

RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN COMPARTIMENTOS AMBIENTALES

Diciembre, 2020

**SERIE
FPTA-INIA**
90

RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN COMPARTIMENTOS AMBIENTALES

PROYECTO FPTA 324.

Estudio del impacto de las actuales prácticas agrícolas en los recursos hídricos del bajo Río Negro y Esteros de Farrapos

Responsable del Proyecto: Dr. Andrés Pérez Parada ^{1,2}

Institución ejecutora: Facultad de Química, Universidad de la República

Equipo Técnico de Trabajo:

- Beatriz Alonso¹
- Federico Ernst¹
- Cintia Rodríguez¹
- María Verónica Cesio¹
- Horacio Heinzen¹
- Marcos Colazzo³
- Lucía Pareja³
- Alfredo Pereira⁴
- Alejandro Márquez⁴
- Eugenia Errico⁴

¹Grupo de Análisis de Compuestos Traza – GACT, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Ruta 9 y Ruta 15, CP 27000, Rocha, Uruguay.

³Grupo de Análisis de Compuestos Traza – GACT, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, Paysandú, Uruguay.

⁴Dirección Nacional de Recursos Acuáticos – DINARA, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Constituyente 1497, CP 11200, Montevideo, Uruguay.

Título: RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN COMPARTIMENTOS AMBIENTALES

Responsable Técnico: Dr. Andrés Pérez Parada

Institución Ejecutora: Facultad de Química, Universidad de la República

Equipo Técnico de Trabajo: Beatriz Alonso
Federico Ernst
Cintia Rodríguez
María Verónica Cesio
Horacio Heinzen
Marcos Colazzo
Lucía Pareja
Alfredo Pereira
Alejandro Márquez
Eugenia Errico

e-ISBN: 978-9974-38-453-8

Serie: FPTA N°90

© 2021, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Avda. Italia 6201, Edificio Los Guayabos, Parque Tecnológico del LATU,
Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr. José Bónica - Presidente

Ing. Agr. Walter Baethgen - Vicepresidente



Ministerio
**de Ganadería,
Agricultura y Pesca**

Ing. Agr. Rafael Secco

Ing. Agr. Martín Gortari



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

El FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al personal del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) especialmente a Gabriel Pineda, Fabricio Mendieta y Ángel Rosano, por su gran apoyo en tareas de campo y organización de jornadas de difusión. A Sebastián Horta y Ana Lía Ciganda del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA). A Natalia Zaldúa y Cecilia Pirez de ONG Vida Silvestre. Al Prof. Franco Teixeira de Mello y Prof. Ángel M. Segura por sus contribuciones al desarrollo del proyecto. A RALACA por el suministro de estándares.

IN MEMORIAM

Alfredo Nicolás Pereira Patti (1957-2021) obtuvo los títulos de Licenciado en Ciencias Biológicas en 1985 y de Magister en Ciencias Biológicas en 1990 por la Universidad de la República. Se desempeñó como Coordinador del Departamento de Biología en DINARA durante el desarrollo de este proyecto. Alfredo participó desde la génesis de la propuesta en 2012. Participó en etapas de redacción de proyecto, informes y publicaciones, así como en la planificación, ejecución, discusión y divulgación de resultados aportando rigurosidad científica e inteligencia. Promovió el vínculo inter-institucional. Alfredo trabajó para la mejor difusión de los resultados del proyecto en diversos ámbitos, desde las instituciones gubernamentales, la comunidad científica y la sociedad en general.

Carlos Alejandro Márquez Herney (1970-2020) obtuvo los títulos de Licenciado en Ciencias Biológicas en 1998, Master en 2002 y Doctorado en Ciencias Biológicas en 2012 por la Universidad de la República. Se desempeñó en la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de Facultad de Ciencias y como asesor de DINARA en diversos proyectos. Alejandro trabajó en el diseño y ejecución de muestreos de peces. Participó en la redacción de manuscritos y discusión de resultados.

Ambos trabajaron con espíritu constructivo, siempre impulsaron el trabajo en equipo, aportando sus conocimientos teóricos y de campo para un mejor desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

	Página
RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN COMPARTIMENTOS AMBIENTALES	9
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	9
2. NUEVAS HERRAMIENTAS ANALÍTICAS	11
2.1 Introducción	11
2.2 Parte Experimental	11
2.3 Resultados y Discusión	14
2.4 Conclusiones	17
3. BIOMONITOREO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN PECES	17
3.1 Introducción	17
3.2 Parte Experimental	17
3.3 Resultados y Discusión	18
3.4 Conclusiones	20
4. MONITOREO DE HERBICIDAS	21
4.1 Introducción	21
4.2 Parte Experimental	21
4.3 Resultados y Discusión	23
4.4 Conclusiones	26
5. COMENTARIOS FINALES	27
6. REFERENCIAS	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Clasificación de uso del suelo utilizando imágenes Landsat 8 para una serie temporal del 2014-2017. Realizado en Google Earth Engine	10
Figura 2. Distribución de la curva de NDVI para un pixel de 30x30 m clasificado como Agricultura dentro de toda la serie temporal. Se puede apreciar un pico de crecimiento en invierno y un pico de crecimiento en verano con ventanas de aplicación para un barbecho químico corto entre Noviembre-Diciembre y Mayo-Junio, caracterizando este sistema de producción como doble cultivo, un cultivo de invierno y un cultivo de verano	11
Figura 3. Instrumental analítico empleado en este proyecto. Equipamiento disponible en Departamento de Química del Litoral (DQL), Cenur Litoral Norte, UdelaR, Paysandú	13
Figura 4. Esquema del método QuEChERS para determinación de plaguicidas en tejido de peces ...	13
Figura 5. Efecto matriz de los herbicidas estudiados en agua	15
Figura 6. Recuperaciones y LOQs de la metodología QuEChERS original en sedimentos	15
Figura 7. Especímenes de boga y dorado capturados en Nuevo Berlín, Río Uruguay. Detalle de la zona analizada para cada individuo	17
Figura 8. Ilustración de los muestreos de peces realizados en el marco de este proyecto en relación a la temporalidad de cultivos	18
Figura 9. Variación temporal durante 2016 para un grupo de insecticidas en especies de peces	20
Figura 10. Identificación espacial de los sitios de muestreo y su codificación	22
Figura 11. Distribución de curva de índice NDVI para un pixel de 30 x 30 m definido en la clasificación de Figura 1 como clase Agricultura para el periodo Abril 2016 - Abril 2017. Lo que se observa es un típico sistema de producción donde la secuencia de cultivo es cultivo de verano sobre cultivo de verano con una ventana invernal de abril a fines de noviembre en barbecho químico largo	23
Figura 12. Frecuencias de detección (FO, %) de los herbicidas detectados. Estimación realizada sobre el total de detecciones	24
Figura 13. Distribución espacio-temporal de las detecciones de herbicidas por zonas. Cuenca Alta de cursos que desembocan en Río Uruguay (ARU), Cuenca Baja de cursos que desembocan en Río Negro (BRN) y muestras tomadas del propio Río Uruguay en la parte baja (BRU). En el eje secundario se representan las precipitaciones semanales acumuladas	24
Figura 14. Herbicidas detectados, concentraciones máximas, mínimas y medias. LOQ: límite de cuantificación	25
Figura 15. Unidades Tóxicas estimadas en el peor escenario para los diferentes sitios de muestreo durante este estudio	27
Figura 16. Reuniones de divulgación mantenidas en San Javier y Nuevo Berlín (Río Negro). Año 2016	28

¹Grupo de Análisis de Compuestos Traza – GACT, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Ruta 9 y Ruta 15, CP 27000, Rocha, Uruguay.

RESUMEN

El objetivo de esta publicación es difundir los principales resultados del trabajo realizado en el marco del proyecto FPTA 324: Estudio del impacto de las actuales prácticas agrícolas en los recursos hídricos del bajo Río Negro y Esteros de Farrapos.

Las zonas estratégicas definidas en este proyecto -bajo Río Negro (desde Mercedes aguas abajo) y Esteros de Farrapos, Río Uruguay- pretendieron establecer un diagnóstico y evaluación del riesgo por plaguicidas con influencia sobre el bioma de los ríos en relación a la incidencia de los cultivos extensivos existentes como ser la producción de soja.

Para comenzar a estudiar los impactos causados por estos contaminantes en las aguas y sobre sus recursos ictícolas en las cercanías de las poblaciones costeras, se procedió a identificar los residuos de pesticidas en recursos acuáticos de la zona de estudio.

El presente proyecto intentó aportar datos en esta dirección, desarrollando durante el mismo diferentes capacidades analíticas que permitieran la determinación de contaminantes trazas por métodos instrumentales basados en cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Se estudiaron diferentes muestras procedentes de la zona de estudio en busca de comprender la distribución ambiental que sufren los plaguicidas entre compartimentos bióticos y abióticos. Se planteó realizar un proyecto multi compartimental que permita identificar patrones espaciales y

Residuos de plaguicidas en compartimentos ambientales

Proyecto FPTA 324

Período de Ejecución: Mayo 2014/Jun 2017

temporales de los residuos de pesticidas, capaces de ser asociados con eventos agrícolas.

Se planteó en este proyecto la utilización de distintas especies de peces con hábitos migratorios o locales, diversos niveles tróficos y hábitos alimenticios de forma de esclarecer los objetivos planteados y asesorar en el conocimiento del destino ambiental de plaguicidas empleando estrategias de muestreo alternativas. Los resultados generados en este proyecto son relevantes en el marco de la evaluación de la sustentabilidad ambiental de los sistemas productivos.

1. INTRODUCCIÓN

La expansión de la agricultura en Uruguay ha tenido consecuencias positivas en varios aspectos del desarrollo económico y social. Este proceso ha sido llevado a cabo en un escenario de intensificación agrícola global donde las formas de producir los alimentos se desarrollan incorporando tecnologías e insumos que permiten maximizar los rendimientos productivos [1].

Es por esto que se han adoptado sistemas para producir alimentos empleando fitosanitarios o plaguicidas para controlar diversos factores que pueden disminuir la productividad y rentabilidad [1,2]. Por este motivo, los plaguicidas, entre ellos herbicidas, fungicidas e insecticidas, buscan disminuir los riesgos productivos, generando estrategias preventivas o reactivas frente a la aparición de una plaga.

Estas formas de producción, basadas en el uso de insumos han demandado el estableci-

miento de normas y criterios internacionales en cuanto al control y la inocuidad de los alimentos [3,4]. En este sentido los residuos de plaguicidas se determinan en alimentos para evaluar las Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs) y las diferentes formas de producción. Para cada par alimento-plaguicida, se establecen límites máximos de residuos (MRLs) de plaguicidas que a la vez son empleados como barreras de acceso a los mercados internacionales.

Sin embargo, la perspectiva de los residuos de plaguicidas en el ambiente ha cobrado mayor relevancia por la necesidad de generar evidencia que fundamente la producción de alimentos de formas más sostenible. Los plaguicidas son contaminantes ambientales que pueden impactar en los ecosistemas naturales, en la salud de la población en general y en la calidad de los alimentos. Además pueden incidir en forma indirecta en el desarrollo de otras actividades económicas tales como la apicultura.

En el escenario de Uruguay, existe una notoria carencia reglamentaria respecto a la naturaleza, identidad química y niveles de plaguicidas en relación a la calidad del agua natural y potable bajo los actuales estándares internacionales [5,6]. La realidad normativa actual en política de aguas supone un anacronismo normativo de más de 40 años sostenidos de prácticas agrícolas extensivas, sin laboreo, empleando variedad y multiplicidad de plaguicidas, los cuales no están reglamentados en aguas. Por ese motivo no son monitoreados y de los cuales se desconoce qué potenciales efectos generan sobre el ambiente en general [7].

