

COMPORTAMIENTO Y DESTINO AMBIENTAL DE LA ATRAZINA EN EL SUELO: DETECCIÓN POR HPLC Y ^{14}C DE LAS CONCENTRACIONES AMBIENTALES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS Y DE CAMPO EN SALDAÑA –TOLIMA¹

Environmental Behavior of Atrazine in Soils: Detection of Environmental Concentrations Using HPLC and ^{14}C Under Controlled and Field Conditions at Saldaña-Tolima, Colombia

Cilia L. Fuentes², Amanda Lozano de Yunda³, Jairo Arturo Guerrero-Dallos⁴,
Luz Elena Pérez⁵, Israel Olarte⁵ y Baudilio Acevedo⁵

RESUMEN

En este trabajo se optimizó y validó un método analítico que incluyó extracción, limpieza, y determinación cromatográfica por HPLC de los compuestos atrazina (AT), deetilatraxina (DEA) y deisopropilatraxina (DIA). Se analizaron muestras de suelo tomadas de una parcela sembrada comercialmente con maíz en el municipio de Saldaña, Tolima, tratada con el herbicida atrazina a una dosis de 2,4 Kg i.a/ha. No se detectaron los productos de degradación DIA y DEA en ninguna de las muestras. AT se encontró a una concentración de 233 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a los 4 días después del tratamiento (ddt), de 137,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a los 37 ddt y de 24,8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a los 70 ddt; en el muestreo a los 125 ddt no fue detectada.

En otro experimento bajo condiciones controladas de cámaras de crecimiento, para evaluar el efecto de la temperatura y la humedad del suelo en el proceso de degradación de la atrazina, se encontró que la temperatura, más que la humedad, resultó ser un factor determinante para la degradación de este herbicida; así, la degradación del compuesto fue mayor a 30°C que a 20°C. Con base en el análisis cromatográfico por HPLC tampoco se detectaron los metabolitos DIA y DEA en ninguno de los muestreos. Los resultados sugirieron, o que el compuesto parental se transformaba (metabolizaba) a otros metabolitos diferentes a DIA y DEA, o que existía una fuerte interacción de la molécula parental y sus metabolitos con los componentes del suelo, lo cual no permitía su extracción y detección mediante técnicas analíticas convencionales. Por lo cual, se estudió la mineralización, sorción y movilidad de la atrazina bajo condiciones de laboratorio utilizando técnicas isotópicas con ^{14}C en dos suelos del Municipio de Saldaña. La mineralización se determinó a 25°C en biómetros que contenían suelo tratado con ^{14}C -atrazina equivalente a 2,0 Kg ia/ha y pequeños frascos con NaOH para colectar el $^{14}\text{CO}_2$, producto de la mineralización del herbicida. El $^{14}\text{CO}_2$ se colectaba semanalmente y se leía su actividad en un contador de centelleo. Los suelos estudiados presentaron una

baja mineralización de ^{14}C -atrazina durante las 17 semanas que duró la experiencia, de máximo 11%. En todos los suelos la mayor cantidad de ^{14}C permaneció en forma ligada (49% a 80%); además, ésta fracción ligada se incrementaba con el tiempo. Respecto a la fracción extraíble, estaba compuesta en un 62% a 94% por ^{14}C -atrazina y en un 6% a 38% por hidroxiatrazina (HA); no se encontró otro metabolito. Los suelos presentaron una alta afinidad por el herbicida, y tanto la adsorción como la desorción se ajustaron al modelo de Freundlich. Los valores de K_d para la adsorción fueron respectivamente para los dos suelos de 0,61 y 0,14. La movilidad de la ^{14}C -atrazina se evaluó mediante la técnica de Cromatografía de Capa Fina de Suelo (CCFS); así, la movilidad de la ^{14}C -atrazina fue mucho mayor en el suelo franco-arenoso que en el franco-limoso.

Palabras claves: Herbicidas, atrazina, metabolitos, mineralización, degradación, adsorción-desorción, K_d , HPLC, técnicas isotópicas.

SUMMARY

An analytic method that included extraction, cleaning, and HPLC determination of atrazine (AT), deethylatraxine (DEA) and deisopropilatraxine (DIA) was optimized and validated. Soil samples from a corn field of the municipality of Saldaña, Tolima-Colombia, treated with the herbicide atrazine (2,4 Kg a.i/ha) were analyzed. DIA and DEA metabolites were not detected in any of the soil samples. AT was found in to concentration of 233 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 4 days after treatment (dat), of 137,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 37 ddt and of 24,8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 70 ddt, but 125 ddt it was not detected.

In a second phase, atrazine soil behavior was studied under growth chambers conditions to evaluate temperature and soil humidity effect. It was found that temperature, more than humidity, was the main factor controlling herbicide degradation process. This way, atrazine transformation was bigger at 30°C than at 20°C. Based on

- Fecha de recepción 17 de noviembre de 2002
- Aceptado para publicación 25 de marzo de 2003

¹ Estudio patrocinado por el International Atomic Energy Agency (IAEA), bajo el proyecto COL-05/16.

² Profesora. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail: ciliafuentes@mailcity.com

³ Profesora. Facultad de Ciencias-Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

⁴ Profesor. Facultad de Ciencias-Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

⁵ Anteriormente, estudiante de Química, Facultad de Ciencias-Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

HPLC procedure DIA and DEA was not detected in any of soil samples. Results suggest that parental compound was transformed to other metabolites different to DIA or DEA, or that a strong interaction of atrazine and their metabolites with soil components happens, which did not allow compounds extraction and detection by means of HPLC procedures. In a third phase, herbicide mineralization, sorption and mobility was studied under laboratory conditions using isotopic techniques in two soils of Saldaña Municipality. Mineralization was determined at 25°C in biometers contained soil treated with ^{14}C -atrazine equivalent to a dose of 2,0 Kg ai/Ha and small flasks with NaOH to collect the $^{14}\text{CO}_2$, resulting of ^{14}C -atrazine mineralization. $^{14}\text{CO}_2$ was collected weekly and their activity was read by liquid scintillation counting. No more than 11% of ^{14}C -atrazine was transformed to $^{14}\text{CO}_2$ during 17 weeks period. ^{14}C remained in bound form (49% to 80%), and this bound portion increased with the time. Extractable fraction was composed in a 62% to 94% by ^{14}C -atrazine and in 6% to 38% by hidroxiatrazina. There was not found any other metabolite. Soils had high affinity for the herbicide, and adsorption as the desorption were adjusted to Freundlich model. K_d adsorption values were 0,61 and 0,14 for the two soils, respectively. ^{14}C -atrazina mobility was evaluated by means of Soil Thin Layer Chromatography (STLC); herbicide mobility was higher in the sandy-loam than in the silty-loam soil.

Key words: Herbicides, atrazine, metabolites, mineralization, degradation, adsorption-desorption, K_d , HPLC, isotopic technics.

INTRODUCCION

Actualmente existen en el mercado mundial más de 150 ingredientes activos con propiedades herbicidas, que pertenecen a diferentes familias o grupos químicos. Una familia importante de herbicidas son los compuestos triazínicos, dentro de la cual se encuentra el herbicida atrazina (2-cloro-4 – etilamino- 6- isopropilamino-s-triazina) (WSSA, 1994).

La atrazina es un herbicida selectivo que tiene como mecanismo de acción la inhibición del Fotosistema I en el proceso fotosintético en plantas sensibles. Este herbicida tiene actividad tanto en el suelo como vía foliar (WSSA, 1994). Es un herbicida s-triazínico muy utilizado en todo el mundo para controlar selectivamente plantas adventicias en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar y plantaciones forestales; también es usado para el control total de malas hierbas en áreas no agrícolas, tales como vías férreas y zonas industriales (Ashton & Crafts, 1981, García & Fernandez, 1991). En Colombia, la atrazina es uno de los productos para la protección de cultivos más vendidos y ocupó el sexto lugar en ventas en 1995; la cantidad vendida (consumo aparente) fue de 324.400 kg, representando el 3,9% del total de ventas de herbicidas (Instituto Colombiano Agropecuario, 1996).

Dado que el uso de la atrazina se difundió ampliamente durante los últimos 40 años, sobre la base de sus pro-

piedades fisicoquímicas es considerada en varios países, especialmente de zonas templadas, como un contaminante potencial de las aguas subterráneas (Mirgain *et al.*, 1993). Los organismos internacionales de gestión ambiental han comenzado a preocuparse por el riesgo de contaminación que pudiera correr el hombre y los animales debido al consumo de agua potable de origen superficial y subterráneo que pudiera estar contaminada con atrazina.

Una vez los plaguicidas son introducidos en el ambiente, estos sufren transformaciones biológicas y químicas. La atrazina, como muchos otros plaguicidas, es susceptible de sufrir transformaciones químicas y biológicas al estar expuesta al ambiente. Entre los principales factores abióticos que determinan su transformación están: la temperatura, la humedad, el pH del suelo, el contenido y el tipo de arcillas, y el contenido de materia orgánica (Hance *et al.*, 1968; Best & Weber 1974; Borggaard & Streibig, 1988; Armstrong *et al.*, 1967). Por lo tanto, el patrón de degradación de la atrazina, al igual que el de muchos plaguicidas, no es igual en todos los tipos de suelos y todos los ambientes. La acción de microorganismos es tal vez el factor biótico más importante en la degradación de este herbicida (Pichon *et al.*, 1995; Steinheimer, 1993; Lerch & Donald, 1994; Govi *et al.*, 1996).

Varios estudios muestran que la atrazina sigue fundamentalmente dos vías de degradación: la hidrólisis química y la degradación microbiana (Vera *et al.*, 1988; Steinheimer, 1993). La hidrólisis química conduce comúnmente a la obtención de compuestos hidroxilados como hidroxiatrazina (HA), deetilhidroxiatrazina (DEHA) y deisopropilhidroxiatrazina (DIHA). Estos productos comparados con el compuesto parental no son fitotóxicos, por tanto se considera que ésta vía es en cierta forma de descontaminación del ambiente (Mersie & Seybold, 1996; Pichon *et al.*, 1995; Aker & Muir, 1978).

En el proceso de transformación de la atrazina en el suelo, la actividad microbiana es muy importante puesto que un grupo de microorganismos puede utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno y energía (Sorenson *et al.*, 1994, entre otros autores). La degradación microbiana conduce principalmente a la N-dealquilación formando deetilatrizona (DEA), deisopropilatrizona (DIA), y deetildeisopropilatrizona (DEDIA); la posterior degradación de estos productos produce 4-amino-2-cloro-1,3,5-triazina (Sorenson *et al.*, 1994, entre otros autores).

El proceso de transformación o degradación de algunos compuestos se caracteriza por un periodo de retardo durante el cual la concentración cambia poco ó nada; esto es seguido por una rápida degradación. Para algunos compuestos no hay un periodo de retardo y la velocidad de degradación es más ó menos proporcional a la concentración; así, los resultados son a menudo interpretados usando una cinética de primer orden (Hance, 1980); tal es el caso de atrazina (Aker & Muir, 1978; Hurlle & Walker, 1980).

El concepto de vida media ($t_{1/2}$), tiempo que se requiere para que desaparezca el 50% de la concentración inicial del compuesto, es una herramienta valiosa para comparar tasas de disipación o degradación de plaguicidas, o el efecto de diferentes factores sobre un mismo compuesto. Existen numerosos estudios sobre el cálculo de la vida media de la atrazina en el suelo a nivel mundial. Nakagawa *et al.* (1995) informan por ejemplo, valores de $t_{1/2}$ en suelos de Brasil entre 56 y 54 días. Por su parte, Sorenson *et al.* (1994) indican que aún después de 16 meses, la atrazina y sus productos de degradación estaban presentes en suelos de Minnesota, con un potencial de movilidad tal que puede llegar a contaminar aguas subterráneas. Best & Weber (1974) registraron del 87 a 99% de la concentración inicial de ^{14}C -atrazina después de 5 meses de tratar un suelo en condiciones de invernadero. En el oeste de Australia la vida media del herbicida puede variar desde 42 hasta 110 días. Los valores de $t_{1/2}$ se correlacionaron positivamente con la cantidad de herbicida aplicado y con el adsorbido por el suelo. Estos valores se incrementan con el pH del suelo, la materia orgánica y el contenido de arcilla. Los valores de $t_{1/2}$ decrecieron exponencialmente con el aumento de la temperatura y la humedad del suelo (Walker & Blacklow, 1994).

