Glyphosate; Sherpa para Cypermethrin; Shooter o Lorsban para Chlorpyrifos y Thionex-L® para Endosulfan

Los impactos de aplicaciones de mezclas que contenían glifosato sobre plantas vasculares en estudios de campo (franja riparia y macrófitas acuáticas), indican efectos en el contenido de clorofila, biomasa, cobertura y abundancia. Asociado a la deriva del herbicida se evidenciaron efectos adversos hasta 200 m aguas abajo en momentos donde se realizaban aplicaciones en sectores de cultivo (Martin et al., 2003; Sobrero et al., 2007). El seguimiento de comunidades riparias a lo largo de un año, luego de aplicaciones reiteradas de glifosato a concentraciones esperadas en el ambiente por deriva, muestran un decrecimiento significativo de la diversidad, con reversión del proceso a partir de dos meses luego de tratamientos, con disminución del porcentaje de especies en flor y fruto (Martin, 2010). Los experimentos de laboratorio con el principio activo del herbicida y formulados sobre distintas etapas de desarrollo y respuestas fisiológicas en plantas, indican efectos adversos sobre diversas especies de semillas y macrófitas acuáticas, como por ejemplo impactos en arquitectura de colonias de lemnáceas, efectos en la germinación de granos de polen y elongación de tubo polínico de duraznillo blanco (Martin and Ronco, 2005; Sobrero et al., 2007; Martin, comunicación personal).

El estudio de los efectos del glifosato como principio activo y formulado y la contribución a la toxicidad de un tensoactivo, ingrediente de la formulación de Roundup Max (POEA), permitió valorar de manera diferencial los efectos en ensayos de toxicidad de laboratorio con celenterado, anfípodos, anfibios, plantas vasculares; detectándose una contribución mayor a la toxicidad del principio activo en plantas y celenterado de agua dulce y de los ingredientes de la formulación en los otros organismos.

Se puede concluir que los resultados de estos estudios indican presencia de plaguicidas en cuerpos de agua superficial asociados al manejo de cultivos. La evaluación de efectos en todos los componentes de la biota de ecosistemas estudiados (flora, invertebrados, peces y anfibios), señalan existencia de diferente grado de afectación en relación a las aplicaciones, lo cual representa un grado apreciable de estrés. Se observaron efectos desde drásticos a leves, siendo estos últimos en mayor grado en la vegetación. Se reveló buena consistencia entre los resultados de estudios de laboratorio y los de campo. La presencia de plaguicidas en el medio muestra un comportamiento pulsátil con variable grado de disipación

en función del tipo de compuesto. La escorrentía superficial contribuye con mayores aportes a los cuerpos de agua respecto a deriva durante aplicaciones. Entre los aspectos que influyen la llegada de plaguicidas a los cuerpos de agua, la densidad y altura de la vegetación riparia y acuática, así como el estado de crecimiento del cultivo, representan barreras que contribuye a mitigar los impactos de los plaguicidas. Una aproximación integrada de análisis aparece como buena opción para comprender el impacto global que el cultivo intensivo de soja produce en cuerpos de agua superficial de agroecosistemas. Las buenas prácticas de conducción y el mantenimiento de ambientes riparios deberían ser considerados dentro de objetivos de manejo sostenible de la producción a largo plazo. Estas evidencias, junto a la magnitud de la escala de uso de glifosato e insecticidas en el actual sistema productivo y la superficie cultivada a nivel regional, además de la escasa información sobre los potenciales impactos del uso sostenido de plaguicidas, requieren urgente atención e intervención.

Referencias

- Agostini G, G. Natale, A. Ronco, 2009. Impact of endosulfan and cypermethrin mixture on amphibians anurans under field use for biotech soy bean production. *International Journal of Environment and Health*: 3: 379-389.
- Agostini MG, G.S. Natale, A.E. Ronco, 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. En prensa, *Ecotoxicology*.
- BerkovicA, D Marino, P Lespade, A Ronco, 2006. Análisis de pesticidas asociados al cultivo de soja en aguas y sedimentos de un sector productivo de la pampa ondulada. *Anales XXVI Congreso Argentino de Química*, 8-053, 4 pp.
- Carriquiriborde P, Díaz J, Mugni H, Bonetto C, Ronco AE, 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field use in biotec-soybean production. *Chemosphere*, 68: 613-621.
- Carriquiriborde P, J Díaz, GC. López, AE. Ronco, GM. Somoza, 2009. Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation and gonadal developmental

- stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere*, 76: 374-380.
- Marino D and Ronco A, 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75:820-826.
- Marino D, 2009. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Martin ML, 2010. Tesis doctoral (en evaluación). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Martin ML y Ronco AE, 2009. Impacto del herbicida glifosato sobre la germinación de especies indicadoras de fitotoxicidad. *Química y Toxicología Ambiental en América Latina*. Ed J. Herkovits. SETAC LA, Buenos Aires, p 68-69.
- Martin ML, Ronco AE, 2006. Effects of Mixtures of Pesticides Used in the Direct Seeding Technique on Non-Target Plant Seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 228-236.
- Martin ML; C Sobrero; C Rivas, F Rimoldi; A Ronco, 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco. *Flora riparia y acuática. Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Agua 2003, Cartagena de Indias*. p 27-31.
- Mugni H, 2009. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Mugni H, A. Ronco, C. Bonetto, 2010. Insecticide toxicity in runoff and stream water within a soybean field (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.030.
- Mugni H, P. Demetrio, D. Marino, A Ronco, C. Bonetto, 2010. Toxicity Persistence Following an Experimental Cypermethrin and Chlorpyrifos Application in Pampasic Surface Waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(5).
- Natale G, A Ronco, 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco: Anuros autóctonos. *Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Agua 2003, Cartagena de Indias*. p 36-39.
- Peruzzo P, D Marino, C Cremonte, M da Silva, A Porta, A Ronco, 2003. Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos

asociado a cultivos por siembra directa, Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Agua 2003, Cartagena de Indias. p 135-142.