La reglamentación nacional básicamente establece límites para plaguicidas organoclorados que son obsoletos desde el punto de vista productivo, aunque aún de relevancia internacional dada su elevada persistencia ambiental [6,8]. Por otra parte, las limitaciones de infraestructuras y capacidad de trabajo en matrices ambientales por organismos e instituciones de control nacionales, ha supuesto un interés adicional para desarrollar una propuesta de investigación centrada en el monitoreo de las actividades agrícolas en cursos de agua estratégicos para nuestro país.

Así nació la idea conceptual del proyecto FPTA 324, la cual se delineó en llamado a perfiles

2012 y cuya ejecución se desarrolló entre los años 2014 y 2017. El área de estudio de este proyecto se identificó como las zonas de influencia de los Esteros de Farrapos y el Bajo Río Negro, debido a que son interesantes por la incidencia simultánea de diversas actividades productivas de cultivos de secano, forestal y en especial por estar inserta en la zona de influencia del sitio RAMSAR Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay, el cual es un área protegida de interés internacional [9]. En este contexto, se planteó como interesante disponer de información que releve los principales desafíos en materia de sostenibilidad ambiental asociada a plaguicidas. El Río Uruguay y el Río Negro o sus afluentes atraviesan numerosos poblados para los que sirven de fuente para producir agua potable. Al ser los receptores de las externalidades agropecuarias situadas en las zonas de influencia, la calidad de las aguas es relevante para la salud de esas poblaciones. Otro punto a considerar además, es que sus recursos ictícolas complementan la alimentación de la población local. Se buscó a través de este proyecto comenzar a responder algunas preguntas asociadas a la compatibilidad de un área natural y poblada con agricultura intensiva circundante. Para ello fue necesario disponer de capacidades analíticas que no se disponían en el grupo de trabajo ni en Uruguay, lo que implicó desarrollar metodologías. Con estas herramientas, se buscó aportar a identificar los riesgos asociados a la agricultura a escala cuenca en ecosistemas acuáticos. Es ineludible la necesidad de desarrollar una agricultura más sustentable, lo que conlleva a identificar los riesgos que esta genera, su caracterización y evaluación para así sugerir o fomentar prácticas mejores o más eficientes de producción enfocadas a proteger a los consumidores y a la vez la conservación ambiental.

La presente propuesta introdujo a la evaluación de los impactos producidos por plaguicidas en el ecosistema un área de estudio comprendida entre zonas con características bien diferentes: i) una en bajo Río Negro (desde Mercedes río abajo) y ii) en Río Uruguay, el Esteros de Farrapos entre Nuevo Berlín y San Javier, esta última un área protegida, dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) con agricultura en zonas alejadas. Es decir, la propuesta se enmarca dentro de la caracterización de riesgos de un sitio RAM-

SAR de relevancia internacional. Teniendo en cuenta que, la evaluación individual de algunas matrices ambientales carece de robustez a la hora de interpretar el riesgo asociado a plaguicidas se planteó realizar un estudio mediante un enfoque complementario de las matrices biota, agua y sedimentos. Las características de la propuesta pretende servir como modelo de un plan de monitoreo integrado de los recursos en función de las actividades económicas insertas en los sitios de estudio.

La agricultura del bajo Rio Negro y Estero de Farrapos es fundamentalmente de cultivos de secano, entre ellos dominan la soja, sorgo y maíz en verano y trigo, cebada y avena en invierno.

La Figura 1 muestra un detalle del sitio de estudio y su uso del suelo. Por otra parte, como puede apreciarse de los análisis de imágenes satelitales de curvas de Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) en la Figura 2, entre los años donde este proyecto fue desarrollado, existe una clara ciclicidad entre cultivos de invierno y de verano bastante sostenida en el tiempo. Estos periodos de cultivo y uso del suelo demandan fitosanitarios para preparar los cultivos así como para protegerlos durante su desarrollo.

En este marco introductorio, el presente proyecto intentó aportar herramientas y evidencia científica, desarrollando durante su duración diferentes capacidades analíticas que permitieran la

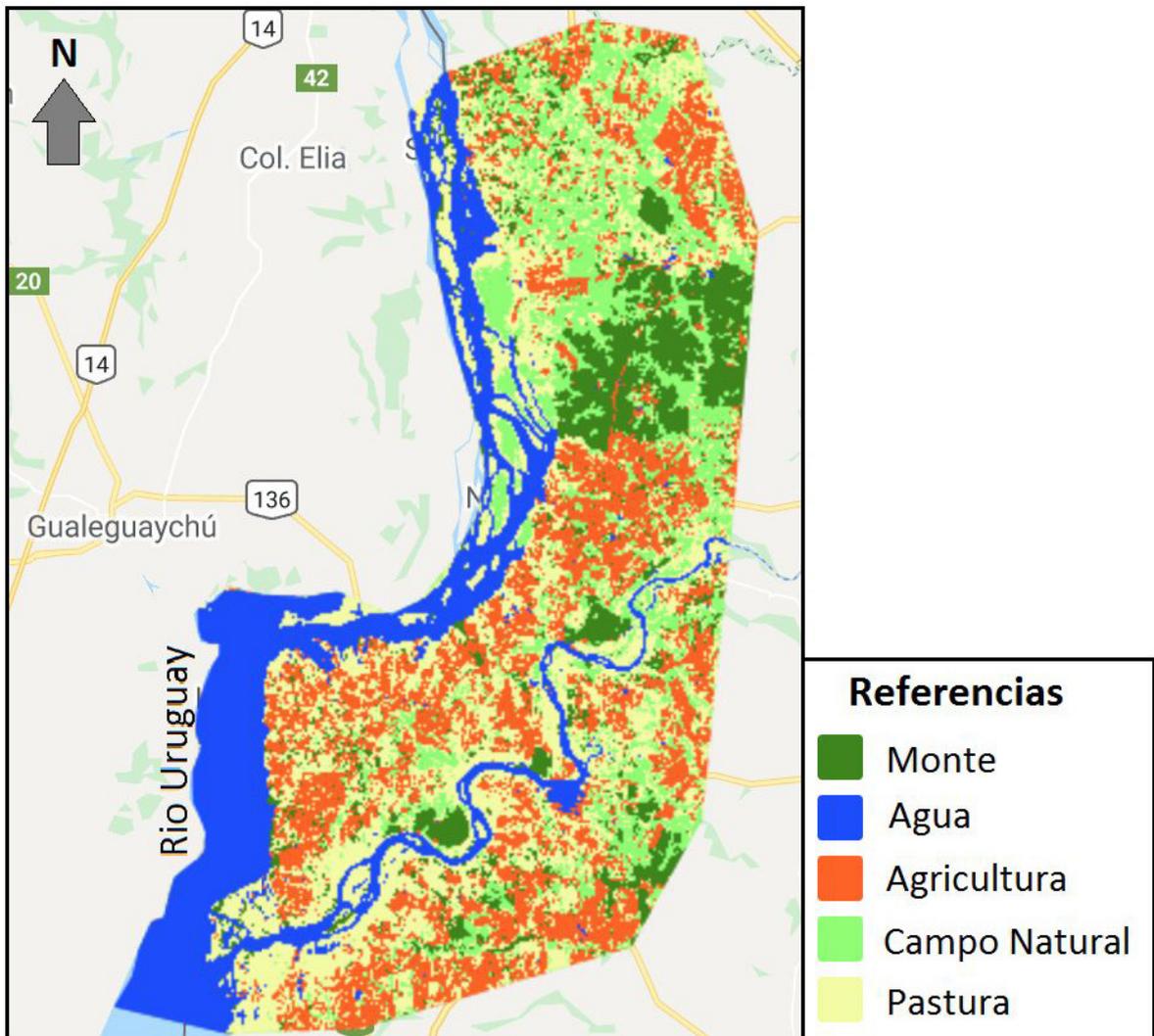


Figura 1. Clasificación de uso del suelo utilizando imágenes Landsat 8 para una serie temporal del 2014-2017. Realizado en Google Earth Engine.

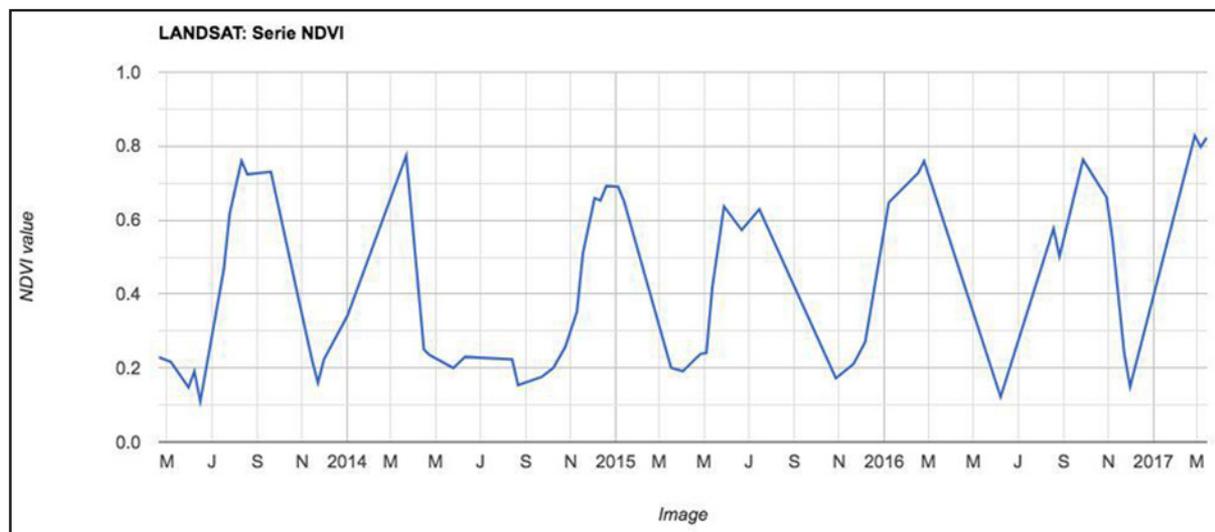


Figura 2. Distribución de la curva de NDVI para un pixel de 30x30 m clasificado como Agricultura dentro de toda la serie temporal. Se puede apreciar un pico de crecimiento en invierno y un pico de crecimiento en verano con ventanas de aplicación para un barbecho químico corto entre Noviembre-Diciembre y Mayo-Junio, caracterizando este sistema de producción como doble cultivo, un cultivo de invierno y un cultivo de verano.

determinación de contaminantes trazas por métodos instrumentales. Se estudiaron diferentes muestras procedentes de la zona de estudio en busca de comprender la distribución ambiental que sufren los plaguicidas entre compartimentos bióticos y abióticos.

2. NUEVAS HERRAMIENTAS ANALÍTICAS

2.1 Introducción

Las actividades realizadas en el marco de este proyecto comenzaron con el desarrollo y ajuste de metodologías analíticas. Estas cumplieron un rol de inducción a la temática, permitiendo consolidar al laboratorio GACT como espacio académico de generación de conocimiento en la temática planteada a escala nacional. Por otra parte, el equipo de trabajo pudo consolidar la formación de recursos humanos universitarios y publicar sus investigaciones en revistas arbitradas de reputación. Diversas metodologías fueron desarrolladas y validadas, algunas de las cuales permitieron generar otros proyectos académicos o directamente posicionaron al laboratorio GACT–UdelaR como referente interinstitucional en temáticas relacionadas.