El fenómeno dominante en la interacción de un plaguicida con los constituyentes del suelo es el fenómeno de adsorción-desorción en la interfase sólido-agua, puesto que afecta la concentración del producto en la solución del suelo; por tanto, éste proceso está estrechamente involucrado en el transporte y la absorción por los organismos vivos. La distribución del herbicida entre la fase líquida y la fase adsorbente afecta el grado de fitotoxicidad que pueda causar el compuesto así como su degradación, y por consiguiente el riesgo de contaminación de suelos y aguas subterráneas (Calvet, 1980).

El comportamiento de herbicidas como la atrazina en el suelo depende de varios factores, tales como las características fisicoquímicas del compuesto, de la actividad superficial de los componentes orgánicos e inorgánicos de suelo, de las propiedades del suelo y de la cantidad de herbicida aplicado, entre otros (Govi *et al.*, 1996). Las propiedades del herbicida y los constituyentes del suelo con los cuales el herbicida entra en contacto, son de importancia primordial en la determinación de los mecanismos de adsorción y por ende, de la bioactividad y movilidad del compuesto (García & Fernández, 1991; Aker & Muir, 1978; Huang *et al.*, 1984; Barriuso *et al.*, 1992b).

La atrazina es un compuesto débilmente básico ($\text{pK}_a = 1,68$) y de baja solubilidad en agua ($3,3 \times 10^{-3}$ g/mL), que se adsorbe sobre la materia orgánica y las arcillas del suelo. La adsorción es dependiente del valor de pH del suelo; así, la adsorción es mayor a medida que decrece el pH (Best & Weber, 1974). La máxima cantidad adsorbida se da a valores de pH cercanos al valor de pK_a .

La dinámica de la adsorción puede definirse mediante isothermas de adsorción. En las isothermas la constante de adsorción (K_d) es de gran importancia ya que es un índice

de la capacidad de adsorción del herbicida por el suelo (Barriuso *et al.*, 1992a & b; Clay & Koskinen, 1990; Gilchrist, 1993; Weber *et al.*, 1993).

Hasta el momento hay pocos estudios sobre la adsorción / desorción de los principales productos de degradación de la atrazina en suelos agrícolas; sin embargo se conoce que en suelos agrícolas de Virginia (USA), la HA es más fuertemente adsorbida que la AT, DEA y DIA (Mersie & Seybold, 1996).

La atrazina por ser una base débil y de baja solubilidad en agua, en la mayoría de los suelos con pH entre 4,0 y 8,0 y fuerza iónica en la solución del suelo del orden de 0,01, su adsorción sobre la materia orgánica y los minerales de los suelos debida a intercambio iónico es despreciable; mientras que pueden considerarse otros mecanismos como la formación de puentes de hidrógeno o la formación de complejos donador-aceptor de electrones (Hance *et al.*, 1968; Best & Weber, 1974; Borggaard & Streibig, 1988; Armstrong & Cherster-Harris, 1967).

De manera general, la atrazina se adsorbe con mayor facilidad en suelos francos o arcillosos que en suelos con poca arcilla y bajo contenido de materia orgánica; la adsorción es reversible y la desorción depende de factores como pH, temperatura y humedad. Su movimiento quelatante está limitado por la adsorción sobre los constituyentes del suelo (Barriuso *et al.*, 1992b).

El uso de técnicas isotópicas normalmente que utilizan ^{14}C - permiten obtener información acerca de la cantidad de plaguicida, que luego de ser aplicado al suelo, no se libera y empieza a formar enlaces que dan origen a residuos llamados "recalcitrantes". En experimentos de degradación de un plaguicida en el suelo, cierta cantidad radiactiva permanece inextractable, denominada parte ligada. Así, podría definirse como el residuo del plaguicida que permanece en el ácido fúlvico, ácido húmico y fracciones húmicas luego de una secuencia exhaustiva de extracciones con solventes polares y orgánicos no polares (Hance, 1980).

El grado de movilidad de un plaguicida en el suelo puede determinar su potencial como contaminante (Hance, 1980). Existen varios procedimientos para caracterizar la movilidad de un plaguicida en el suelo, entre otros, las isothermas de adsorción, el uso de columnas de suelo, experimentos de campo con medidas a diferentes profundidades, los estudios con lisímetros y la cromatografía de capa fina de suelo (Helling, 1971c). Helling (1971a y b) desarrolló la técnica de "Cromatografía de Capa Fina de Suelo", la cual es una técnica análoga a la Cromatografía en Capa Delgada convencional, eluida con agua. La movilidad del plaguicida en el suelo se expresa como el Rf.

Para dar un manejo adecuado de los plaguicidas, es necesario entender el destino y comportamiento de estos compuestos en el ambiente. En países industrializados, las diversas investigaciones en torno al tema

son la base para el establecimiento de normas para el control y buen uso de estos productos, lo que conlleva a un uso racional y por tanto, a la disminución de sus efectos negativos potenciales.

Desde el punto de vista práctico, un acercamiento a la resolución del comportamiento de la atrazina en los suelos de Colombia, es determinar su vida media en el suelo (como una medida de la persistencia), los factores que afectan esa vida media, los coeficientes de adsorción, la cinética del metabolismo y el potencial de lixiviación, entre otros factores, que permitirían comprender el destino de la atrazina en el suelo.

El presente trabajo es un modelo de estudio del destino en el suelo de un plaguicida de uso agrícola. En este caso particular, se trata del herbicida atrazina en Saldaña-Tolima, una zona cálida de intensa actividad agrícola y alto consumo de plaguicidas en Colombia.

Se tuvieron como objetivos:

1. Estandarizar una metodología para la determinación de atrazina y sus metabolitos en suelo, por HPLC y detección con UV.
2. Evaluar a nivel de campo, la disipación de la atrazina y de algunos de sus productos de degradación en el suelo de una parcela tratada con el herbicida.
3. Evaluar, bajo condiciones controladas, el efecto de dos factores ambientales: la temperatura ambiente y el grado de humedad del suelo, sobre la degradación del herbicida en estudio en el suelo.
4. Determinar, bajo condiciones de laboratorio, la cinética de la mineralización, la adsorción-desorción y

la movilidad del herbicida en dos suelos del municipio de Saldaña-Tolima, utilizando técnicas isotópicas (^{14}C).

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento Experimental General

El trabajo se realizó en tres etapas durante los años 1997, 1998 y 1999, así: 1) Estandarización de la determinación de atrazina en suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), 2) Evaluación del efecto de la temperatura y humedad sobre la degradación de atrazina por HPLC y, 3) Evaluación de la mineralización, sorción y movilidad del herbicida utilizando técnicas isotópicas (^{14}C). En todos los casos las muestras de suelo fueron tomadas en el municipio de Saldaña (temperatura 28 C), Tolima, en la sede de la Asociación de Usuarios del distrito de riego del río Saldaña (USOSALDAÑA) y en un cultivo de algodón de la misma localidad. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de las condiciones generales de los experimentos y de la toma de las muestras en todo el estudio.

En el Cuadro 2 se presentan las características físico-químicas de los suelos estudiados. El contenido de arcillas en el suelo llamado "Usosaldaña" es medio y el contenido de arenas del suelo que se denominó "Algodonal" es alto. El contenido de materia orgánica es normal para la zona y presentan buenas características de fertilidad potencial.

Cuadro .1 Características generales de los procedimientos experimentales y de la toma de muestras de suelo tomadas en el municipio de Saldaña, Tolima.

	Estandarización de la Técnica por HPLC	Evaluación del efecto de la temperatura y la humedad por HPLC	Mineralización, Sorción y Movilidad por técnicas isotópicas
No. de parcelas muestreadas o experimentos	1 (se tomaron muestras de suelo tratadas en el campo)	1 (se tomó suelo sin tratar en el campo)	3 (se tomó suelo sin tratar en el campo)
Cultivo	Maíz	Sin cultivo	Sin cultivo
Dosis de atrazina	2,4 Kg i.a /ha	1,5 Kg i.a /ha	2,0 Kg i.a /ha
Método de aplicación del compuesto	Aspersora en campo	Laboratorio	Laboratorio
Profundidad de las muestras de suelo	0 – 15 cm	0 – 10 cm	0 – 20 cm
Tamaño de muestra	1 kg		2,5 kg
Conservación	Bolsas de polietileno a -5°C		
Localización	Sede de usuarios del distrito de riego del río Saldaña (USOSALDAÑA), Saldaña (Tolima)		Sede de USOSALDAÑA y lote de Algodón del Municipio de Saldaña (Tolima)
Tratamiento previo a procesamiento de muestras	Las muestras se descongelaron y se dejaron secar al aire		

Cuadro 2. Características fisicoquímicas de los suelos de Saldaña-Tolima estudiados.

ANALISIS		SUELO	
		USOSALDAÑA Fluvaquentic Ustropepts	ALGODONAL Typic Troporthent
Textura	Arena	24,6	66
	Arcilla	21,0	4
	Limo	54,4	30
	Textura	Franco Limosa	Franco Arenosa
pH		6,7	7,3
Capacidad de campo (%)		25,6	18,1
Densidad Real (g/cm ³)		2,81	2,91
C.I.C. cmol(+)/kg		28,5	19,1
Bases de cambio cmol(+)/kg	Ca ²⁺	13,9	9,6
	Mg ²⁺	4,5	2,2
	K ⁺	0,5	4,8
	Na ⁺	0,3	0,2
C.I.C.E. (cmol (+)/g)		19,2	16,8
Acidez total cmol(+)/kg		4,7	2,3
Carbono orgánico (%)		1,0	0,7
Materia orgánica (%)		2,1	1,2
Fósforo disponible (mg P/kg)		55,0	70
METODOS DE ANALISIS		Convenciones	
Textura:	Bouyoucos	C.I.C.E.	Capacidad de intercambio catiónico efectiva
pH:	Relación suelo:agua 1:1		
Fósforo disponible:	Olsen	C.I.C.	Capacidad de intercambio catiónico
Ca ²⁺ y Mg ²⁺ :	Acetato de amonio		
Na ⁺ y K ⁺ :			
Materia orgánica:	Walkley y Black		

Optimización de la determinación de la atrazina y algunos de sus productos de degradación en el suelos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Condiciones cromatográficas

Las soluciones de trabajo de los compuestos (atrazina: pureza del 97%, AgEvo, Grupo Hoechst Colombia; deetilatrazina e hidroxiatrazina: pureza del 99%, y deisopropilatrazina: pureza del 94%) se prepararon a partir de las soluciones *stock* por dilución con metanol

calidad HPLC, y las soluciones patrón se prepararon por dilución de las soluciones de trabajo de acuerdo con los requerimientos específicos (Cuadro 3). A partir de las soluciones de trabajo, se prepararon soluciones metanólicas de cada uno de los compuestos, a una concentración de 1,2 µg/mL. Igualmente, se preparó una solución de la mezcla de los compuestos a una concentración de 1,2 µg/mL. De estas soluciones se tomaron 20 µL para inyectarlas en el sistema cromatográfico, con el fin de determinar las mejores condiciones cromatográficas, tales como: flujo, composición de la fase móvil (sistema de gradientes) y parámetros cromatográficos. El sistema

Cuadro 3. Soluciones stock y de trabajo.

Compuesto	Concentración <i>stock</i> (µg/mL)	Soluciones de trabajo (µg/mL)
Atrazina	420	84
Deetilatrazina	401	80
Deisopropilatrazina	538	107
Hidroxiatrazina	506	101

cromatográfico consistió en un equipo para Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), constituido por: Bomba Cuaternaria LC 250 Perkin Elmer®, Detector ultravioleta-visible a una longitud de onda de 218 nm, UV/VIS LC 295 Perkin Elmer®, Interfase serie 900 Pe Nelson®, Interfase serie 600 link Pe Nelson® y Soft-

ware Turbochrom® Versión 4.0, 1994. Se utilizó una columna analítica Lichrocart RP-18, 125 mm x 4 mm, 5 µm Merck®, y una Precolumna Lichrocart 100 RP-18, 5 µm Merck®. El volumen de inyección fue de 20 µL, y la fase móvil acetonitrilo:agua, bajo el gradiente que se indica en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de la fase móvil.