- Peruzzo, P.J. A.A. Porta, A.E. Ronco, 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in North pampasic region of Argentina. P.J. Peruzzo, A.A. Porta, A.E. Ronco, Environmental Pollution 156:61-66.
- Rimoldi F, M Schneider, A Ronco, 2008. Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. Environmental Entomology, 37: 1252-1257.
- Rimoldi F., Schneider M., Martinez A.M. y Ronco A.E., 2006. Estudios ecotoxicológicos de insecticidas utilizados para el control de plagas de la soja, sobre huevos del predador generalista *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) en laboratorio. Resumen expandido. X Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Tapachula, Chiapas, México. ISBN: 970-9712-22-5. p 117:119.
- Ronco, A; P. Carriquiriborde, G. S. Natale, M.L. Martin, H. Mugni, C. Bonetto, 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. En: Ecosystem Ecology Research, Nova Publishers, ISBN 978-1-604561-83-8, p. 209-239.
- Schneider M, N Sánchez, S Pineda, H Chi, A Ronco, 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological Approach. Chemosphere, 76: 1451-1455.
- Sobrero M. C., F. Rimoldi and A. E. Ronco, 2007 a. Effects of the Glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 7: 537-543.
- Sobrero MC, M L Martin, A Ronco, 2007 b. Efecto del herbicida Roundup® Max sobre especies de plantas acuáticas no blanco. Hidrobiológica, 17:1-10.
- Sobrero, MC; Rimoldi, F; Ronco AE, 2006. Sensibilidad de *Lemna gibba* a herbicidas. Respuesta al principio activo glifosato. Libro SETAC-LA2003 p 79-81.

Vera Candioti J, GS. Natale, S Soloneski, AE. Ronco, ML. Larramendy, 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®, Chemosphere, 78(3):249-255.

Transporte de glifosato en el perfil un suelo del sudeste bonaerense

José Luis Costa¹, Virginia Aparicio¹, Manuel Zelaya¹, Valeria Gianelli¹ y Francisco Bedmar²

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Balcarce. Ruta 226, km 73.5, Buenos Aires, Argentina.

² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Ruta 226, km 73.5, Buenos Aires, Argentina.

Introducción

El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo. El riesgo de lixiviación de glifosato es generalmente considerado muy bajo, principalmente porque varios estudios han demostrado que es biodegradable y fuertemente adsorbido en suelos superficiales (Rueppel et al, 1977; Jonge y de Jonge, 1999; Aamand y Jacobsen, 2001). Por otra parte, la USEPA (1993) ha informado que los valores de K_d de glifosato oscilan entre 62 y 175 L kg⁻¹.

En una revisión de Geisy et al. (2000), los valores de tiempo de disipación (DT50) de glifosato fueron reportados para una variedad de tipos de suelo. Los valores DT50 con medidas obtenidas en laboratorio, son inferiores a 60 días, mientras que los generados por la disipación en estudios de campo están en el rango de 1 y 197 d, respectivamente.

Los estudios de transporte de glifosato en laboratorio, sugieren que el riesgo de lixiviación en el suelo es bajo (Sprankle et al, 1975; Roy et al, 1989; Cheah et al, 1997). Si bien los datos generados en el laboratorio son muy importantes, proporcionan escasa o nula información sobre la variabilidad inherente de los parámetros del suelo que afectan a la lixiviación en la escala de campo. Esto es de particular importancia para los suelos estructurados, donde el flujo preferencial puede tener un impacto importante en la lixiviación (Kjaer et al., 2005). De hecho, diversos estudios de campo sugieren que el transporte preferencial de varios plaguicidas ocurre a una profundidad de 1 m (Brown et al, 1995; Flury, 1996; von Kordel et al, 1997; Zehe y

Flühler, 2001; Kladvik et al, 2001; Petersen et al, 2002). Los estudios de campo aún son escasos, probablemente por su complejidad.

En Argentina se produjo una importante intensificación de la agricultura que mejoró la rentabilidad de los sistemas de producción. Esta intensificación fue acompañada por la adopción de la siembra directa (SD) y el reemplazo de la energía mecánica por la energía química para el control de malezas. En el mercado nacional, el 62% del total de plaguicidas corresponde a los herbicidas y dentro de este grupo, el glifosato solo representa el 42% de ese mercado, expresado en millones de dólares para el año 2009 (CASAFE, 2010).

El objetivo de éste trabajo fue estudiar el transporte vertical de glifosato y bromuro, utilizado como trazador, en el perfil del suelo.

Materiales y Métodos

El ensayo constó de 7 parcelas de 3,5 m de ancho y 10 m de longitud. En cada parcela se colocaron tres tubos de PVC, que contenían una cápsula de cerámica en el extremo inferior y un tapón de goma en el extremo superior. El tapón de goma tenía dos orificios donde se conectaron mangueras flexibles de 5 mm de diámetro. Una de las mangueras se utilizó para realizar absorción y estaba conectada a un sistema de vacío centralizado, mientras que con la otra se realizaba la extracción de la muestra desde la cápsula de cerámica, mediante un sistema de vacío individual. Las cápsulas se ubicaron a 1, 1.5 y 1.9 m de profundidad en cada parcela.

El sistema de riego fue por microaspersión y el flujo de agua (q) = 11 mm h⁻¹.

La aplicación del pulso de bromuro y de glifosato se realizó con una bomba peristáltica conectada a la manguera de riego. La medición del contenido hídrico del suelo (θ) se realizó con sonda de neutrones para verificar el estado de equilibrio en el flujo a estudiar.

La aplicación de cada soluto se realizó en dos momentos diferentes. La secuencia de actividades para cada aplicación fue la siguiente: primero se procedió a calcular el q con datos de precipitación instantánea; luego se realizó una extracción de la solución del suelo, considerada como blanco y al finalizar la misma se realizó la aplicación de un pulso de Br- disolviendo 10 kg de BrK en 20 L de agua y otro pulso de Glifosato diluyendo 336 ml de producto

comercial al 35.6% de equivalente ácido (Glifosato Atanor II) en 5.5 L de agua.

El Br⁻ fue determinado en el laboratorio de Salinidad de Suelos y Aguas de la EEA INTA Balcarce empleando un analizador expansible de iones (EA-940 Orion), provisto de un electrodo específico para Br⁻ con un límite inferior de detección de 0,0005 mmol ⁽⁺⁾ l⁻¹ en 20 ml de la muestra.

El glifosato fue determinado en el Laboratorio de Pesticidas de la EEA INTA Balcarce empleando un cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC Waters ®) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Quattro Premier XE) (UPLC-MSMS),

Se utilizó el programa CXTFIT 2.1 (Toride et al., 1999) para ajustar las curvas de paso de glifosato y Br⁻.

Resultados y Discusión

Caracterización del suelo

El perfil de suelo tiene una profundidad que supera los 70 cm, cuyos horizontes principales son franco y franco arcilloso (Tabla 1). Además, este suelo posee un horizonte superficial de 30 cm de espesor, rico en carbono orgánico (CO).

Tabla 1. *Espesor, contenido de arcilla, limo y arena, contenido de carbono orgánico (CO), densidad aparente (δ_a), porosidad (ϕ) y conductividad hidráulica (K-30) para los principales horizontes del suelo estudiado.*

Hz	Espesor	As	Li	Ar	CO	δ_a	ϕ	K(-30)
	cm	%			g kg ⁻¹	Mg m ⁻³	%	mm h ⁻¹
A	0-30	28	46	27	38	1.15	57	18.7
B	30-70	33	40	27	15	1.27	52	16.6
C	+ 70	26	45	28	5	1.35	49	26.8

El agua útil que se puede almacenar en el primer metro de profundidad es aproximadamente 160 mm y la densidad aparente (δ_a) y porosidad (ϕ) muestran buena capacidad de aereación y circulación de agua.

Curvas de Paso de glifosato y Br⁻

Se estimaron los parámetros de transporte empleando el modelo de Convección Dispersión (CDE) con las concentraciones relativas de Br⁻ y glifosato en función del tiempo.

Como ejemplo se muestran en la Figura 1 las concentraciones relativas de glifosato que se lixiviaron de dos de las parcelas para las profundidades de 100 y 190 cm y su ajuste por CXTFIT. Es importante destacar la gran variabilidad que existe en los parámetros de flujo tanto de dispersión como de velocidad entre parcelas, lo cual se muestra a modo de ejemplo en estas dos parcelas (Figura 1).

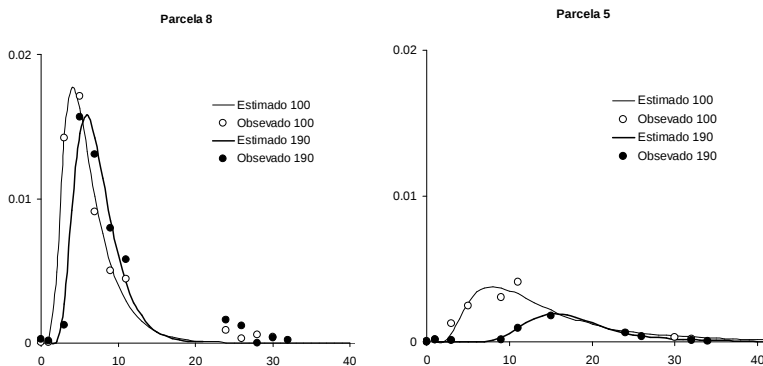


Figura 1. Valores observados y estimados correspondientes a las profundidades de 100 y 190 cm.

Al comparar las curvas de paso de glifosato y Br⁻ (Figura 2) (tiempo de aplicación (t_0): Br⁻ $t_0=1.5$ h, glifosato $t_0=0.38$ hs), podemos observar que los picos de concentración de ambos son muy cercanos, no observándose la existencia de algún factor de retardo (R). Tal situación se comprobó al estimar la curva de paso con CXTFIT, dado que el factor R calculado para ambos fue de uno. Esto indicaría que no habría existido retención para glifosato al ser transportado. Es probable que cuando se inyectó el pulso de glifosato, bajo flujo constante y estando el suelo ya parcialmente saturado, todo el transporte se haya producido bajo flujo preferencial. El agua que ingresó en el momento de aplicación del pulso de glifosato sólo estuvo en contacto con los macroporos. Por esta razón, el glifosato que estaba diluido en ese pulso, presumiblemente tuvo

contacto con una superficie muy pequeña del suelo por lo que su absorción fue por lo tanto baja. De confirmarse esta situación, se apoyaría la hipótesis de que en suelos estructurados con alta proporción de macroporos y cuando el suelo se encuentra cercano a saturación el glifosato es transportado básicamente por el agua móvil (Kjaer et al., 2005).

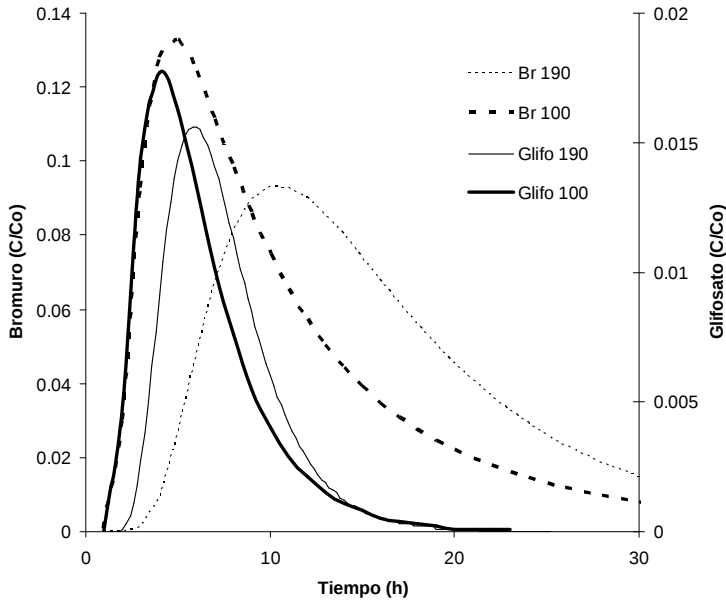


Figura 2. Valores de concentración relativa de Glifosato y Br-, estimados por CXTFIT, para las profundidades de 100 y 190 cm.

En suelos arcillosos, bien estructurados y con un flujo de agua de 11 mm h^{-1} el glifosato se lixivió en concentraciones promedio de $203 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. Estas concentraciones son superiores al límite máximo de plaguicidas de $0,1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, permitido por la Unión Europea para el agua potable (Tabla 2). Las pérdidas en promedio fueron de 39 g ha^{-1} de glifosato para una aplicación de 8 l ha^{-1} .

Tabla 2. Concentración máxima y masa de glifosato que pasaron las

profundidades de 100, 150 y 190 cm cuando se aplicó el equivalente a 8 l de producto comercial y se regó con un flujo constante de 11 mm h⁻¹ de agua.

Profundidad	Concentración	Glifosato
cm	□ g l ⁻¹	g ha ⁻¹
100	211	39
150	245	41
190	155	36

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten establecer que glifosato se lixivió a través del perfil de un suelo estructurado, bajo flujo saturado y constante, lo cual representaría un riesgo potencial de contaminación del agua subterránea.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias a INTA a través del proyecto de investigación AEGA 221641, a la AGENCIA-SECYT a través del PICT 2007-00448

Bibliografía

- Amand, J., and O.S. Jacobsen. 2001. Sorption and degradation of glyphosate and dichlobenil in fractured clay. p. 205–210. In A. Walker (ed.) Pesticide behaviour in soils and water. Symp. Proc. 78, Brighton, UK. 13–15 Nov. 2001. British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Brown, C.D. 1995. Movement of pesticides to surface water from a heavy clay soil. Pestic. Sci. 43:131–140.
- CASAFE, 2010. (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). www.casafe.org.
- Cheah, U.-B. 1997. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. Pestic. Sci. 50:53–63.
- De Jonge, H. 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. Chemosphere 39:753–763.

- Flury, M. 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soil—A review. *J. Environ. Qual.* 25:25–45.
- Geisy, J.P. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Toxicol.* 167:35–120.
- Kladivko, E.J. 2001. Pesticide transport to subsurface tile drains in humid regions of North America. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31:1–62.
- Kjaer, J., Olsen P., Ullum, M and Grant, R., 2005. Leaching of Glyphosate and Amino-Methylphosphonic Acid from Danish Agricultural Field Sites. *Vadose Zone Processes and Chemical Transport*.
- Petersen, C.T. 2002. Movement of pendimethalin, ioxynil and soil particles to field drainage tiles. *Pest Manage. Sci.* 59:85–96.
- Roy, D.N. 1989. Persistence, movement, and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils. *J. Hydrol. (Amsterdam)* 37:437–440.
- Sprinkle, P. 1975. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23:229–234.
- Toride N, FJ Leij, MTh van Genuchten. 1999. The CXTFIT code for Estimating Transport Parameters from Laboratory or Fiel Tracer Experiments. Version 2.1. Research Report n° 137. US Salinity Laboratory. Agricultural Research Service. US Deptatment of Agriculture. Riverside, California. 119 pp
- USEPA. 1993. Reregistration eligibility decision (RED): Glyphosate. EPA 738/R-93/014. USEPA Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC.

Pérdidas de Glifosato por Drenaje y Esgurrimiento y Riesgo de Contaminación de Aguas

***Carolina. Sasa¹, Adrian E. Andriulo², Marcelo G. Wilson¹,
Silvina I. Portela²***

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, (1) EEA Paraná (2) INTA EEA Pergamino

El glifosato (N-fosfonometil glicina) es el herbicida más utilizado a escala mundial para el control de malezas en áreas agrícolas y urbanas (Borggaard, Gimsing 2008). Es un herbicida organofosforado de acción sistémica postemergente que aplicado sobre el follaje es asimilado por las hojas y rápidamente translocado (Sprankle et al., 1975). Su acción no selectiva y de amplio espectro, se basa en la inhibición de la síntesis de aminoácidos esenciales. En el suelo es adsorbido mediante uniones fosfato y degradado por microorganismos.

Esto determina una escasa movilidad tanto del glifosato como de su principal metabolito, el ácido amino metil fosfónico (AMPA). Sin embargo, estudios de lixiviación y esgurrimiento indican que el glifosato puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo debido al flujo preferencial por macroporos o hacia cursos de agua superficiales cuando su aplicación se realiza en momentos anteriores a lluvias intensas (Petensen et al., 2002; Jaynes et al., 2001; Elliot et al., 2000; Villholth et al., 2000 y Flury 1996).

La agricultura argentina se está tornando cada vez más especializada y homogénea. En efecto, el esquema de producción a partir de la década del 90 se caracteriza por grandes superficies bajo siembra directa continua (SD) y alta proporción del cultivo de soja. En el país, la superficie destinada a este cultivo se ha casi duplicado en los últimos 10 años llegando a los niveles récord de producción de 47,5 millones de toneladas en la campaña 2007/2008 (SAGPYA, 2008). El uso casi exclusivo de variedades transgénicas de soja está ligado al uso del herbicida glifosato. Esto justifica la necesidad de evaluar el impacto ambiental que genera su uso en esta región.

Peruzzo et al. (2008) registraron recientemente concentraciones de glifosato de 0,10 a 0,70 mg l⁻¹ en 4 cursos de agua del área agrícola de la Pampa Ondulada argentina y Arregui et al. (2004) lo detectaron en tejidos y granos de soja transgénica de la misma región.

Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de la acción del glifosato sobre las malezas y su inocuidad para el cultivo transgénico, la comprensión de sus vías de degradación ambientales (persistencia y destino después de cumplir con su efecto fitotóxico) permanece incompleta. Por otro lado, la evaluación del riesgo de contaminación debido a prácticas agrícolas sobre el agua es compleja. Sólo será factible identificar si existen impactos ambientales negativos y controlarlos si se conocen las características del flujo subterráneo y superficial en términos de su funcionamiento en el tiempo y el espacio. Por ello, el estudio de los cambios en la calidad del agua debidos a prácticas agrícolas requiere unidades experimentales de evaluación y monitoreo adecuadas. En efecto, existe poca información sobre las pérdidas de glifosato a través de los excedentes hídricos, monitoreo en aguas superficiales y subterráneas y más aún sobre su acumulación en grano. Cuantificar estas pérdidas y conocer su dinámica aportaría información sobre aspectos relacionados con el mejor momento de su aplicación para tener un menor impacto sobre el ambiente.

Pérdidas de Glifosato Por Drenaje y Esgurrimiento

El estudio fue realizado en dos Estaciones Experimentales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ubicadas en la Pampa Ondulada (Argentina): Pergamino en la provincia de Buenos Aires (33° 51 ' S; 60° 40 ' O) y Paraná en la provincia de Entre Ríos (31° 51' S; 60° 31' O).

Para medir drenaje se utilizaron tres cajas lisimétricas de hormigón armado (lisímetros cerrados y de gravedad) ubicadas en la Estación Experimental de Pergamino. Cada lisímetro tiene una superficie de 10 m² (3,3 x 3,3 x 1,4 m de profundidad) y no presentan pendiente. Las cajas lisimétricas fueron construídas en 1969 y rellenas con un Argiudol típico de la serie Pergamino, respetando la secuencia, el espesor y la densidad aparente de cada uno de los horizontes del perfil. Los perfiles se apoyan sobre un lecho filtrante de arena y grava que deriva el agua hacia un tubo de salida para recoger

el drenaje a la profundidad de 1,4 m. Para medir escurrimiento se utilizaron tres parcelas de 100 m² (4x25 m y 3,5% de pendiente), construidas en la Estación Experimental Paraná en 1970, sobre un Argiudol ácuico de la serie Tezanos Pinto bajo SD Desde 1990.

En ambos dispositivos se sembró soja (*Glycine max* (L) Merr.) transgénica en el mes de noviembre. En Pergamino se realizó una aplicación de glifosato un mes antes de la siembra (7-10-02) y otra en post-emergencia (28-11-02). En Paraná se realizó la primera aplicación de glifosato en pre-siembra (27/09/06) y luego dos más en pre (14/11/06) y post-emergencia (11/12/06). Todas las aplicaciones tuvieron una dosis de 3 l ha⁻¹ de glifosato (p.a. 48%) sal de isopropilamina.

Se analizaron datos de las campañas 2002/2003 en Pergamino y 2006/2007 en Paraná, que tuvieron precipitaciones anuales de 1433 y 1574 mm, respectivamente (~50% superiores al promedio histórico en ambos casos). Después de cada lluvia que produjo drenaje o escurrimiento se midió su volumen y se extrajo una muestra para determinar la concentración de glifosato y su metabolito AMPA. En Pergamino se registró un evento de drenaje antes de la primera aplicación, 5 entre la primera y segunda aplicación y 5 entre la segunda aplicación y la cosecha. En Paraná se agruparon las muestras de agua de escurrimiento y se analizaron glifosato y AMPA en 7 momentos del ciclo del cultivo. A la cosecha se analizó glifosato en grano sólo en Pergamino. Para ello, se extrajeron muestras de tallos, vainas y granos en cada lisímetro.

Las muestras de agua y tejidos vegetales se analizaron con HPLC con derivatización post-columna y detección por fluorescencia (límite de detección: 0,05 µg l⁻¹ en agua y 0,02 mg kg⁻¹ en grano). Las determinaciones se realizaron en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (CONICET-UNL). La cantidad de glifosato en agua de drenaje y/o escurrimiento se calculó como el producto del volumen drenado o escurrido por la concentración medida en el agua de drenaje o escurrimiento del mismo evento y se expresó en µg ha⁻¹.

En Pergamino, se detectó glifosato en el agua de drenaje en tres fechas de muestreo con concentraciones medias que variaron entre 8,8 y 12,8 µg l⁻¹ (Figura 1). Entre la primera y la segunda aplicación de glifosato se registraron 340 mm de lluvia, de los cuales 90 se perdieron por drenaje profundo. La presencia de vías de flujo

preferencial y en particular de macroporos, común en suelos muy estructurados y conducidos bajo SD, favoreció la lixiviación de glifosato. Entre la segunda aplicación de glifosato y la cosecha se registraron 688 mm de lluvia y 60 mm de drenaje, pero no se detectó glifosato en el agua de drenaje. Esto se atribuyó a la intercepción del glifosato aplicado en post-emergencia del cultivo de soja.

La cantidad de glifosato lixiviada representó entre 0,03 y 0,6% del aplicado. Las elevadas precipitaciones del período evaluado también produjeron pérdidas de agua por escurrimiento estimadas en 80 mm para condiciones de cultivo y suelo similares a las de los lisímetros (Portela et al., 2009). El 70% de estas pérdidas se concentraron en el mes de octubre (presiembr) y seguramente contribuyeron a incrementar las fugas de glifosato hacia arroyos. De modo que las cantidades de glifosato lixiviadas podrían estar sobreestimadas por el aumento en el volumen de agua drenado en ausencia de escurrimiento superficial en los lisímetros.

En general, en todos los momentos de muestreo la variabilidad de las concentraciones de glifosato resultó muy elevada y estuvo condicionada por la imposibilidad de aumentar el número de repeticiones debido a las características de las unidades experimentales.

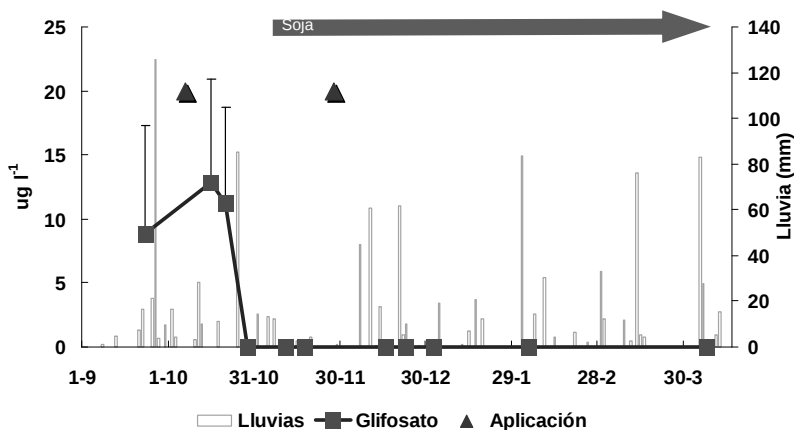


Fig. 1. Lluvias registradas en presiembra y durante el cultivo de soja (2002/2003) en Pergamino (barras) y concentración de glifosato en el agua de drenaje (línea). Los triángulos indican los momentos de aplicación de glifosato. La flecha superior indica el ciclo de la soja.

En Paraná el registro de lluvias durante la campaña 2006/2007 fue muy elevado con respecto al promedio anual histórico (>50%). Desde la aplicación de glifosato en presiembra hasta finalizar el ciclo del cultivo llovieron 1430 mm y el 10% se perdió por escurrimiento (88% de los eventos).

En tres fechas de muestreo se registraron concentraciones de glifosato en el agua escurrida en un rango de 1 a 12 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 2). Las concentraciones de glifosato y AMPA del agua escurrida antes e inmediatamente después de la siembra fueron 6,47-8,27 y 3,61-5,20 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente. Un mes después de la siembra del cultivo las concentraciones registradas fueron bajas (0,07-3,63 y 0,36-0,87 $\mu\text{g l}^{-1}$ para glifosato y AMPA, respectivamente). Dos y tres días después de la segunda y tercera aplicación del herbicida se registraron lluvias de 73 y 91 mm, respectivamente, que produjeron escurrimiento que contenía glifosato. Screpanti et al (2005) detectaron picos de altas

concentraciones de glifosato ($\sim 16 \mu\text{g l}^{-1}$) en eventos de escurrimiento ocurridos 1 día después de la aplicación del herbicida.

La concentración media de AMPA en el agua de escurrimiento fue similar a la de glifosato. Todos los muestreos registraron su presencia y hubo dos fechas de muestreo que presentaron concentraciones en un rango de 1 a $6 \mu\text{g l}^{-1}$, evidenciando la rápida velocidad de transformación del glifosato.

Las cantidades de glifosato y AMPA perdidas en el agua de escurrimiento durante el período de estudio, fueron muy bajas, menores al 0,05% de las cantidades aplicadas al cultivo de soja. Screpanti et al. (2005) también cuantificaron las pérdidas de glifosato con el agua de escurrimiento con respecto a las cantidades de ingrediente activo aplicadas y obtuvieron resultados muy inferiores a los nuestros (0.064‰). En Entre Ríos, Díaz et al. (2008) analizaron muestras de agua superficial obtenidas en más de treinta represas para riego y no detectaron glifosato ni su metabolito AMPA.

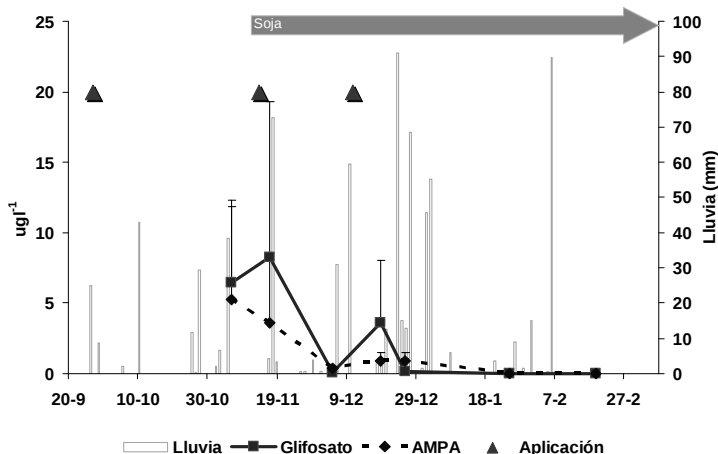


Fig. 2. Lluvias registradas en presiembra y durante el cultivo de soja (2006/2007) en Paraná (barras) y concentración de glifosato y AMPA en el agua de escurrimiento (líneas). Los triángulos indican los momentos de aplicación de glifosato. La flecha superior indica el ciclo de la soja.

La aplicación en post-emergencia del cultivo de soja en Pergamino se detectó con elevada variabilidad en la biomasa aérea

(grano, vainas y tallos) presentando concentraciones inferiores al límite de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ establecido por la USEPA (Tabla 1). La presencia de glifosato en la biomasa aérea representó 0,0005-0,001% de la cantidad aplicada en post-emergencia.

Tabla 1. *Concentración y cantidad de glifosato en grano, vaina y tallo de soja transgénica a la cosecha del cultivo en Pergamino.*

Parte de la planta	Glifosato	
	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cantidad ($\mu\text{g ha}^{-1}$)
Granos	2,8 $\pm$ 2,5	10 $\pm$ 9
Vainas	12,4 $\pm$ 17,6	86 $\pm$ 45
Tallos	9,9 $\pm$ 4,2	49 $\pm$ 23

Riesgo de contaminación de Aguas

En función de las dos vías de aporte difuso de glifosato visualizadas desde agrosistemas hacia el agua: lixiviación y escurrimiento, se propuso como objetivo analizar cambios en la concentración de glifosato del agua de un embalse y de una napa freática en una microcuenca.

El sitio de estudio fue un lote agrícola sembrado con maíz en la campaña 2009/10, de 16 ha con un embalse de 1 ha situado en la EEA Paraná del INTA, Entre Ríos, Argentina. El suelo es Argiudol ácuico de la serie Tezanos Pinto. El lote presenta dos laderas con pendientes de 4% (oeste) y 8% (este) que desaguan a un canal central conectado con el embalse (tajamar). La microcuenca (relevada topográficamente) que alberga al lote en estudio tiene una superficie total de 29 ha e incluye además un lote de soja de 13 ha,

cuyo desagüe se conecta a través de una alcantarilla con el canal central del lote en estudio.

En diciembre de 2008 se instaló una unidad de monitoreo de calidad de agua. Se realizaron 8 pozos (3 alrededor del embalse –bajo-, 3 en posiciones medias de ambas laderas –medio- y 2 en la posición alta del lote –alto-) perforados para monitoreo del nivel freático de una napa colgante cercana a la superficie de flujo local (Figura 3). Los pozos denominados 1, 2 y 3 se ubican en la posición baja del lote de estudio (97.33 m snm, 97.91 m y 98.91 m, respectivamente), 4, 5 y 7 en posición media (100.7 m, 102.85 m y 105.96 respectivamente), y 6 y 9 en posición alta (105.5 m y 109.23, respectivamente). El pozo 8 (de referencia) se ubica a 103.97 m snm en el Observatorio Agrometeorológico de la Estación Experimental, situado a 650 m de la microcuenca, donde fueron registradas las precipitaciones. Se colocó una regla para medir el nivel de agua superficial en el embalse.



Figura 3. Mapa de la microcuenca y localización de los pozos.

La secuencia de cultivos en el lote bajo estudio es maíz-trigo/soja de segunda siembra bajo siembra directa continua y durante el período de muestreo tuvo la fase maíz. El maíz se sembró el 15/09/09 y se fertilizó con 14 kg ha⁻¹ de P y 92,6 kg ha⁻¹ de N. Se realizaron aplicaciones de sulfosato (glifosato p.a. 62%) el 20/08/09 (2 l ha⁻¹) y el 21/09/09 (1,5 l ha⁻¹). En el lote de soja se aplicaron 2 l ha⁻¹ de sulfosato el 15/12/09 y 2,5 l ha⁻¹ de glifosato (p.a. 46%) el 15/01/10.

Se registró el nivel freático y del embalse con frecuencia semanal. Con frecuencia aproximada bimestral se realizaron muestreos de la calidad del agua subterránea entre junio de 2009 y febrero de 2010 y superficial (embalse) entre enero de 2009 y febrero de 2010. El glifosato y el ácido amino metil fosfónico (AMPA) se analizaron por derivatización pre-columna (FMOC-CL) y cromatografía líquida en el laboratorio de Pesticidas de INTA Balcarce.

Para el periodo en estudio, el nivel del embalse osciló entre las cotas 94,7 m y 96,3 m y el nivel freático osciló entre -0,2 y -1,2 m en el pozo 1 y entre -6.9 y -8.2 m para el pozo 9. Estas oscilaciones se debieron a la respuesta inmediata de la napa ante las precipitaciones y del embalse al aporte de agua superficial por escurrimiento.

Con respecto a las concentraciones de glifosato y AMPA, en 2 fechas de muestreo se encontraron concentraciones superiores al límite de detección. Luego de las aplicaciones de pre-siembra y pre-emergencia del maíz se registraron en el pozo situado en la posición más baja (pozo 1) valores de 0,5 µg l⁻¹ de glifosato y en el muestreo del 11 de febrero de 2010 en el embalse se registraron 1,38 y 1,82 µg l⁻¹ de glifosato y AMPA, respectivamente. Estos niveles se atribuyeron a las aplicaciones realizadas al cultivo de soja.

Tabla 2. Concentraciones de glifosato en agua y momento y dosis de las aplicaciones.

	11/06/2009	20/08/2009	21/09/2009	30/09/2009	09/11/2009	15/12/2009	15/01/2009	11/02/2010
Freátiómetro alto (F9)	ND	2L/ha sulfosato en maíz	1,5 L/ha sulfosato en maíz	ND	ND	2L/ha glifosato en soja	2,5L/ha glifosato en soja	ND
Freátiómetro bajo (F1)	ND			<0,5 µg l-1	ND			ND
Embalse	ND			ND	ND			1,38 µg.l-1

Consideraciones Finales

El estudio de la movilidad y transporte en el suelo de un herbicida ampliamente utilizado como el glifosato resulta de gran interés para el sector agrícola. Los resultados obtenidos sobre el aporte del cultivo de soja a la contaminación del agua por glifosato y AMPA mostraron su presencia en el agua de drenaje y de escurrimiento, en coincidencia con lluvias de primavera que favorecerían el pasaje rápido de agua hacia la capa freática o hacia cursos de agua superficial.

Si bien, las concentraciones y las cantidades de glifosato y AMPA que salió del sistema por drenaje y escurrimiento resultaron bajas, representando menos del 0,03 y menos del 0,6% de las cantidades aplicadas, respectivamente. La aplicación de glifosato en postemergencia afectó la calidad del grano en concentraciones inferiores al umbral admitido.

El estudio del impacto ambiental que genera el uso de tecnologías agrícolas no es sencillo, ya que requiere de dispositivos experimentales adecuados que permitan el control de los insumos que se agregan al sistema y la correcta medición de los excedentes hídricos tanto en superficie como en profundidad. En todos los compartimentos analizados (tejidos vegetales, agua de escurrimiento y de drenaje) se registró la presencia de glifosato a pesar de la elevada variabilidad de las concentraciones.

Los picos de alta concentración de glifosato y AMPA detectados en el escurrimiento y el drenaje luego de lluvias importantes y la interceptación del herbicida en función del momento del ciclo indican la

relevancia de analizar aspectos relacionados al momento y condiciones de aplicación. La identificación del mejor momento para la aplicación de glifosato permitirá reducir el impacto sobre el sistema suelo-agua-planta.

Referencias

- Arregui, C., Lenardon, A., Sanchez, D., Maitre, M.I., Scotta, Roberto y Enrique, S.co autores, Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate resistant soybean, *Pest Manag Sci.*: 160(2),163-167 (2004)
- Borggaard, O.K. y A.L. Gimsing, Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci* 64(4): 441-456 (2008)
- Díaz, E., Quintero, C., Boschetti, N., Duarte, O., Romero, C., Paz Gonzáles, A., Lenzi, L., Perusset, A. Evaluación de residuos de plagicidas en suelos y aguas cultivados con arroz en Entre Ríos, Actas del XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. San Luis, 13 al 16 de mayo (2008).
- Elliott, J.A., Cesna, A.J., Best, K.B., Nicholaichuk, W. y L.C. Tollefson, Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled soil, *J Environ Qual* 29:1650–1656 (2000)
- Flury, M., Experimental evidence of transport of pesticides through field soils—a review. *J Environ Qual* 25:25–45 (1996)
- Jaynes, D.B., Ahmed, S.I., Kung K-J.S. y R.S. Kanwar, Temporal dynamics for preferential flow to a subsurface drain, *Soil Sci Soc Am J* 65:1368–1376 (2001)
- Peruzzo P.J., Porta A.A. y A.E. Ronco, Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina, *Environ*
- Petersen, C.T., Holm, J., Koch, C.B., Jensen, H.E. y S. Hansen, Movement of pendimethalin, ioxynil and soil particles to field drainage tiles, *Pest Manag Sci* 59:85–96 (2002).
- Portela S.I., Andriulo A.E., Jobbágy E.G. y M.C. Sasal, Water and nitrate exchange between cultivated ecosystems and groundwater in the Rolling Pampas, *Agric. Ecosyst. Environ.*: 134, 277-286 (2009)

- Screpanti C. y C. Accinelli, Glyphosate and glufosinate-ammonium runoff from a corn-growing area in Italy, *Agron Sustain Dev* 25③3) 407-412 (2005)
- Sprankle, P., Meggit, W.F. y D. Penner, Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil, *Weed Sci.* 23: 229–234 (1975)
- Villholth, K.G., Jarvis, N.J., Jacobson, O.H. y H. de Jonge, Field investigations and modelling of particle-facilitated pesticide transport in macroporous soil. *J Environ Qual* 29:1298–1309 (2000)