2.2 Parte experimental

2.2.1 Determinación de plaguicidas en aguas

De acuerdo a reportes previos del equipo [10], las muestras son agitadas y se filtran directamente colectando en un vial de autosampler mediante filtro de PTFE 0,45 μm . Se toman 900 μL de agua y se adicionan 100 μL de acetonitrilo. Posteriormente se analiza por LC-MS/MS. Para la determinación por LC-MS/MS se emplea un HPLC 1200 de la firma Agilent acoplado a un QTrap 4000 de Sciex. El método cromatográfico optimizado para el análisis mediante LC-MS/MS consistió en la separación de los analitos de interés en una columna cromatográfica de fase reversa C-18 de 4,6 mm x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula. La fase móvil utilizada fue 0,1 % de ácido fórmico en agua y acetonitrilo (MeCN) en un gradiente. El flujo de dicha fase móvil fue de 0,6 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 μL . Se realizaron dos métodos, uno en modo positivo de 33 minutos de duración y otro en modo negativo de 15 minutos.

Los parámetros del analizador de masas, voltaje de fragmentación, y energía de colisión, se optimizaron para cada uno de los agroquímicos en forma individual con el fin de seleccionar 2 transi-

ciones para cada uno de los compuestos. La transición que presentó la mayor intensidad fue seleccionada para la cuantificación y la de menor sensibilidad para la confirmación de los compuestos según la normativa de la Unión Europea [11]. Se realizaron curvas de calibración en agua con 7 puntos (0; 0,5; 1; 5; 10; 15 y 20 $\mu\text{g/L}$). En el marco de este proyecto, la metodología fue ajustada y validada al alcance analítico particular que la Sección 4 demandaba. Esta metodología fue comunicada oportunamente en un congreso nacional [12].

2.2.2 Determinación de plaguicidas en sedimentos

Se evaluó una modificación del método QuE-ChERS [13] en sedimentos el cual fue evaluado mediante GC-MS y LC-MS/MS.

Brevemente, 5 g de sedimentos liofilizados se fortificaron con 50 μL de solución de TPP 10 mg/L y adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente durante 1 min y dejando reposar 10 min. Se agregaron 1,5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 4 g de sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), agitando nuevamente y centrifugando luego durante 5 min a 4000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo otra etapa de clean-up del extracto mediante extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE): 50 mg/mL de PSA; 150 mg/mL de MgSO_4 y 33 mg/mL de GCB, se agitó en vórtex y se centrifugó. Una alícuota de 1 mL de extracto filtrada se inyectó en LC-MS/MS. Otra alícuota de 4 mL a sequedad bajo corriente de N_2 , se re-disolvió en 1 mL de bromofos metil 0,5 mg/L en acetato de etilo (AcOEt) para inyectar en GC-MS.

Las determinaciones en GC-MS fueron realizadas en un instrumento GC-MS-QP2010 Ultra. Usando modo Split 1:5, columna: TR-5MS Thermo (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), Flujo: 1,0 mL/min usando gas carrier de He, Volumen de inyección: 1 μL . El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: 120 °C desde 0 a 5 min; 120-190 °C a 10 °C/min; 190 °C durante 1 min; 190-250 °C a 5 °C/min; 250 °C 5 min; 250-300 °C a 5 °C/min; 300 °C por 5 min (t = 45 min). El gas carrier fue Helio. La temperatura del inyector fue 280 °C, el flujo constante a 1 mL/min, la temperatura de la interfase 280 °C y el volumen de inyección fue 1 μL . La detección fue realizada en modo SIM (Single Ion Monitoring) utilizando los iones previamente seleccionados para cada compuesto. Las

determinaciones en LC-MS/MS se realizaron en un equipo Agilent 1200 con detector MS/MS AB-Sciex 4000 Qtrap. Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 4,6 mm x 150 mm x 5 μm . Los parámetros del analizador de MS/MS, voltaje de fragmentación, y energía de colisión, se optimizaron para cada uno de los agroquímicos en forma individual con el fin de seleccionar 2 transiciones para cada uno de los compuestos. La transición que presentó la mayor intensidad fue seleccionada para la cuantificación y la de menor sensibilidad para la confirmación de los compuestos según la normativa de la Unión Europea [11]. Se realizaron curvas de calibración en agua con 7 puntos (0; 0,5; 1; 5; 10; 15 y 20 $\mu\text{g/L}$). En el caso de determinaciones por GC-MS se emplearon criterios similares ajustados a correspondencia de tiempos de retención, 3 iones particulares y relación de iones [11]. En el marco de este proyecto, la metodología fue validada al alcance analítico particular que la Sección 4 demandaba. Los equipos empleados son mostrados en Figura 3. Esta metodología fue comunicada oportunamente en un congreso nacional [14].

2.2.3 Determinación de plaguicidas en peces

Se evaluó una modificación del método QuE-ChERS en matrices lipídicas el cual fue evaluado mediante GC-MS y LC-MS/MS [15,16].

Brevemente, a 10 g de tejido muscular homogeneizado de peces se le adiciona 10 μL de TPP 10 mg/L y 10 mL de MeCN agitando vigorosamente durante 3 min. Se agregan 1,5 g de NaCl y 4 g de sulfato de MgSO_4 , agitando nuevamente y centrifugando luego durante 4 min a 4000 rpm. Posteriormente se llevó a cabo una etapa de clean-up del extracto mediante extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE): 50 mg/mL de PSA; 150 mg/mL de MgSO_4 y 25 mg/mL de C-18 se agitó en vórtex y se centrifugó. Una alícuota de 1 mL de extracto filtrada se inyectó en LC-MS/MS. Otra alícuota de 4 mL a sequedad bajo corriente de N_2 , se re-disolvió en 1 mL de bromofos metil 0,1 mg/L en AcOEt para inyectar en GC-MS. Este proceso se ilustra en la Figura 4. Esta metodología y anexos fue comunicada oportunamente en diversos congresos internacionales [17-21], publicada en revistas arbitradas [15,16] y en un capítulo de libro [22]. Los detalles instrumentales empleados pueden encontrarse detallados en tales publicaciones.

LC-MS/MS	GC-MS
	
<ul style="list-style-type: none"> ♣ LC-MS: Agilent 1200 Applied Biosystems API4000 QTRAP ♣ Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) ♣ Gradiente: (A) Agua con acido formico 0.1% y (B) acetonitrilo ♣ Flujo: 0.6mL/min ♣ Volumen de inyección: 5 μL ♣ Adquisición MRM & IDA (EPI) 	<ul style="list-style-type: none"> ♣ GC-MS: Shimadzu GC-MS-QP-2010 Ultra ♣ Columna:TR-5MS Thermo (30m x 0.25 mm, 0.25 μm) ♣ Carrier: Helio ♣ Flujo: 1.0 mL/min ♣ Volumen de inyección:1.0 μL ♣ Adquisición SIM

Figura 3. Instrumental analítico empleado en este proyecto. Equipamiento disponible en Departamento de Química del Litoral (DQL), Cenur Litoral Norte, UdelaR, Paysandú.

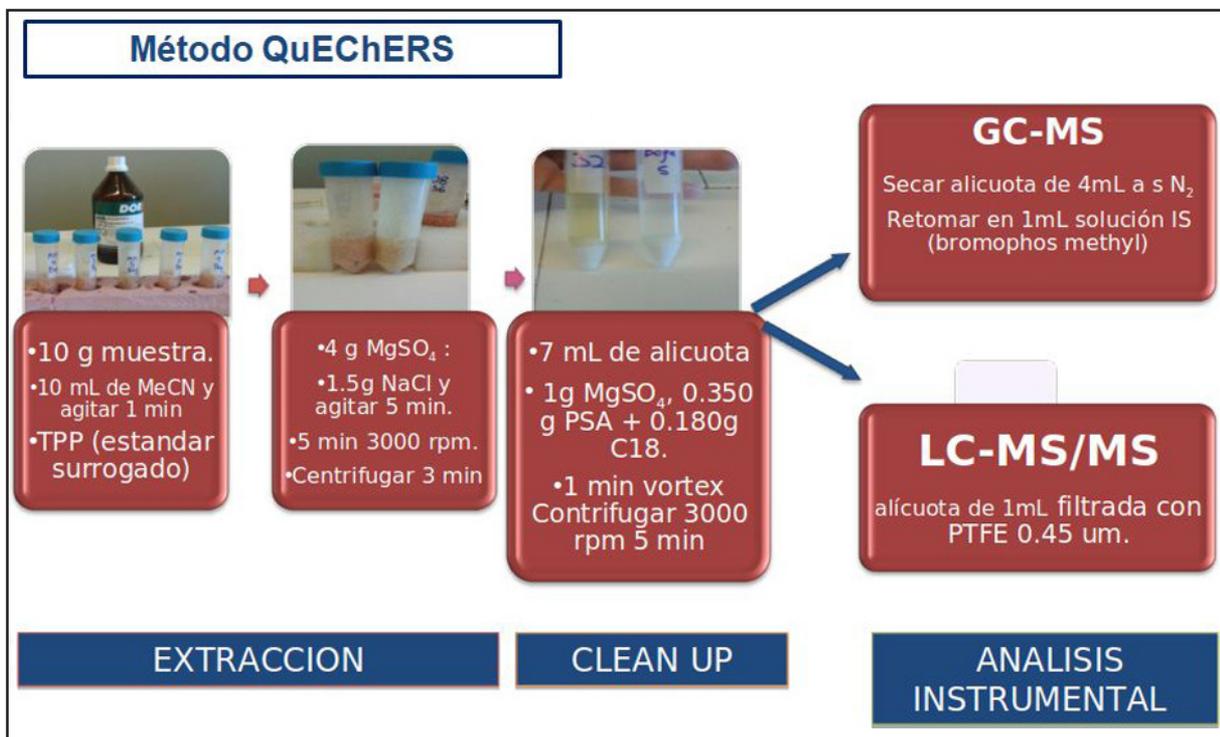


Figura 4. Esquema del método QuEChERS para determinación de plaguicidas en tejido de peces.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Determinación de plaguicidas en aguas

Los resultados mostraron la adecuación de la metodología propuesta para el monitoreo ambiental. Para los herbicidas estudiados se encontró un bajo Efecto Matriz (EM) lo que posibilita la estimación de concentración empleando calibración en medio ideal (agua milliQ). Los límites de detección y cuantificación (LODs y LOQs, respectivamente) alcanzados son apropiados para el monitoreo de herbicidas en cursos de agua en nuestro país. En la Tabla 1 se muestran las transiciones buscadas y los LODs y LOQs señalados.

Tal como se ve en la Figura 5, Los EM (%) fueron en todos los casos de supresión pero menores a 20% con lo cual es posible realizar determinaciones desestimando el EM y la construcción de calibraciones en matriz.

2.3.2 Determinación de plaguicidas en sedimentos

El método QuEChERS evaluado es apropiado para la multideterminación de 41 residuos de pesticidas en sedimentos según los estándares de validaciones de metodologías para residuos de pesticidas [11]. Para todos los analitos evaluados mediante LC-MS/MS las recuperaciones promedio se encontraron dentro del rango 73-108%. Otros compuestos evaluados de baja polaridad

Tabla 1. Detalles de los herbicidas analizados en aguas y sus LODs y LOQs.