Tiempo (min.)	Flujo (ml/min)	% Acetonitrilo	% Agua
1,0	1,0	30	70
1,5	1,0	30	70
4,0	1,5	60	40
2,0	1,5	60	40
3,5	1,0	30	70

Optimización del método

Extracción. La extracción de los compuestos de la matriz suelo consistió en el siguiente proceso: Adición de 20 mL de metanol a 10,0 g de suelo seco al aire, seguido de una agitación vigorosa durante 1 hora usando un agitador orbital, posteriormente se filtró y lavó con 10 mL de metanol, usando papel filtro para análisis cualitativo, luego se filtró a través de una membrana Millipore 0.45 µm, y se obtuvo un extracto.

Limpieza. El proceso de limpieza del extracto se efectuó adoptando el siguiente procedimiento: Se evaporó el extracto ya obtenido hasta sequedad a una temperatura de 35 °C en un Rotaevaporador BUCHI® R-114; enseguida se disolvió el residuo en 5,0 mL de diclorometano, y se transfirió a un embudo de decantación. Luego se le adicionaron 5,0 mL de buffer fosfato (Na_3PO_4) pH 10,0 y se realizó una extracción líquido-líquido. Posteriormente, a la fase acuosa se le adicionó 1 mL de buffer en diclorometano, repitiendo una vez más el proceso de extracción líquido-líquido. Enseguida, se mezclaron los dos volúmenes de diclorometano (6,0 mL), llevando posteriormente a sequedad bajo una atmósfera de nitrógeno usando un sistema para evaporación con nitrógeno PIERCE Reacti-VapIII®. El residuo se disolvió en 1 mL de metanol y se filtró a través de una membrana Millipore 0,45 µm, tomando 20,0 µL para inyectarlos en el sistema cromatográfico.

Selectividad. Muestras de 10,0 g de suelo blanco se trataron con soluciones de los diferentes compuestos en estudio; estas muestras fortificadas se procesaron de acuerdo con el protocolo de extracción y limpieza que se indica antes, y sus extractos se inyectaron en el sistema cromatográfico, por triplicado.

Linealidad y curvas de calibración. Igualmente, a muestras de suelo blanco (10,0 g) se adicionaron cada uno de los compuestos de interés en solución, a distintas concentraciones. Enseguida, se realizó el proceso de

extracción, limpieza y análisis cromatográfico. Las concentraciones usadas fueron iguales para los compuestos atrazina, deetilatrastina y deisopropilatrastina: 0,6 ; 0,9; 1,2; 1,5 y 2,0 µg/mL

Exactitud. Para evaluar la exactitud del método se uso el porcentaje de recuperación; este se evaluó a tres concentraciones diferentes de los compuestos dentro del rango de la curva de calibración usada. Se tomaron 10,0 g de suelo, se adicionó independientemente cada compuesto a tres concentraciones distintas, se dejó en equilibrio durante 48 horas, luego se hizo el proceso de extracción, limpieza y análisis cromatográfico. Las concentraciones usadas fueron iguales para los tres compuestos: 0,5, 0,8, y 1,4 µg/mL. También se evaluó el porcentaje de recuperación en el proceso de limpieza. Para esto se procedió de la siguiente manera: se adicionó cada uno de los compuestos a un mililitro de metanol, por separado, en una concentración de 1,2 µg/mL, luego se realizó el proceso de limpieza y análisis cromatográfico. La respuesta (o señal) se comparó con la respuesta del patrón correspondiente inyectado directamente.

Límite de detección y cuantificación. El límite de detección y el límite de cuantificación se calculó de acuerdo con la siguiente definición:

$$\begin{aligned} \text{Límite de Detección} &= 3s/b \\ \text{Límite de Cuantificación} &= 10s/b \end{aligned}$$

Donde s es la desviación estándar del blanco (desviación estándar del intercepto con la ordenada) y b es la sensibilidad de calibración (promedio de las pendientes de las curvas de calibración).

Precisión. Muestras de suelo blanco de 10,0 g se fortificaron con soluciones de cada uno de los compuestos, a dos concentraciones distintas; enseguida, se hizo el proceso de extracción y limpieza; posteriormente los extractos se inyectaron en el sistema cromatográfico. El número de repeticiones fue de tres.

Determinación de la atrazina y algunos de sus metabolitos en muestras de campo

Una vez se optimizó el método para la determinación de la atrazina y tres de sus metabolitos en la matriz suelo, los compuestos se cuantificaron en muestras de suelo provenientes de condiciones de campo. Se tomaron muestras suelo de una parcela comercial de 330 m² de la sede de USODALDAÑA (Saldaña, Tolima), que no había sido tratada con el herbicida, por lo menos en los últimos tres años antes de iniciar el estudio. La parcela fue sometida a labranza convencional procediendo luego a sembrar maíz, híbrido Funks G5423. El herbicida atrazina se aplicó al suelo (*i.e.* en preemergencia) a una dosis de 2,4 Kg de i.a./ha, antes de la emergencia del maíz, utilizando una aspersora de precisión de uso experimental marca Calimax, equipada con boquillas de abanico Color Jet 89-2R. Se realizaron cuatro muestreos (4, 37, 70 y 125 ddt) más un blanco (muestra tomada antes de asperjar el herbicida), en cuatro sitios de la parcela. Las muestras tomadas de los cuatro sitios se analizaron independientemente.

Efecto de la temperatura y el grado de humedad del suelo sobre la degradación de la atrazina

Este experimento tuvo como objetivo evaluar, bajo condiciones controladas, el efecto de la temperatura ambiente y el grado de humedad del suelo sobre la degradación de la atrazina en el suelo. Se tomó una muestra compuesta (16 submuestras) de suelo USOSALDAÑA sin tratar con atrazina (suelo blanco) a una profundidad de 10 cm. Se colocaron 100 g de suelo en materos plásticos de 10 x 10 cm; este suelo se llevó a los niveles de humedad establecidos de 25%, 50% o 75% de la capacidad de campo (cc), agregando el agua necesaria calculada con base en curvas de humedad del suelo. Una vez el suelo se humedeció, se aplicó una solución del herbicida usando una pipeta, cuidando que la solución quedara uniformemente distribuida en la superficie del suelo de los materos, en dosis equivalente a 1,5 Kg i.a./ha. El control de la humedad del suelo de los materos se efectuó mediante el control diario del peso del matero con suelo, agregando con una pipeta la cantidad de agua necesaria para mantener los niveles de humedad requeridos. Los materos se mantuvieron durante los dos meses que duró la experiencia en cámaras de crecimiento debidamente termostatadas a 20 °C ± 2 °C y 30 °C ± 2 °C. El ensayo se instaló bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2x3x4) y tres repeticiones, de los siguientes tratamientos:

- Factor A: Temperatura con dos niveles (20 °C y 30 °C).
- Factor B: Humedad del suelo con tres niveles (25%, 50%, 75% de cc).
- Factor C: Fechas de muestreo con cuatro niveles (0, 15, 30, 45, y 60 ddt)

En cada muestreo se tomó la totalidad del suelo que estaba contenido en el matero (100,0 g). De esta muestra se tomó una submuestra de 10,0 g y se siguió el procedimiento de extracción y limpieza, y el posterior análisis

cromatográfico según las condiciones descritas en el capítulo anterior.

Mineralización de la atrazina en el suelo

Se utilizó suelo blanco (no tratado antes con atrazina) de dos localidades del municipio de Saldaña, proveniente de la sede de USOSALDAÑA y de un campo cercano sembrado de algodón. Los suelos se tomaron de los primeros 20 cm de profundidad. El experimento se realizó en frascos Pyrex (Figura 1), herméticos y de 2 L de capacidad (Figura 1). En el interior se colocaron 200,0 g de suelo con una humedad del 60% de la capacidad de campo, previamente tratado uniformemente con atrazina a una dosis equivalente a 2,0 kg i.a./ha. La atrazina se adicionó en mezcla de forma fría (atrazina técnica) y radiomarcada en los carbonos del anillo (U-¹⁴C), con una actividad específica de 47,756 µCi/mg, para obtener una actividad de 10⁶DPM (desintegraciones por minuto) por 200,0 g de suelo. La determinación de la atrazina ligada al suelo se efectuó mediante combustión en un oxidador biológico Harvey OX-600®, y la posterior medición de la actividad en un contador de centelleo Beckman LS 5600, utilizando líquido de centelleo para CO₂ (Harvey®).

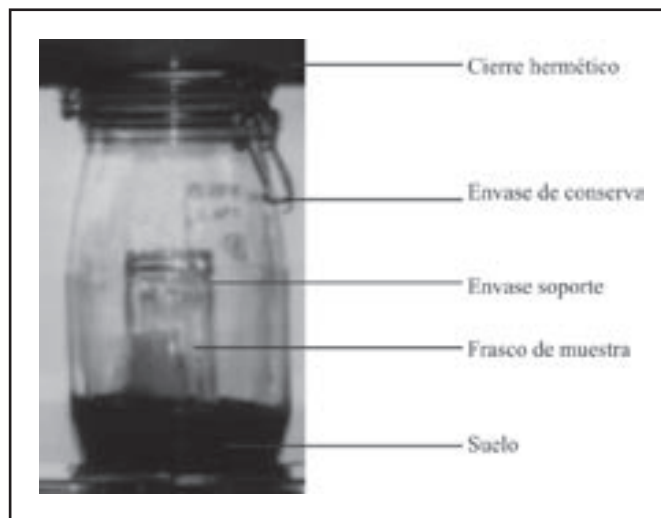


Figura 1. Montaje para el ensayo de Mineralización.

Se tuvieron 10 repeticiones por cada tipo de suelo. La mineralización fue evaluada mediante la medida del ¹⁴CO₂, recolectado en pequeños frascos que contenían 15,00 mL de NaOH 0,3 M dispuestos en el interior del frasco hermético. Los frascos de pirex se colocaron en una incubadora (Lab Line con control automático de temperatura) a 25 ± 2 °C, según se observa en la Figura 2. Cada semana se cambió la solución de NaOH y se determinó el ¹⁴CO₂. Se realizaron mediciones del ¹⁴CO₂ producido cada 7 días durante 120 días (17 semanas) tomando alícuotas de 1,00 mL del NaOH, por triplicado, utilizando líquido centellador HP Beckman tipo II® para muestras acuosas y midiendo la actividad en el contador de centelleo. El ¹⁴CO₂ producto de la mineralización de



Figura 2. Vista de las muestras en la incubadora en el ensayo de mineralización.

la atrazina, se calculó con base en la actividad inicial de las muestras.

Extracción de la atrazina remanente y de sus metabolitos

En las semanas 5, 9 y 17 de incubación se retiraron cada vez dos frascos por suelo para determinar la presencia de atrazina y de sus metabolitos. Las muestras retiradas se congelaron para detener la degradación. Inicialmente se analizó el contenido total de ^{14}C en la muestra retirada y posteriormente se realizó una extracción a 2,00 g de suelo con 5 ml de metanol sometidos a ultrasonido (Ultrasonic LC 30, Elma®) durante 5 minutos. El ^{14}C de

esta fracción se denominó extraíble y la diferencia con el total correspondió a la fracción ligada.

Cromatografía de la fracción extraíble

En la fracción extraíble se determinó la presencia de atrazina y los metabolitos HA, DEA, DIA y DEDIA mediante cromatografía de capa fina utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas con una película de sílica gel GOF254® de 0,20 mm de espesor y dos sistemas de solventes (Cuadro 5). La detección inicial se realizó por UV, posteriormente se raspó la zona correspondiente a cada compuesto, se recuperó en metanol y se cuantificó la actividad de ^{14}C por centelleo líquido. Con base en la actividad total del extraíble se calculó el porcentaje relativo de cada compuesto.