Compuesto	Tr (min)	m/z Precursor	m/z Producto	LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
<i>Modo de ionización positivo (ESI +)</i>					
Atrazina desetil	7,71	188	104,2 79,1	0,23	0,47
Atrazina desisopropil	7,38	174	104,2 79,2	0,41	0,96
imazapir	7,63	262	217,2 149,2	0,44	0,63
Acetoclor	9,37	270,2	224 148	0,41	0,73
Metsulfuron Metil	8,14	382	199,1 141,1	0,36	0,38
Atrazina	8,64	216,1	174 103,9	0,04	0,24
Clomazone	8,88	240	125 89,3	0,05	0,14
Clorimuron Etil	8,82	415	121,1 186,1	0,15	0,17
Metolaclor	9,51	284,1	252 176,1	0,3	0,08
Ametrina	8,29	228,1	186,2 96,1	0,11	0,23
Clorsufuron	8,28	357,9	141,1 167,1	0,07	0,15
Simazina	8,27	202,2	124 132	0,47	0,49
<i>Modo de ionización negativo (ESI -)</i>					
2,4-D	9,44	219	160,9 129,4	0,4	0,46

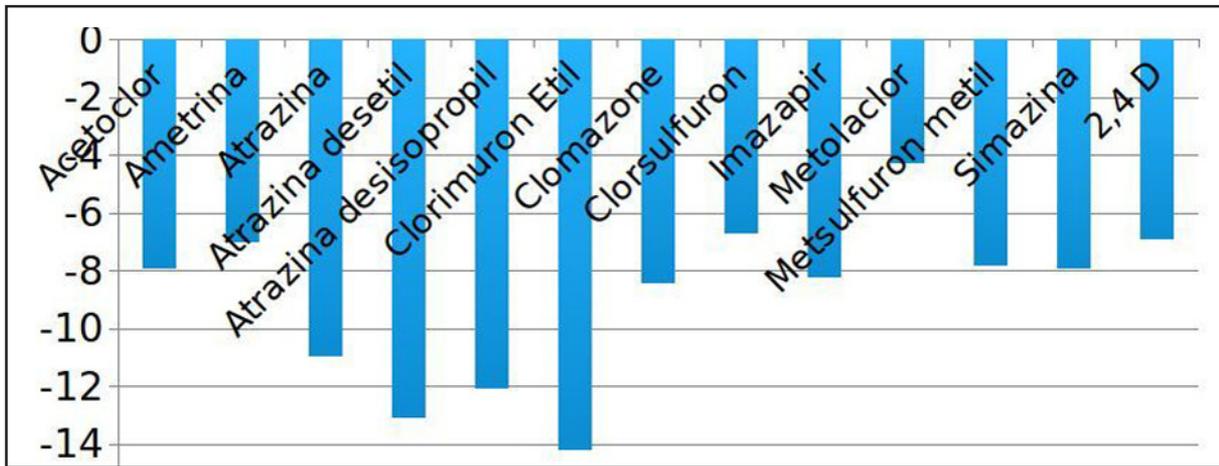


Figura 5. Efecto matriz de los herbicidas estudiados en agua.

(por ejemplo clorpirifos) permanecieron por fuera del alcance por recuperaciones <70%. Los compuestos de GC-MS disponen notoriamente de LOQs mayores debido a problemas de selectividad de señal. Sin embargo, la metodología propuesta es un herramienta útil para el monitoreo de plaguicidas en sedimentos de cursos en agroecosistemas. La Figura 6, ejemplifica las recuperaciones alcanzadas por los sistemas de determinación propuestos y los LOQs alcanzados en cada caso [14].

2.3.3 Determinación de plaguicidas en peces

La validación del método se realizó de acuerdo a los requisitos de normas europeas [11], obteniendo la mayoría de las recuperaciones

entre 70-120% a 1 ng/g en LC-MS/MS y 50 ng/g en GC-MS. Se validó el método para tejido de boga que fue analizada previamente donde se demostró la ausencia de los pesticidas estudiados. Los límites de detección para LC-MS/MS en la mayoría de los compuestos fueron menores a 10 ng/g y en GC-MS rondaron entre los 10 y 50 ng/g. Se seleccionaron un total de 72 pesticidas para los que se ajustó una variación del método QuEChERS para el análisis multiresiduo en tejido muscular de peces. El alcance analítico de esta validación es mostrado en la Tabla 2. La mayor modificación al método QuEChERS original se encuentra en las cantidades de sorbentes empleadas en la etapa de purificación. El extracto purificado se analiza mediante

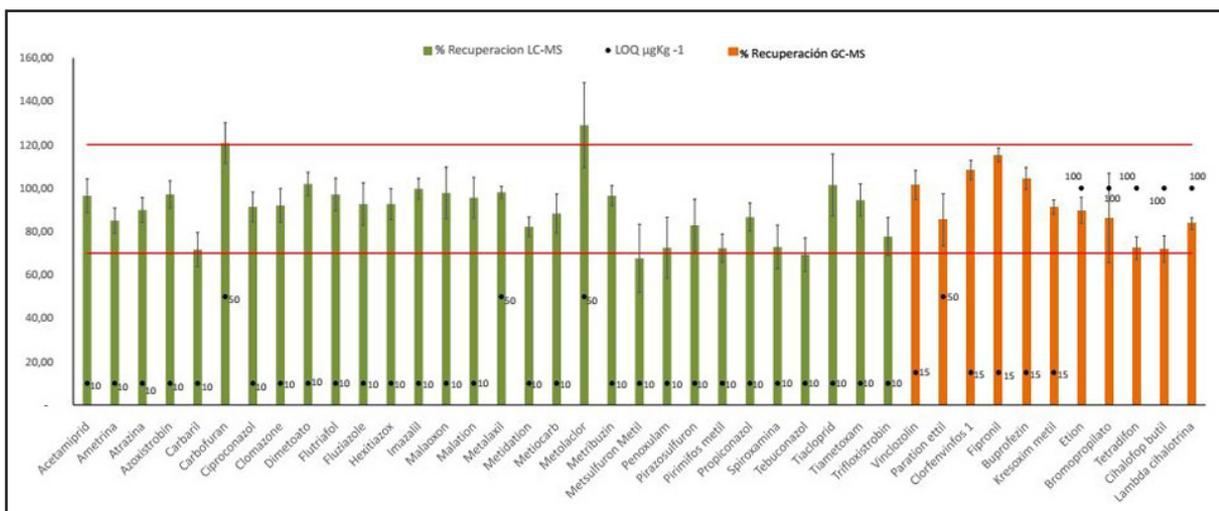


Figura 6. Recuperaciones y LOQs de la metodología QuEChERS original en sedimentos.

Tabla 2. Alcance analítico del método QuEChERS para el análisis multiresiduo en tejido muscular de peces.

Alcance GC-MS		Alcance LC-MS	
Nº	Nombre de molécula	Nº	Nombre de molécula
1	2-phenyl phenol (OPP)	1	Acetamiprid
2	Trifluralin	2	Ametrina
3	Diazinon	3	Amitraz
4	Chlorpyrifos methyl	4	Atrazine
5	Vinclozolin	5	Azinphos methyl
6	Alachlor	6	Azoxistrobin
7	Parathion methyl	7	Boscalid
8	Chlorpyrifos	8	Carbaril
9	Fenthion	9	Carbendazim
10	Parathion ethyl	10	Carbofuran
11	Chlorfenvinphos	11	Ciproconazole
12	Fipronil	12	Clomazone
13	Buprofezin	13	Difenoconazole
14	Kresoxim methyl	14	Dimethoate
15	Ethion	15	Epoxiconazole
16	Fenhexamid	16	Flutriafol
17	Bromopropilate	17	Fluziazole
18	Tretradifon	18	Hexitiazox
19	Pyriproxifen	19	Imazalil
20	Cyhalofop buthyl	20	Malaoxon
21	Azinphos methyl	21	Malathion
22	λ -cyhalothrin	22	Metalaxyl
23	Coumaphos	23	Metamidophos
24	β -cyfluthrin	24	Metidathion
25	Cypermethrin	25	Metiocarb
26	Fenvalerate	26	Metolachlor
27	τ -Fluvalinate	27	Metribuzin
28	Deltamethrin	28	Metsulfuron methyl
		29	Pendimetalin
		30	Penoxulam
		31	Pirazosulfuron
		32	Pirimicarb
		33	Pirimiphos methyl
		34	Prochloraz
		35	Propanil
		36	Propiconazole
		37	Pyraclostrobin
		38	Pendimethalin
		39	Tebuconazole
		40	Thiacloprid
		41	Thiametoxam
		42	Tiabendazole
		43	Tricyclazole
		44	Trifloxystrobin

LC-MS/MS y GC-MS. Por el contrario, para alcanzar bajos niveles de detección y cuantificación en GC-MS es necesario concentrar la muestra. Se realizó un cambio de solvente a acetato de etilo conteniendo bromofos metil empleado como estándar interno. Las cifras de méritos alcanzadas pueden ser consultadas en publicaciones [15, 16].

2.4 Conclusiones

Se desarrollaron o ajustaron y validaron metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas en aguas, sedimentos y peces. Los criterios para estos desarrollos involucran tendencias hacia la miniaturización de la preparación de muestra. Algunos de estos resultados, tuvieron repercusión académica, permitieron múltiples instancias de formación de recursos humanos jóvenes, difusión en congresos internacionales y revistas arbitradas. Los desarrollos precedentes permitieron fortalecer o consolidar el rol del GACT en las capacidades de trabajo y respuesta hacia temáticas de monitoreo ambiental en sistemas acuáticos.

3. BIOMONITOREO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN PECES

3.1 Introducción

Las cuencas hidrográficas cercanas a áreas agrícolas son susceptibles a la contaminación difusa por plaguicidas. Estos son capaces de alcanzar el ambiente acuático por deriva luego de las aplicaciones o por escurrimiento superficial. En consecuencia, los residuos de pesticidas pueden ser incorporados en biota acuática expuesta [23]. El destino ambiental de plaguicidas, depende de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, teniendo un efecto potencial en la salud humana y en el ambiente aunque se encuentren a bajas concentraciones [15, 22, 23].

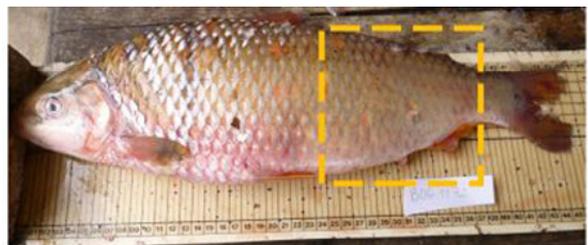
Entre la biota acuática, los peces poseen ciertas ventajas en cuanto a identificación taxonómica y en el gran conocimiento sobre los niveles tróficos entre otras características ecológicas. Se conoce que los peces son capaces de bioacumular distintos contaminantes a través del agua y

la dieta. Además, su capacidad para metabolizar plaguicidas, especialmente organohalogenados es muy limitada, por lo tanto resultan ser un muy buen bioindicador del estado ambiental del sitio en donde habitan. Sumado a eso, al seleccionar individuos situados en distintos niveles de la cadena alimenticia y por hábitos migratorios, se puede obtener una visión integrada del ambiente acuático [23]. Existen escasos antecedentes de análisis de residuos de pesticidas en peces del Río Uruguay [24]. En esas instancias se analizaron principalmente pesticidas organoclorados y organofosforados, encontrándose endosulfán en algunas muestras.

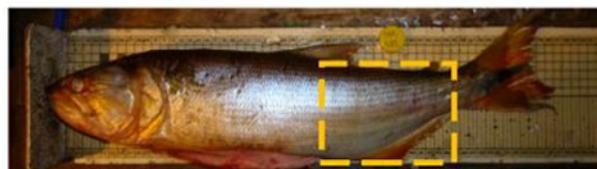
3.2 Parte experimental

3.2.1 Muestreos

Los peces estudiados en este proyecto fueron muestreados entre los años 2015 y 2016. Se realizaron 4 campañas de muestreo. Las distintas especies de peces y sus hábitos están señalados en la Tabla 3. En resumen, en 2015 fueron tomadas 185 muestras y 193 en 2016 de acuerdo al siguiente detalle: Muestreo 1 (Abril 2015): 62 muestras; Muestreo 2 (Septiembre 2015): 123 muestras; Muestreo 3 (Mayo 2016): 80 muestras; Muestreo 4 (Noviembre 2016): 113 muestras.



Leporinus obtusidens (Boga, 45 cm)



Salminus brasiliensis (dorado, 57 cm)

Figura 7. Especímenes de boga y dorado capturados en Nuevo Berlín, Río Uruguay. Detalle de la zona analizada para cada individuo.



Figura 8. Ilustración de los muestreos de peces realizados en el marco de este proyecto en relación a la temporalidad de cultivos.

Tabla 3. Especies y hábitos de las especies estudiadas.

Nombre científico	Nombre común	Hábito alimenticio	Comportamiento migratorio
<i>Hoplias malabaricus</i>	Tararira	Predador	No migratorio
<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre negro	Omnívoro	No migratorio
<i>Pimelodus maculatus</i>	Bagre amarillo	Omnívoro	No migratorio
<i>Paraloricaria vetula</i>	Vieja cola de látigo	Detritívoro	No migratorio
<i>Hypostomus commersonni</i>	Vieja del agua	Detritívoro	No migratorio
<i>Salminus brasiliensis</i>	Dorado	Predador	Migratorio
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	Boga	Omnívoro	Migratorio
<i>Prochilodus lineatus</i>	Sábalo	Detritívoro	Migratorio

Las muestras fueron adquiridas a pescadores artesanales. Los sitios de muestreo en la zona de estudio fueron Mercedes (Río Negro), Nuevo Berlín (Río Uruguay) y San Javier (Río Uruguay). Durante el año 2015 se adquirieron muestras de San Gregorio de Polanco (Río Negro) que fue señalada como una zona «control negativo» debido a la escasez de cultivo de secano. Cada muestra pertenecía a un individuo adulto. En campo se realizaron medidas de los individuos y desescamado de los mismos. Las muestras analizadas corresponden a un corte dorsolateral de la zona indicada en la Figura 7 de cada individuo. Estos cortes de tejido fueron transportados al laboratorio en conservadoras con hielo. En el laboratorio se congelan en freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta procesamiento. El homogenizado de los tejidos se realiza con la muestra congelada en licuadora de acero inoxidable [15, 16].

3.2.2 Determinaciones y análisis de datos

Las determinaciones fueron realizadas de acuerdo a lo detallado en Sección 2.3.3. Diferentes análisis estadísticos de los datos obtenidos fueron realizados para vincular la presencia de plaguicidas con las características ecológicas de las especies de peces analizadas así como asociar las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas y los usos de estos compuestos en el ambiente productivo. Los detalles de los análisis estadísticos pueden ser consultados en detalle [15].

3.3 Resultados y Discusión

Para las muestras obtenidas en el año 2015, fueron identificados los 30 plaguicidas mostrados en la Tabla 4. Se determinaron la frecuencia de ocurrencia o detección porcentual (FO, %) para el set de muestras. Esto señala la identidad de los

compuestos mayormente acumulados en peces. Estos compuestos fueron identificados con los códigos numéricos señalados. Se encontró un promedio de 4 plaguicidas identificados por individuo. Para el set de muestras sin hábitos migratorios, es decir locales, fueron realizados diferentes análisis estadísticos para dar cuenta la incidencia espacial de los residuos de plaguicidas encontrados. En este sentido, se encontró que el

orden de intensidad agrícola y contaminación por plaguicidas podría ser señalado en el siguiente orden: Mercedes y Nuevo Berlín > San Javier >> San Gregorio de Polanco. Estos resultados confirmaron la hipótesis de la habilidad de los peces como bioindicadores de la contaminación por plaguicidas debido a que la exposición acumulada se ve reflejada de acuerdo al sitio en donde habitan. Otros análisis estadísticos reflejaron la

Tabla 4. Compuestos identificados, frecuencia de detección y log Kow.

Código	Plaguicida	Frecuencia (%)	log Kow
1	Acetamiprid	0,7	0,8
2	Ametryn	2,7	2,63
3	Amitraz	2	5,5
4	Atrazine	16,1	2,7
5	Azinphos_methyl	1,3	2,96
6	Azoxystrobin	16,8	2,5
7	Boscalid	0,7	2,96
8	Carbaryl	5,4	2,36
9	Carbendazim	20,1	1,48
10	Carbofuran	1,3	1,8
11	Cyproconazole	1,3	3,09
12	Clomazone	5,4	2,54
13	Chlorpyrifos	5,4	4,7
14	Difenoconazole	15,4	4,36
15	Epoxiconazole	12,1	3,3
16	Flusilazole	4,7	3,87
17	Imazalil	0,7	2,56
18	Malathion	0,7	2,75
19	Metalaxyl	17,4	1,65
20	Methidathion	0,7	2,57
21	Metolachlor	56,4	3,4
22	Pendimethalin	0,7	5,2
23	Pirimicarb	16,8	1,7
24	Pirimiphos_methyl	17,4	3,9
25	Propiconazole	2	3,72
26	Pyraclostrobin	51	3,99
27	Tebuconazole	20,1	3,7
28	Thiabendazole	0,7	2,39
29	Tricyclazole	7,4	1,4
30	Trifloxystrobin	83,9	4,5

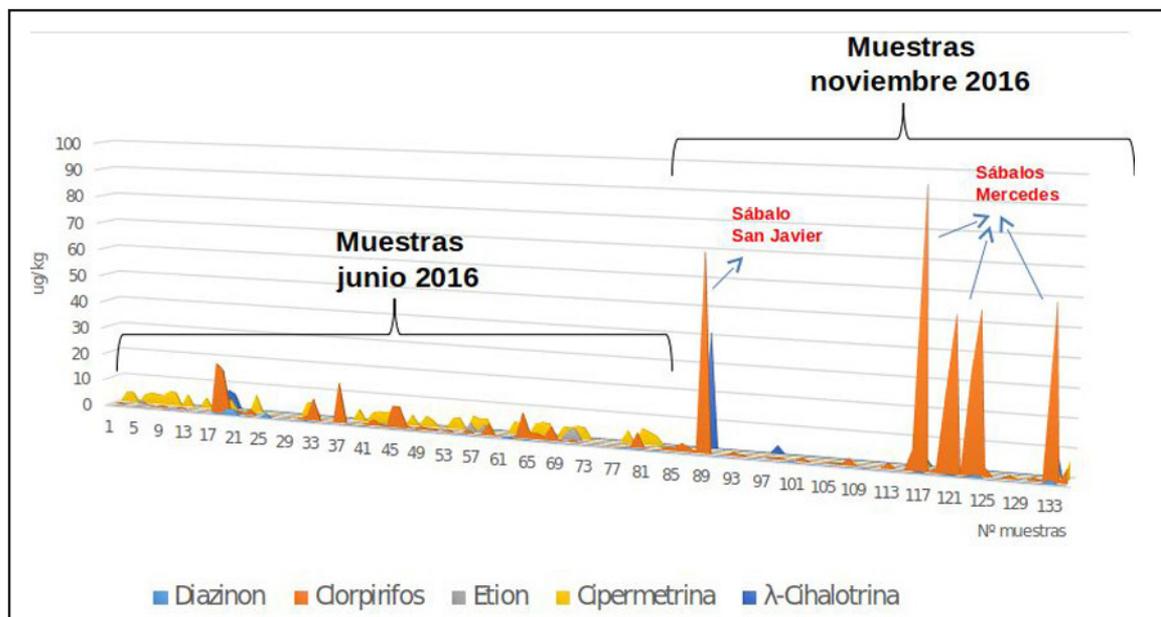


Figura 9. Variación temporal durante 2016 para un grupo de insecticidas en especies de peces.

capacidad selectiva de los compuestos en ser bioacumulados. Diferentes categorías de compuestos fueron señaladas como dominantes, frecuentes, ocasionales y raros de acuerdo a las concentraciones encontradas y las FO.

Estos compuestos fueron analizados de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de los mismos, en particular al coeficiente octanol agua ($\log K_{ow}$), toxicidad en peces, degradación en suelo, demanda de uso en kg de ingrediente activo en Uruguay, usos previstos, entre otros. De estos resultados se encontró que los compuestos con mayor $\log K_{ow}$ son los mayormente acumulados. Por este motivo, y de acuerdo a los resultados obtenidos los fungicidas trifloxystrobin, y pyraclostrobin y el herbicida metolaclor fueron señalados como aquellos compuestos dominantes de acumulación en peces independientemente del hábito migratorio o su posición trófica. En cuanto a la toxicidad, no se encontraron diferencias significativas de toxicidad entre las diferentes clases de acuerdo a las concentraciones encontradas. De los 30 compuestos identificados, solo 2 compuestos no corresponden a uso en cultivos de secano; amitraz y pirimifos metil que son de uso agroveterinario.

Sin embargo, se sostiene que estos resultados deben ser evaluados desde una perspectiva de exposición subletal crónica a las especies. Se encontró que existe temporalidad en el patrón de

los compuestos debido a la estacionalidad de los cultivos [15]. La Figura 9 ejemplifica los resultados de insecticidas identificados en las muestras de 2016. Como puede observarse, se identificaron muestras con contenidos extraordinarios de clorpirifos posterior a cultivos de invierno mientras que las muestras posteriores a cultivo de verano presentan niveles detectables de cipermetrina. Esto último sugiere evidencia de ciertos mecanismos de detoxificación por parte de los peces siendo capaces de depurar los plaguicidas. Por otra parte, se señala que, desde una perspectiva de la inocuidad alimentaria de estos peces, en principio los riesgos estimados por ingesta son bajos para el ser humano de acuerdo a estimaciones preliminares de la ingesta diaria admisible (IDA) expresada en mg/kg de peso corporal por día [25]. Ante la falta de LMRs para muchos de los compuestos estudiados, los resultados obtenidos en este trabajo son un aporte importante para el estudio de la seguridad de los consumidores. Estos resultados, señalan sin embargo la necesidad de continuar en futuras investigaciones con el monitoreo continuo de los plaguicidas identificados.

3.4 Conclusiones

Se demuestra el potencial de analizar tejidos de peces como forma integral de monitoreo ambiental a escala espacial y temporal. Las concen-

traciones encontradas corresponden a dosis subletales, es decir no hay evidencia de toxicidad aguda sino de una capacidad de tolerancia de las especies a estos compuestos que están siendo incorporados a los tejidos vivos y cuyos efectos a largo plazo no son comprendidos en la actualidad. Se demuestra la bioacumulación de plaguicidas, no así la biomagnificación, es decir, que los niveles de plaguicidas no se ven incrementados en las especies predatoras. Los resultados sugieren que la principal fuente de exposición es el agua. No se encuentran diferencias significativas entre especies migradoras y no migradoras. Desde un punto de vista de monitoreo ambiental, pueden ser empleadas especies de peces locales como integradoras del impacto productivo. Los resultados sostienen que esta herramienta pueden ser empleadas en el estudio de otros ambientes agrícolas.

4. MONITOREO DE HERBICIDAS

4.1 Introducción

El uso intensivo de plaguicidas conlleva una creciente preocupación relacionada al escurrimiento de éstos hacia cursos de agua. El clima del Uruguay es templado y presenta un régimen de precipitaciones isohigro donde llueve aproximadamente 1000 mm por año. Estas lluvias son muy variables dentro del año llegando a acumularse una gran parte en periodos cortos de tiempo [26], lo que favorece el arrastre o escorrentía de estos compuestos hacia los cursos de agua. Los plaguicidas pueden transportarse disueltos en agua, o asociados a partículas de suelo [27].