Adsorción – Desorción de la atrazina en el suelo

En este experimento se midió la sorción de la atrazina en dos suelos (“Usosaldaña” y “Algodonal”). Se prepararon seis soluciones diluidas en CaCl_2 0,01M entre 0,82 y 10,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de atrazina fría y radiomarcada según el esquema que se presenta en el Cuadro 6. A cada una de estas soluciones se les midió la actividad inicial por centelleo líquido. El experimento se realizó en tubos de centrifuga de 25,0 mL de capacidad. Se pesaron 2,000 g de suelo y se añadieron 5,00 mL de la solución respectiva; se tuvieron 4 repeticiones por dilución por tipo de suelo. Los tubos con suelo tratados con las soluciones se dejaron en contacto (equilibrio) con agitación continua en un agitador orbital Lab Line Instruments® durante 24 horas; enseguida se separó el sobrenadante

Cuadro 5. Mezcla de solventes para la separación de la ^{14}C atrazina y sus metabolitos mediante TLC.

Sistema	Solvente	Compuesto	Rf
1	Cloroformo: 50 mL Acetona: 30 mL Acido acético: 15 mL Agua: 1 mL	Atrazina (AT)	0,97
		Hidroxiatrazina (HA)	0,58
		Deetildeisopropilhidroxiatrazina (DEDIA)	0
		Deetilatrazina (DEA)	0,92
		Deisopropilatrazina (DIA)	0,88
2	n-heptano: 70 mL Acetato de etilo: 30 mL	Atrazina	0,80

Cuadro 6. Preparación de soluciones diluidas de atrazina.

Concentración de ^{14}C -atrazina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentración de atrazina fría ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentración total de atrazina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0,57	0,25	0,82
0,52	0,50	1,02
0,53	1,00	1,53
0,54	2,50	3,04
0,52	5,00	5,52
0,55	10,00	10,55

por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. Se determinó la actividad del ^{14}C de en alícuotas de 1,00 mL del sobrenadante por centelleo líquido; esta actividad correspondía a la atrazina en equilibrio.

Para determinar la desorción se procedió como sigue. Una vez cuantificada la actividad del ^{14}C en el sobrenadante de los tubos con suelo, se retiró la solución remanente con ayuda de una micropipeta. Luego se adicionaron nuevamente 5,00 mL de solución de CaCl_2 0,01M y se dejó en contacto la solución con el suelo durante 24 horas con agitación continua en el agitador orbital, se centrifugó a 10.000 rpm, dejó decantar y se tomó una alícuota del sobrenadante para determinar la actividad de ^{14}C por centelleo líquido, la cual se consideró desorbida por el suelo. Fue necesario efectuar una corrección debido a la pequeña cantidad de solución (aproximadamente 1 mL) que es prácticamente imposible separar del suelo, para lo cual se pesaron los tubos antes y después de agregar la solución de CaCl_2 0,01M. Con los datos obtenidos se construyeron curvas de adsorción y desorción. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo de Freundlich y de acuerdo con los datos derivados de éste ajuste se calcularon los valores de K_d para cada suelo.

Movilidad de atrazina en el suelo

En este experimento se utilizó la técnica de Cromatografía de Capa Fina de Suelo (CCFS) descrita por Helling (1971 a y b). Se utilizaron placas de vidrio de 10 x 20 cm. El suelo seco al aire se pasó por un tamiz de 360μ , se mezcló con agua hasta obtener una pasta moderadamente fluida, se extendió rápidamente sobre la placa hasta obtener una capa homogénea y sin agrietamientos. Las placas se secaron al aire y se procedió a aplicar las

soluciones de ^{14}C atrazina y ^{14}C glifosato, éste como patrón de comparación; las placas se eluyeron en una cámara saturada de agua.

El revelado se llevó a cabo con placas para rayos X. Las placas de vidrio con suelo se colocaron en contacto directo con la placa radiosensible del mismo tamaño. Una vez aseguradas las placas de vidrio con las placas radiosensibles, se introdujeron en sobres de cartulina negra; luego se guardaron en una caja hermética negra para evitar cualquier filtración de luz, donde se dejaron en contacto durante 30 días. Las placas se revelaron automáticamente en un Procesador Dent X 9000®; el tiempo de revelado fue de 4,5 minutos por placa. Posteriormente se midieron los Rf de los compuestos en los diferentes suelos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Optimización de la determinación de atrazina y algunos de sus productos de degradación en el suelos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Condiciones Cromatográficas

Selectividad. Se hicieron inyecciones de soluciones obtenidas a partir de extractos de la matriz blanco (suelo). No se encontraron sustancias que interfirieran con los tiempos de retención de los compuestos de interés, que fueron atrazina (AT), deetilatraxina (DEA) y deisopropilatraxina (DIA); hidroxiatraxina (HA) se descartó del análisis pues hubo dificultades en el proceso de extracción. En la Figura 3 se presenta un cromatograma obtenido a partir de una mezcla de los tres compuestos.

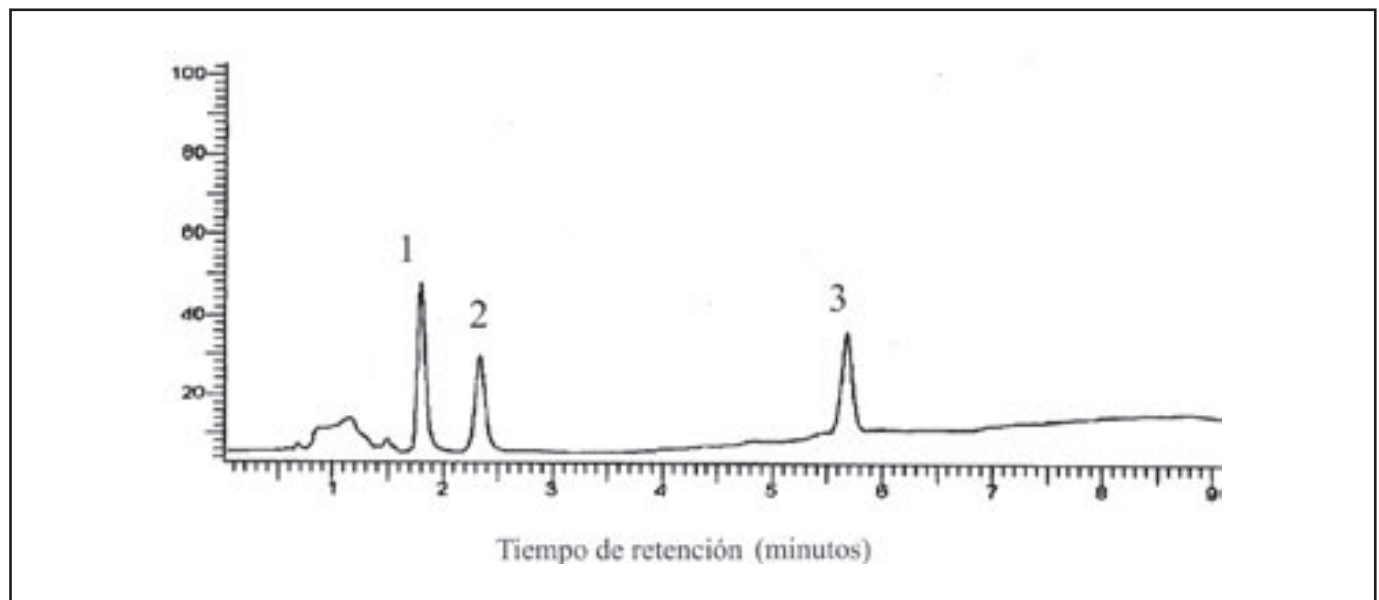


Figura 3. Cromatograma obtenido con el gradiente acetonitrilo-agua y la mezcla de los tres compuestos; (1) deisopropilatraxina, (2) deetilatraxina, y (3) atrazina.

Linealidad. Para determinar la linealidad se evaluó el estimador de regresión (coeficiente de regresión lineal, r^2) usando la prueba *t de student* (Cuadro 7). El coeficiente de regresión lineal r^2 no es significativamente diferente de 1, lo cual indica que el modelo propuesto es lineal ($P = 0,005$) (Cuadro 7).

Exactitud (porcentajes de recuperación). El Cuadro 8 contiene valores del porcentaje de recuperación de atrazina y sus metabolitos deisopropilatrastina y deetilatrastina a tres concentraciones distintas dentro del rango de la curva de calibración usada. Los porcentajes de recuperación para estos compuestos estuvieron entre el 45% al 65% para las concentraciones evaluadas, con coeficien-

tes de variación entre 9,2% al 18,0 %; este porcentaje de recuperación puede ser bajo debido a que la matriz suelo es muy compleja. Sin embargo, se puede decir que el método de extracción y limpieza resultó adecuado para la determinación de los compuestos en una matriz tan compleja como el suelo, ya que se pudo extraer cantidades de los compuestos superiores a los límites de detección y cuantificación. Es de tener en cuenta que de acuerdo con la literatura (Sharon y Koskinen, 1990; Barriuso *et al.*, 1992a; Liwang *et al.*, 1993; Borggaard & Streibig, 1988; Stork, 1997), parte del compuesto puede estar ligado a los componentes del suelo, por lo tanto con esta metodología solo puede determinarse la fracción “extraíble”, y que es diferente según sea el tipo de suelo.

Cuadro 7. Datos estadísticos para la evaluación de la linealidad del método.

Parámetro	Deisopropilatrastina	Deetilatrastina	Atrastina
a	-44466,0	-37530,0	-25885,0
b	188942,0	119367,0	133888,0
r	0,995	0,993	0,998
t_{r^*}	17,23	14,53	27,33
t_t	3,182	3,182	3,182
n	5	5	5
S_b	11441,0	8262,0	19144,0
S_a	13965,0	10998,0	23368,0
LC_a	-63300,0; 14234,0	-64023,0; 5969,0	-71669,0; 58069,0
LC_b	143798,0; 207318,0	86733,0; 139311,0	67930,0 ;174218,0

* $t_{Calculado}$, $gl (n-2) = 3$; $\alpha = 0,05$; a = intercepto; b = pendiente; r = coeficiente de regresión lineal; n = número de mediciones; LC_a y LC_b = límites de confianza para a y b; S_a y S_b = varianza de a y b

Cuadro 8. Porcentajes de recuperación para deisopropilatrastina, deetilatrastina y atrastina, a partir de muestras de suelo tratadas con estos compuestos a tres concentraciones.

Repeti- ciones	Deisopropilatrastina			Deetilatrastina			Atrastina		
	0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,8 $\mu\text{g/mL}$	1,4 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,8 $\mu\text{g/mL}$	1,4 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,8 $\mu\text{g/mL}$	1,4 $\mu\text{g/mL}$
1	56	47	64	56	62	49	65	70	62
2	27	46	62	57	59	45	51	82	59
3	60	44	49	49	53	43	--	64	55
4	49	52	39	53	58	42	59	57	59
5	50	39	50	46	49	43	62	50	52
6	49	----	51	47	--	47	73	43*	50
S	5.0	4.7	9.2	7.0	5.17	2.71	8.06	12.3	4.62
\bar{X}	53%	46%	52%	52%	56.%	45%	62%	65%	56%
C.V. (%)	9,4	10,0	18,0	13,5	9,2	6,0	13,0	19,0	8,0
n	5	5	6	6	5	6	5	5	6

---dato faltante

Límites de detección y cuantificación del método. Los límites de detección y cuantificación del método en la determinación de deisopropilatrizona, deetilatrizona y atrazina se muestran en el Cuadro 9; estos límites se determinaron a partir de las curvas de calibración y se expresan en μg del compuesto/Kg.

Precisión. Los coeficientes de variación que se obtuvieron al procesar muestras de suelo fortificadas con los compuestos a dos concentraciones, variaron entre el 7% y el 13% (Cuadro 10), valores relativamente bajos si se tiene en cuenta que la matriz suelo tiene un alto grado de complejidad.

Cuadro 9. Límites de detección y cuantificación del método.

Compuesto	Límite de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Deisopropilatrizona	4	12
Deetilatrizona	13	43
Atrazina	11	37

Cuadro 10. Datos cromatográficos (área) para la evaluación de la precisión del método en la matriz suelo., de los compuestos en estudio, a dos concentraciones.

Muestra	Deisopropilatrizona		Deetilatrizona		Atrazina	
	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	104365	239423	34881	137194	59130	134199
2	84187	232267	35576	131153	46624	125330
3	87444	185998	30403	118948	53941	135436
4	84146	186224	33134	117768	56628	118230
5	98781	192824	28521	120914	66935	140456
S	9248	26280	2999	8543	7413	8863
\bar{X}	91784	207347	32503	25195	56652	130730
C.V. (%)	10	13	9	7	13	7

En la Figura 4 se observan las curvas de calibración obtenidas con patrones y con adición directa de los compuestos atrazina, deisopropilatrizona y deetilatrizona a las muestras de suelo blanco. La separación entre las curvas es grande indicando efecto de la matriz, lo cual era de esperarse ya que el suelo es una matriz compleja (Figura 4).

Resultados del análisis de las muestras de suelo tomadas en campo

El cromatograma de la Figura 5 indica que el suelo blanco no estaba contaminado, pues no se detectaron ninguno de los compuestos en estudio. A cada una de las muestras de campo se le realizó el proceso de extracción y limpieza y luego el extracto se inyectó por duplicado en el sistema cromatográfico. En las muestras de campo solo se detectó atrazina; los compuestos deetilatrizona y deisopropilatrizona no fueron detectados en ninguna de las muestras (Figura 6). Los resultados para la atrazina se muestran en el Cuadro 11. Como era de esperarse, en el muestreo inicial antes de tratar el suelo con el herbicida atrazina, no se detectó este compuesto. En el segundo muestreo (4 ddt) se encontró una concentración de 155, 184, y 161 μg de atrazina/Kg de suelo para los sitios 1, 2, 3 respectivamente; en el sitio 4 se encontró una concen-

tración bastante más alta, de 470 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En el segundo muestreo (37 ddt) se encontró que la concentración había disminuido aproximadamente a 137 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y a los 70 ddt a cerca de 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; en el último muestreo efectuado 125 ddt la atrazina ya no se detecta. La concentración de atrazina en el sitio cuatro fue bastante alta comparada con los otros sitios; posiblemente hubo traslape entre un pase y el siguiente al aplicar el herbicida.

La no detección de atrazina ni de metabolitos dealquilados después de los 70 días posteriores al tratamiento, indicarían que las cosechas subsiguientes en este suelo no sufrirán efectos tóxicos. Por otra parte, la no detección de los metabolitos dealquilados DIA y DEA podría deberse a que las cantidades de estos compuestos son tan bajas que no alcanzan a ser detectadas mediante el método seguido, a que las arcillas favorecen la adsorción de estos compuestos reduciendo las cantidades extraíbles y por consiguiente su biodisponibilidad, o a que los metabolitos DIA y DEA no serían los principales productos de degradación en este caso. Se ha comprobado ampliamente que la adsorción de compuestos orgánicos (como los plaguicidas de síntesis química) a superficies arcillosas reducen su biodisponibilidad (Cook & Hüter, 1981; Walker & Blacklow, 1994; Reinhardt *et al.*, 1990).

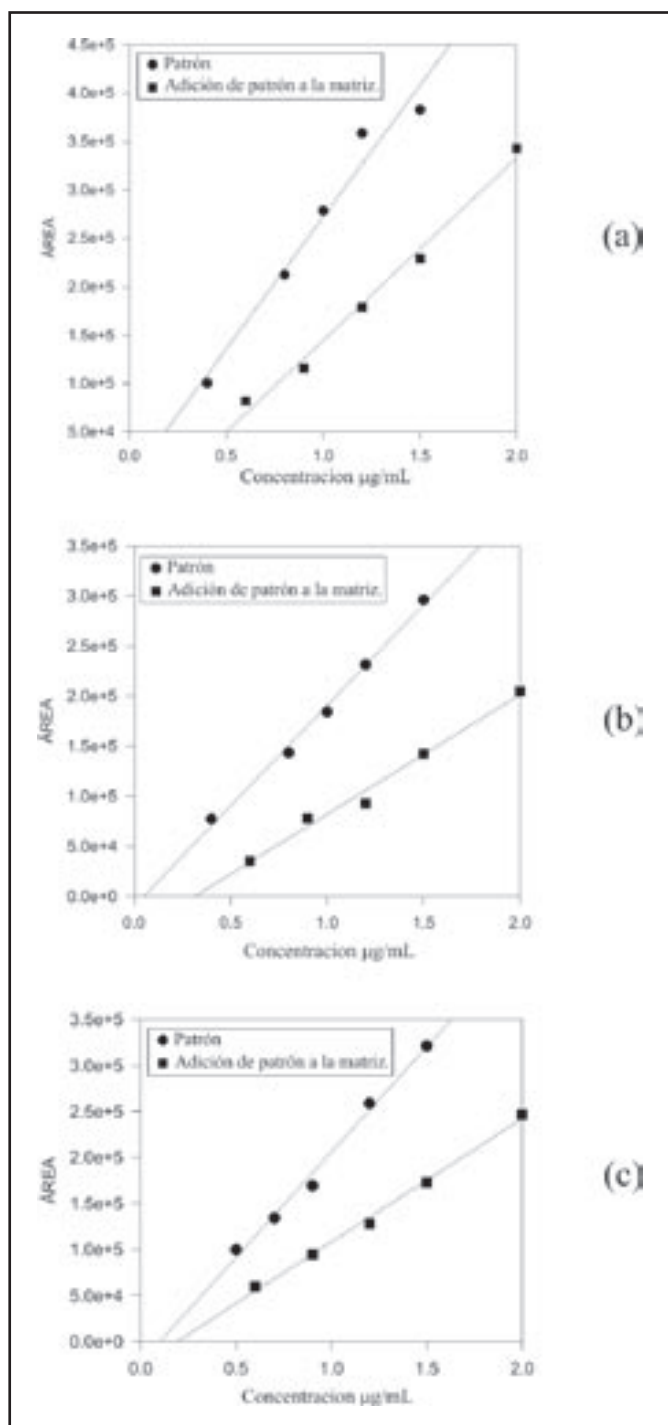


Figura 4. Curva de calibración para (a) deisopropilatrastina, (b) deetilatrastina y (c) atrastina.

Evaluación del efecto de la temperatura y humedad sobre la degradación de atrastina

En este experimento se determinó la concentración de atrastina y de sus metabolitos dealquilados DEA y DIA en suelo durante 60 días después del tratamiento. La atrastina fue detectada en los cuatro muestreos realizados (hasta los 60 ddt) durante el transcurso del experimento, mientras que los metabolitos dealquilados no fueron detectados en

ninguno de los muestreos. El análisis de varianza indicó que hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$ entre las cantidades de atrastina encontradas entre fechas de muestreo y temperaturas; mientras que no hubo diferencias ($P > 0,05$) por efecto de la humedad del suelo. Las interacciones fecha de muestreo x temperatura, muestreo x humedad, temperatura x humedad, y muestreo x temperatura x humedad fueron significativas; por tanto, se analiza esta interacción triple (Figura 7). Las diferencias en la concentración de atrastina por efecto de la humedad del suelo no presentaron en general, grandes variaciones; mientras que resultaron más importantes las diferencias por efecto de la temperatura. Así, 15 días después de tratar (ddt) con el herbicida las cantidades de atrastina encontradas a 20°C variaron entre 682 a 790 µg/Kg de suelo y entre 539 a 676 µg/Kg a 30°C, lo que representa una reducción en la concentración del compuesto entre el 21% y el 14 % a 30 °C respecto a 20°C; 60 ddt las concentraciones de atrastina estuvieron entre 224 a 238 µg/Kg a 20°C y entre 173 µg/Kg a 108 µg/Kg a 30°C; en esta última situación, al comparar las concentraciones del compuesto a 25% de cc respecto a 50% y 75% de cc, se calcula una reducción del 37%, lo que significa que en el tiempo, ocurre mayor degradación del herbicida bajo la condición de alta temperatura y alto contenido de humedad del suelo (Figura 7). En algunos estudios se ha encontrado mayor influencia de la temperatura en la velocidad de degradación de pesticidas en comparación con el efecto de la humedad del suelo (Walker y Blacklow, 1994; Reinhardt *et al.*, 1990; Mukherjee & Gopal, 1996).

Mineralización de la atrastina en el suelo

En las mediciones del ^{14}C oxidado, debido a que se retiraron repeticiones para evaluar la presencia de los metabolitos y el compuesto parental en diferentes tiempos, hasta la semana 5 se tuvieron 10 repeticiones por cada suelo; de la semana 6 hasta la semana 9 se tuvieron 8 repeticiones y de la 10 en adelante, 6 repeticiones por suelo. La cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ (%) determinada en cada suelo semanalmente se muestra en el Cuadro 12. Con el acumulado de la mineralización se obtuvieron las siguientes ecuaciones de segundo orden para cada uno de los suelos:

$$Y_1 = -0,1202 + 0,5275X + 0,0038X^2; r^2 = 0,98$$

$$Y_2 = -0,0665 + 0,4836X + 0,0151X^2; r^2 = 0,98$$

Donde Y_1 y Y_2 corresponden al valor acumulado de mineralización para los suelos "Usosaldaña" y "Algodonal" respectivamente, y X corresponde al tiempo en semanas de 1 a 17. No hubo diferencias apreciables en el proceso de mineralización de la ^{14}C -atrastina entre los dos suelos (Cuadro 12). Además, la mineralización del herbicida realmente fue muy baja; así, al término de 17 semanas solo se había mineralizado el 9,5% en el suelo se "Usosaldaña" y el 11% en el suelo "Algodonal".

^{14}C extraíble y ^{14}C ligado. El Cuadro 13 contienen los resultados obtenidos (en porcentaje) de ^{14}C -atrastina o sus metabolitos extraíbles y ligados para cada suelo y cada

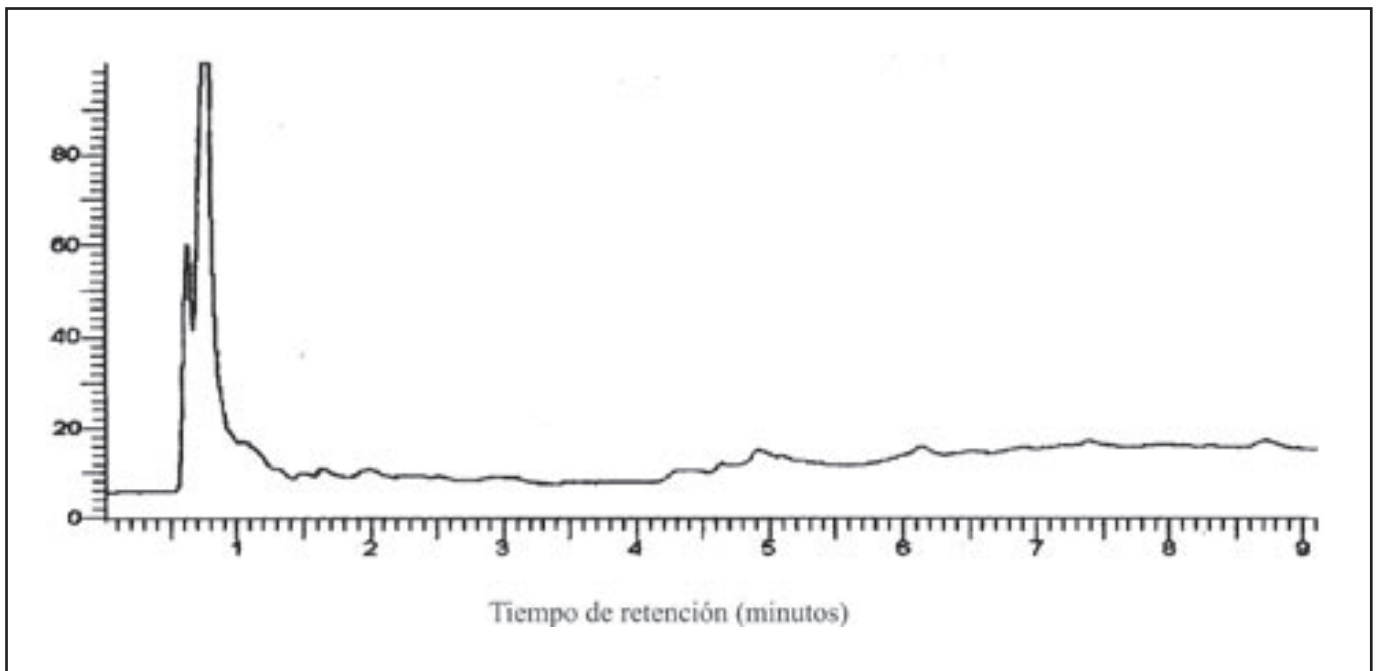


Figura 5. Cromatograma obtenido a partir del extracto de una muestra de suelo blanco. El pico que se observa al tiempo 0,8 minutos no corresponde con los tiempos de retención de ninguno de los compuestos de interés.

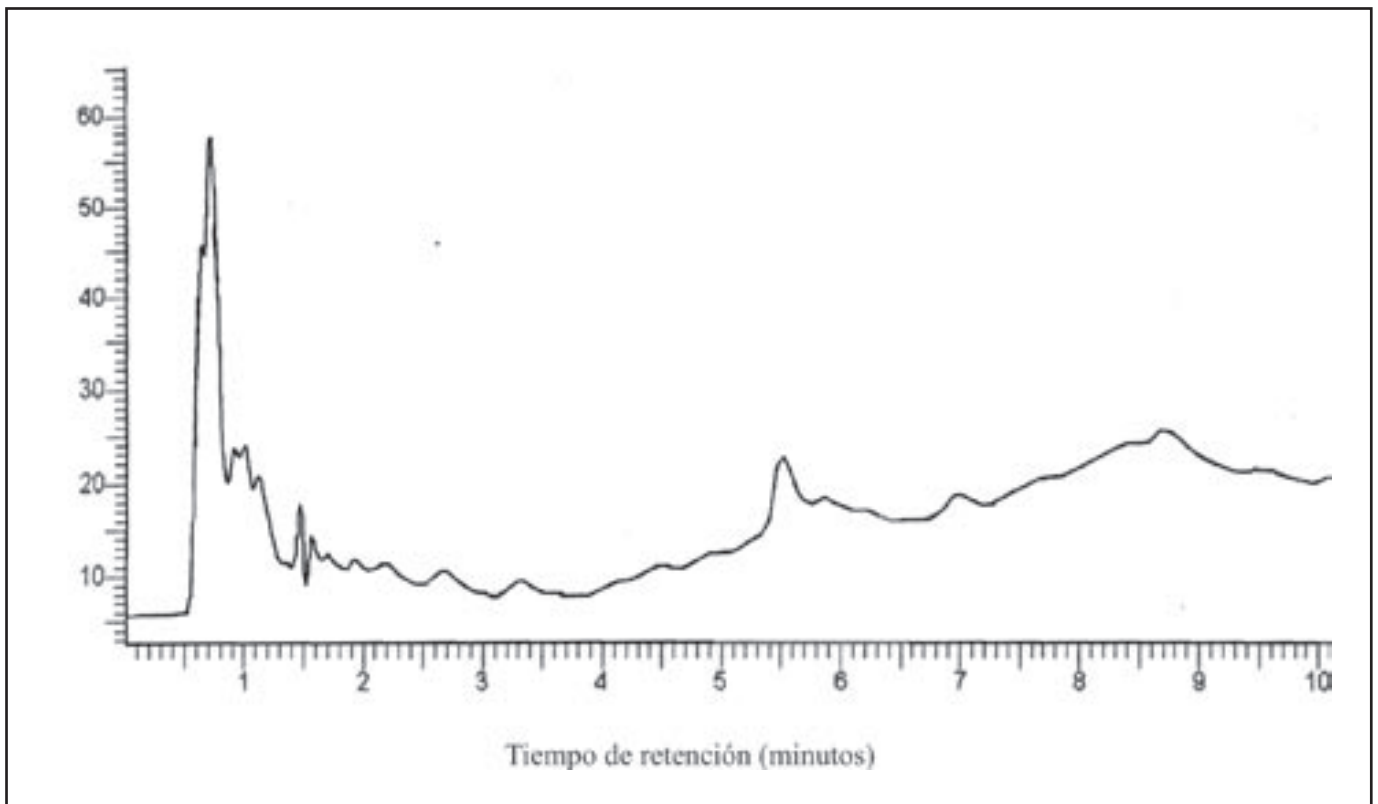


Figura 6 . Cromatograma obtenido a partir del extracto de una muestra de campo. El pico que se observa al tiempo 5,6 minutos corresponde a atrazina.

Cuadro 11. Concentraciones de atrazina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) en muestras de suelo de una parcela de maíz tratada con este herbicida, en Saldaña, Tolima.

Muestreo 1 Blanco $\mu\text{g}/\text{Kg}$				Muestreo 2 4 ddt $\mu\text{g}/\text{Kg}$				Muestreo 3 37 ddt $\mu\text{g}/\text{Kg}$				Muestreo 4 70 ddt $\mu\text{g}/\text{Kg}$				Muestreo 5 125 ddt $\mu\text{g}/\text{Kg}$			
S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
n.d	n.d	n.d	n.d	173	178	92	407	73	111	123	200	42	n.d	n.d	58	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d	n.d	n.d	n.d	164	193	87	395	70	86	---	204	39	n.d	n.d	52	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d	n.d	n.d	n.d	148	171	134	536	86	76	83	182	38	37	n.d	40	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d	n.d	n.d	n.d	134	192	145	522	102	---	96	189	45	48	n.d	42	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d	n.d	n.d	n.d	--	175	186	490	90	115	89	360	43	n.d	n.d	43	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d	n.d	n.d	n.d	---	195	179	---	93	117	98	375	43	n.d	n.d	---	n.d	n.d	n.d	n.d
Promedio por sitio				155	184	137	470	86	107	98	251	42	42		47				
Promedio general				233,0				137,0				24,8				n.d			
C.V. (%)				11.0	5.7	30.0	14.0	14.0	13.0	16.0	36.0	6.3	---		16				
Número de muestras				4	6	4	5	6	5	5	6	6	2	5					

n.d: No detectado; ---: dato faltante; S1- S4: número del sitio de muestreo; ddt: días después del tratamiento

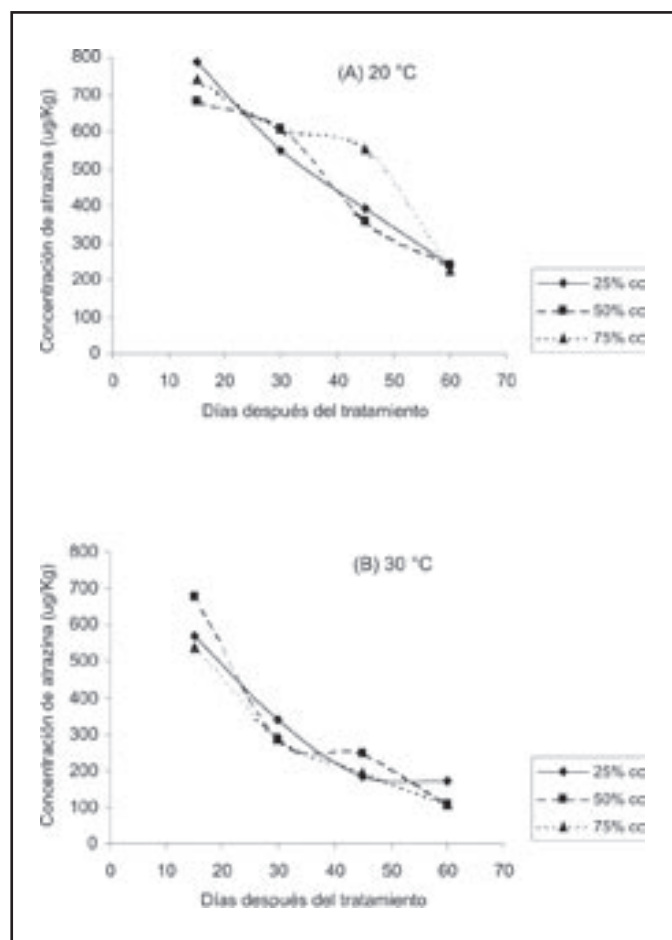


Figura 7. Evolución de la degradación de la atrazina a dos temperaturas, (A) 20° y (B) 30 °C y tres niveles de humedad del suelo (25, 50 y 75% de capacidad de campo), bajo condiciones controladas.

lapso de tiempo de mineralización. En los dos suelos, es notable el proceso de ligamiento al suelo de la atrazina y/o sus metabolitos; al término de cinco semanas la fracción ligada correspondía entre el 56,5% y el 49%, y fue superior al 70% al cabo de 17 semanas. Probablemente con el tiempo y repetidas aplicaciones de este herbicida, puede ir acumulándose en el suelo bajo la forma de los llamados residuos recalcitrantes, los que van siendo desorbidos del suelo lentamente (Hance, 1980). Por otra parte, la fracción extraíble está relacionada con la cantidad de un compuesto plaguicida que es biológicamente activo en el suelo (Hance, 1980 ; Weber *et al.*,1993).

Cromatografía de la fracción extraíble. En los ensayos de separación por cromatografía de capa delgada, se detectaron solo atrazina y su metabolito hidroxiatrazina (Cuadro 13). Los resultados que se obtuvieron indican baja transformación de la atrazina, esto es, que el porcentaje de ^{14}C extraíble como ^{14}C atrazina fue superior al 85% hasta la semana 9; ya al término del tercer período (semana 17) el ^{14}C extraíble como ^{14}C -atrazina fue inferior en el suelo “Algodonal” (62%) con relación al suelo “Usosaldaña” (83,6%), por tanto, en este último suelo se dio menor transformación de ^{14}C atrazina a ^{14}C hidroxiatrazina (Cuadro 13).

Durante los primeros 35 años de comercialización de la atrazina, se asumió que el catabolismo de este compuesto era solo parcial (de Souza *et al.*, 1998). También, se creía que la dealkilación, que conduce a la formación de deetilatrastina y deisopropilatrastina, era la principal ruta del catabolismo microbiano de la atrazina; mientras que la hidrólisis, que conduce a la formación de hidroxiatrazina, se consideró una vía sólo de procesos abióticos (Erickson & Lee, 1989). Sin embargo, en la pasada década se han podido aislar algunas bacterias aeróbicas que pueden

Cuadro 12. Mineralización de ¹⁴C-atrazina a ¹⁴CO₂ después de 17 semanas en dos suelos.

Tiempo (Semanas)	Suelo "Usosaldaña"		Suelo "Algodonal"	
	% ¹⁴ CO ₂ Semanal	% ¹⁴ CO ₂ Acumulado	% ¹⁴ CO ₂ Semanal	% ¹⁴ CO ₂ Acumulado
1	0,63	0,63	0,29	0,29
2	0,51	1,14	0,24	0,53
4	0,58	1,72	0,51	1,04
5	0,57	2,30	0,62	1,66
6	0,64	2,93	0,74	2,40
7	0,67	3,60	0,93	3,33
8	0,68	4,29	0,91	4,24
9	0,49	4,78	0,62	4,87
10	0,81	5,59	1,13	6,00
11	0,69	6,29	0,98	6,98
12	0,73	7,01	0,88	7,86
14	0,88	7,89	1,29	9,14
16	1,11	9,00	1,66	10,80
17	0,52	9,53	0,61	11,41

* Hasta la semana 5 los resultados son promedio de 10 repeticiones
 * De la semana 6 a la semana 9 los resultados son promedio de 8 repeticiones
 * De la semana 10 a la 17 los resultados son promedio de 6 repeticiones

Cantidad de suelo incubado: 200 g
 Temperatura de incubación: 25°C
¹⁴C-atrazina+atrazina fría aplicada: 2,0 kg i.a./ha

Cuadro 13. Porcentaje de ¹⁴C en la fracción ligada y extraíble, y composición porcentual de la fracción extraíble.

Suelo	Semana	Fracción Ligada (%)	Fracción Extraíble (%)		
			Atrazina	Hidroxi-atrazina	Total
Usosaldaña	5	56,5	40,5 (93,1)*	3,00 (6,9)	43,5
	9	52,7	44,6 (94,3)	2,7 (5,7)	47,3
	17	74,3	21,5 (83,6)	4,2 (16,4)	25,7
Algodonal	5	48,9	47,1 (92,2)	4,0 (7,8)	51,1
	9	62,3	32,3 (85,7)	5,4 (14,3)	37,7
	17	80,4	12,2 (62,2)	7,4 (37,8)	19,6

* Los valores en paréntesis representan la proporción (%) en la fracción extraíble, de atrazina e hidroxiatrazina

degradar completamente la atrazina (Mandelbaum *et al.* 1995; Struthers *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000; Rousseaux *et al.*, 2001). Varias de ellas pueden hidrolizar la atrazina a hidroxiatrazina, compuesto que es a su vez transformado a ácido cianúrico, mediante una nueva ruta. En este trabajo no se detectaron otros metabolitos diferentes a la hidroxiatrazina usando técnicas analíticas isotópicas (¹⁴C), y ninguno con técnicas de extracción convencionales y separación por HPLC, lo cual sugiere que el principal producto de transformación de la atrazina es la hidroxiatrazina, mediante catabolismo microbiano o hidrólisis química.

Adsorción – Desorción de la atrazina en los suelos

En el Cuadro 14 se presentan los resultados del experimento de adsorción-desorción. Los resultados del ajuste de las curvas de adsorción-desorción a una recta se presentan en el Cuadro 15. Las curvas de adsorción indican respuesta lineal; esto es, que los suelos tienen afinidad por el herbicida en el intervalo de concentraciones evaluado, siendo la adsorción del compuesto menor en "Algodonal" respecto a "Usosaldaña". Los coeficientes de correlación lineal de la adsorción fueron superiores a

Cuadro 14. Resultados del ensayo de adsorción - desorción de atrazina en dos suelos.

SUELO	Concentración µg/mL	Actividad DPM	Atrazina adsorbida			Atrazina desorbida		
			Actividad DPM	Concentración µg/mL	µg/g	Actividad DPM	Concentración µg/mL	µg/g
Usosaldaña	0,8156	59962,87	26.433,69	0,36	0,23	10.097,52	0,14	0,10
	1,0240	55556,72	23.946,33	0,44	0,29	9.120,93	0,16	0,20
	1,5294	56131,13	23.977,77	0,65	0,44	8.898,75	0,25	0,24
	3,0357	56791,36	29.520,16	1,58	0,72	10.492,66	0,57	0,19
	5,5183	54954,29	24.483,44	2,46	1,51	9.761,78	1,01	0,99
	10,5492	58222,13	25.426,49	4,61	2,98	10.529,37	1,86	1,62
Algodonal	0,8156	59962,87	46.654,91	0,63	0,09	12.259,76	0,17	0,09
	1,0240	55556,72	41.062,72	0,76	0,13	11.754,34	0,22	0,07
	1,5294	56131,13	44.778,18	1,22	0,15	11.718,44	0,32	0,14
	3,0357	56791,36	41.582,32	2,22	0,39	12.320,80	0,66	0,28
	5,5183	54954,29	39.515,66	3,97	0,77	11.460,91	1,55	0,88
	10,5492	58222,13	42.126,43	7,63	1,50	11.706,03	2,12	1,53

DPM: Desintegraciones por minuto

Valores promedio de 4 repeticiones y 3 lecturas por actividad por repetición.

Volumen de lectura de 1,00 mL y volumen del extracto de 5,00 mL.; peso del suelo aproximadamente 2,00 g.

Tiempo de contacto: 24 horas

0,98 (Cuadro 15) y no se observa, por lo menos hasta la concentración máxima usada (10,55 µg/mL), que haya una tendencia a disminuir tal afinidad (Cuadro 14). Respecto a la desorción, la tendencia también fue lineal, solamente que el coeficiente de correlación fue menor comparado con el de adsorción, pero superior a 0,93 (Cuadro 15).

Cuadro 15. Resultados del ajuste lineal de las curvas de adsorción - desorción de la atrazina en dos suelos (µg /g vs. µg/mL).

	Suelo "Usosaldaña"			Suelo "Algodonal"		
	r ²	m	b	r ²	m	b
Adsorción	0,9889	0,64	-0,05	0,9963	0,20	-0,05
Desorción	0,9480	0,89	-0,03	0,9314	0,80	-0,12

m = pendiente, b = intercepto

Al examinar las isotermas de adsorción ajustadas al modelo de Freundlich (Figura 8), que relaciona matemáticamente la cantidad de material adsorbido con su concentración, se evidenció una clara tendencia a la linealidad (r² entre 0,90 0,98; Cuadro 16) y por lo tanto, se confirma así que la adsorción de la atrazina en los dos suelos se ajusta bastante bien a dicho modelo (Cuadro 16), lo que permite calcular la constante de adsorción K_d; esta constante indica el grado de afinidad de los suelos con el herbicida. Como se observa en el Cuadro 16, "Usosaldaña" presentó un valor de K_d cuatro veces mayor que "Algodonal", aunque con un valor relativa-

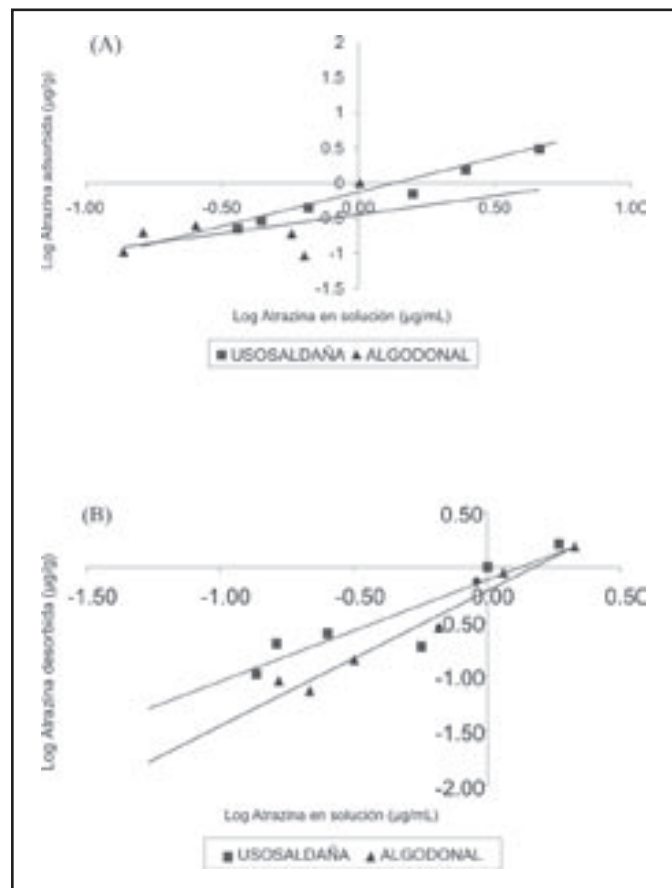


Figura 8. Isotermas de (A) adsorción y (B) desorción de la atrazina en dos suelo, ajustadas al modelo de Freundlich.

Cuadro 16. Parámetros de las curvas de adsorción – desorción de la atrazina en dos suelos ajustados al modelo de Freundlich.

Parámetro	Suelo “Usosaldaña”		Suelo “Algodonal”	
	Adsorción	Desorción	Adsorción	Desorción
R ²	0,9829	0,8392	0,9001	0,7126
1/n	0,9601	0,9833	1,1232	0,9308
K _d	0,61	0,72	0,14	0,64

mente bajo (Cuadro 16); lo que puede explicarse debido a su mayor contenido de arcilla (18,4%). Las cualidades adsorbentes de las arcillas son bastante conocidas. Con relación al factor de cubrimiento (1/n), los valores son cercanos a la unidad (monocapa) (Cuadro 16), y esta situación valida el sentido físico de los valores K_d, puesto que la aproximación a Freundlich considera la adsorción de una monocapa de moléculas de sorbato sobre una superficie heterogénea.

En cuanto a la desorción, aunque también hubo una tendencia a la linealidad (r² entre 0,71 y 0,84; Cuadro 16) no es tan marcada como en el caso de la adsorción, y por tanto, el grado de ajuste al modelo es menor. Las K_d fueron calculadas de acuerdo con el modelo (Cuadro 16), y se observa una menor diferencia entre los suelos en la desorción; el suelo Algodonal desorbe con mayor facilidad que lo que adsorbe (Cuadro 16), situación que está relacionada con su alto contenido de arena (66,0%). Los valores 1/n o factor de cubrimiento (que se calcula con la pendiente de la recta de ajuste) son cercanos a la unidad (Cuadro 16). En el caso del suelo “Usosaldaña” no presentaron diferencia con el valor de la respectiva curva de adsorción (1/n de adsorción = 0,96 y desorción = 0,98; Cuadro 16), lo cual significa que específicamente para una concentración de compuesto dada en la solución del suelo la cantidad de atrazina retenida puede ser calculada mediante los valores de la curva de adsorción. En este caso particular, por tanto, no se presentó el fenómeno llamado de histéresis de desorción. La histéresis se caracteriza por la retención de moléculas que no son desorbidas completamente. Por el contrario, en el suelo Algodonal los valores de 1/n de adsorción y desorción fueron diferentes (1,12 y 0,93, respectivamente; Cuadro 16); por tanto, la histéresis fue importante en este suelo, hecho que puede explicar el mayor porcentaje de producto ligado a partir de la semana 9, así como la presencia de HA en mayor proporción, según se pudo evidenciar en el experimento de mineralización.

El fenómeno de la histéresis no puede atribuirse a una característica en particular de un determinado suelo, sino que es el resultado de diversos factores que convergen en un mismo suelo que impiden que haya una total recuperación del herbicida; entre estos factores está la posible formación de enlaces que hacen que el herbicida pase a ser un compuesto inactivo o inactivado, o la degradación del pesticida que permite la formación de sus metabolitos de degradación.

Movilidad de la atrazina en dos suelos

El Cuadro 17 contiene los resultados obtenidos en el ensayo de movilidad por el método de Cromatografía en Capa Fina de Suelo de Helling (1971 b y c), en los dos suelos.

Cuadro 17. Valores de Rf para atrazina y glifosato en los suelos estudiados.

Suelo	Usosaldaña		Algodonal		
	Herbicida	Atrazina	Glifosato	ATRAZINA	GLIFOSATO
Rf	0,345	0	0,690	0	0

Los resultados de la movilidad evidencian claramente que el glifosato es un herbicida prácticamente inmóvil comparado con la atrazina en los suelos estudiados. De acuerdo con Helling (1971 a, b y c) la atrazina presentó en “Usosaldaña” movilidad baja y en el suelo “Algodonal” la movilidad fue media (Figura 9). Esta movilidad se debe únicamente a la difusión en la fase suelo - agua. De los resultados anteriores también se puede inferir que hay alta probabilidad de contaminación de aguas subterráneas cuando la atrazina se aplica en suelos de tipo arenoso, como es el caso del suelo “Algodonal”, donde ocurrió movilidad del herbicida.

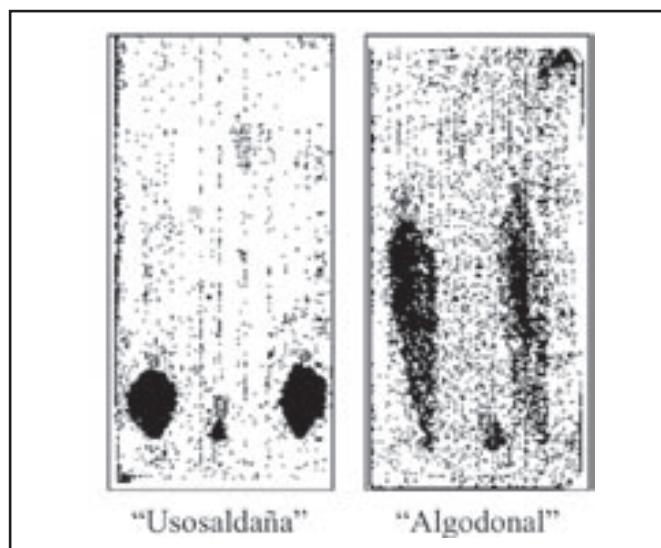


Figura 9. Movilidad de atrazina (a) comparada con la de glifosato (g) en dos suelos: “Usosaldaña” y “Algodonal”.

De los resultados importantes que se obtuvieron en este trabajo, se puede resaltar que el método de análisis de atrazina, deisopropilatraxina y deetilatraxina en muestras de suelo con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (218 nm), resultó adecuado por ser selectivo para la determinación de los compuestos atrazina, deisopropilatraxina, y deetilatraxina a partir de las muestras de suelo; es lineal en el rango de 0,2 – 2,0 µg / mL para los compuestos atrazina, deisopropilatraxina y deetilatraxina.; estos compuestos se recuperaron en cantidades que oscilaron entre 45% a 65%,(fracción extraíble) a partir de suelo “Usosldaña”; el parámetro precisión presentó valores del coeficiente de variación entre 7% a 13%; el método tiene un límite de detección para los tres compuestos, que está entre 4,0 y 1,0 µg/ Kg de suelo; las condiciones cromatográficas permitieron la determinación simultánea de los tres compuestos en un tiempo de 11 minutos y con un bajo consumo de solventes, y los procesos de limpieza utilizados (extracción en fase sólida con C₁₈ y extracción líquido-líquido) permitieron obtener soluciones libres de compuestos orgánicos que interfieran en el análisis cromatográfico. Con base en el resultado del análisis de las muestras de campo se pudo detectar la atrazina hasta por setenta días después de su aplicación, a concentraciones de 137 y 24,8 µg/Kg a los 37 y 70 ddt, respectivamente. La temperatura ambiente, más que la humedad del suelo, resultó ser un factor determinante en la degradación de la atrazina en este suelo. Ocurre una mayor degradación del herbicida a 30 °C que a 20 °C, bajo condiciones de laboratorio. Los compuestos deisopropilatraxina y deetilatraxina no se detectaron en ninguno de los experimentos.

La mineralización de la atrazina en los suelos estudiados fue baja, de máximo 11% hasta los 120 días que duró la experiencia, y debido a que no se observó una tendencia marcada en el decaimiento en la producción del ¹⁴CO₂, se considera que éste tiempo no fue suficiente para evaluar la degradación total del herbicida y a su vez el tiempo de vida media. El uso de técnicas isotópicas permitieron la detección del metabolito hidroxiatrazina; sin embargo, la transformación de la molécula parental a hidroxiatrazina fue relativamente baja, de máximo un 38%. Adicionalmente, los suelos presentaron una afinidad alta por el herbicida en el intervalo (0,8156µg/mL a 10,5492 µg/mL) y los procesos de adsorción-desorción se ajustaron al modelo de Freundlich. Como era de esperarse, el valor de K_d fue mayor en el suelo “Usosaldaña”; al tener mayor contenido de arcillas y materia orgánica la atrazina se liga a estos coloides. Por otra parte, la mayor transformación de la atrazina a hidroxiatrazina en el suelo “Algodonal”, a pesar de ser un suelo con bajo contenido de materia orgánica que supone baja actividad microbiana, se podría explicar por la probable predominancia de una ruta de transformación abiótica sobre la transformación microbiana.

Al comparar los resultados de la disipación del herbicida en el campo mediante HPLC y las deter-

minaciones con técnicas isotópicas bajo condiciones controladas de laboratorio, se evidencia que la presencia de residuos de atrazina biodisponibles (no ligados) en el suelo en condiciones de campo no va más allá de los 70 días, mientras que el uso de la metodología con ¹⁴C indica que el herbicida va ligándose con el tiempo al suelo, y que en 120 días (ciclo de vida por ejemplo del maíz en clima cálido) no se alcanza a mineralizar (total transformación) ni siquiera el 50% del compuesto inicialmente aplicado. Estos resultados son importantes, pues indican que el herbicida permanece ligado al suelo constituyendo residuos recalcitrantes, los que pueden ir siendo liberados lentamente con el tiempo. La pregunta entonces es, ¿estos residuos recalcitrantes estarían afectando o interfiriendo con organismos no objetivo, y entre ellos, los cultivos de rotación subsiguiente? Si los cultivos de rotación son altamente sensibles al herbicida, es de esperarse fitotoxicidad. El efecto sobre otros organismos no objetivo dependen de la cantidad de compuesto que se va liberando y que pasa a la solución del suelo, y a la sensibilidad particular de los diferentes organismos que habitan el sitio. Por ejemplo, de acuerdo con los trabajos del profesor T. Hayes de la Universidad de Berkeley, California, la atrazina está haciendo que algunas ranas desarrollen órganos sexuales anómalos a concentraciones 30 veces más bajas que los niveles encontrados en el agua potable (Royte, 2003). Finalmente, en condiciones de campo se espera mayor lixiviación del herbicida en el perfil del suelo “Algodonal”, particularmente durante el período cercano a la aplicación, pues el compuesto tiende a ligarse al suelo a medida que pasa el tiempo.

LITERATURA CITADA

1. AKER, B. & D. C. MUIR. 1978. The disappearance and movement of three triazine herbicides and several of their degradation products in soils under field conditions. *Weed Research* 18: 111-120.
2. ARMSTRONG, G. & R. F. CHESTER HARRIS. 1967. Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 31: 61-66.
3. ASHTON, F.M & S. A. CRAF. 1981. Mode of action of herbicides. 2nd edition. John Wiley & Sons. pp: 328-329.
4. BARRIUSO, E., C. FELLER; R. CALVET & R. CERRIC. 1992a. Sorption of atrazine and 2-4D herbicides in two brasilian oxisols. *Geoderma* 53: 155-167.
5. BARRIUSO, E.; U. BAER & R. CALVET. 1992b. Dissolved organic matter and adsorption-desorption of dimefuron, atrazine and carbetamide by soils. *J. Environ. Qual.* 21:359-367.
6. BEST, J.A. & J. B. WEBER. 1974. Disappearance of s-triazine by pushing a balance-sheet approach. *Weed Science* 22: 364-373.
7. BORGAARD, O. K. & J. C. STREIBIG. 1988. Atrazine adsorption by some soil samples in relation to their constituents. *Acta Agric.Sc&. 38: 293-301.*

8. CALVET, R., 1980. Adsorption-desorption phenomena. En: Interactions between herbicides an the soil . Hance, R. J., Ed. European Weed Research Society. Academic Press. London.
9. CLAY, S. A. & W. C. KOSKINEN. 1990. Adsorption and desorption of atrazine, hidroxiatrazine and S-glutathione atrazine on two soils. Weed Science 38: 262-266.
10. COOK, A. M.& R. HÜTER. 1981. s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. J. Agric. Food Chem. 29:1135-1143
11. DE SOUZA, M. L., D. NEWCOMBE, S. ALVEY, D. E. CROWLEY, A. HAY, M. J. SADOWSKY, & L. P. WACKETT. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 178-184.
12. ERICKSON, L. E. & K. H. LEE. 1989. Degradation of atrazine and related s-triazines. Crit. Rev. Environ. Control. 19: 1-13.
13. GARCÍA, L. & C. FERNANDEZ. 1991 Fundamentos de las malas hierbas y herbicidas. Editorial Mundiprensa. Madrid, España.
14. GILCHRIST, G.F. 1993. Atrazine interactions with clay minerals: kinetics and equilibria of sorption. J. Agric. Food Chem. 41: 1748-1755.
15. GOVI, M., A. SARTI, E. DI MARTINO, C. CIAVATTA & N. ROSS. 1996. Sorption and desorption of herbicides by humic acid fractions. Science 161: 265-269.
16. HANCE, R. J. *et al.* 1968. The phytotoxicity of some herbicides in field and pot experiments in relation to soil properties. Weed Research 8: 136.
17. HANCE, R. J., Ed. 1980. Interation between herbicides & the . Cap. 4 & 5. European Weed Research Society. Academic Press, London.
18. HELLING, C.S. 1971a. Pesticide mobility in soils I. Parameters of thin layer chromatography. Sci. Soc. Amer.Proc. 35: 733-737.
19. HELLING, C.S. 1971b. Pesticide mobility in soils II. Application of thin layer cromatography. Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 738-743.
20. HELLING, C.S. 1971c. Pesticide mobility in soils III. Influence of soil propierties. Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 744-747.
21. HUANG, P.M.; R. GROVER & R. B. McKERCHER. 1984. Components and particle size fractions involved in atrazine adsorption by soils. Science 138: 20-24.
22. HURLE, K. & A. WALKER 1980. Persistence and its prediction. En: Interactions between herbicides and the soil. R. J. Hance, Ed. European Weed Research Society. Academic Press, London. pp: 84-86.
23. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 1996. Subgerencia de prevención y control. División de Insumos Agrícolas. Reporte general de plaguicidas. Bogotá, Colombia.
24. LERCH, R. N. & W. W. DONALD. 1994. Analisis of hidroxilated atrazine degradation products in water using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. J. Agric. Food. Chem. 42: 922-927.
25. LIWANG, M. A., L. M. SOUTHWICK, G. H. WILLIS & H. M. SELIM. 1993. Hysteretic characteristics of atrazine adsorption – desorption by a sharkey soil. Weed Science 41:627–633.
26. MANDELBAUM, R. T., D. L. ALLAN & L. P. WACKETT. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Appl. Environ. Microbiol. 61(4): 1451-1457.
27. MIRGAIN, I., *et al.* 1993. Degradation of atrazine in laboratory microcosms: Isolation and identification of the biodegrading bacteria. Environ. Toxicol. Chem.12: 1627-1633.
28. MUKHERJEE, I. & M GOPAL. 1996. Chromatographic techiques in the analysis of organochlorine pesticide residues. Journal of Chromatography A. 754:33-42.
29. NAKAGAWA, L. E., L. C. LUCHINI, M. R. MUSUMECI & M. M. DE ANDEA. 1995. Comportamento da atrazina em solos brasileiros em condicoes de laboratorio. Pesq. Agrop. Bras. 30: 471-476
30. PICHON, V., L. CHER, S. GUENW & M. C. HENNSON. 1995. Comparison of sorbents for the solid-phase extraction of the highly polar degradation products of atrazine. J. Chromatogr.-A. 711: 257-267.
31. REINHARDT, F; G. EHLERS & P. NEL. 1990. Persistence of atrazine affected by selected profiles. S. Afr. J. Plant : 182-187.
32. ROUSSEAU, S., A. HARTMANN, & G. SOULAS. 2001. Isolation & characterization of new gram-negative and gram positive atrazine degrading bacteria from different French s. FEMs Microbial. Ecol. 36: 211-222.
33. ROYTE, E. 2003. Ranas transexuales. Discover 7 (3): 40-47.
34. SHARON, A. C. & W. C. KOSKINEN. 1990. Adsorption and desorption of atrazine hidroxiatrazine, and s-glutathione atrazine on two soils. Weed Science 38: 262-266.
35. SORENSON, B. A., W. C. KOSKINEN, D. D. BUHLER, D. L. WYSE, W. E. LUESCHEN & M. D. JORGENSON. 1994. Formation and movement of ¹⁴C atrazine degradation products in a clay loam soil in the field. Weed Science 42: 618-624.
36. STEINHEIMER ,T. R. 1993. HPLC Determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water. J. Agric. Food. Chem. 41 : 588-595.
37. STORK, P.R. 1997. Field leaching and degradation of atrazine in a graditionally textured alkaline soil. Aust. J. Agric. Res. 48: 371-376.
38. STRUTHERS, J. K., K. JAYACHANDRAN, & T. B. MOORMAN. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a & use of this strain in bioremediation of contaminated . Appl. Environ. Microbiol. 64(9): 3368-3375.

39. TOPP, E., H. ZHU, S. M. NOUR, S. HOUOT, M. LEWIS, & D. CUPPELS. 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ Microbiol.* 66: 2773-2782.
40. VERA, P.; K. STULIK & M. PRIHODA. 1988. High-performance liquid chromatography of *s*-triazines and their degradation products using ultraviolet photometric and amperometric detection. *Journal of Chromatography* 442: 147-155.
41. WALKER, S. R. & W. BLACKLOW W. 1994. Adsorption and degradation of triazine herbicides in soils used for Lupin Production in Western Australia: Laboratory Studies and a simulation model. *Aust. J. Res.* 33: 1189-1205.
42. WEBER, J. B.; J. A. BEST & J. U. GONESE. 1993. Bioavailability and bioactivity of sorbed organic. Science Society of America. Special publication: 153-165.
43. WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. 1994. Herbicide handbook. Seventh edition Champaign, Illinois, USA. pp: 20-23.