Al ingresar al medio acuático, los plaguicidas pueden amenazar especies no objetivo de los ecosistemas acuáticos comprometiendo ambientes propicios para el desarrollo o la reproducción de distintas especies [23]. En el área de estudio, la aplicación de mayores cargas de plaguicidas, entre ellos herbicidas, se da fundamentalmente durante la preparación del área de siembra de cultivos de verano en los meses de junio a septiembre (barbechos largos) donde se intenta controlar malezas de alto porte que provienen de pasturas que finalizan con un alto grado de enmalezamiento. Las aplicaciones de herbicidas son

previas a la siembra en épocas donde la saturación del suelo por lluvias es más factible.

Durante el año 2015, se relevó mediante consultas específicas con productores, que durante este periodo se dan las aplicaciones de glifosato conjuntamente con otros herbicidas como el 2,4-D. Estas aplicaciones, se dan previas a las siembras tempranas de maíz (setiembre) las cuales tampoco son muy frecuentes en el área de estudio. Luego existen ciertas aplicaciones recomendadas de otros herbicidas como atrazina (en la actualidad ya en desuso), S-metolaclor y acetoclor, entre otros, en el mes de octubre donde se concentran mayoritariamente las siembras del cultivo de maíz. Por lo cual, se pretendió realizar un diseño de muestreo - incorporando cursos de agua secundarios del área de estudio- para evidenciar la dinámica de ingreso de estos compuestos a los cursos de agua. En este sentido, los objetivos trazados fueron identificar y cuantificar herbicidas en cursos de agua secundarios en épocas de barbechos de forma de conocer su dinámica temporal y espacial en el área de estudio. El diseño realizado esperaba estudiar la evolución espacio-temporal de ingreso y el transporte de estos plaguicidas en agua así como establecer un orden de priorización de los pesticidas a ser estudiados en el futuro a través de la evaluación ecotoxicológica de los resultados en agua.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Diseño de muestreo

Para la determinación de los puntos de muestreo se realizaron mapas en ArcGis 10.1 de las zonas de interés a gran escala, estudiando e identificando cada curso de agua desde la nacimiento hasta desembocadura. Paralelamente, se trató de distribuir puntos en zonas donde existe forestación, puntos donde se realiza agricultura, puntos en zonas combinadas y puntos sobre el Río Uruguay.

En la Figura 10 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo seleccionados dentro del área definida.

Se realizó un muestreo diferido en el tiempo en un periodo entre el 26 de agosto al 4 de noviembre abarcando los meses de preparación del tapiz

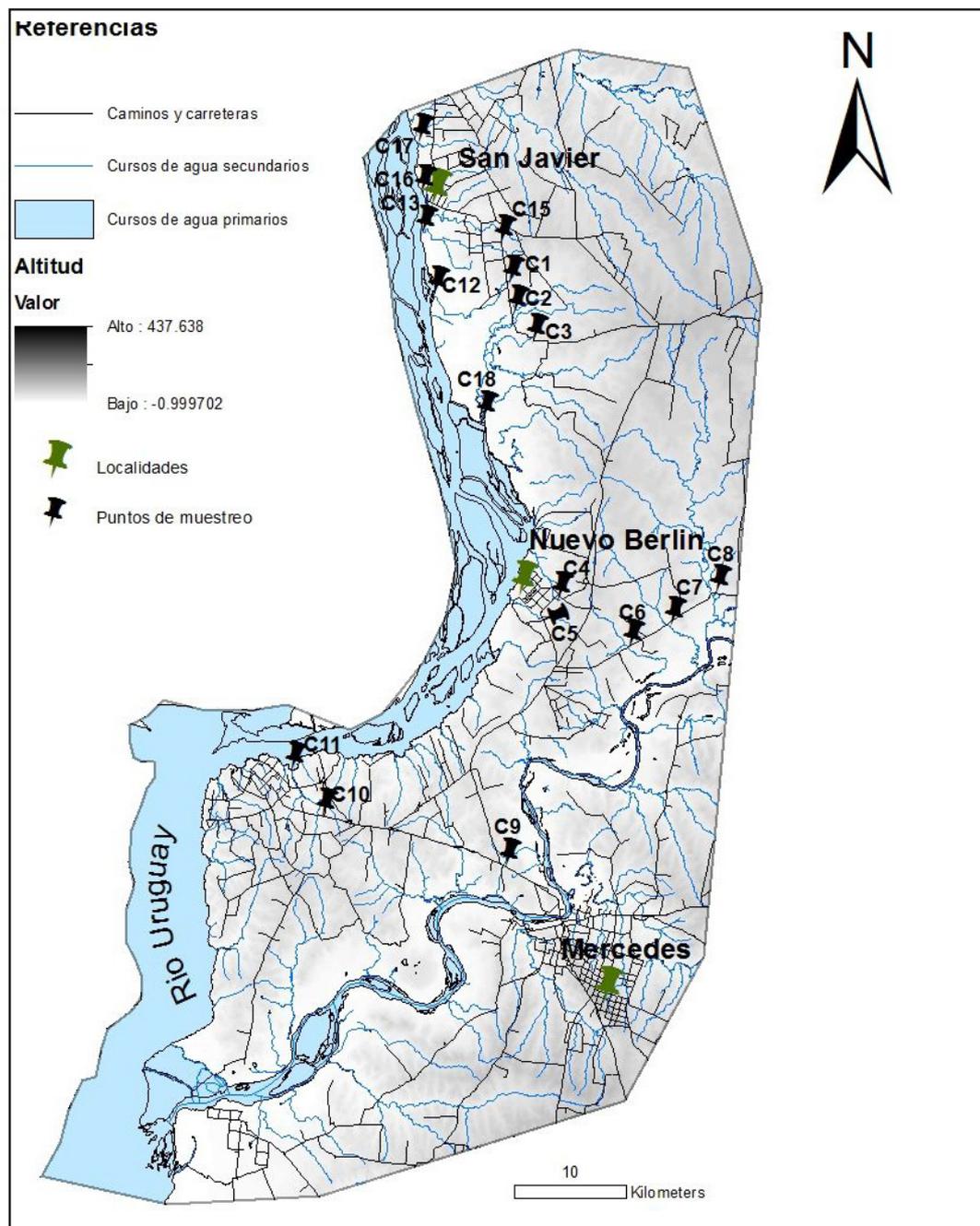


Figura 10. Identificación espacial de los sitios de muestreo y su codificación.

terrestre para la siembra de cultivos de verano (soja, maíz, sorgo). En este periodo se aplican la mayor parte de los plaguicidas buscados. El alcance de estos compuestos estuvo asociado al uso previsto reportado en La Guía SATA [28]. La Figura 11 ejemplifica mediante análisis de imágenes satelitales la existencia de predios con uso

con barbecho químico largo durante el transcurso de este trabajo.

Para la selección de sitios de muestreo, los criterios fueron los siguientes:

- Cursos que atraviesan una ruta definida sobre la zona geográfica delimitada;

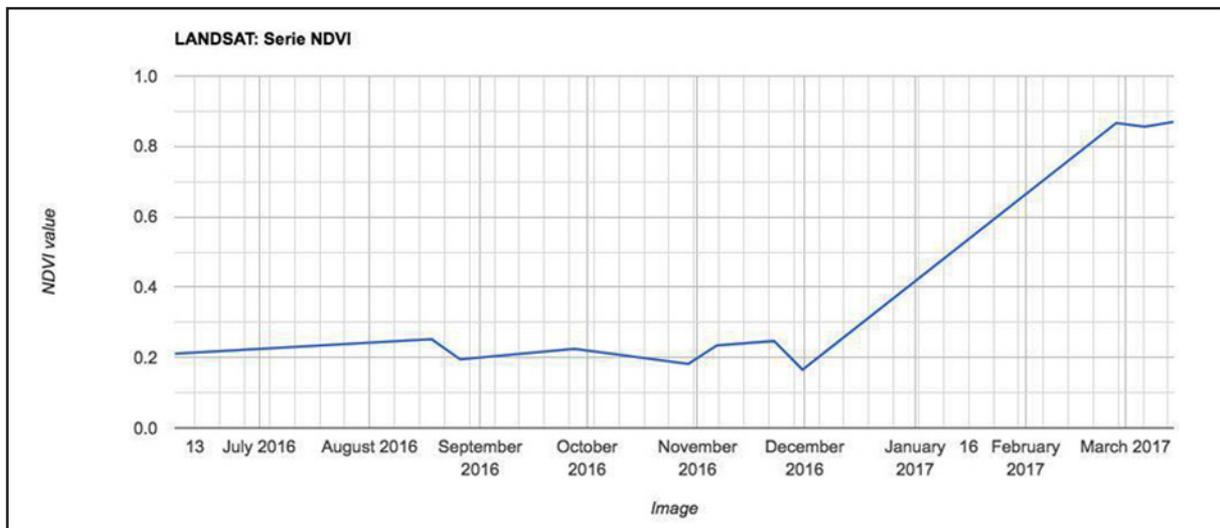


Figura 11. Distribución de curva de índice NDVI para un pixel de 30 x 30 m definido en la clasificación de Figura 1 como clase Agricultura para el periodo Abril 2016 - Abril 2017. Lo que se observa es un típico sistema de producción donde la secuencia de cultivo es cultivo de verano sobre cultivo de verano con una ventana invernal de abril a fines de noviembre en barbecho químico largo.

- ii) Cursos en áreas donde dominan zonas con forestación, zonas con agricultura y zonas mixtas para de esta forma estudiar diferencias por actividad productiva;
- iii) Cursos que desembocan en Rio Uruguay o bajo Rio Negro;
- iv) Factibilidad de realizar un muestreo programado semanal al que eventualmente podría sumarse una muestra más en alguna semana particular donde ocurra un evento de precipitación importante.

Los supuestos realizados implican evidenciar mediante muestreos de alta frecuencia, el momento de ingreso de los herbicidas a los cursos de agua. Las aplicaciones de herbicidas fueron confirmadas visualmente desde fines de agosto de 2016 y posteriormente mediante análisis de imágenes satelitales.

4.2.2 Muestreo

Los muestreos fueron realizados semanalmente entre los meses de agosto y noviembre de 2016. Muestras representativas de cada sitio y fecha de muestreo fueron tomadas con un balde tomado incrementos de 1-2 L por minuto. Estas se recogieron del medio del curso de agua y fueron transferidas por triplicado a recipientes de polipropileno de 50 mL. Las muestras fueron inmediatamente guardadas en con-

servadora con hielo y transportadas al laboratorio en el mismo día donde fueron congeladas hasta su análisis.

Al momento de recoger las muestras se tomó una medida de caudal instantáneo del curso al cual pertenece la muestra. Adicionalmente, se midieron con sonda multiparamétrica los parámetros temperatura, oxígeno disuelto y conductividad. Para este trabajo no fue determinado el herbicida glifosato.

4.2.3 Determinaciones

Los métodos analíticos empleados en este monitoreo fueron detallados en la Sección 2.2.1 de este documento.

4.3 Resultados y Discusión

Fueron analizadas 127 muestras del área de estudio en el periodo de tiempo. Fueron realizadas 66 detecciones de los herbicidas estudiados en las muestras señaladas. La distribución de frecuencias de detección se muestra en la Figura 12.

Fueron detectados 6 herbicidas de los 11 monitoreados y 2 metabolitos de atrazina buscados. Cabe destacar que la metodología utilizada fue objetivada al grupo de compuestos para los que se desarrolló el método.

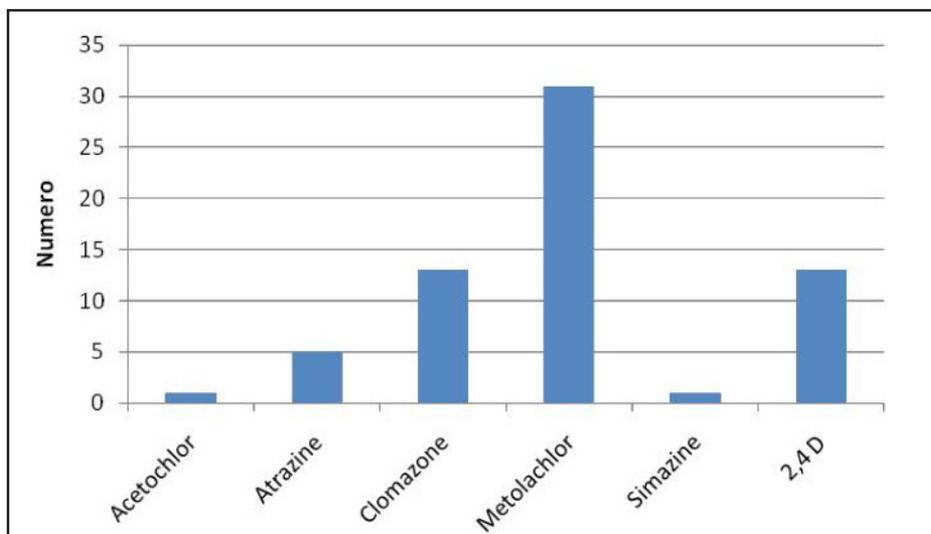


Figura 12. Frecuencias de detección (FO, %) de los herbicidas detectados. Estimación realizada sobre el total de detecciones.

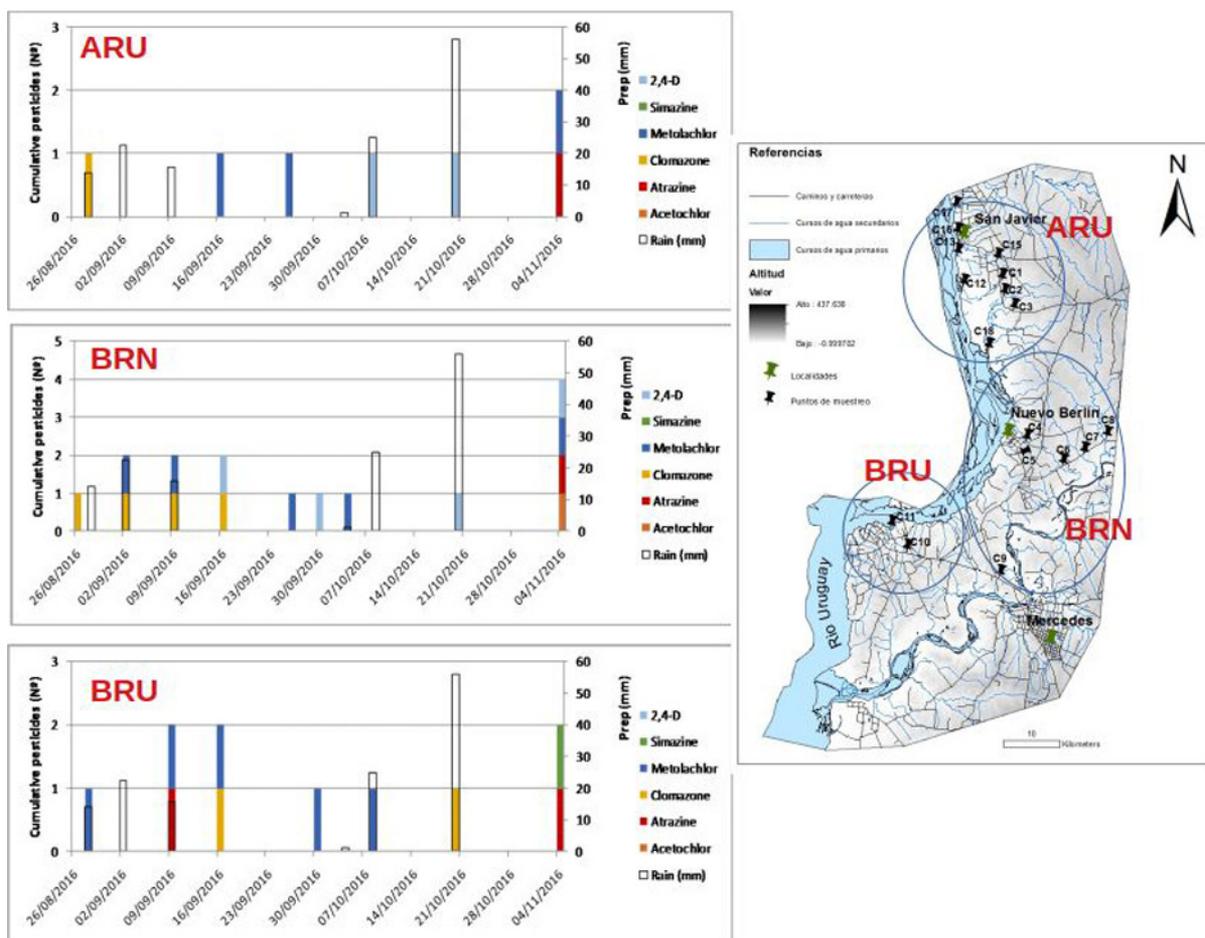


Figura 13. Distribución espacio-temporal de las detecciones de herbicidas por zonas. Cuenca Alta de cursos que desembocan en Río Uruguay (ARU), Cuenca Baja de cursos que desembocan en Río Negro (BRN) y muestras tomadas del propio Río Uruguay en la parte baja (BRU). En el eje secundario se representan las precipitaciones semanales acumuladas.

		Acetoclor	Atrazina	Clomazone	Metolaclor	Simazina	2,4-D
Cuenca alta (C1:C2:C3:C15)	Frecuencia de detección (%)	0	2	5	12	0	5
	Máxima Conc. detectada (µg/L)	-	0,4	<LOQ	0,6	-	0,3
	Mínima Conc. detectada (µg/L)	-	-	-	<LOQ	-	0,2
	Promedio (µg/L)	-	-	0,1	0,3	-	0,2
	n (muestras)	41					
Cuenca baja (C4 a C10)	Frecuencia de detección (%)	2	4	9	19	0	20
	Máxima Conc. detectada (µg/L)	<LOQ	0,4	0,4	0,6	-	2,8
	Mínima Conc. detectada (µg/L)	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	0,1
	Promedio (µg/L)	-	0,4	0,4	0,4	-	0,7
	n (muestras)	54					
Río Uruguay (C11 a C14: C16 a C18)	Frecuencia de detección (%)	0	7	13	50	3	0
	Máxima Conc. detectada (µg/L)	-	<LOQ	0,5	0,6	<LOQ	-
	Mínima Conc. detectada (µg/L)	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-
	Promedio (µg/L)	-	-	0,3	0,5	0,1	-
	n (muestras)	30					

Figura 14. Herbicidas detectados, concentraciones máximas, mínimas y medias. LOQ: límite de cuantificación.

Como puede verse en Figura 12, el herbicida metolaclor es el compuesto con mayor frecuencia de detección (FO = 31%) seguido por 2,4-D y clomazone (FO = 13%). También fueron detectados atrazina, acetoclor y simazina. La distribución temporal y espacial de resultados puede verse en la Figura 13 mientras que el resumen de los resultados se esquematiza en la Figura 14. Como puede observarse en estos se ha simplificado la agrupación de resultados en las áreas Cuenca Alta de cursos que desembocan en Río Uruguay (ARU), Cuenca Baja de cursos que desembocan en Río Negro (BRN) y muestras tomadas del propio Río Uruguay en la parte baja (BRU). Se deduce una dinámica espacial interesante donde en BRN se dan las mayores concentraciones encontradas de 2,4-D. A comienzos de noviembre, fecha en la cual se dejó de muestrear, se observó el máximo de frecuencias y concentraciones detectadas. De acuerdo con estos resultados, se observa que los eventos de precipitaciones no se vinculan inmediatamente con la presencia de los herbicidas en los cursos de agua secundarios. Se observa un desfase de al menos quince días entre un evento de lluvia relevante (56 mm) que pudo producir la escorrentía y la consecuente detección de estos compuestos en la gran mayoría de los cursos relevados. Por otra parte, el tiempo entre la aplicación de herbicidas en los predios y su llegada a los cursos se observa que está en el orden de al menos un mes para esta área de estudio. Es de destacar, las escasas pendientes encontradas para el área estudiada tal como se ilustra en la Figura 10. Esta información no está disponible en Uruguay y debe ser considerada a futuro en el marco de los diseños de campañas de muestreo.

La significancia de estos resultados en términos ecotoxicológicos fue evaluada a través de la toxicidad aguda y crónica de acuerdo a información de referencia [29]. En este sentido, fueron estimadas las Unidades Tóxicas (UT) de estos resultados como indicadores de toxicidad aguda empleando organismos de referencia [29]. La Figura 15 ejemplifica para los máximos niveles encontrados, es decir, en el peor escenario, las UT para tres niveles de organismos acuáticos: invertebrados, peces y algas.

De acuerdo a esta evaluación, se encuentra que para todos los sitios, los riesgos para invertebrados y peces no son significativos. Sin embargo, en la gran mayoría de sitios relevados, las UT son menores a 4% para algas y un caso de 22% en C7 asociado específicamente a la detección de acetoclor. Estos resultados revelan un posible riesgo agudo hacia organismos fotosintéticos en agua. Por otra parte, la exposición en general debe ser evaluada en perspectiva de toxicidad crónica para futuros trabajos aunque pueden existir eventos puntuales cuyo riesgo no debe ser desestimado.

4.4 Conclusiones

Se detectaron 6 residuos de herbicidas, dos de ellos con mayor frecuencia (metolaclor y 2,4-D) posiblemente asociados a su mayor uso en la ventana de tiempo estudiada en estas cuencas y su relativa movilidad por escorrentía. Se encontró una multiplicidad de principios activos en algunas muestras tomadas al final del estudio, encontrándose simultáneamente hasta 4 herbicidas por muestra de agua. El acetoclor demuestra ser el compuesto prioritario para la gestión en base a su toxicidad aguda a plantas acuáticas. Es de destacar que en todos los momentos fueron detectados algunos herbicidas desde el inicio hasta el final del estudio. Sin embargo, al final de este se encontró mayor frecuencia y niveles de residuos lo que indica una clara asociación a los eventos de aplicación en barbechos químicos.

Se concluye además, que las muestras del Río Uruguay no son muy diferentes a las de los cursos secundarios de la zona de estudio tanto en diversidad de compuestos como en concentraciones. Esto indica una incidencia de la agricultura a escala regional. Se encontró que se requiere de al menos un mes luego de aplicaciones para evidenciar la llegada de herbicidas a los cursos de agua cercanos (arroyos) dentro de las cuencas estudiadas. La estrategia e información generada es relevante desde una perspectiva de diseños de monitoreo ambiental, gestión ambiental y priorización de riesgos.

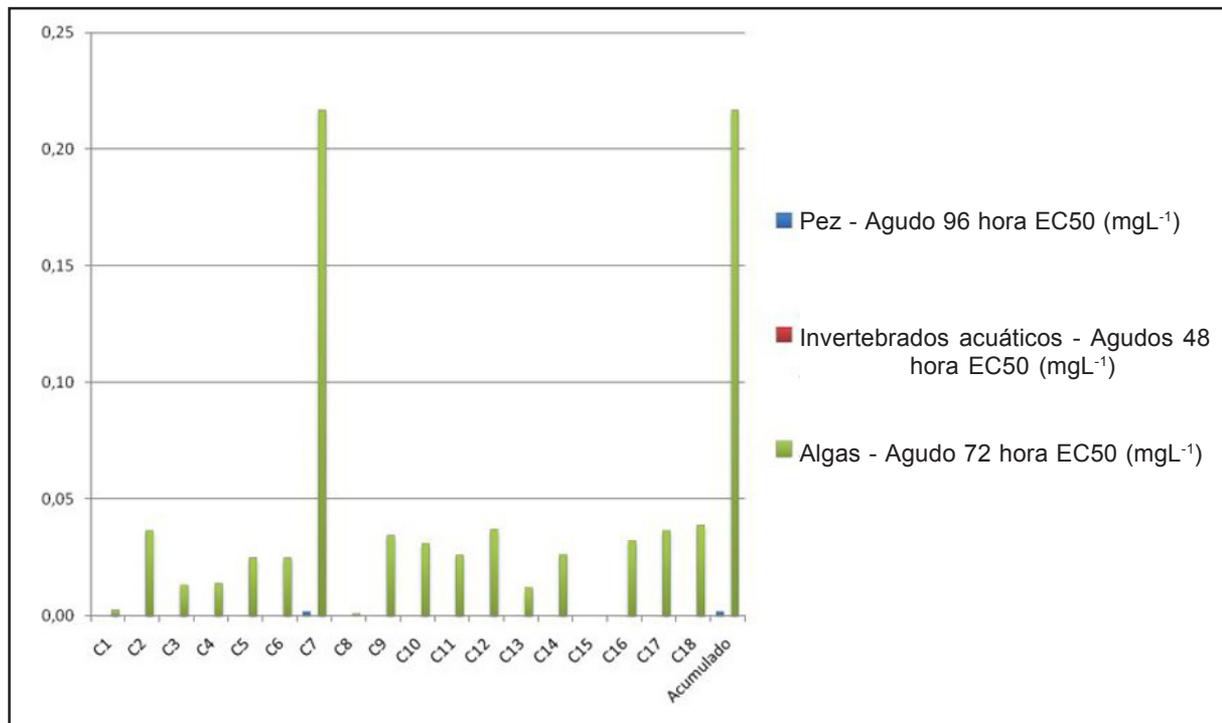


Figura 15. Unidades Tóxicas estimadas en el peor escenario para los diferentes sitios de muestreo durante este estudio.

5. CONCLUSIONES

Este proyecto intentó establecer bases para desarrollar capacidades analíticas, estrategias de trabajo en el estudio de los residuos de plaguicidas desde una perspectiva ambiental. Ejemplos de ello son, la indicación de algunas estrobirulinas frecuentemente detectadas en peces como aquellos compuestos que pueden generar mayor toxicidad o la identificación de acetoclor como un compuesto que merece atención por riesgo ecotoxicológico.

Se ha evidenciado un destino difuso de los plaguicidas con diferentes variables de difícil asociación, como ser la incidencia de las propiedades fisicoquímicas del plaguicida, la toxicidad, capacidad de degradación ambiental, la temporalidad de usos de los plaguicidas, los volúmenes de uso, entre otras. El desarrollo de este proyecto ha sido innovador en la evidencia el estrés ambiental que sufre el contexto de un área protegida RAMSAR de interés internacional como el Parque Nacional Esteros de Farrapos por la agricultura. La influencia agropecuaria local sobre la sostenibilidad y conservación

del ecosistema acuático aún es poco clara con la información disponible. Se ha visto que los niveles de residuos de plaguicidas encontrados tanto en peces como en agua no pueden ser diferenciados localmente de la contaminación a nivel cuenca. Es decir, las estrategias de conservación del sitio en estudio dependen más de medidas de gestión regionales, incluso internacionales que propias de la agricultura próxima al Parque.

Este proyecto ha permitido al grupo GACT fortalecer su trayectoria académica y visibilidad nacional e internacional en las temáticas discutidas, en especial en relación al monitoreo ambiental empleando peces. Como productos de este proyecto han sido cubiertos varios hitos en formación de recursos humanos, investigación y relacionamiento con el medio. Fueron numerosas las presentaciones en congresos nacionales e internacionales, se lograron algunas publicaciones científicas y un capítulo de libro. Se logró establecer en el marco del proyecto el soporte para la realización de trabajos finales de carreras de grado, proyectos de iniciación a la investigación, entre otras activida-

des. Fueron también desarrolladas varias charlas presenciales de divulgación con las comunidades locales en San Javier y Nuevo Berlín así como mantener reuniones regulares de trabajo y evaluación de resultados con los integrantes de DINARA, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). De la misma forma, los resultados fueron divulgados a las autoridades

del MGAP y presentados posteriormente en eventos organizados por la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA). Los resultados generados en este proyecto han sido relevantes para evaluar la sustentabilidad ambiental de los sistemas productivos y generar capacidades nacionales para enfrentar estos desafíos.



Figura 16. Reuniones de divulgación mantenidas en San Javier y Nuevo Berlín (Rio Negro). Año 2016.

6. REFERENCIAS

- [1] D. Tilman, C. Balzer, J. Hill, B.L. Befort, Global food demand and the sustainable intensification of agriculture, *PNAS*. 108 (2011) 20260–20264.
- [2] D. Tilman, K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor, S. Polasky, Agricultural sustainability and intensive production practices, *Nature*. 418 (2002) 671–677.
- [3] Codex Alimentarius, No Title, Codex Pestic. Residues Food Online Database. (2020). en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>
- [4] Comisión Europea. EU - Pesticides. Database. (2020). en: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- [5] Comisión Europea. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas., *Diario Oficial de La Unión Europea* (2008) 84–97. en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0105>
- [6] Decreto 253/79 del Poder Ejecutivo. República Oriental del Uruguay (1979) 1–14.
- [7] A. Pérez-Parada, Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas, Tesis Doctoral. Facultad de Química UdelaR (2012) pp. 437. en: <http://riqim.fq.edu.uy/items/show/5460>
- [8] UNIT 833, Instituto Uruguayo de Normas Técnicas. Agua Potable – Requisitos. (2010).
- [9] SNAP Esteros Farrapos e Islas Del Río Uruguay. (2004). en: http://www.snap.gub.uy/sisnap/web/mapa_conceptual/nodo/18
- [10] L. Pareja, M.J. Martínez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 4790–4798. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.044>
- [11] Comisión Europea, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017, *Eur. Comm. Dir. Heal. Food Saf.* (2017) 1–46.
- [12] B. Alonso, M. Eugui, R. Sofía, C. Marcos, A. Pérez-Parada, H. Heinzen, L. Pareja, Análisis de herbicidas en cursos de agua mediante inyección directa en LC-MS/MS, 2016.
- [13] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck, Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [14] F. Ernst, B. Alonso, A. Pérez-Parada, M. Colazzo, N. Besil, L. Pareja, H. Heinzen, Validación de un método QuEChERS para la determinación de residuos de pesticidas en sedimentos mediante GC-MS y LC-MS/MS. Cuarto Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA4). ISBN 978-9974-0-1404-6. (2016) 116.
- [15] F. Ernst, B. Alonso, M. Colazzo, L. Pareja, V. Cesio, A. Pereira, A. Márquez, E. Errico, A.M. Segura, H. Heinzen, A. Pérez-Parada, Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems, *Sci. Total Environ.* 631–632 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.320>
- [16] M. Colazzo, B. Alonso, F. Ernst, M.V. Cesio, A. Pérez-Parada, H. Heinzen, L. Pareja, Determination of multiclass, semi-polar pesticide residues in fatty fish muscle tissue by gas and liquid chromatography mass spectrometry, *MethodsX*. 6 (2019) 929–937. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.04.014>
- [17] A. Pérez-Parada, B. Alonso, C. Rodríguez, H. Heinzen, QuEChERS determination of pesticide residues in fish tissues from Rio Uruguay and Rio Negro using GC-MS & LC-MS / MS, *Trab. Present. En Formato Póster En El Quinto Congr. Latinoam. Residuos Plaguicidas (LAPRW)*, Santiago Chile. (2015) 1.
- [18] A. Pérez-Parada, B. Alonso, F. Ernst, M. Colazzo, L. Pareja, N. Besil, S. Rezende, V. Cesio, H. Heinzen, Multiresidue analysis of pesticides in fish muscle tissue from agricultural areas in Uruguay/: analytical and monitoring outcomes, 5th Latin American Pesticide Residue Workshop. (2017) San José, Costa Rica.
- [19] A. Pérez-Parada, M. Colazzo, B. Alonso, F. Ernst, L. Pareja, N. Besil, V. Cesio, H. Heinzen, New workflow for identification of multiclass pesticides at < 1 ppb levels in fish samples by LC-MS / MS using enhanced product ion spectrum, *Pittsbg. Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (Pittcon)* (2017) Chicago, EEUU.
- [20] B. Alonso, F. Ernst, A. Pereira, V. Cesio, A. Pérez-Parada, H. Heinzen, S.-C. Nancy, Desarrollo de una metodología analítica y su aplicación en el monitoreo de residuos de pesticidas en peces en las cuencas de los ríos Negro y Uruguay, 25a Reunion Anual Da Sociedade Brasileira de Química - SBQ. 2016 (2016) 10. Sao Carlos.
- [21] A. Pérez-Parada, B. Alonso, E. F., F. Teixeira de Mello, A. Pereira, H. Heinzen, One year pilot monitoring of pesticide residues in fish from Uruguay and Negro river basins Non-Migratory, *European Pesticide Residue Workshop*. (2015) Limassol, Cyprus.

- [22] L. Pareja, M. Colazzo, M. Cesio, H. Heinzen, A. Pérez-Parada, Determination of pesticide residues in fish, in: *Pesticide Occurrence Analysis and Remediation*. Vol 1. Biological Systems. Eds. Innamuddin, Mohd Imran Ahamed Eric Lichtfouse. *Sustainable Agriculture Reviews* 47 Springer Nature (2020) DOI: 10.1007/978-3-030-54712-7_1
- [23] A. Pérez-Parada, G. Goyenola, F. Teixeira de Mello, H. Heinzen, Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes, *Current Opinion in Environmental Science and Health* 4 (2018) 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.08.004>
- [24] M. Ríos, N. Zaldúa, S. Cupeiro. Evaluación participativa de niveles de plaguicidas en el Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay ISBN: 978-9974-7589-5-7. (2010) Disponible en: http://vidasilvestre.org.uy/wpcontent/uploads/2010/10/libro_resultados_sc.pdf
- [25] WHO. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. Global Environment Monitoring System – Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) in collaboration with Codex Committee on Pesticide Residues. (1997) WHO/FSF/FOS/97.7 en: <https://www.who.int/foodsafety/publications/pesticides/en/>
- [26] INIA GRAS, Mapas de Precipitación Acumulada. (2020). <http://www.inia.uy/gras/Clima/Precipitación-nacional>
- [27] Z. Vryzas, Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions, *Current Opinion in Environmental Science and Health* 4 (2018) 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.001>
- [28] SATA. Guía para la Protección y Nutrición Vegetal. La Guía SATA. (2020). <https://www.laguiasata.com/>
- [29] IUPAC FOOTPRINT. Pesticides Properties DataBase PPDB. (2020). <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>
- [30] von der Ohe P.C., de Zwart D. (2013) Toxic Units (TU) Indicators. In: Férard JF., Blaise C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_103

INIA Dirección Nacional
Avenida Italia 6201,
Ed. Los Guayabos,
Parque Tecnológico LATU.
Montevideo
Tel.: 2605 6021
inia@inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11
Colonia
Tel.: 598 4574 8000
Fax: 598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48, Km 10
Canelones
Tel.: 598 2367 7641
Fax: 598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: 598 4733 5156
Fax: 598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5, Km 386
Tacuarembó
Tel.: 598 4632 2407
Fax: 598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres
Tel.: 598 4452 2023
Fax: 598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy