



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA NATURALEZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA EMPLEANDO QUECHERS Y HPLC-  
DAD PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE LA  
ATRAZINA POR HONGOS FILAMENTOSOS**

**ANGIE ROCIO BARRERA CONTRERAS**

Foz de Iguazú  
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA EMPLEANDO QUECHERS Y HPLC-DAD  
PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA  
POR HONGOS FILAMENTOSOS**

**ANGIE ROCIO BARRERA CONTRERAS**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para la obtención de título de grado en Biotecnología.

Orientador: Prof. Dra. Marcela Boroski  
Coorientadora: Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz de Iguazú  
2024

ANGIE ROCIO BARRERA CONTRERAS

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA EMPLEANDO QUECHERS Y HPLC-DAD  
PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA  
POR HONGOS FILAMENTOSOS**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para la obtención de título de grado en Biotecnología.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dra. Marcela Boroski  
UNILA

---

Coorientadora: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA

---

Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA

---

Prof. Dra. Marciana Pierina Uliana Machado  
UNILA

Foz de Iguazú, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2024.

## PLAZO DE PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor: Angie Rocio Barrera Contreras

Curso: Biotecnología

	tipo de documento
(X) graduación	(.....) artículo
(.....) Especialización	(X) proyecto final de curso
(.....) maestría	(.....) monografía
(.....) doctorado	(.....) disertación
	(.....) tesis
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuales
	(.....) _____

Título del trabajo académico: Desarrollo de una metodología empleando QuEChERS y HPLC-DAD para la evaluación del potencial de biodegradación de la atrazina por hongos filamentosos.

Nombre del asesor: Marcela Boroski

Fecha de defensa: 25/05/2024

### Licencia de distribución no exclusiva

El autor antes mencionado:

a) Usted declara que el documento entregado es su obra original, y que tiene derecho a otorgar los derechos contenidos en esta licencia. También declara que la entrega del documento no infringe, a su leal saber y entender, los derechos de ninguna otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material del cual usted no posee los derechos de autor, declara que ha obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para otorgar a UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana los derechos requeridos por esta licencia, y que este material cuyos derechos pertenecen a terceros esté claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento entregado se basa en un trabajo financiado o apoyado por una institución distinta a la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, declara haber cumplido con las obligaciones requeridas en el respectivo contrato o convenio.

Como titular de los derechos sobre el contenido antes mencionado, el autor autoriza a la Biblioteca Latino-Americana – BUNILA a poner la obra a disposición, de forma gratuita y de acuerdo con la licencia pública *Bienes comunes creativos Licencia 3.0 no portada*.

Foz de Iguazú, 06 de mayo de 2024.

---

Firma del responsable

Dedico este trabajo a mis abuelas y abuelos, quienes me enseñaron y ayudaron a tornar la persona que soy. A mi mamá, quien ha sido mi ejemplo a seguir, mi fuerza, compañía, mi mejor amiga, la mujer más fuerte, persistente y resiliente.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la posibilidad de estar aquí y permitirme culminar bien esta etapa, por ayudarme en los peores momentos y por cuidarnos siempre.

Le agradezco inmensamente a mi mami por ser mi apoyo en todos y cada uno de mis pasos, por haberme dicho dale ve a Brasil por un futuro mejor, así ha sido y tú me has acompañado siempre. Gracias por ese amor que nos has dado siempre y por buscar siempre la forma de darnos todo lo que necesitamos.

Agradezco a Dios y a la vida por haberme permitido conocer a mi Brayitan y a él por ser mi apoyo, por calmarme cuando estaba en desespero, por motivarme a continuar por más que ya no quisiera seguir, por cuidarme, por quererme, ser mi mejor amigo, con quien nos contamos cosas, vemos series, hacemos deportes, gracias por ser ese ser tan especial que eres.

Les agradezco mucho a mis hermanos Nico, Pipe y Shofi por todos los grandes momentos que hemos vivido, por apoyarme al igual que mi mamá con la idea de vivir en Brasil y ustedes en la lejanía acompañandome, gracias por aguantar mi mal genio, aunque no tuvieran otra opción, los quiero muchísimo y ustedes son un gran apoyo en mi vida.

Gracias a mis orientadoras las profesoras Rafaella y Marcela por haberme permitido trabajar con ustedes, aprendí mucho en cuanto a la parte experimental, teórica, redacción y de la vida en sí, muchas veces yo no quería seguir adelante con mis proyectos por que no encontraba las palabras, el tema o lo que en sí estaba buscando y ustedes sin saberlo respondiendo mis preguntas siempre me calmaron y me ayudaron a darle diferentes enfoques a cosas que ni sabía que se podía.

Le agradezco mucho a mi cuarteto de amigas: Naty, Isa, Vivi y Grecia por haberme acompañado en este trayecto, nos reímos, trasnochamos, sufrimos, lloramos, chismeamos, son unas loquillas y las quiero muchísimo.

Mi Natys gracias por ser mi compañera de estudio, siempre fue de gran ayuda el repasar todo contigo, por tus chistes, por tu grandiosa compañía, por seguirme el juego siempre y ser mi compañera de deportes.

Gracias a Vi por ser esa persona con la que podía compartir mis sentimientos, la que siguió cada una de mis locuras como las ventas en el cantinho, gracias por ser una gran amiga y espero no te vuelvas a encerrar en ti misma.

Gracias Grecia maria por ayudarnos en esas materias difíciles que para ti

eran sencillas, gracias por esos grandes apuntes que siempre haces, por esos momentos viendo pelis infantiles y comiendo pizzas.

Gracias a Isa por habernos ayudado tanto con el portugues y las costumbres brasileras, por hacernos reir con tus grandes anécdotas, se que ha sido dificil pero hay que seguir adelante, eres una gran persona y vas a triunfar en la vida.

Gracias Bernicito, Luquitas y Jonathan por hacer que nuestra turma fuera especial, siento que fue gracias a su forma de ver la vida que hizo que todos nos contagiaramos de ese compañerismo que no he visto en otros lugares, gracias porque siempre nos ayudaron con nuestras dudas y encontraban siempre la manera mas fácil de hacer las cosas, simplificaban procesos tan complejos que lo hacían ver tan sencillos.

Gracias a todos los profesores que nos acompañaron en este trayecto, en especial a los profesores: Cristian, Carla, Tathianne, Kelvinson y Leticia, quienes con su forma de enseñar simplificaron mucho los procesos, su métodos de evaluación son únicos y generan que crezca un interes mayor por sus materias.

Gracias a toda la turma de biotecnología de 2019, de cada uno de ustedes aprendi muchas cosas, en especial a Susana, Hevelin, Gustavo, João; compartir con cada uno fue muy especial y nos hicieron siempre sentir muy agustos.

Gracias a todos los técnicos, estágiarios y compañeros de los laboratorios tanto en el JU como en PTI, que siempre estuvieron a disposición para la realización de nuestras diferentes practicas, ensayos, pruebas, en especial a Quemili, Carla y Luana quienes me apoyaron mucho en la elaboración de mis proyectos de investigación y TCC.

Gracias a mis compañeros de juego Elkin, Edisson y Thais, quienes estuvieron presentes en los momentos de desestresarse, de compartir y divertirse.

Gracias a la Universidad Federal de la Integración Latino-americana por la oportunidad de estudiar en una Universidad que esta uniendo tantos pueblos, esta experiencia ha sido muy enriquecedora, ha contribuido en muchos aspectos de mi vida y estoy muy agradecida por cada uno de los momentos vividos en esa maravillosa universidad.

*La frase que me ha sido mi fiel compañera y me ha calmado en los peores momentos: Todo pasa por algo, nada es por casualidad.*

## RESUMEN

El agua, crucial para la vida, enfrenta una grave contaminación debido a actividades antrópicas, una vez que sustancias tóxicas son desechadas y estas contaminan aguas superficiales y subterráneas, causando pérdida de biodiversidad y enfermedades. La agricultura, una de las principales actividades con su uso extensivo de agrotóxicos como la atrazina, contribuye significativamente a esta contaminación. Aunque efectiva contra malezas, la atrazina residual persiste en el ambiente debido a su uso indiscriminado y a la relativa estabilidad de las propiedades químicas, llevando así a una acumulación y por ende aumentando el riesgo de exposición a largo plazo, afectando la salud de los animales y el mismo ser humano. Por ello, existen diversos estudios que buscan alternativas que sean económicas y reproducibles, como es el caso del uso de bacterias y hongos con la capacidad de biodegradar la atrazina. Este trabajo buscó evaluar hongos aislados del Arroyo Dorado, un efluente de la ciudad de Foz de Iguazú que se ha visto contaminado por desechos agrícolas y lixiviados provenientes de un antiguo vertedero. Los aislados están depositados en la Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) de la Unila. Se desarrollaron metodologías para seleccionar hongos con la capacidad de degradar la atrazina, que incluyeron pruebas de enriquecimiento y crecimiento, purificación de muestras con QuEChERS y análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD). Tras las pruebas de selección y enriquecimiento seis hongos filamentosos destacaron, entre los cuales el hongo *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 fue el que no obtuvo una diferencia significativa en el test de crecimiento comparado con el crecimiento en fuentes ricas en carbono, convirtiéndolo en un candidato prominente para futuros estudios de degradación. Los resultados indican que el aislamiento selectivo de hongos es una estrategia eficiente para la identificación de microorganismos con alta tolerancia a la atrazina. Además, se demostró que la metodología QuEChERS es efectiva en la recuperación de la atrazina y sus metabolitos deisopropilatrazina y desetilatrazina, lo que la hace prometedora para estudios posteriores de degradación de la ATZ por medio de hongos filamentosos, con posibles implicaciones significativas en aplicaciones biotecnológicas para futuras aplicaciones en la remediación ambiental.

**Palabras clave:** agua; agrotóxicos; atrazina; biodegradación; hongos; HPLC, QuEChERS.

## ABSTRAC

Water, crucial for life, faces serious contamination due to anthropogenic activities. Once toxic substances are discarded, and these contaminate surface and groundwater, causing loss of biodiversity and diseases. Agriculture, one of the main activities with its extensive use of pesticides such as atrazine, contributes significantly to this contamination. Although effective against weeds, residual atrazine persists in the environment due to its indiscriminate use and the relative stability of chemical properties, thus leading to an accumulation and therefore increasing the risk of long-term exposure, affecting the health of animals and the same human being. Because of that, there are various studies that look for alternatives that are economical and reproducible, such as the use of bacteria and fungi with the ability to biodegrade atrazine. This work seeks to evaluate fungi isolated from Arroyo Dorado, an effluent from the city of Foz de Iguazú that has been contaminated by agricultural waste and leachates from an old landfill. The fungi isolated is deposited in the Culture Collection of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Importance (CCMIBA) of Unila. Methodologies were developed to select fungi with the ability to degrade atrazine, including enrichment and growth tests, sample purification with QuEChERS, and high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) analysis. After the selection and enrichment tests, six filamentous fungi stood out, among which the fungus *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 was the one that did not obtain a significant difference in the growth test, compared to growth in rich carbon sources, making it a prominent candidate for future degradation studies. The results indicate that the selective isolation of fungi is an efficient strategy for the identification of microorganisms with high tolerance to atrazine. Furthermore, the QuEChERS methodology was shown to be effective in the recovery of atrazine and its metabolites isopropylatrazine and desethylatrazine, which makes it promising for subsequent studies of ATZ degradation by filamentous fungi, with possible significant implications in biotechnological applications for future applications in environmental remediation.

**Keywords:** water; agrochemicals; atrazine; biodegradation; fungi; HPLC, QuEChERS

## RESUMO

A água, crucial para a vida, enfrenta uma grave contaminação devido a atividades antrópicas, uma vez que substâncias tóxicas são descartadas e contaminam águas superficiais e subterrâneas, causando perda de biodiversidade e doenças. A agricultura, uma das principais atividades com seu uso extensivo de agrotóxicos como a atrazina, contribui significativamente para essa contaminação. Embora eficaz contra ervas daninhas, o resíduo de atrazina persiste no ambiente devido ao seu uso indiscriminado e à relativa estabilidade das propriedades químicas, levando a uma acumulação e, portanto, aumentando o risco de exposição a longo prazo, afetando a saúde dos animais e dos seres humanos. Por isso, existem diversos estudos que buscam alternativas que sejam econômicas e reproduzíveis, como é o caso do uso de bactérias e fungos com capacidade de biodegradar a atrazina. Este trabalho buscou avaliar fungos isolados do Arroyo Dorado, um efluente da cidade de Foz do Iguaçu que tem sido contaminado por resíduos agrícolas e lixiviados de um antigo aterro. Os isolados estão depositados na Coleção de Culturas de Microorganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) da Unila. Foram desenvolvidas metodologias para selecionar fungos com capacidade de degradar a atrazina, que incluíram testes de enriquecimento e crescimento, purificação de amostras com QuEChERS e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD). Após os testes de seleção e enriquecimento, seis fungos filamentosos se destacaram, entre os quais o fungo *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 foi o que não apresentou diferença significativa no teste de crescimento, comparado ao crescimento em fontes ricas em carbono, tornando-o um candidato promidente para futuros estudos de degradação. Os resultados indicam que o isolamento seletivo de fungos é uma estratégia eficiente para a identificação de microorganismos com alta tolerância à atrazina. Além disso, foi demonstrado que a metodologia QuEChERS é eficaz na recuperação da atrazina e seus metabólitos deisopropilatrazina e desetilatrazina, tornando-a promissora para estudos posteriores de degradação da atrazina por meio de fungos filamentosos, com possíveis implicações significativas em aplicações biotecnológicas para futuras aplicações na remediação ambiental.

**Palavras-chave:** água; agrotóxicos; atrazina; biodegradação; fungos; HPLC; QuEChERS.

## TABLA DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de uso de pesticidas a nivel mundial 1999-2020 .....	19
<b>Figura 2.</b> Top 10 de los países con mayor uso de agrotóxicos desde el año 2000 al 2021.....	20
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de agua contaminada con pesticidas 2014-2017.....	20
<b>Figura 4.</b> Incremento en el uso de herbicidas a nivel mundial desde el año 1990 al 2021.....	21
<b>Figura 5.</b> Ciclo de los pesticidas en el entorno agrícola.....	24
<b>Figura 6.</b> Casos de intoxicación a nivel mundial.....	25
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la molécula de Atrazina en 2D y 3D.....	27
<b>Figura 8.</b> Proceso de absorción de la ATZ y su mecanismo de acción.....	28
<b>Figura 9.</b> Proceso de la degradación de la atrazina por medio de hidrólisis.....	29
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de acción del carbón activado.....	33
<b>Figura 11.</b> Método fotocatalítico.....	34
<b>Figura 12.</b> Etapas de la acción de los microorganismos en el proceso de biodegradación.....	35
<b>Figura 13.</b> Vías de biodegradación de la atrazina a hidroxiatrazina (HOATZ) en condiciones aerobias y anaerobias, deisopropilatrazina (DIATZ), desetilatrazina (DEATZ).....	37
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de acción de la enzima fúngica sobre la degradación química de pesticidas.....	39
<b>Figura 15.</b> Rutas de la N-desalquilación (DIA y DEA) y descloración de la ATZ (HOATZ).....	41
<b>Figura 16.</b> Metodología para la selección de hongos con alta tolerancia a la ATZ para análisis en HPLC-DAD.....	44
<b>Figura 17.</b> Localización del Arroyo Dorado/PR y puntos de colecta.....	45
<b>Figura 18.</b> Paso a paso del proceso de liofilización.....	50
<b>Figura 19.</b> Metodología QuEChERS simplificada.....	51
<b>Figura 20.</b> Placa de 96 pozos inoculada en triplicata por cada uno de los diferentes hongos.....	55
<b>Figura 21.</b> Hongos seleccionados en la prueba de enriquecimiento en medio ATZ.....	56
<b>Figura 22.</b> Muestras una vez finalizado el proceso de liofilización.....	61
<b>Figura 23.</b> Muestras una vez finalizado el proceso de QuEChERS.....	62

<b>Figura 24.</b> Curva analítica estándar con la presencia de los analitos DIA, DEA y ATZ. .....	63
<b>Figura 25.</b> Gráficos de las curvas analíticas de los analitos ATZ (A), DIA (B) y DEA (C).....	64
<b>Figura 26.</b> Dispersión de residuos de ATZ (A), DIA (B), DEA (C). ....	66
<b>Figura 27.</b> Cromatogramas evaluando la recuperación de la ATZ. ....	69

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación toxicológica de los agrotóxicos en función de la toxicidad aguda oral (DL50), cutánea (DL50) e inhalatoria (CL50). ....	23
<b>Cuadro 2.</b> Principales productos de degradación de la ATZ. ....	29
<b>Cuadro 3.</b> Propiedades del comportamiento de la ATZ en el ambiente.....	30
<b>Cuadro 4.</b> Masa de los hongos después de ocho días de crecimiento en los medios MA2 y ATZ. ....	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Identificación molecular de los hongos y puntos de colecta en el Arroyo Dorado/PR .....	47
<b>Tabla 2.</b> Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de la ATZ, DIA y DEA .....	65
<b>Tabla 3.</b> Repetibilidad y Precisión intermedia para ATZ, DIA y DEA. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AD	Arroyo Dorado
AGT	Agrotóxicos
ANOVA	Análisis de Varianza, del inglés: Analysis of Variance
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
ATZ	Atrazina
C18	Cadena de 18 carbonos
CCMIBA	Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental
CL50	Concentración Letal 50
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONAMA	Consejo Nacional del Medio Ambiente
DDA	Didealquilatrazina
DEA	Desetilatrazina
DEHA	Desetilhidroxiatrazina
DIA	Desisopropilatrazina
DL50	Dosis Letal 50
DPR	Desvío Estandar Relativo, del portugués: Desvio Padrão Relativo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, del inglés Food and Agriculture Organization
HPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección por Arreglo de Diodos, del inglés: High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection
HOATZ	Hidroxiatrazina
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza
LD	Límite de Detección
LEIMAA	Laboratorio de Estudios Interdisciplinarios del Medio Ambiente y Alimentos
LQ	Límite de Cuantificación, del inglés: Limit of Quantification
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio

ONG	Organización No Gubernamental
PDA	Agar Papa Dextrosa, del inglés: Potato Dextrose Agar
PR	Paraná
PSA	Amina Primaria y Secundaria, del inglés: Primary Secondary Amine
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro, del inglés: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
UNILA	Universidad Federal de la Integración Latino-Americana

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1. AGROTÓXICO.....	18
2.1.1. Demanda Actual de Agrotóxicos.....	18
2.1.2. Toxicidad de los agrotóxicos.....	22
2.1.3. Problemas que conlleva el uso de los agrotóxicos.....	23
2.2. ATRAZINA .....	27
2.2.1. Mecanismo de acción de la ATZ en las plantas .....	27
2.2.2. Propiedades de la atrazina .....	29
2.2.3. Metodología de detección y técnicas para la remediación de ambientes contaminados con ATZ.....	32
2.3. BIODEGRADACIÓN .....	35
2.3.1. Biodegradación de la ATZ por medio de bacterias .....	36
2.3.2. Biodegradación de la ATZ por medio de hongos .....	38
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1. GENERAL.....	43
3.2. ESPECÍFICOS.....	43
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1. Sitio de origen de las muestras .....	45
4.2. PRIMERA FASE: SELECCIÓN DE HONGOS .....	48
4.2.1. Reactivación y cultivo de microorganismos .....	48
4.2.2. Prueba de enriquecimiento .....	48
4.2.3. Test de crecimiento y cuantificación de biomasa .....	49
4.3. SEGUNDA FASE: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	49

4.3.1.	Pre-inóculo e inóculo .....	49
4.3.2.	Liofilización .....	50
4.3.3.	Purificación de las muestras por medio de QuEChERS.....	51
4.3.4.	Validación.....	52
4.3.5.	Evaluación de la presencia de ATZ por medio de HPLC-DAD.....	53
4.4.	LIMPIEZA DE VIDRIERÍA .....	53
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
5.1.	Primera Fase .....	55
5.1.1.	Prueba de enriquecimiento .....	55
5.1.2.	Cuantificación de biomasa.....	58
5.2.	Segunda Fase.....	61
5.2.1.	Preparación de las muestras .....	61
5.2.2.	Validación de la metodología y análisis cromatográfico. ....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el agua a pesar de ser indispensable para la vida está siendo gravemente afectada por causas antrópicas, puesto que, a nivel mundial, enormes volúmenes de aguas residuales urbanas e industriales, junto con efluentes de drenaje agrícola, son liberados anualmente al medio ambiente sin tratamiento alguno (SAGASTA; ZADEH; TURRAL; 2018), dificultando así el acceso al agua potable y por consiguiente afectando directamente a la salud, el desarrollo económico y la seguridad alimentaria.

La agricultura, como principal usuario de recursos de agua dulce, es una fuente importante de contaminación química y orgánica de las aguas superficiales y subterráneas (DRECHEL; MARJANI; PEDRERO, 2023). Es especialmente preocupante la contaminación causada por contaminantes químicos emergentes, incluidos los agrotóxicos, los productos farmacéuticos para el ganado y los plásticos (FAO, 2021).

En el caso específico de los agrotóxicos, como la ampliamente utilizada atrazina (ATZ), se destaca su baja biodegradabilidad y su propensión a migrar hacia aguas superficiales y subterráneas, presentando concentraciones que con frecuencia superan los niveles máximos para agua potable y representan una amenaza potencial para ecosistemas y la salud humana (TAVERNA, *et al*, 2018; XIAOWEI, *et al*. 2019).

Esto se ve reflejado en el monitoreo de las aguas subterráneas en el acuífero de Zwischenscholle en el oeste de Alemania, donde se han revelado concentraciones de ATZ que superan el valor umbral incluso 20 años después de su prohibición, lo cual se debe a que los restos de ATZ siguen filtrándose de forma constante hacia el acuífero y a la baja degradación de la ATZ en las aguas subterráneas (VONBERG; *et al.*, 2014).

Para contrarrestar los efectos negativos de la ATZ, se están llevando a cabo investigaciones que buscan reducir su impacto de manera económica, reproducible y eficaz. Se destaca la aplicación de la biodegradación, una técnica de biorremediación, donde se aprovecha la tecnología y el conocimiento de las especies presentes en el medio.

En la biodegradación, microorganismos como hongos y bacterias, así como plantas se exponen a medios contaminados, adaptándose y metabolizando los compuestos contaminantes para utilizar la molécula como fuente de energía y/o

nutrientes de carbono, generando productos que pueden ser menos tóxicos que la sustancia inicial (LEAL, 2019), generando productos que pueden llegar a ser más o menos tóxicos que el de la sustancia inicial.

Entre los microorganismos que presentan la capacidad de degradar la ATZ se han encontrado: bacterias de los géneros, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* (FERNANDES, 2018) y hongos de los generos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaeta*, *Trametes*, *Trichoderma*, entre muchos otros, así como algunas micorrizas (DOUGLASS, 2017).

Debido a la gran biodiversidad de hongos, así como a su potencial biotecnológico, como es el caso de la biodegradación, existe un gran interés en la diversidad y aislamiento de estos microorganismos, ya que el conocimiento sobre su abundancia y distribución es fundamental para comprender cuáles son los principales grupos dominantes en un ambiente dado y conocer las principales funciones ecológicas que están mediando en estos lugares (LOUCA, et al., 2018).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de degradación de ATZ por parte de los hongos pertenecientes a la Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) que fueron aislados del sedimento del Arroyo Dorado de la ciudad de Foz de Iguazú/PR. Este canal natural se caracteriza por la presencia de diversos contaminantes, como metales pesados, dióxido de carbono y agroquímicos (DA SILVA, 2023).

La comprobación de la recuperación de la ATZ se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD) en conjunto con la técnica de extracción y limpieza de analitos conocida como QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), reconocida por su eficiencia en el aislamiento de analitos de pesticidas en matrices alimentarias.

Esta técnica, con algunas adaptaciones, es ampliamente empleada en la preparación de muestras que serán sometidas a análisis cromatográficos (GABARDO; et al., 2021), permitiendo evaluar con precisión la recuperación de los analitos ATZ, DIA y DEA. Los resultados de estas técnicas proporcionarán información crucial en la detección de los analitos de interés, para así poder ser usados como métodos de comprobación de estudios posteriores sobre la degradación de la ATZ.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. AGROTÓXICO**

Según la ley N° 7.802 de Brasil, reglamentada por el Decreto nº 4.074/2002 los agrotóxicos (AGT) y afines son: agentes de procesos físicos, químicos o biológicos, destinados al uso en los sectores de producción, almacenamiento y beneficio de productos agrícolas, pasturas, protección de florestas, nativas e implantadas y de otros ecosistemas, así como también ambientes urbanos, hídricos e industriales, cuya finalidad sea alterar la composición de la flora o de la fauna, con el fin de preservarlos de la acción dañosa de seres vivos considerados nocivos.

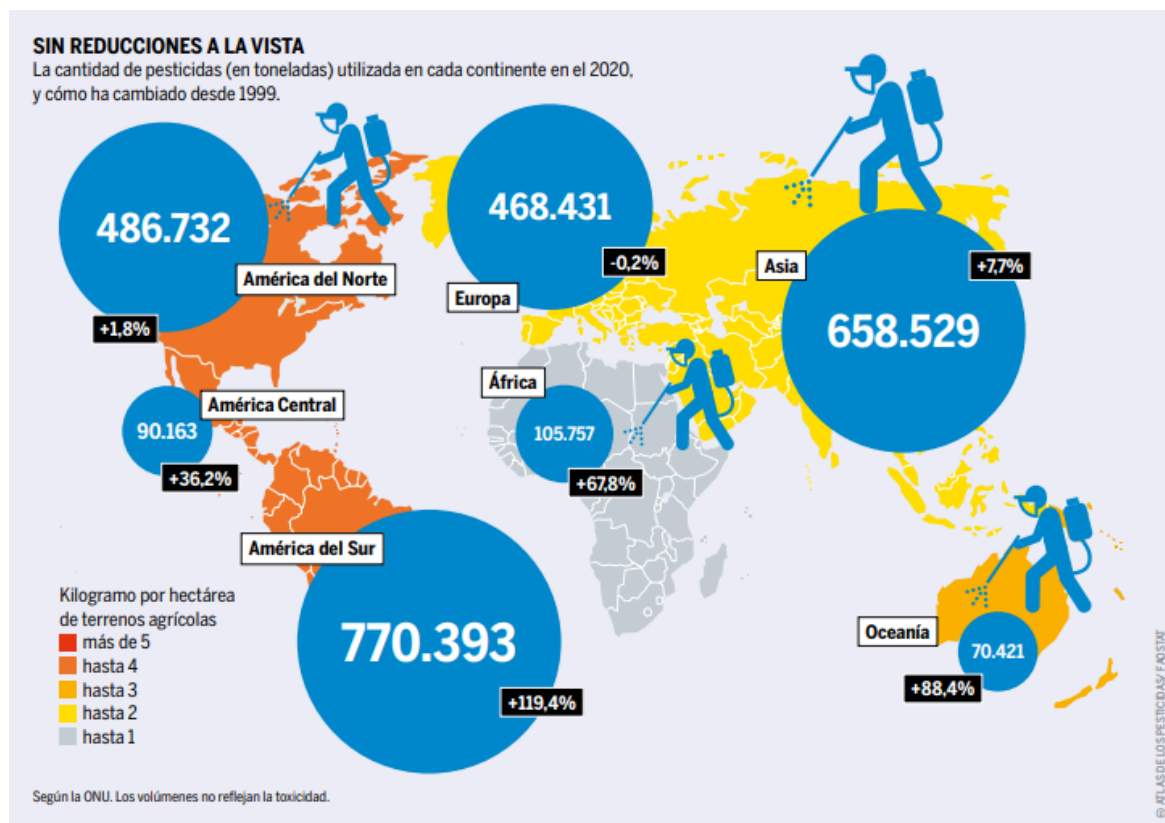
Entre los AGT encontramos los pesticidas, los cuales son cualquier sustancia o mezcla de sustancias de ingredientes químicos o biológicos destinada a repeler, destruir y controlar cualquier plaga o regular el crecimiento de las plantas (FAO; WHO, 2014). Entre los principales encontramos: insecticidas, herbicidas y fungicidas. Los insecticidas están diseñados para combatir insectos y artrópodos, afectando su sistema nervioso o reproductivo. Los herbicidas se utilizan para controlar malezas, afectando el crecimiento o la fotosíntesis de las plantas no deseadas. Los fungicidas son compuestos químicos biocidas que se utilizan para matar hongos o esporas parásitos (FAO, 2023).

#### **2.1.1. Demanda Actual de Agrotóxicos**

Con la creciente demanda de alimentos a causa del incremento demográfico a nivel mundial, se ha promovido la intensificación y extensión de los cultivos, en búsqueda de cumplir con las demandas alimenticias. Sin embargo, también se está dando un incremento en el efecto negativo debido a plagas, enfermedades y hierbas, una vez que se estima que alrededor del 30% de la producción agrícola se pierde debido al ataque de plagas (GILANI, 2015).

Además, la presencia de hierbas reduce el rendimiento de los cultivos a través de la competencia por el agua, la luz, el espacio y los nutrientes (RENTON; SINGH, 2017), desencadenando así el aumento en uso de defensivos tóxicos. Este fenómeno es particularmente prominente en el continente americano, que representa casi el 50% del consumo mundial de este tipo de defensivos para el año 2020 (figura 1) (FAOSTAT, 2024)

Figura 1. Porcentaje de uso de pesticidas a nivel mundial 1999-2020

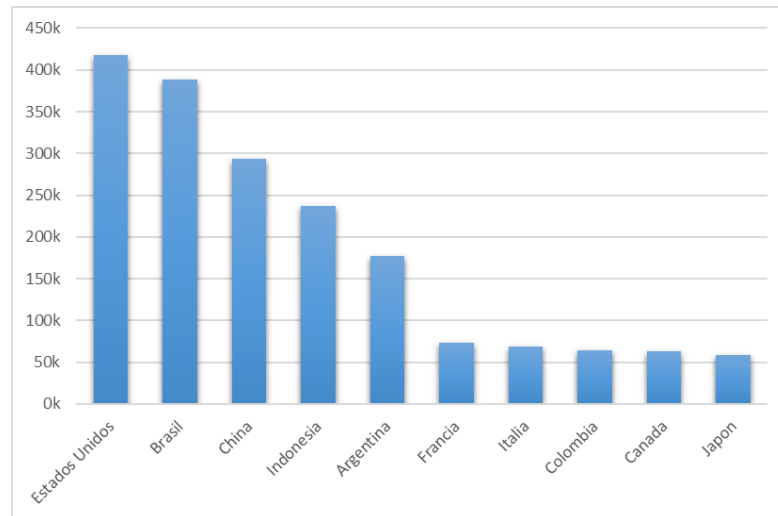


Fuente: FHB, AT, PAN, 2022.

Destacándose en América del Sur el caso de Brasil, el cual lidera junto a los Estados Unidos el comercio mundial de plaguicidas (figura 2), en los últimos diez años la demanda de estos productos en el mercado interno brasilero aumentó un 190%, especialmente en cultivos como soja, maíz y caña de azúcar (DAUNFENBACK; *et al*; 2022), mientras que en el mercado mundial el aumento fue del 90% (ARANTES, 2017).

En 2015, Brasil cultivó 71,2 millones de hectáreas con 899 millones de litros de pesticidas. La soja, maíz y caña de azúcar representaron el 76% del área total y usaron el 81% de los pesticidas. La soja fue la mayor usuaria con un 63%, seguida por el maíz (13%) y la caña de azúcar (5%) (PIGNATI; *et al*, 2017).

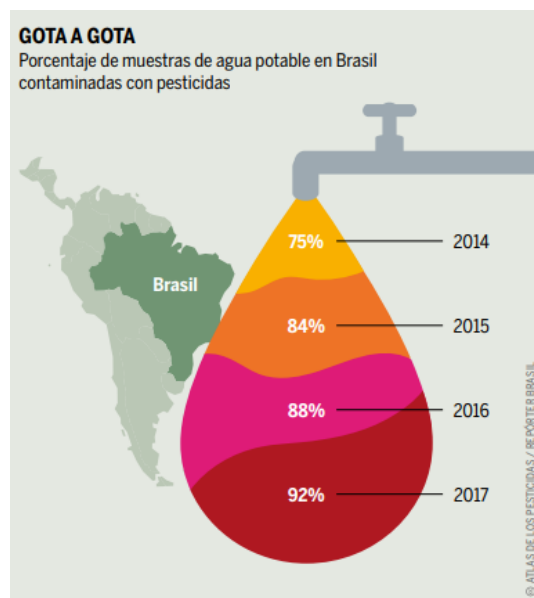
Figura 2. Top 10 de los países con mayor uso de agrotóxicos desde el año 2000 al 2021.



Fuente: adaptado de FAOSTAT, 2024.

Es por causa de este crecimiento en la implementación de pesticidas que en la actualidad en un 92% de las aguas potables de Brasil se han encontrado residuos de estos (figura 3), las Organizaciones no Gubernamentales (ONG) temen que en los próximos años sea difícil encontrar agua potable sin agroquímicos en la red de agua corriente brasileña (FHB; AT; PAN, 2023).

Figura 3. Porcentaje de agua contaminada con pesticidas 2014-2017.

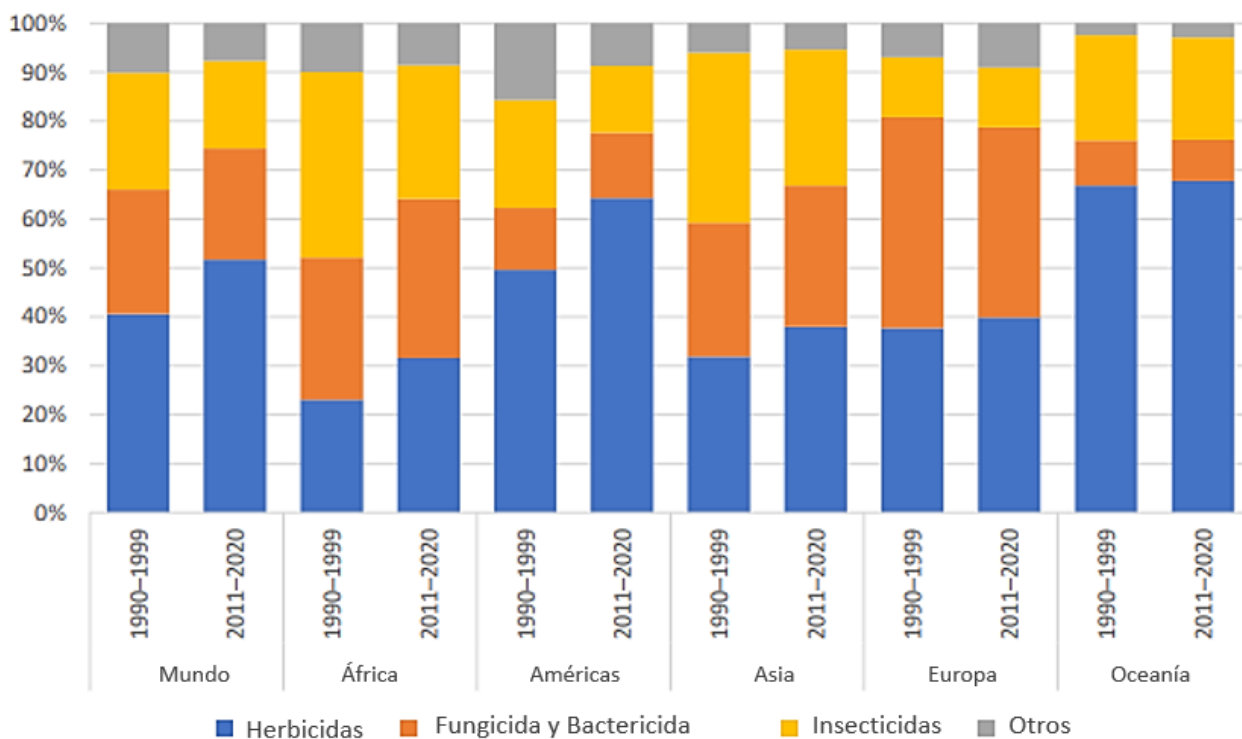


Fuente: FHB; AT; PAN, 2023.

Entre los AGT más implementados para este tipo de cultivos, como forma de control de malezas se encuentra la atrazina (ATZ), el segundo pesticida más consumido en el mundo, con un consumo anual de alrededor de 70.000 a 90.000 toneladas (SINGH, 2018), el quinto ingrediente activo más vendido en Brasil con 37.298,57 toneladas/año y el cuarto plaguicida más vendido en el estado de Paraná (PEVASPEA, 2019).

El uso de herbicidas como la ATZ viene en aumento, debido a los cambios significativos que vienen experimentado en el consumo mundial de pesticidas, desde la década de 1990 (FAO, 2022). Una vez que la proporción de herbicidas ha aumentado y la de insecticidas, fungicidas y bactericidas ha disminuido (figura 4). En términos del consumo mundial actual, el 47,5% de los AGT son herbicidas, el 29,5% son insecticidas, el 17,5% son fungicidas, y todos los demás representan el 5,5% (SAGASTA; ZADEH; TURRAL; 2018; FHB; AT; PAN, 2023).

Figura 4. Incremento en el uso de herbicidas a nivel mundial desde el año 1990 al 2021.



Fuente: adaptado de FAO, 2022.

### 2.1.2. Toxicidad de los agrotóxicos

Diversas entidades en Brasil y el exterior están enfocadas en el combate al uso indiscriminado de AGT, debido a los resultados de diversas investigaciones que evidencian daños a la salud, incluyendo efectos genotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos entre otros (INCA, 2018). Una de estas entidades en Brasil es la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), la cual mediante la Resolución de la Dirección Colegiada o RDC N° 294 del 2019 estableció los criterios de evaluación y clasificación toxicológica de los AGT, componentes afines y preservantes de madera. Donde se encuentran 6 clasificaciones para estos:

- I. Categoría 1: Producto Extremadamente Tóxico-Raya roja
- II. Categoría 2: Producto Altamente Tóxico-Raya roja
- III. Categoría 3: Producto Moderadamente Tóxico-Raya amarilla
- IV. Categoría 4: Producto poco Tóxico-Raya azul
- V. Categoría 5: Producto improbable de causar daño Agudo-Raya azul
- VI. No clasificado: Producto no clasificado-Raya verde

Así como también la clasificación según diversas vías de exposición, como la DL50 (Dosis Letal para el 50% de la población) y la CL50 (Concentración Letal para el 50% de la población), lo que refleja la gravedad de su impacto en la salud humana y el medio ambiente (cuadro 1). La exposición a AGT ha demostrado ser un riesgo para la salud, especialmente para los agricultores, quienes enfrentan un alto riesgo de enfermedades relacionadas a la exposición a estos productos químicos, es por ello que una debida clasificación y etiquetado de AGT es crucial para proteger la salud pública y el medio ambiente.

Es así que el uso de los AGT siempre representa un problema de toxicidad, ya sea en baja probabilidad, pero aun así presenta una cantidad. Por ello el control de estas sustancias debe ser riguroso, además que debe estar siempre en constante estudio, ya que a medida que avanzamos se van generando más y más productos que afectan la salud ambiental y humana.

Cuadro 1. Clasificación toxicológica de los agrotóxicos en función de la toxicidad aguda oral (DL50), cutánea (DL50) e inhalatoria (CL50).

Categoría	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5	No clasificado
Nombre de la Categoría	Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Medianamente Tóxico	Poco Tóxico	Improbable de causar daño Agudo	No clasificado
Vía de exposición Oral (mg/kg p.c.)	≤ 5	> 5-50	> 50-300	> 300-2000	> 2000-5000	> 5000
Vía de exposición Cutánea (mg/kg p.c.)	≤ 50	> 50-200	> 200-1000	> 1000-2000	> 2000-5000	> 5000
Vía de exposición inhalatoria	Gases (ppm/V)	≤ 100	> 100-500	> 200-2500	> 2500-20000	>20000-50000
	Vapores (mg/L)	≤ 0,5	> 0,5- ≤ 2,0	> 2,0- ≤ 10	> 10 ≤ 20	> 20-50
	Productos sólidos y líquidos (mg/L)	≤ 0,05	> 0,05-0,5	> 0,5-1,0	> 1,0-5,0	> 5,0-12,5

Fuente: adaptado de RDC N° 294 de 2019

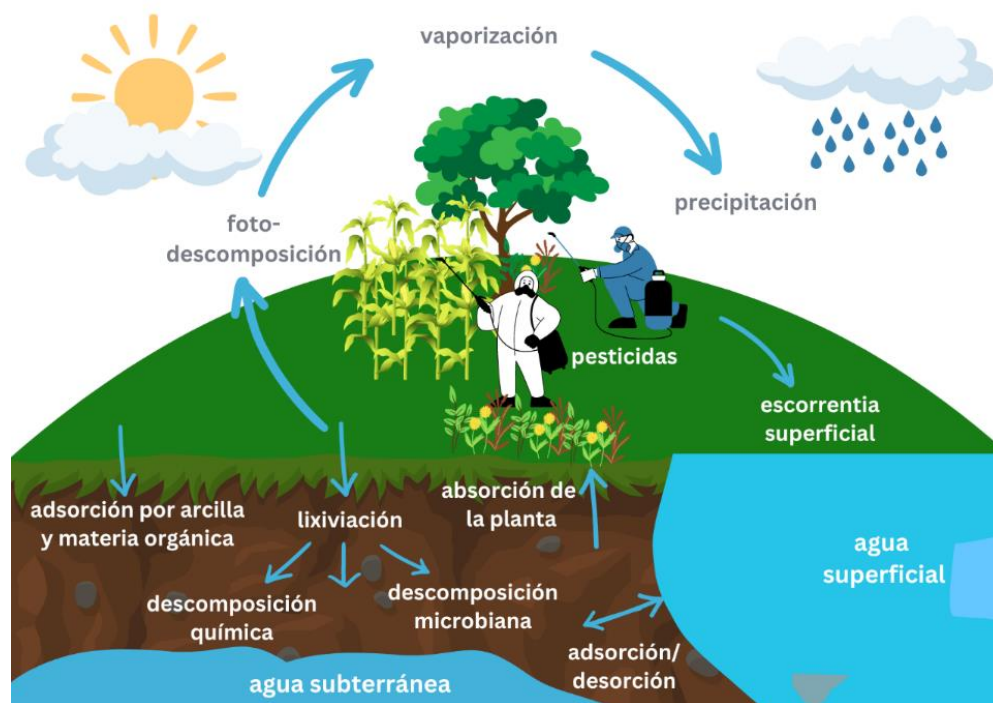
### 2.1.3. Problemas que conlleva el uso de los agrotóxicos

Este aumento en el uso de AGT plantea preocupaciones significativas sobre los posibles impactos ambientales y para la salud asociados con estas prácticas agrícolas intensivas. Debido a las transformaciones que experimentan una vez aplicados en el campo, grande parte de los pesticidas no logran alcanzar su objetivo, dispersándose en su lugar a través del viento y el agua (CAMPOS, 2018).

Cuando se aplican pesticidas con pulverizadores, el viento puede transportar las gotas o el rocío a tierras cercanas. Los ingredientes activos pueden viajar distancias significativas, desde unos pocos cientos de metros hasta más de mil kilómetros. Esto se debe a que pueden elevarse en el aire debido al calentamiento del suelo, evaporarse o adherirse a micropartículas de polvo que son levantadas por el viento (FHB; AT; PAN, 2023)

El porcentaje que logra ingresar en el suelo se reparte en las fases sólida, líquida y gaseosa (figura 5). En la fase líquida está disponible para ser transformado o degradado química, física o microbiológicamente a otros compuestos, o puede ser transportado por el agua en movimientos como la lixiviación hacia zonas más profundas y finalmente llegar a aguas subterráneas (PIRSAHEB; MORADI, 2020).

Figura 5. Ciclo de los pesticidas en el entorno agrícola.



Fuente: autoría propia, 2024 (PIRSAHEB; MORADI, 2020; FHB; AT; PAN, 2023; canva.com).

En la fase sólida puede ser retenido con diferente fuerza en lugares de enlace de los coloides orgánicos (materia orgánica) e inorgánicos (arcillas) del suelo. Si este fuera el caso, pueden migrar transportados por el agua (escorrentía), o por el aire (foto-descomposición). En la fase gaseosa, es incorporado a la atmósfera cuando se volatiliza desde el suelo o desde el agua que se encuentra en el suelo (COLASURDO, 2020).

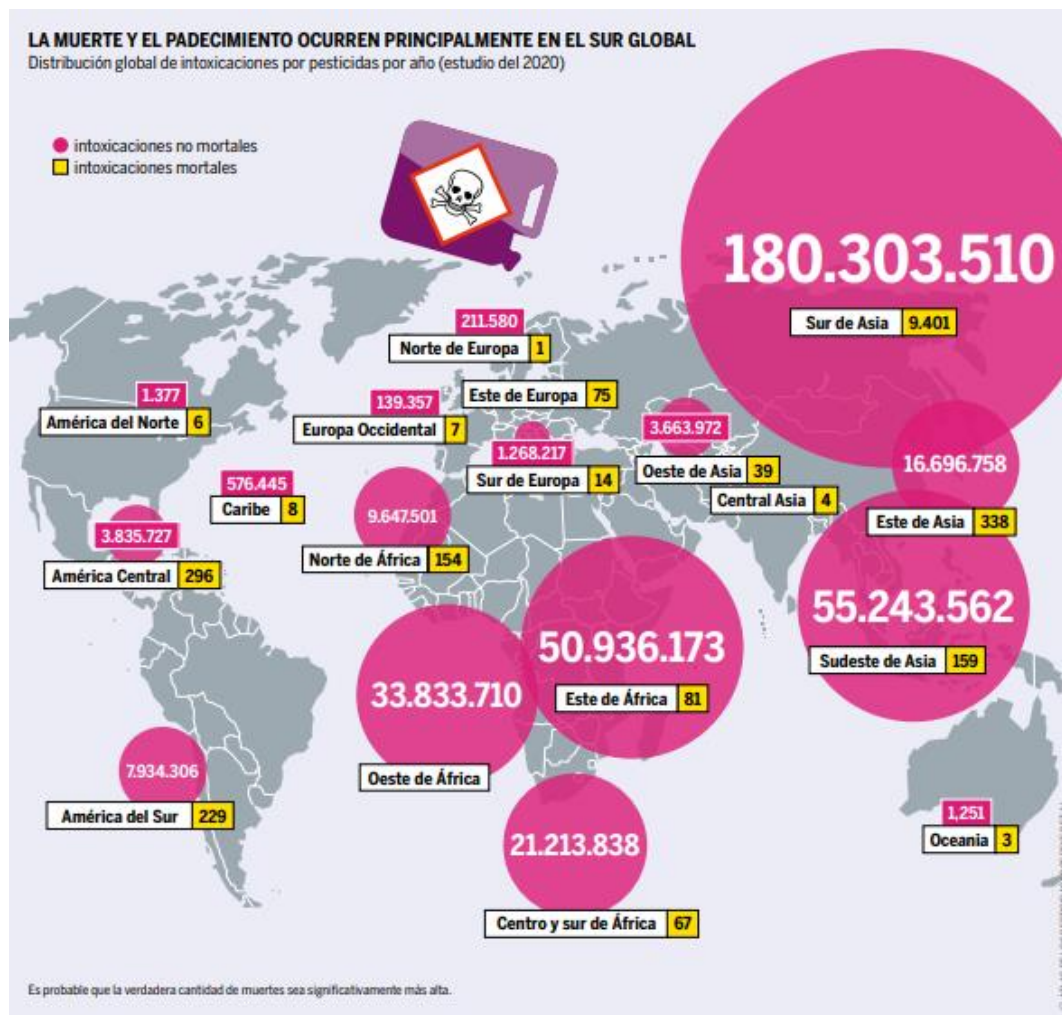
Si bien los asentamientos humanos, las industrias y la agricultura son fuentes clave de contaminación del agua, en muchos países la agricultura es la principal fuente de contaminación, una vez que de los 3.928 km<sup>3</sup> de agua dulce que se extraen cada año, se estima que sólo el 44% se consume, principalmente a través de la evapotranspiración de la agricultura de regadío. El 56% restante (2212 km<sup>3</sup> por año) se libera al medio ambiente como aguas residuales urbanas (aproximadamente 330 km<sup>3</sup>), aguas residuales industriales –incluida el agua de refrigeración– (aproximadamente 660 km<sup>3</sup>) o drenaje agrícola (aproximadamente 1260 km<sup>3</sup>) (SAGASTA; ZADEH; TURRAL; 2018).

Los AGT pueden ser problemáticos cuando la aplicación excede las necesidades de la planta. Las aplicaciones intensas de fertilizantes en China y América del Norte y del

Sur, por ejemplo, han producido consecuencias ambientales adversas con mayores cargas de nutrientes en los cuerpos de agua regionales, en particular nitrógeno y fósforo (DRECHEL; MARJANI; PEDRERO, 2023), pudiendo causar problemas de eutrofización, toxicidad (figura 6), pérdida de biodiversidad, motivos de especial preocupación.

Todos los pesticidas están diseñados para ser lo suficientemente tóxicos y persistentes como para reducir las poblaciones de la plaga que deben controlar, pero la mayoría de los AGT también envenenan a los peces y la vida silvestre, contaminan las fuentes de alimentos, destruyen los hábitats de los animales y, además, son tóxicos para los humanos (SAGASTA; ZADEH; TURRAL, 2018).

Figura 6. Casos de intoxicación a nivel mundial.



Fuente: FHB, AT, PAN, 2022

Se han obtenido diversos estudios que demuestran que el contacto con los AGT puede desarrollar intoxicaciones (figura 6), mortalidad infantil, trastornos endocrinos, problemas gastrointestinales, malformaciones congénitas, disrupciones endocrinas, morbilidad por cáncer, principales causas de muerte por autointoxicación, sobre todo en los países de ingreso mediano bajo, muertes y más (OMS, 2022; FHB; AT; PAN, 2023). Su gravedad muchas veces va a estar relacionada al tiempo de exposición, es por ello que la mayor parte de los casos se ve en personas que entran en contacto con ellos en el trabajo, el hogar o el jardín (PEVASPEA, 2021; OMS, 2022; FHB; AT; PAN, 2023). Estos problemas destacan la necesidad de medidas preventivas y regulaciones más estrictas para proteger la salud de la población y los trabajadores agrícolas.

El uso desmedido de AGT es un tema de gran interés y de preocupación mundial, ya que estas sustancias y sus residuos están contaminando fuentes de agua potable y los diversos ecosistemas, generando problemas en la salud tanto de los animales, plantas y hasta el mismo ser humano. En el estudio realizado por Schreiner Verena (2016) analizaron datos de monitoreo de rutina en los países de Alemania, Francia, los Países Bajos y los Estados Unidos, con el objetivo de identificar los plaguicidas más frecuentemente detectados en los arroyos cercanos al uso de estos, sus metabolitos y mezclas.

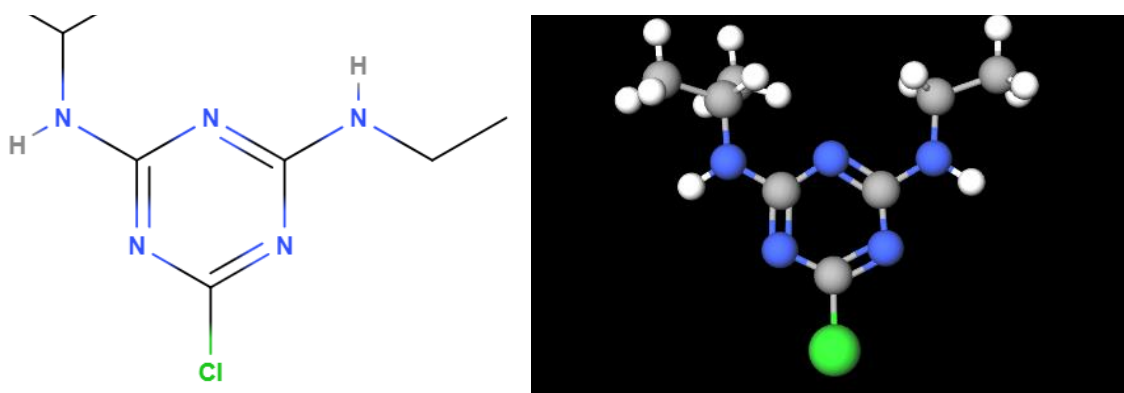
De este estudio obtuvieron que los compuestos detectados con mayor frecuencia estuvieron dominados por los herbicidas y sus metabolitos, destacándose la ATZ, su metabolito desetilatrizona (DEA) y las mezclas con ATZ. Una vez que en cada uno de los países fue detectado una gran cantidad de estos compuestos, en especial en Francia y Estados Unidos, donde fue identificado una alta frecuencia en el uso de mezclas implementadas en la agroindustria con ATZ.

A pesar de todas las precauciones, los herbicidas no solo afectan el desarrollo de las hierbas, sino que también afectan negativamente a los cultivos, microbios y animales. Así, el herbicida contamina la cadena alimentaria, amenazando la salud humana en general (SINGH, 2017).

## 2.2. ATRAZINA

La ATZ, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (figura 7) se caracteriza por ser un polvo blanco, sin olor que se emplea como herbicida selectivo sistémico para controlar el crecimiento de especies como: *Cyperus sesquiflorus* (Tiririca), *Sida cordifolia* (Acebo hueco), *Cenchrus echinatus* (hierba mariposa), *Bidens pilosa* (pez rey negro) (ALMEIDA, 2018) en diversos cultivos, principalmente en maíz, soja, sorgo, caña de azúcar, piña y diversos pastos. El compuesto es clasificado por la ANVISA (2022) como clase III de toxicidad, en el cual encuadran los compuestos medianamente tóxicos.

Figura 7. Estructura química de la molécula de Atrazina en 2D y 3D.

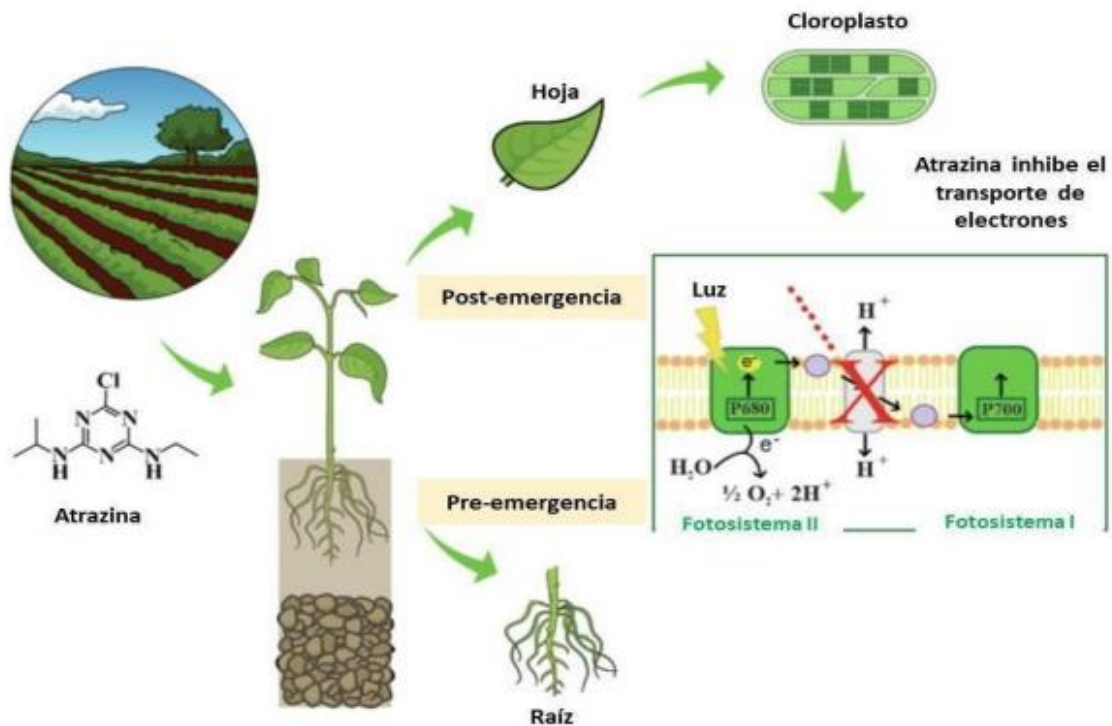


Fuente: Autoría propia, 2024 (molview.com).

### 2.2.1. Mecanismo de acción de la ATZ en las plantas

El proceso de absorción de la ATZ inicia en las raíces de las hierbas en casos de pre-emergencia y a través de las hojas en caso de post-emergencia (figura 8), se transloca por el xilema acumulándose en los meristemas apicales y hojas, buscando bloquear el transporte de electrones en el fotosistema II, provocando la inhibición de los hidratos de carbono, la acumulación de dióxido de carbono, la peroxidación de lípidos en las membranas, entre otros (GAGNETEN, 2021).

Figura 8. Proceso de absorción de la ATZ y su mecanismo de acción.



Fuente: GAGNETEN, 2021.

Según Cabral (2017) en el medio ambiente, la ATZ está sujeta a procesos de degradación biótica y abiótica, como fotólisis, hidrólisis y biodegradación, dando como subproductos: desetilatrazina (DEA), desisopropilatrazina (DIA), didealquilatrazina (DDA), desetilhidroxiatrazina (DEHA) e hidroxiatrazina (HOATZ), siendo el primero el que más se encuentra en fuentes de agua superficiales y subterráneas (cuadro 2).

En cuanto a la toxicidad de los metabolitos de la ATZ el HOATZ se puede decir que es menos tóxico que DIA o DEA, una vez que en el estudio realizado por Cecilia y Maggi (2016) realizaron una serie ensayos sobre la degradación de la ATZ con *Ralstonia basilensis*, en el identificaron que la oxidación de ATZ a HOATZ es más rápida que la oxidación de ATZ a DIA y DEA, la vida media de HOATZ es más corta en comparación con DIA y DEA.

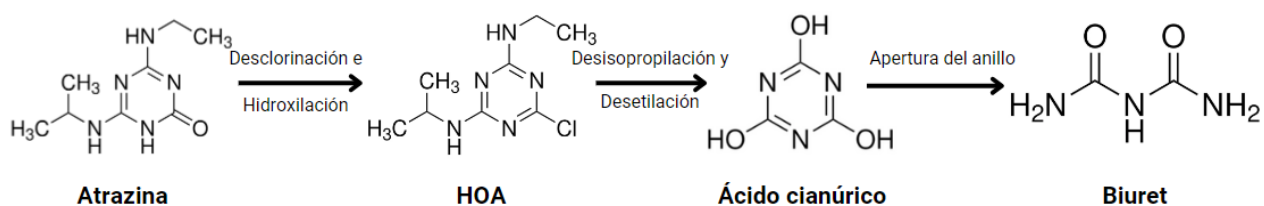
Cuadro 2. Principales productos de degradación de la ATZ.

Nombre	Atrazina ATZ	Desetilatrazina DEA	Deisopropilatrastina DIA
Estructura Química			
Formula Molecular	$C_8H_{14}ClN_5$	$C_6H_{10}ClN_5$	$C_5H_8ClN_5$

Fuente: adaptado de DELLA, 2018.

Además, la pérdida del cloro le permite descomponerse más rapido pasando a ácido cianúrico, luego a biuret, alofanato y así llegar a moléculas más simples: amonio, agua y dióxido de carbono (KUMAR; SINGH, 2016) (figura 9) mientras que DIA o DEA requieren de más pasos para llegar a moléculas más simples como el ácido cianúrico o amelida (figura 15).

Figura 9. Proceso de la degradación de la atrazina por medio de hidrólisis.



Fuente: adaptado de QU, 2018.

### 2.2.2. Propiedades de la atrazina

Con respecto a cómo se comporta la ATZ en el ambiente, puede ser observado en el cuadro 3 que presenta una vida media con persistencia media en suelo y agua, ya que se encuentra entre los 30 y 100 días (TAVERNA, *et al*, 2018). En dicho cuadro se comparan los diferentes tiempos de vida media de la ATZ variando algunas condiciones, donde de manera general presenta un riesgo medio para los organismos.

Los valores medidos de Koc tendencia de un herbicida a moverse en el suelo, el cual al ser menor de 100 indica que es altamente móvil y Kf constante que se utiliza

para describir y cuantificar la capacidad de adsorción en este caso la ATZ en el suelo, el 3,2 indica una retención moderada, brindan una idea de la capacidad de adherirse a las fracciones coloidales, donde para la ATZ es moderadamente móvil.

En relación a los valores de GUS, índice que permite conocer si una sustancia es o no lixivable, valores menores a 1,8 indica que la sustancia no lo es, un valor entre 1,8 y 2,8 es intermedio su comportamiento y un valor mayor a 2,8 indica que es lixivable. El índice GUS de la ATZ indica que es una sustancia lixivable (GAGNETEN, 2021), por lo que puede disolverse o liberarse con la presencia de agua u otros disolventes, haciendo que dicho componente se disperse en el ambiente, contaminando así ríos, suelos y aire.

Cuadro 3. Propiedades del comportamiento de la ATZ en el ambiente.

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Vida media an agua superficial (días)	> 100 (20 °C)
Vida media en el suelo (días)	60
Vida media en aire a 25°C (horas)	2,6
Vida media en condiciones de laboratorio a 20-25°C (días)	20-50
Degradación en el suelo DT50 típico (días)	75
Degradación en el suelo DT50 laboratorio a 20°C (días)	66
Degradación en el suelo DT50 en campo (días)	29
Fotólisis acuosa DT50 a pH=7 (días)	2,6
Hidrólisis acuosa DT50 a 20°C y pH=7 (días)	86
Adsorción en el suelo (Koc)	100
Freundlich	Kf = 3,2
	1/n = 1,07
Índice GUS	3,06

Fuente: GAGNETEN, 2021.

Las características adherentes y lixiviables del ATZ han dado lugar a su detección en diversas fuentes de agua alrededor del mundo. En Italia, estudios como el de Cabral (2017) han documentado su presencia en manantiales. A pesar de su prohibición en

Alemania, el ATZ sigue siendo detectado en aproximadamente una quinta parte de las estaciones de seguimiento de las napas freáticas (FHB; AT; PAN, 2023).

En Brasil, la situación es preocupante, ya que la presencia de ATZ se ha encontrado en la mayoría de los estados, como lo demuestra un estudio que analizó 100 muestras de agua potable tomadas en 61 puntos en 22 capitales, donde se encontró la presencia de ATZ en el 75% de las muestras (Machado et al., 2016). Además, en el estado de São Paulo, un estudio llevado a cabo por Lima et al. (2018) reveló una concentración de 10 µg/L de ATZ en aguas superficiales, resaltando la extensión de la contaminación por este herbicida en diversas regiones del mundo.

Siendo que en Brasil el límite permisible de ATZ en aguas superficiales de clase 1 y 2 el límite es de 2 µg/L, en aguas superficiales de clase 3 el límite es 2 µg/L, en aguas subterráneas dependiendo el uso hay un límite permisible, así para consumo humano es de 2 µg/L, bebida de animales 5 µg/L e irrigación 10 µg/L (CONAMA, 2005, 2008).

Hallar concentraciones de 10 µg/L es preocupante ya que se han relacionado diversas afecciones a causa del consumo de ATZ, puesto que en humanos y animales, la ATZ actúa sobre el sistema endocrino, teniendo una toxicidad crónica relativamente alta, varios estudios sugieren que la ATZ tiene un efecto cancerígeno potencial, además de ser identificado como causante de efectos sobre el sistema nervioso central, el sistema reproductivo, el sistema inmunológico y la función cardiovascular (TOLLER, 2021).

Además, según lo reportado por Aggelopoulos, Tataraki y Rassias (2018; apud FRANK; SIRONIS; ANDERSON, 1983), las investigaciones de campo han demostrado que los suelos con una contaminación por ATZ de 0,20-0,50 mg/kg afectaron negativamente a la producción de cultivos. Además, se observó que la presencia de plantas muertas y moribundas se asoció con residuos de ATZ en el suelo entre 0,20 y 7,0 mg/kg.

En cuanto a la toxicidad en animales, se estima que la DL50 oral en ratas hembras es superior a 300 mg/kg, pero inferior a 2.000 mg/kg, con un valor estimado de 500 mg/kg (valor de corte). En cuanto a la exposición dérmica, la DL50 es mayor a 2000 mg/kg en ratas macho y hembra (SHARDA, 2018).

### 2.2.3. Metodología de detección y técnicas para la remediación de ambientes contaminados con ATZ

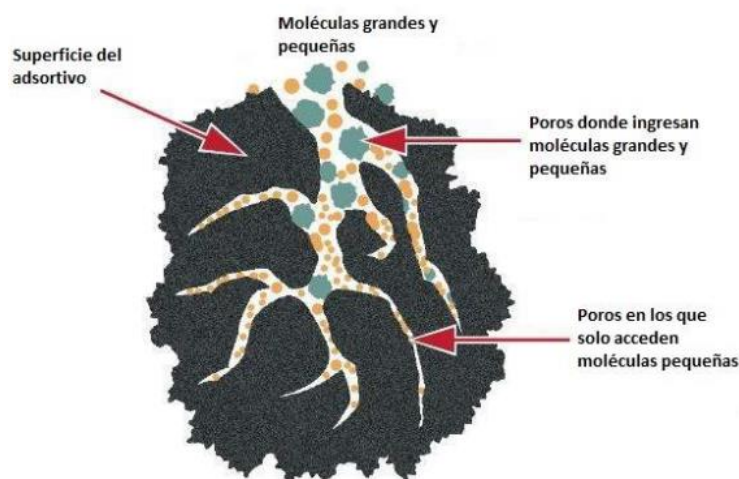
Se requiere una metodología precisa para medir los niveles de compuestos como la ATZ en áreas con actividad agroindustrial intensa, con el fin de identificar su presencia y concentración para luego implementar medidas de control y tratamiento. La cromatografía líquida en combinación con la metodología QuEChERS se presenta como una solución adecuada para este propósito.

Por tanto, el enfoque QuEChERS, basado en modificaciones de la metodología propuesta por Anastassiades (2003), permite una extracción, limpieza y concentración eficientes de la muestra de interés, lo que facilita una lectura más precisa mediante cromatografía (PRUSSAK, 2018). Ya la cromatografía funciona separando los componentes de una mezcla mediante su interacción selectiva con una fase estacionaria y una fase móvil (LIMACHI, 2016). Esta técnica es fundamental para evaluar la presencia y cuantificar la ATZ en áreas con alta actividad agroindustrial, lo que proporciona un control del uso del herbicida y abre la posibilidad de analizar las opciones de tratamiento adecuadas para mitigar sus efectos (DELLA, 2018).

Por otro lado, existen diversas técnicas de tratamiento, como métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos para eliminar pesticidas de diferentes tipos de matrices, como el agua y el suelo. Sin embargo, los métodos físicos como la nanofiltración y la adsorción con arcillas, zeolita, carbón activado (figura 10) entre otros, presentan limitaciones como una cinética lenta, la dependencia de la movilidad, la polaridad del pesticida, los altos costos de los solventes, la inversión del capital, las altas temperaturas de procesamiento y muchas veces solo transfieren contaminantes de una fase a otra, creando problemas de contaminación secundaria (PIRSAHEB; MORADI, 2020).

El uso de métodos químicos se da principalmente mediante la reacción de óxido-reducción, que genera sustancias químicas con propiedades oxidantes, como el radical hidroxilo, capaces de degradar y mineralizar la ATZ en el medio ambiente, entre los métodos encontramos el Fenton, oxidación de ozono, oxidación radical sulfato y el método fotocatalítico (HUIJUN; *et al.*, 2019).

Figura 10. Mecanismo de acción del carbón activado.

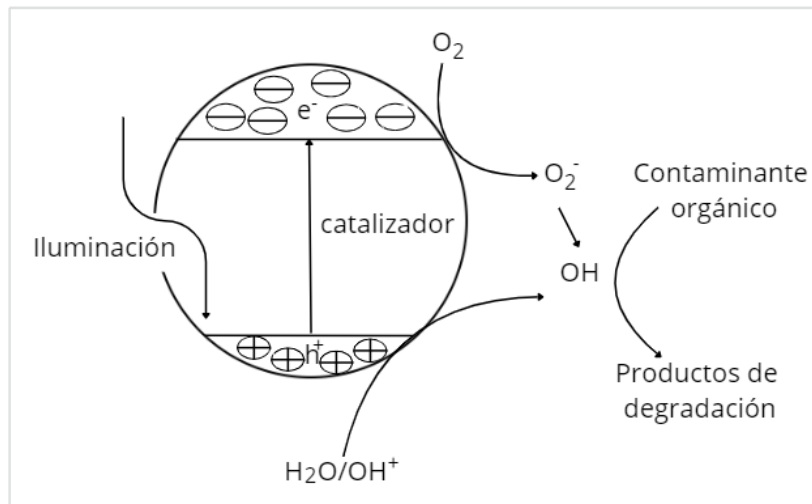


El carbón activado tiene una estructura porosa y una gran superficie específica, y estas características permiten que el carbón activado contenga buenas propiedades de adsorción de diversos contaminantes. Fuente: Colasurdo, 2020.

A pesar de las ventajas de ciertas metodologías, es importante tener en cuenta que pueden surgir ciertas condiciones que requieren atención especial. Por ejemplo, el control del pH puede ser crucial en algunos métodos, y existe la posibilidad de generar subproductos no deseados. Además, los costos adicionales y la gestión de residuos pueden representar desafíos adicionales que deben abordarse (COLASURDO, 2020; ROSTAMI; *et al.*, 2021).

En la revisión realizada por Paniura (2022) se pudo identificar de 43 artículos que hablan de la degradación de la ATZ, el 74% implemento procesos fisicoquímico, en especial la aplicación fotocatalítica (figura 11) con un 44%, esto por causa de la producción de radicales de hidroxilo en presencia del catalizador y bajo luz ultravioleta o visible oxidan y descomponen eficientemente el contaminante. Sin embargo, implican costos elevados, energía, estabilidad de catalizador, entre otros.

Figura 11. Método fotocatalítico.



Los catalizadores agregados en el sistema de reacción bajo la irradiación de luz ultravioleta o visible producen fuertes radicales hidroxilo oxidantes, que oxidan y descomponen los contaminantes orgánicos.

Fuente: adaptado de HUIJUN *et al.*, 2019.

En cuanto a los métodos biológicos, están siendo bastante estudiados debido a su eficiencia y costo de implementación. Se trata de una metodología utilizada con frecuencia para la degradación de los compuestos, esta incluye la remediación microbiana, la fitorremediación y la remediación microbiana de plantas. Especialmente en la remediación microbiana de plantas, es un método altamente efectivo que combina fitorremediación y mineralización microbiana para degradar contaminantes orgánicos (HUIJUN; *et al.*, 2019).

Algunos microorganismos, como pseudomonas y hongos, han mostrado capacidad parcial de degradación y mineralización de la ATZ, siendo las cepas fúngicas especialmente ventajosas por sus redes de micelio y enzimas extracelulares (HERRERA, 2019). Aunque es eficiente el uso de microorganismos y plantas, una de sus mayores desventajas es el tiempo que les lleva degradar los compuestos, una vez que debe primero adaptarse a él para luego metabolizarlo, además requiere al igual que otras técnicas algunas condiciones como el pH, la temperatura, la humedad, entre otros.

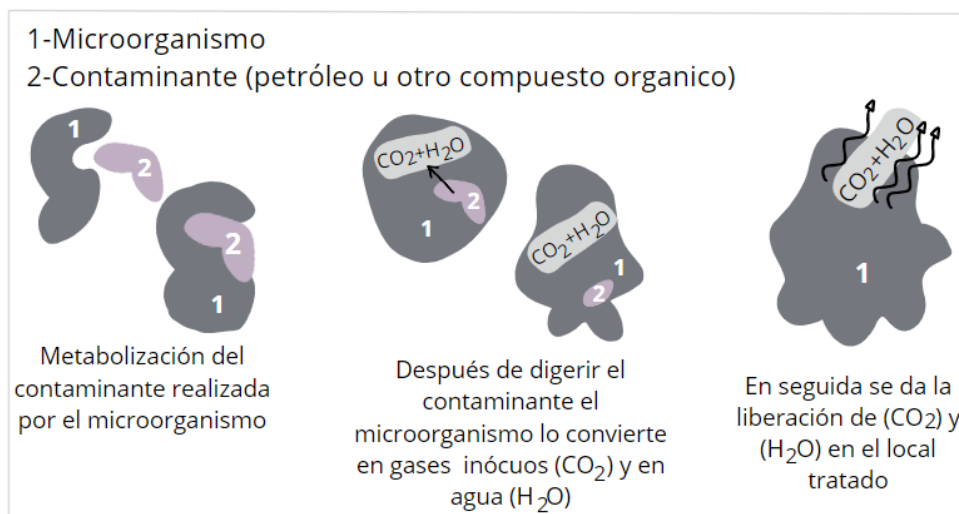
### 2.3. BIODEGRADACIÓN

El uso desmedido de pesticidas es un tema de gran interés y de preocupación mundial, ya que estas sustancias y sus residuos están contaminando fuentes de agua potable y los diversos ecosistemas, generando problemas en la salud tanto de los animales, plantas y hasta el mismo ser humano. Es por ello que se han venido implementando alternativas que buscan controlar, disminuir y/o tratar las áreas degradadas.

Entre ellas se encuentra la biorremediación y la biodegradación, que, aunque parecen términos semejantes, difieren en sus significados; por una parte, la biorremediación es un proceso biotecnológico que puede ser implementado a partir del conocimiento de las reacciones bioquímicas por parte de agentes biológicos acoplado con la ingeniería (JI-DONG, 2020), llevando así al desarrollo de técnicas como: la bioestimulación, bioaugmentación, bioventilación, biopilas y la bioatenuación (ABATENH, 2017), las cuales utilizan las habilidades de los microorganismos naturales o modificados genéticamente, para recuperar ambientes contaminados (VITERI, 2022).

Mientras que, por el otro lado, la biodegradación, es el proceso mediante el cual los organismos vivos o sus subproductos se utilizan para degradar, eliminar o transformar los contaminantes de un medio ambiente (figura 12).

Figura 12. Etapas de la acción de los microorganismos en el proceso de biodegradación.



Fuente: adaptado de CORIOLANO, 2016.

A través de este proceso biológicamente natural, los contaminantes tóxicos peligrosos se transforman en sustancias menos tóxicas o no tóxicas, una forma natural de reciclar desechos, o descomponer la materia orgánica en nutrientes que pueden ser utilizados por otros organismos (ESKANDER, 2017). La biorremediación puede ser “in situ” o “ex situ”, la primera se ocupa de la perturbación en el lugar, es de menor costo y evita la dispersión del contaminante, mientras que la segunda se refiere a la remoción de una muestra de suelo o agua contaminada del sitio a tratar (FERREIRA, 2016).

Existen dos tipos principales de degradación de sustancias químicas orgánicas por microorganismos. En el primer tipo, los productos químicos orgánicos se degradan por completo en sus metabolitos junto con la liberación de energía y nutrientes que son utilizados por los microorganismos, este tipo de degradación se denomina "catabolismo", mientras que, en el segundo tipo, "cometabolismo", los productos químicos orgánicos específicos no se metabolizan por completo, pueden transformarse (GILANI, 2015).

Este proceso de degradación es posible debido a la destacada capacidad de las bacterias y hongos de adaptarse y descomponer estas sustancias, de esta forma la biodegradación se está convirtiendo en una alternativa prometedora frente a otros métodos convencionales de eliminación de sustancias químicas orgánicas. Un ejemplo destacado de esta tendencia es la degradación de la ATZ, gracias a la capacidad de ciertos microorganismos como bacterias y hongos, los cuales han tenido resultados positivos en la descomposición a metabolitos menos tóxicos (ROSTAMI; *et al.* 2021; GHIM; *et al.*, 2020).

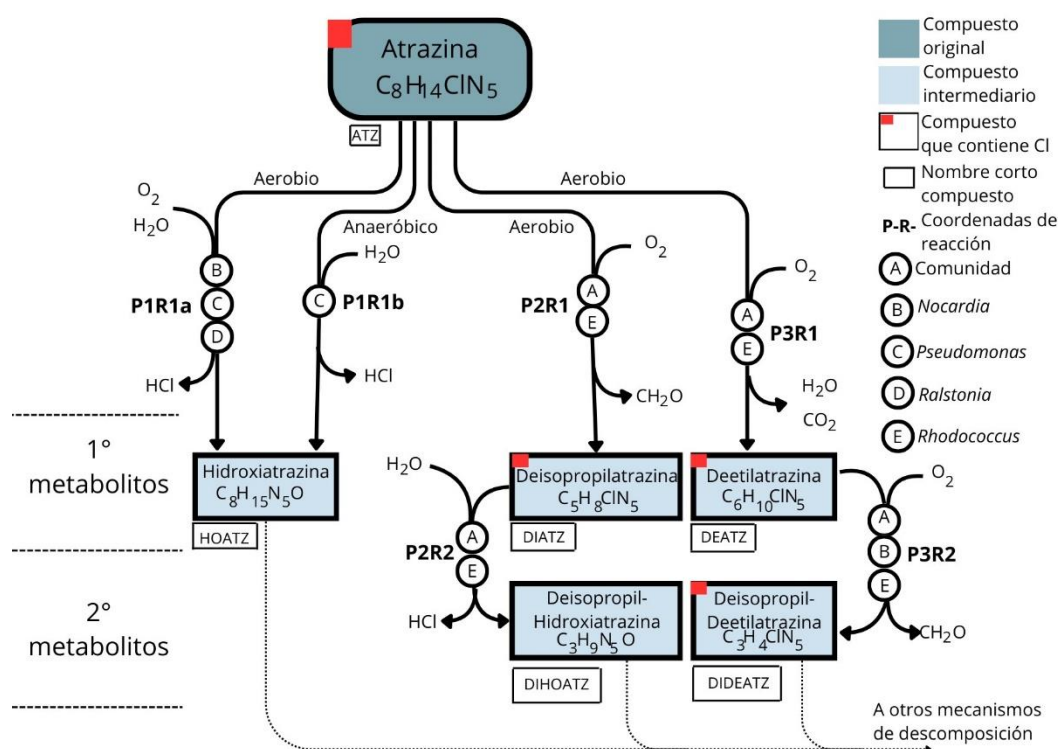
### 2.3.1. Biodegradación de la ATZ por medio de bacterias

La biodegradación de la ATZ por bacterias es un importante mecanismo de eliminación de este herbicida en el medio ambiente. Dependiendo de la presencia de bacterias especializadas y las condiciones ambientales, puede experimentar tres vías de descomposición mediante reacciones de hidroxilación, desalquilación u oxidación mediadas biológicamente (CECILIA, 2016).

Como puede ser observado en la figura 13 se destacan diversos géneros de bacterias en el proceso de degradación de la ATZ, tal es el caso de las: *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp., *Ralstonia* sp. y *Rhodococcus* sp. Cada especie bacteriana tiene

diferentes enzimas y vías metabólicas que están involucradas en la biodegradación de la ATZ.

Figura 13. Vías de biodegradación de la atrazina a hidroxiatrazina (HOATZ) en condiciones aerobias y anaerobias, deisopropilatrazina (DIATZ), desetilatrastina (DEATZ).



Fuente: adaptado de Cecilia, 2016

Una de estas rutas por parte de los *Rhodococcus* sp. implica la desalquilación de grupos amino (CECILIA, 2016), resultando en la formación de 2-cloro-4-hidroxi-6-amino-1,3,5-triazina.

Por otro lado, otra ruta bien establecida que se ha visto en *Pseudomonas* sp. implica la hidrólisis del enlace C-C1, afectando los grupos etilo e isopropilo y generando ácido cianúrico, que posteriormente se descompone liberando  $CO_2$ , este proceso puede suceder tanto de manera aerobia como anaerobia (SIGHN, 2017). Este mismo proceso es realizado por la *Nocardia* sp., solo que en condiciones aeróbicas.

Algunas otras bacterias pueden desclorar la ATZ, eliminando el cloro y produciendo compuestos como hidroxiatrazina. Una vez se obtengan los metabolitos de la degradación de la ATZ las bacterias continuarán degradando los metabolitos de ATZ

hasta convertirlos en compuestos inorgánicos, como dióxido de carbono, agua y nitrógeno. Este proceso final de mineralización completa la biodegradación de la ATZ.

### 2.3.2. Biodegradación de la ATZ por medio de hongos

Los hongos presentan una gran capacidad de formar redes miceliales, la independencia de usar el contaminante como sustrato de crecimiento y un sistema enzimático inespecífico que lo convierten en importantes herramientas biológicas para utilizar en la biodegradación (ROSADO, 2019).

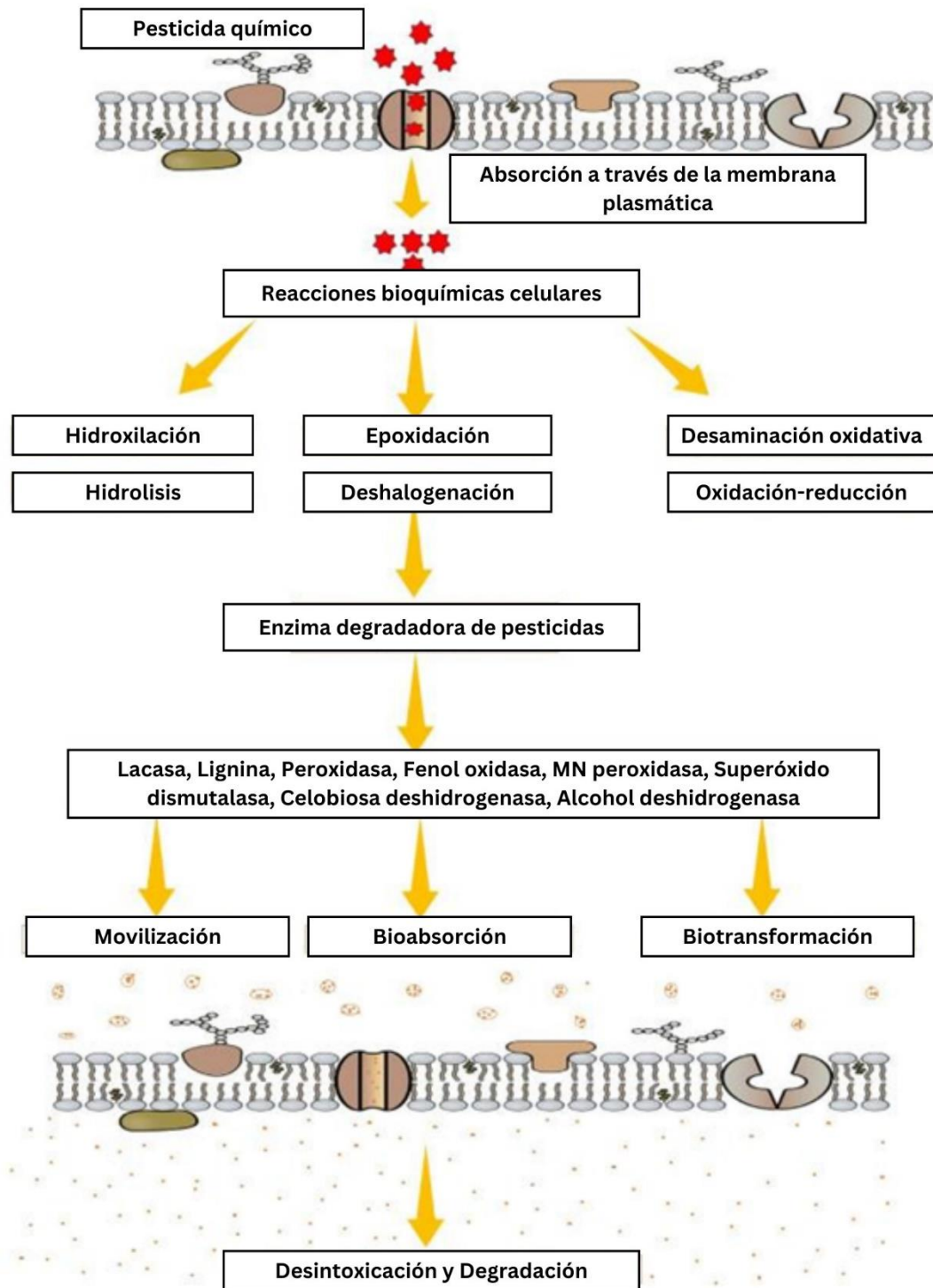
De manera general los hongos en la degradación de pesticidas manejan tanto rutas metabólicas externas como internas, que son catalizadas por enzimas. Aunque se han aislado y caracterizado varias cepas de hongos por su potencial para biodegradar diferentes pesticidas en el suelo y en medios líquidos, hay poca información disponible sobre los genes y enzimas involucradas en tales transformaciones (MAQBOOL; *et al.*, 2016).

Sin embargo, existen trabajos como el de Swanthy *et al.* (2024), el cual realizó una compilación de diversos estudios demostrando la diversidad de rutas que existen en la degradación de estos compuestos, destacándose la figura 14 en la cual se observa como el pesticida es absorbido a través de la membrana plasmática.

Posteriormente se producen una serie de reacciones bioquímicas celulares, donde son biodegradados por medio de enzimas como las lacasas, peroxidasas, ligninas, entre otras. Estas enzimas tienen la capacidad de movilizar, bioabsorber o biotransformar el compuesto, disminuyendo así su toxicidad antes de ser secretado. Además, destaca que los hongos tienen sistemas extracelulares complejos y potentes. Su baja especificidad les permite metabolizar una amplia gama de compuestos contaminantes.

En el trabajo de Maqbool *et al.* (2016) cita estudios como el de Jain *et al.* (2014) donde la degradación de pesticidas por parte de los hongos *Aspergillus flavus*, *Fusarium pallidoroseum* y *Macrophomina* sp. se dieron a través de la liberación extracelularmente de enzimas peroxidasas y lacasas, así como también cita el trabajo de (YADAV; *et al.*, 2006) en el cual encontraron que en el hongo *P. chrysosporium* el sistema enzimático intracelular citocromo P450 por medio de sus monooxigenasas participa de la degradación de pesticidas dependiendo del tipo de xenobiótico y su nutrición.

Figura 14. Mecanismo de acción de la enzima fúngica sobre la degradación química de pesticidas.



Fuente: adaptado de Swanthy, *et al.*, 2024

Ya en el caso de la ATZ se ha relatado que hay diversos hongos que tienen la capacidad de utilizar la ATZ como fuente de carbono y energía, descomponiéndose en productos más simples. Varios hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium decumbens*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*, etc, se ha identificado que degradan la ATZ (SINGH; JAUHARI; 2016; apud OUGIN *et al.*, 1994).

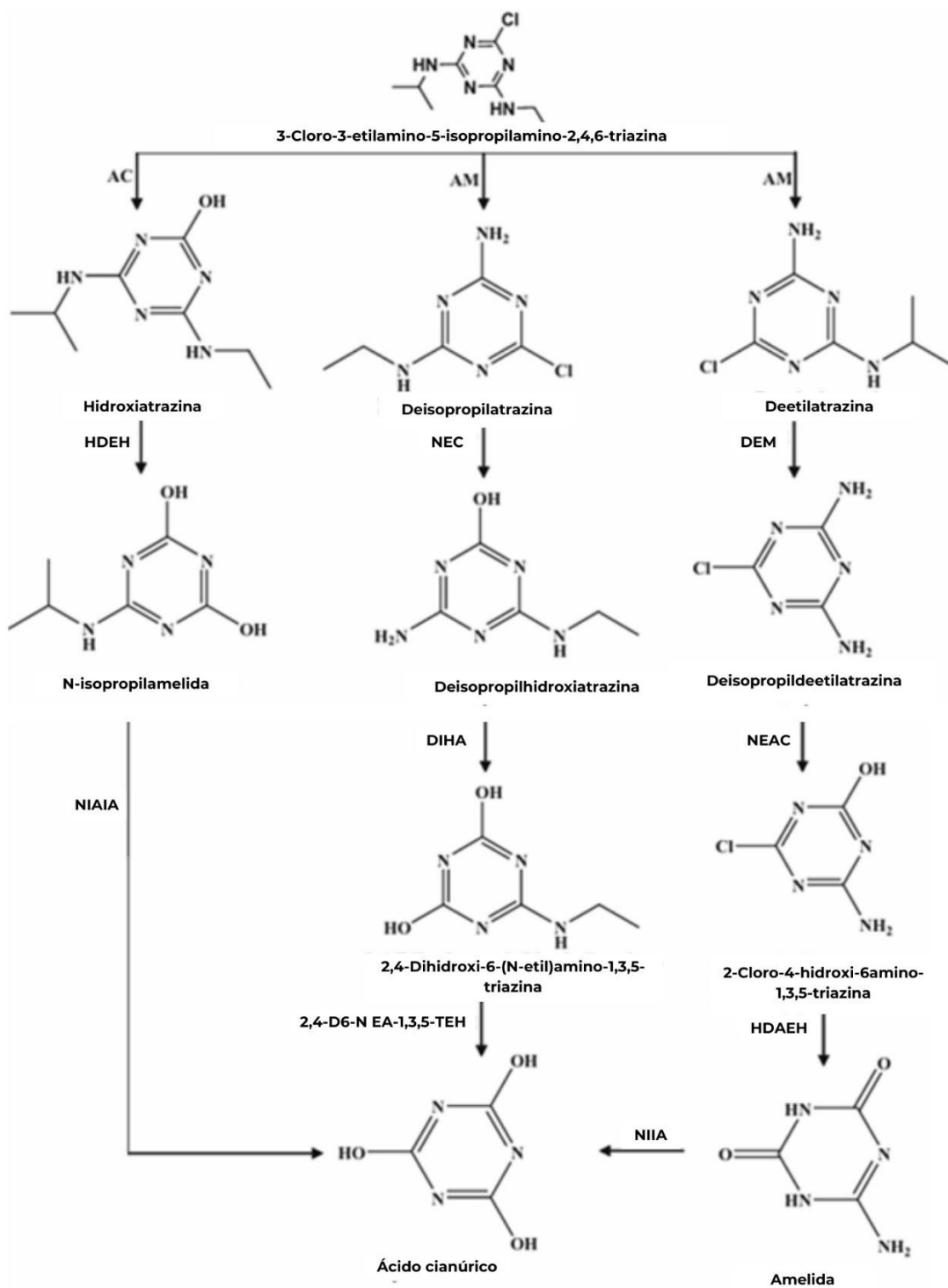
Se ha relatado que hongos como *Metarhizium robertsii* degradan la ATZ por medio del citocromo P450, una vez que en el estudio de Szewczyk *et al.* (2020) utilizaron un inhibidor de este, lo cual interfirió en la N-desalquilación (figura 15), generando menos productos metabólicos. Por otro lado, Herrera (2019) analizó que la degradación de la ATZ en suelos se realiza principalmente a través de mecanismos microbianos, incluyendo la descloración, la N-desalquilación y la escisión del anillo aromático, por medio de enzimas extracelulares, con la mineralización que ocurre en dos etapas, produciendo ácido cianúrico y luego reacciones hidrolíticas adicionales.

Como ejemplos de la efectividad del proceso de biodegradación se tiene que un hongo de pudrición blanca, es decir, *Phanerochaete chrysosporium*, puede metabolizar el 48% de la ATZ en el medio de crecimiento después de 4 días de incubación (SINGH; JAUHARI; 2017). Por otro lado, en condiciones de laboratorio, *Trichoderma sp.*, mostró la capacidad de degradación del 89% del herbicida ATZ a partir de la concentración de 500 mg/kg (ROSADO, 2019).

Si bien muchos enfoques de investigación actuales favorecen la aplicación de microorganismos exógenos para la biorremediación, los microorganismos autóctonos ofrecen ventajas significativas en entornos reales (ARANDA, 2016). Esto se debe a su capacidad para adaptarse a las condiciones específicas del medio ambiente a lo largo del tiempo, al evolucionar en este entorno, los microorganismos autóctonos han desarrollado mecanismos para sobrevivir en presencia de contaminantes y coexistir con otros microorganismos presentes en su hábitat (MADARIAGA; *et al.*, 2017).

Se ha documentado que los organismos autóctonos compiten con los hongos biorremediadores y tienen efectos antagónicos sobre cepas fúngicas aisladas y seleccionadas, y como resultado reducen sus capacidades de degradación (CHAN; HEREDIA; RODRÍGUEZ, 2016), o incluso conducir a la eliminación de los degradadores

Figura 15. Rutas de la N-desalquilación (DIA y DEA) y descloración de la ATZ (HOATZ).



Fuente: adaptado de Singh, 2017

inoculados, además de las características del entorno, incluidas las propiedades del medio, el contenido de agua y las sustancias energéticas disponibles (LIU; *et al.*, 2019). Otro punto importante es que el aislamiento selectivo de cepas autóctonas puede contribuir en la eficacia de eliminación del contaminante de interés, ya que la selección permite obtener los especímenes que tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y llevar a cabo la degradación del compuesto, pues de no generarse esa selección se puede estar utilizando hongos que, aunque degraden el compuesto no sean eficientes en el proceso, retardándolo (MADARIAGA, *et al.*, 2017).

Por otro lado, aunque el uso de hongos para la biodegradación de contaminantes es prometedor, trae consigo algunos desafíos para el uso de estos, ya que para que se desarrollen en el ambiente contaminado requieren de algunas condiciones para poder crecer, como lo es el pH, la temperatura, humedad, aireación (LIU; *et al.*, 2019), la accesibilidad y biodisponibilidad del contaminante (MAQBOOL; *et al.*, 2016), entre otros.

Es por ello que se deben llevar a cabo estudios que reduzcan la necesidad de estas condiciones, para así poder implementar el uso de los hongos en diversos ambientes, así como también deben realizarse estudios adicionales para descubrir las propiedades enzimáticas y genéticas que han sido base de la biodegradación de pesticidas fúngica, con el fin de determinar las rutas metabólicas y sus productos (MAQBOOL; *et al.*, 2016), para determinar si se está consiguiendo realmente la degradación de los compuestos o se está generando sustancias más tóxicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GENERAL

Evaluar el potencial de degradación de la atrazina por parte de los hongos pertenecientes a la Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) que fueron aislados del sedimento del Arroyo Dorado (AD) de la ciudad de Foz de Iguazú/PR.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

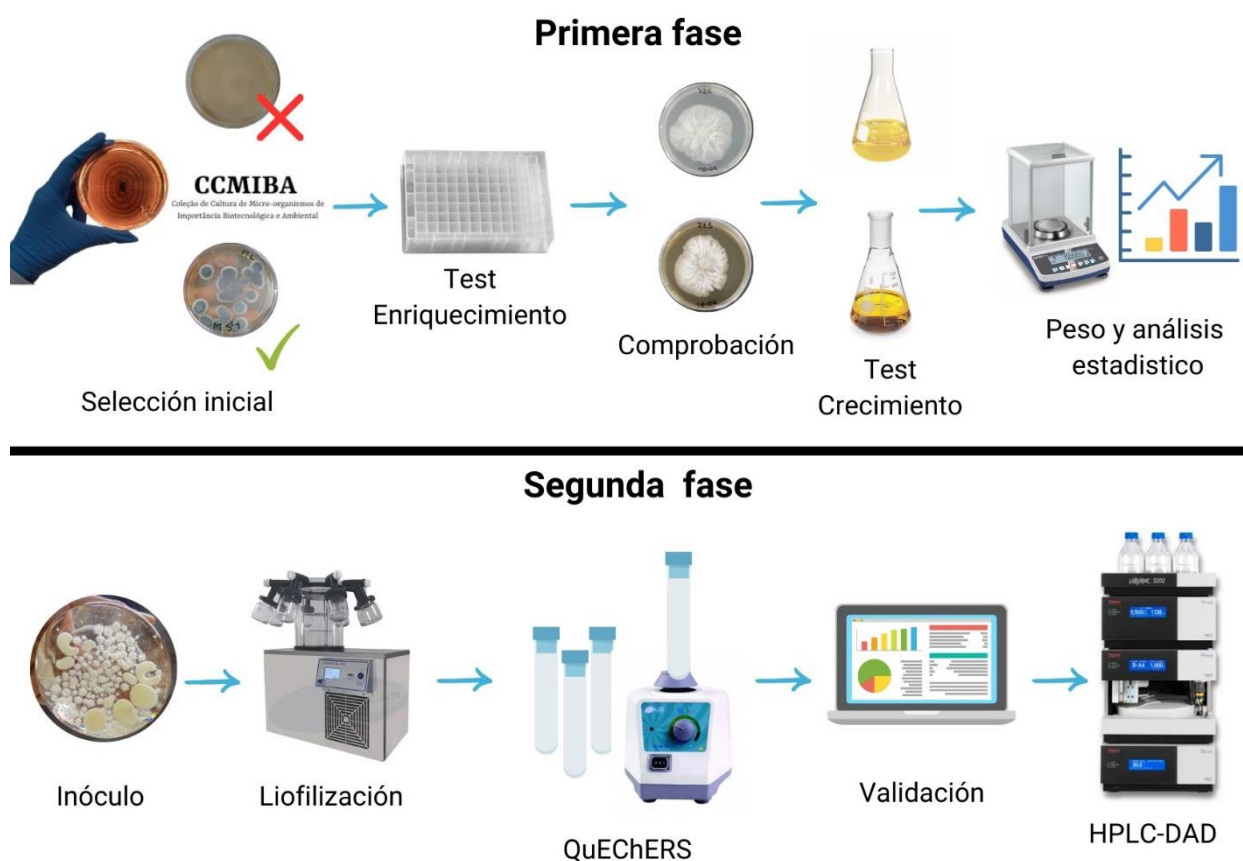
- Reactivar los hongos aislados de la CCMIBA para su posterior estudio;
- Cultivar los hongos en medio con atrazina como única fuente de carbono;
- Comparar el crecimiento de la masa celular en medio MA2 y medio con ATZ como única fuente de carbono, con el fin de identificar las diferencias en su desarrollo y seleccionar los especímenes que obtengan la menor diferencia significativa;
- Desarrollar un protocolo para el proceso de liofilización de hongos, abordando cada etapa desde la preparación de las muestras hasta la obtención del producto liofilizado final, con el objetivo de garantizar la conservación efectiva del analito de interés;
- Desarrollar una metodología de preparación de muestras para extracción de ATZ y sus metabolitos utilizando el método QUECHERS;

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento experimental se dividió en dos fases (figura 16). La primera fase se caracterizó por la identificación y selección de los hongos con mayor tolerancia a la ATZ por medio de variaciones en los componentes del medio y la observación del comportamiento.

En la segunda fase, se procedió a la preparación de las muestras para su análisis cromatográfico utilizando el proceso de liofilización y la metodología QuEChERS. Se realizó una validación del proceso para garantizar la precisión y fiabilidad del proceso y se llevó a cabo el análisis cromatográfico en HPLC-DAD.

Figura 16. Metodología para la selección de hongos con alta tolerancia a la ATZ para análisis en HPLC-DAD

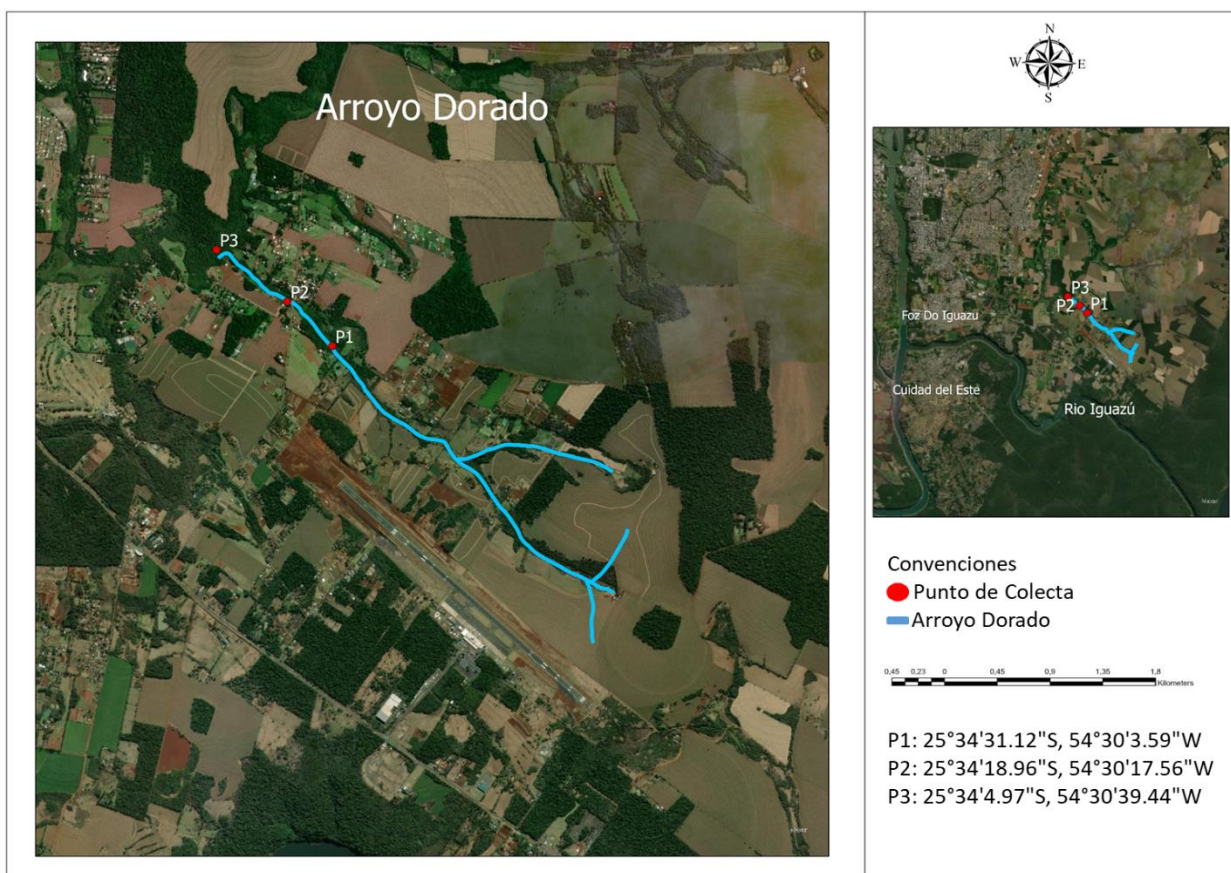


Fuente: Autoría propia, 2024

#### 4.1. Sitio de origen de las muestras

Los hongos utilizados en este trabajo fueron reactivados de la CCMIBA de la UNILA. Estos fueron colectados del sedimento del AD (figura 17) por parte de los proyectos de iniciación científica “Estudio de la contaminación de manantiales: caso del arroyo Dorado/Foz de Iguazú-PR” y “Estrategias para el monitoreo de ríos urbanos y ríos de regiones de agricultura intensiva” coordinado por la profesora Marcela Boroski, en conjunto con la profesora Rafaella Bonugli. El AD se caracteriza por tener la presencia de lixiviados por parte de los cultivos que se encuentran a su alrededor, así como de un antiguo aterro sanitario, lo que lo hace un efluente de interés para la selección de especímenes resistentes a los AGT y otros compuestos.

Figura 17. Localización del Arroyo Dorado/PR y puntos de colecta.



Fuente: Autoría propia, 2023 (ArcGIS).

Las muestras fueron colectadas en tres puntos claves del AD:















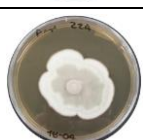

- El punto 1 (P1) se caracteriza por la presencia de varios plantíos de maíz y soja a su alrededor, está ubicado antes del antiguo vertedero, en este punto además fue colectado una muestra adicional (P1A), una vez que se encontraba una producción de espuma superficial que causo interés. Este tipo de espuma se debe a la presencia en el agua de sustancias como detergentes, aceites, productos químicos y un exceso de materia orgánica.

-Por otro lado, el punto 2 se distingue por estar localizado unos metros abajo del antiguo vertedero, por lo que se carga de los lixiviados de este, así como también el desagüe de una pequeña invasión allí localizada.

-En cuanto al punto 3 (P3) fue tomado a unos metros del río Tamandúa, se caracteriza por tener un mayor caudal en esa zona.

De este proceso fueron colectados 16 hongos de medio selectivo con atrazina que se conservan en el CCMIBA, los cuales pueden ser observados en la tabla 1 de acuerdo a su identificación y punto de colecta. Cabe destacar que en el momento en el que se realizó el estudio paralelamente estaban en el proceso de identificación de los hongos, por ello algunos quedaron sin identificación.

Tabla 1. Identificación molecular de los hongos y puntos de colecta en el Arroyo Dorado/PR

IDM	Código	Punto de colecta	Foto	ID	Código	Punto de colecta	Foto
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCMIBA 236	P1		NI	CCMIBA 238	P1	
NI	CCMIBA 209	P1A		<i>Epicoccum</i> sp.	CCMIBA 219	P1A	
NI	CCMIBA 231	P1A		<i>Cladosporium</i> sp.	CCMIBA 233	P1A	
NI	CCMIBA 235	P1A		<i>Tzeanania taiwanensis</i>	CCMIBA 237	P1A	
NI	CCMIBA 246	P1A		<i>Epicoccum</i> sp.	CCMIBA 200	P2	
<i>Trichoderma</i> sp.	CCMIBA 204	P2		<i>Clonastachys</i> sp.	CCMIBA 225	P2	
<i>Penicillium</i> sp.	CCMIBA 239	P2		<i>Trichoderma</i> sp.	CCMIBA 215	P3	
NI	CCMIBA 224	P3		<i>Clonastachys</i> sp.	CCMIBA 228	P3	

IDM: Identificación molecular; NI: No Identificado; P1: Punto de colecta 1; P1A: muestra adicional en el Punto de colecta 1; P2: Punto de colecta 2; P3: Punto de colecta 3. Fuente: Autoría propia, 2024

## 4.2. PRIMERA FASE: SELECCIÓN DE HONGOS

### 4.2.1. Reactivación y cultivo de microorganismos

La reactivación de los hongos fue realizada en medio MA2 enriquecido con ATZ: 2% extracto de Malta, 1,5% Agar, 40 mg/mL de gentamicina y 1000 mg/L de ATZ (Sigma-Aldrich, 99,1% pureza), en una incubadora B.O.D. con fotoperiodo (LUTECH, LUCA-161/04) a 28° C durante 5 a 10 días, dependiendo del crecimiento del hongo. El medio malte fue el primero en ser usado puesto que cuenta con las fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para un crecimiento sin condiciones tan altas de estrés, esto con el objetivo de observar su crecimiento y morfología, para poder así utilizarlo como método de comprobación antes y después de los posteriores ensayos.

### 4.2.2. Prueba de enriquecimiento

A fin de hacer una clasificación y determinar qué hongos tienen una mayor capacidad de tolerar la ATZ se llevó a cabo un test de enriquecimiento por medio de un cultivo en una placa de 96 pozos con 2 mL de capacidad cada uno. Para lo cual primero fue elaborada una tapa por medio de algodón y gasas, que permitiría cuidarlo de cualquier contaminación externa y el intercambio de gases una vez inoculado, estas fueron debidamente auto-clavadas con el fin de eliminar cualquier microorganismo presente.

En cuanto al medio, contenía 5000 mg/L peptona como fuente de nitrógeno y 1000 mg/L ATZ como fuente de carbono, llamado medio ATZ. En cada pozo se colocaron 1,5 mL de medio y se inoculó con un disco de cada hongo de diámetro 8 mm, en triplicata, dejando un pozo por línea sin inocular como control. La placa fue incubada a 28°C y una agitación de 130 rpm durante ocho días.

Como método de comprobación de ausencia de contaminación y selección después del enriquecimiento, los hongos que presentaron crecimiento fueron transferidos a placas Petri conteniendo la misma concentración de peptona y ATZ más agar; se comprobó que fuesen los mismos por medio de la comparación de la morfología del crecimiento entre los hongos iniciales en medio MA2 enriquecido y los hongos en el medio ATZ.

#### 4.2.3. Test de crecimiento y cuantificación de biomasa

Con el fin de comprobar que hongos tenían una mayor probabilidad de metabolizar la ATZ se tomaron los hongos previamente cultivados en medio sólido con ATZ y se transfirieron a medios líquidos con MA2 (extracto de malta 20000 mg/L) y medio ATZ (Peptona 5000 mg/L, ATZ 1000 mg/L). Cada ensayo se inoculó con 3 discos de diámetro 8 mm de los hongos cultivados previamente en medios sólidos MA2 en erlenmeyers de 125 mL que contenían 50 mL de cada medio. Los ensayos fueron inoculados en triplicata y como control negativo fueron preparados erlenmeyers sin inóculo de cada medio. Los ensayos fueron incubados a 28° C y una agitación de 130 rpm, durante ocho días.

Pasados los ocho días fueron retirados del shaker y transferidos a tubos falcón. Con el objetivo de separar la masa del medio se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos. Después, se pesaron distintos papeles de filtro y se utilizaron para filtrar los hongos con la ayuda de un embudo. A continuación, el papel de filtro con la masa de los hongos se transfirió a placas Petri y se secó en una estufa a 80°C durante 48 horas, hasta obtener un peso constante. Una vez finalizado el tiempo se prosiguió a pesarlas y calcular los datos, para lo cual se usó la ecuación:

$$Ph = Pf - Pi$$

Donde:

Ph: Peso hongo

Pf: Peso final del papel filtro con el hongo una vez seco

Pi: Peso inicial del papel filtro

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza ANOVA, con un nivel de probabilidad (P) inferior al 5% ( $P < 0.05$ ) usando el software Past 4.03.

### 4.3. SEGUNDA FASE: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

#### 4.3.1. Pre-inóculo e inóculo

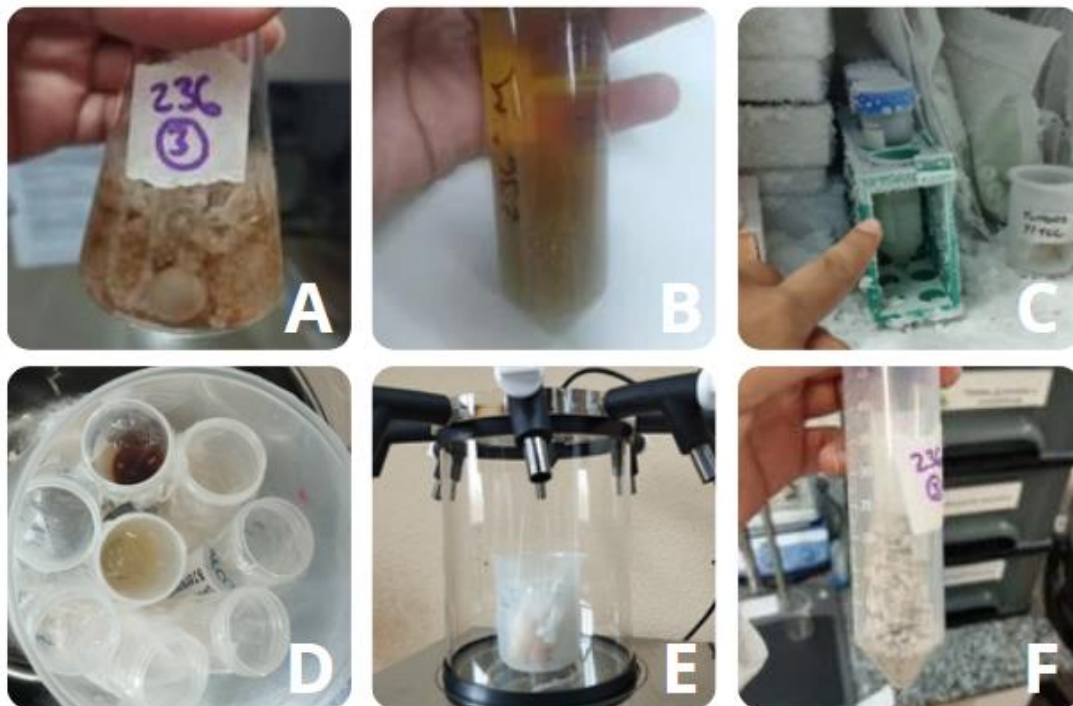
La preparación de las muestras inició con el cultivo de una serie de preinóculos. Para ello, se colocaron dos discos de 8 mm de diámetro del hongo de interés en Erlenmeyers conteniendo 30 mL de medio MA2. Estos preinóculos se incubaron en un

shaker (SIF6000 de Lab Companion) a 130 rpm durante 3 días a una temperatura de 28°C. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar se filtraron utilizando un embudo y papel filtro esterilizados; una vez separado del medio, los micelios filtrados fueron transferidos a 30 mL de medio ATZ. Los cultivos resultantes se colocaron en la incubadora shaker, durante 7 días, a 130 rpm y una temperatura de 28°C.

#### 4.3.2. Liofilización

Una vez las muestras habían alcanzado el crecimiento esperado durante los días determinados (figura..A), se transfirieron a tubos Falcon para facilitar su manejo y almacenamiento (figura..B). Posteriormente, fueron congeladas a -80°C durante 24h (figura..C). Después de ser congeladas eran retiradas las tapas y colocado en su lugar papel film plástico o papel aluminio con unos pequeños agujeros para permitir la salida del agua y minimizar la pérdida de la muestra (figura 18).

Figura 18. Paso a paso del proceso de liofilización.



Fuente: Autoría propia, 2024

Luego las muestras se introducían en el liofilizador (SL-404, SOLAB) programado a una presión de 45000 uHg, temperatura de -30°C y una desorción de 20°C (figura..E). El tiempo necesario para el proceso varía según la cantidad de muestras y su contenido. Por ejemplo, con ocho muestras de 30 mL, el tiempo requerido para obtener la muestra final (figura...F) fue de cuatro días.

#### 4.3.3. Purificación de las muestras por medio de QuEChERS

Es así que, para el análisis de la recuperación de la ATZ los hongos previamente liofilizados fueron resuspendidos con 10 mL de Acetonitrila (Sigma-Aldrich, 99,9% pureza) y 5 mL de agua ultra pura (18.2  $\Omega$ ), posteriormente fueron homogeneizados por medio de un ultra-turrax (IKA, T18 ULTRA TURRAX®) a 6 rpm (figura 19 A). Los tubos se cerraron y agitaron en un mezclador vortex durante un minuto, consecutivamente se agregaron 4,00 g de sulfato de magnesio MgSO<sub>4</sub> anhidro (Êxodo Científica, 98% pureza) y 1,00 g de cloruro de sodio NaCl (Dinâmica, 99% pureza) (B) y se agitaron nuevamente en el vortex durante 1 min (C).

Figura 19. Metodología QuEChERS simplificada.



Fuente: Autoría propia, 2024

Después de agitar, los tubos se centrifugaron (Hettich®-ROTINA 318) a 4000 rpm durante 15 min (D), del sobrenadante se transfirieron 2,00 mL a un tubo falcon de 15 mL que contenía 50 mg de PSA (Sigma-Aldrich), 100 mg de C18 (Sigma-Aldrich) y 300 mg de MgSO<sub>4</sub> (E), se cerraron los tubos y se agitaron en un vortex durante 1 min (F). Una vez más se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min (G) y se tomaron de 500 µL a 1000 µL del sobrenadante, posteriormente se pasaron por un filtro de jeringa de 0,22 µm a un vial de 2 mL, con el fin de retener las impurezas más pequeñas y prolongar la vida útil de la columna cromatográfica (GABARDO, 2021) (H).

#### 4.3.4. Validación

Con el fin de garantizar la precisión y fiabilidad del proceso se realizó la validación del proceso, iniciando por la detección del límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ) y la precisión, para lo cual fueron preparadas soluciones de ATZ, DIA (Sigma Aldrich, 99,9% pureza) y DEA (Sigma Aldrich, 99,9% pureza) de 1000 mg/L, las cuales posteriormente fueron usadas para realizar una solución intermedia, donde se realizó el mix de las soluciones en un balón de 50 mL, para obtener una concentración de 1000 µg/L. Esta solución fue luego usada para realizar diluciones en balón de 5 mL para obtener las concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100, 150, 250 y 300 µg/L. Se usó agua ultrapura para aforar cada concentración y las curvas analíticas fueron preparadas en triplicata. El coeficiente de determinación-R<sup>2</sup> se calculó mediante el gráfico en Microsoft Excel .

El LD y LQ fueron calculados mediante las ecuaciones del método simplificado del INMETRO, así:

$$LD=3,3 s/b$$

$$LQ=10 s/b$$

Donde:

s= desvío padrón de la respuesta del blanco.

b= inclinación de la curva analítica.

La precisión se determinó mediante el cálculo del desvío estándar relativo (DPR) para muestras con concentraciones conocidas, según lo indica Ribeiro (2008). Y para finalizar la linealidad se evaluó utilizando la planilla de Ribeiro (2008), la cual compara los residuos de los ajustes lineales y cuadráticos mediante un test-F para determinar su significancia.

#### 4.3.5. Evaluación de la presencia de ATZ por medio de HPLC-DAD.

Se evaluó el impacto de la metodología QUECHERS en la recuperación y detección de ATZ, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD). Se cuantificó la presencia de ATZ en muestras tanto con presencia de hongo como sin él, con el objetivo de determinar la eficacia de la metodología QUECHERS en la recuperación y lectura del analito de interés. Este análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo serie Dionex Ultimate 3000 de Thermo Fisher Scientific, equipado con una bomba cuaternaria (LGP3400SD), un muestreador automático y un detector de diodos (DAD 3000).

Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase inversa ACE 5 C18 (250 × 4,6 mm – 5 µm) con una precolumna de la misma fase. Se utilizó Acetonitrila (A) y agua (B) en modo de elución en gradiente como fase móvil: 20% de A alcanzando el 90% en 15 min, permaneciendo constante en esta condición durante 15 min. En el paso de limpieza de la columna, la fase móvil volvió al 20% de A en 2 min, permaneciendo en esta condición durante 5 min hasta que se inició una nueva corrida cromatográfica.

El caudal fue de 0,4 mL/min, la temperatura de la columna se fijó en  $25,0 \pm 1,0$  °C y el volumen de inyección fue de 20,0 µL. Se monitorean las siguientes longitudes de onda ( $\lambda$ ) para detectar los plaguicidas: se utilizó 221 nm para ATZ y 213 nm para DIA y DEA, identificadas a través del tiempo de retención y comparación de los espectros UV de los analitos con estándares conocidos (GABARDO, 2021).

#### 4.4. LIMPIEZA DE VIDRIERÍA

Los materiales implementados en el transcurso del trabajo fueron debidamente lavados antes y después del uso, según el protocolo de limpieza de vidriería del grupo de

investigación del Laboratorio de Estudios Interdisciplinarios del Medio Ambiente y Alimentos (LEIMAA). El proceso de limpieza iniciaba sumergiendo los materiales en una solución de jabón Extran alcalino al 20% (Sigma-Aldrich), seguido de un baño en un sonicador durante 15 minutos. Después de este paso, se enjuagaron los materiales con agua destilada en diez ocasiones. Posteriormente, se repite el proceso sumergiendo los materiales en agua destilada y en el sonicador durante 15 minutos más, seguido de otro enjuague con agua destilada diez veces. Luego, los materiales se sumergieron en ácido nítrico al 10% durante 2 horas, se enjuagan con agua destilada otras diez veces y se dejaban secar en una estufa a 40°C (excepto la vidriería volumétrica). Una vez secos, se les aplicó acetona (Dinâmica, 99,5% pureza) tres veces y se dejaban secar, para luego pasarlos tres veces por hexano (Sigma-Aldrich, 95% pureza).

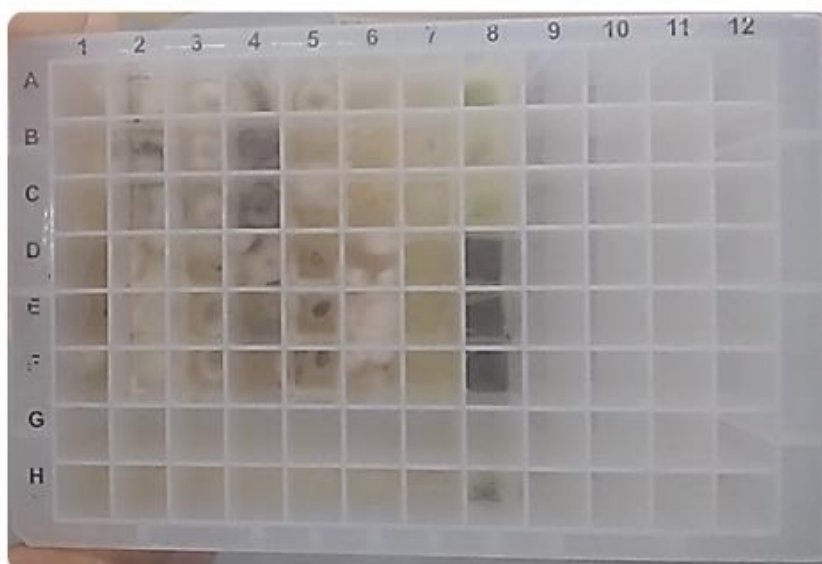
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Primera Fase

#### 5.1.1. Prueba de enriquecimiento

Inicialmente fueron reactivados y analizados 16 hongos en el medio MA2 enriquecido con ATZ. De esta primera etapa se pudo distinguir que en su mayoría eran hongos esporulados. Los 16 hongos fueron sometidos posteriormente a la prueba de enriquecimiento (figura 20), donde, después de un periodo de incubación de ocho días, se observó un crecimiento prometedor en el medio con ATZ como única fuente de carbono para los hongos *Epicoccum* sp. CCMIBA 200 (puente de aislamiento P2), *Trichoderma* sp. CCMIBA 204 (puente de aislamiento P2), *Trichoderma* sp. CCMIBA 215 (puente de aislamiento P3), *Epicoccum* sp. CCMIBA 219 (puente de aislamiento P1A), CCMIBA 224 (puente de aislamiento P3), *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 (puente de aislamiento P2), *Aspergillus fumigatus* CCMIBA 236 (puente de aislamiento P1) y *Penicillium* sp. CCMIBA 239 (puente de aislamiento P2). Sin embargo, al transferir estos hongos a placas Petri para confirmar su pureza, se detectó contaminación por parte de otros hongos en los casos de *Epicoccum* sp. CCMIBA 200 y *Epicoccum* sp. CCMIBA 219, lo que resultó en su exclusión de los siguientes análisis.

Figura 20. Placa de 96 pozos inoculada en triplicata por cada uno de los diferentes hongos.



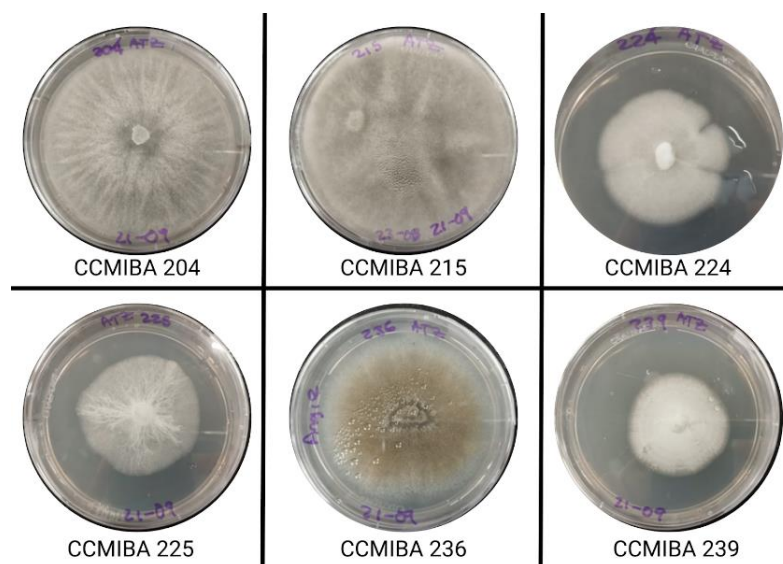
Fuente: Autoría propia, 2023

Los géneros *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium* sp. han sido detectados en otros trabajos con ATZ, como es el caso del estudio realizado por Da Silva (2020), en el cual buscaban observar la diversidad de hongos en suelo contaminado con ATZ, así podemos destacar que hay antecedencia en el crecimiento de estos géneros de hongos en medios con la presencia de ATZ, es por ello que tuvieron un crecimiento prometedor.

Del test de enriquecimiento se destaca que los seis hongos (figura 21) que crecieron en el medio ATZ demostraron una alta capacidad de tolerancia a la sustancia, una vez que fue retirada la fuente de carbono primaria que provenía del malte del medio anterior, lo que los hizo promisorios para la siguiente etapa. Además, se observó que el crecimiento de los hongos varía cuando su fuente de carbono es alterada, tanto en términos de masa como de morfología.

Por ejemplo, en comparación con el medio MA2 enriquecido con ATZ (tabla 1), los hongos *Trichoderma* sp. CCMIBA 204, *Trichoderma* sp. CCMIBA 215 y *Aspergillus fumigatus* CCMIBA 236 presentaban una coloración más intensa, mientras que en el medio ATZ mostraron coloraciones más tenues y una disminución en la esporulación.

Figura 21. Hongos seleccionados en la prueba de enriquecimiento en medio ATZ.



Fuente: Autoría propia, 2023

Asimismo, se observó que el crecimiento de los hongos en medio ATZ puede ser más lento, como se evidencia en el caso de los hongos CCMIBA 224, 225 y 239, que mostraron un crecimiento moderado a los ocho días en placas Petri con medio MA2 enriquecido, mientras que su crecimiento se redujo ligeramente en medio ATZ, lo cual fue más evidente en el test de crecimiento a continuación.

Entre las características de los hongos seleccionados encontramos que:

Las especies de *Epicoccum* son de naturaleza saprofita, aunque también colonizan plantas y residen como endófitos. Son conocidos principalmente por su uso como biocontrol contra fitopatógenos y se le atribuyen una serie de propiedades biotecnológicas, debido a la producción de metabolitos que presentan actividades biológicas como: antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, inhibición de la replicación viral, entre otros (MESQUITA; PADILLA; ARAUJO, 2018; NIGHAT; *et al.*, 2016).

*Trichoderma* sp. este hongo ha demostrado excelentes atributos de biocontrol de enfermedades fungosas y bacterianas, estimulando mecanismos de defensa inducida y sistémica en la planta, y ejerciendo efectos positivos de biofertilización incrementando los rendimientos de los cultivos tratados con el hongo (BETTIOL; *et al.*, 2014), así como también se ha evaluado su capacidad de degradar agrotóxicos, como por ejemplo la ATZ, obteniendo valores de degradación superiores al 50% (MADARIAGA; *et al.*, 2017; CORREA; *et al.*, 2021).

Las cepas de *Clonostachys* sp. están ampliamente distribuidas por todo el mundo, es un hongo filamentosos, micoparásito involucrado en biocontrol, biodegradación, biotransformación, fuente de energía biológica, fermentación, entre otros, siendo *C. rosea* la especie más estudiada del género *Clonostachys* spp. (SOL; *et al.*, 2020).

*Aspergillus fumigatus* es un hongo saprotrófico que se encuentra sobre el material en descomposición, en su nicho ecológico, el hongo ha aprendido a adaptarse y proliferar en ambientes hostiles (LATGÉ; CHAMILOS, 2019), esto le ha proporcionado la capacidad de tolerar diversos contaminantes como los herbicidas: ATZ, glifosato y pendimetalina

(BARBOSA; *et al.*, 2021; CORREA; *et al.*, 2021), lo que lo hace un hongo prometedor para el análisis de degradación de dichos compuestos.

*Penicillium* sp. es también un hongo saprofito que se encuentra en el ambiente, es de gran importancia en industrias biotecnológicas, como en la producción de enzimas y antibióticos (PRASANNA; RAMANJANEYULU; RAJASEKHAR, 2016). También presenta tolerancia a los agrotóxicos, como es el caso del herbicida glifosato, presentando una gran diversidad de especies que lo toleran y su potencial como agentes de biorremediación del glifosato (CORREA; *et al.*, 2021)

#### 5.1.2. Cuantificación de biomasa

Los resultados del test de crecimiento muestran claramente que la masa producida en un medio con una fuente de carbono más rica es considerablemente mayor en comparación con una fuente de carbono más pobre (cuadro 4), donde la producción de masa es significativamente menor. Al emplear el análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en los pesos de los hongos, se observó que solo el hongo *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 no presentó esta diferencia, lo que lo convierte en un candidato prometedor para el análisis de la degradación de ATZ mediante HPLC-DAD.

Cuadro 4. Masa de los hongos después de ocho días de crecimiento en los medios MA2 y ATZ.

<b>Biomasa (Peso seco)</b>		
<b>Hongo</b>	<b>Medio MA2 (g)</b>	<b>Medio ATZ (g)</b>
204*	0,205	0,050
215*	0,140	0,020
224*	0,217	0,033
225	0,163	0,083
236*	0,156	0,005
239*	0,223	0,023

\*p-valor <0,05. Fuente: Autoría propia, 2023

Además, la prueba de crecimiento también reveló que la presencia de ATZ inhibe el crecimiento de los hongos, lo que se reflejó en una disminución del crecimiento superior al 70% en la mayoría de los casos, con la excepción del hongo *Clonostachys* sp. CCMIBA 225, que experimentó una disminución del 49%. Esta marcada diferencia en el crecimiento de los hongos podría atribuirse, al menos en parte, a la falta de utilización de una fuente de carbono alternativa. Solo que como metodología de selección para el presente trabajo el diferencial fue el uso solo de ATZ como fuente de carbono y en una concentración alta, para así hallar los que presentaran una mayor tolerancia al herbicida.

Cuando es empleada una fuente de carbono alterna como la glucosa la disminución en el crecimiento parece ser menos pronunciada. Este fenómeno fue observado en el estudio realizado por Szewczyk *et al.* (2020), donde se evaluó tanto la degradación de la ATZ (25 mg/L) como el crecimiento por parte del hongo *Metarhizium robertsii* durante 10 días. Los resultados revelaron que, si bien se produjo una desaceleración en el crecimiento del hongo a partir del tercer y quinto día, coincidiendo con el agotamiento de la fuente de glucosa (2%) en el medio de cultivo, la disminución en el crecimiento fue menos pronunciada que en ausencia de glucosa. Asimismo, se observó que la degradación de la ATZ comenzó aproximadamente el tercer día. Estos hallazgos sugieren que, aunque la presencia de ATZ indujo estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del carbono y nitrógeno, así como un aumento en la fluidez de la membrana, la disponibilidad de glucosa pudo mitigar en cierta medida los efectos inhibidores de la ATZ en el crecimiento del hongo.

Como fue en el estudio de Chan Cupul *et al.* (2014) donde, variaron las concentraciones de ATZ en el medio PDA (468 mg/L, 937 mg/L, 1875 mg/L y 3750 mg/L) con el fin de observar el efecto que causaban en los hongos *Cymatoderma elegans*, *Daedalea elegans*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus* sp. *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes maxima*. Se observó que a medida que se aumentaban las concentraciones de ATZ, se afectaba significativamente la inhibición del crecimiento micelial y las tasas de crecimiento. Destacándose en la concentración más alta (3750 mg/L) los hongos *Pleurotus* sp. y *Daedalea elegans*, los cuales mostraron una menor inhibición del crecimiento micelial con 66,7% y 68,6% respectivamente. Esto sugiere que a pesar del

uso de concentraciones altas de ATZ, los componentes del medio PDA y la resistencia del hongo podrían mitigar su impacto, ya que a pesar de que en la concentración de 3750 mg/L los que más resistieron tuvieron una inhibición menor que los hongos estudiados en el presente estudio.

Cabe destacar que, aunque en los diferentes ensayos del presente trabajo se obtuvo una disminución en la biomasa, aun así, presentaron un crecimiento prometedor en un medio con una concentración alta de ATZ (1000 mg/L), sin el uso de una fuente de carbono alterna, observándose así que el aislamiento selectivo de especies autóctonas de un ambiente contaminado es eficiente para hallar hongos con la capacidad de degradar compuestos contaminantes, como en este caso la ATZ.

Tal como se observa en la investigación de Madariaga *et al.* (2017), donde por medio de medios selectivos lograron obtener cepas del hongo *Trichoderma* sp. y bacterias *Rhizobium* sp. para posteriormente en medios con ATZ como única fuente de carbono y nitrógeno evaluar la capacidad de degradar la ATZ. De este estudio se pudo identificar que al ser especies autóctonas presentan una mayor resistencia a concentraciones altas del contaminante, siendo que evaluaron el crecimiento de estos en concentraciones de 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500 y 10000 mg/L, con la diferencia de que se realizó un consorcio y bioaumentación tanto de *Trichoderma* sp. como de *Rhizobium* sp, obteniendo porcentajes de degradación de ATZ superiores al 50%.

Por otro lado, resultados previos respaldan la capacidad de *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 como un candidato prometedor para la degradación de la ATZ. Por ejemplo, se encuentra el estudio realizado por Rahmeier (2021), donde se llevaron a cabo ensayos en los que se empleó un medio con una concentración de 10 mg/L de ATZ, permitiendo el crecimiento del hongo durante 10 días a 140 rpm y 28°C. Este estudio reportó una degradación del 68% de la ATZ, lo que indica un potencial significativo de degradación por parte de *Clonostachys* sp.

Sin embargo, es importante resaltar que aunque el hongo *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 proviene del punto de aislamiento P2, el mayor número de aislados

provenían del punto de aislamiento P1A, relacionados a las muestras provenientes de la espuma del agua superficial. Eso sugiere que esa producción de espuma puede deberse a residuos de la aplicación de AGT, incluyendo la ATZ. Para futuros estudios se recomienda un análisis más detallado de los componentes de esta muestra, con el fin de correlacionar los resultados obtenidos en este estudio.

## 5.2. Segunda Fase

### 5.2.1. Preparación de las muestras

El proceso de liofilización se realizó con el fin de pre-concentrar las muestras y conservar sus propiedades, una vez que las cantidades necesarias para trabajar en el cromatógrafo son de  $\mu\text{L}$ , por lo que tener muestras de 30 mL implicaría el uso de más reactivos en procesos como QuEChERS, así al retirar el agua de las muestras se elimina un componente no útil en la muestra, se disminuye el contenido concentrándose y por ende se puede conservar mejor (figura 22). Este proceso consiste en una conversión del estado sólido-hielo al gaseoso sin pasar por el estado líquido, mediante un proceso llamado sublimación, el cual ocurre a una temperatura y presión por debajo del punto triple del agua  $0,01^{\circ}\text{C}$  y  $0,006\text{ atm}$ , para permitir la sublimación del hielo (BUTREDDY; DUDHIPALA; JANGA, 2020).

Figura 22. Muestras una vez finalizado el proceso de liofilización.



Fuente: Autoría propia, 2024

Por otro lado, la metodología de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) creada por Anastassiades (2003) fue inicialmente implementada para evaluar la presencia de pesticidas en los alimentos, pero con el pasar del tiempo y por medio de algunas modificaciones está siendo ampliamente utilizada para separar los analitos de interés de la matriz compleja en la que se encuentran y así poder realizar una lectura eficiente en los diferentes cromatógrafos. Es así que en el presente estudio fue de gran utilidad, pues facilita la separación de los analitos de interés de la matriz, facilitando la recuperación para el análisis en el HPLC-DAD (figura 23).

Figura 23. Muestras una vez finalizado el proceso de QuEChERS.



Fuente: Autoría propia, 2024

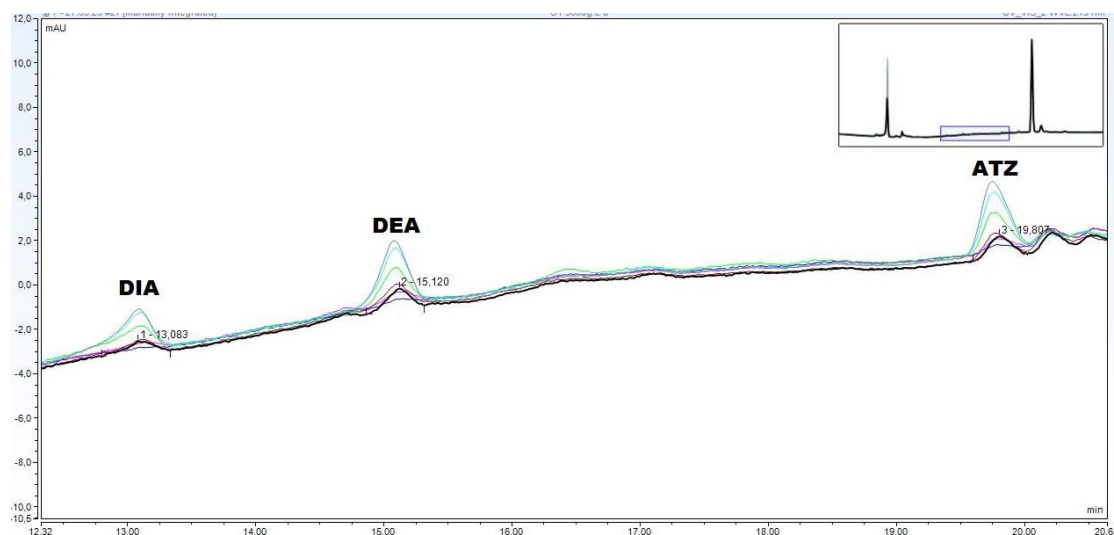
### 5.2.2. Validación de la metodología y análisis cromatográfico.

La validación es un proceso esencial en la investigación científica, ya que garantiza la fiabilidad y precisión de los resultados obtenidos (ANVISA, 2003). En este estudio, se buscó confirmar si el uso de la metodología QuEChERS contribuye significativamente a la recuperación de la atrazina (ATZ), con el propósito de establecer un procedimiento analítico confiable para el análisis de la degradación de ATZ por hongos en investigaciones posteriores.

Para llevar a cabo la validación, se realizaron una serie de curvas analíticas con concentraciones que variaron de 25 µg/L a 300 µg/L con el fin de observar el comportamiento de los analitos de interés, estos fueron evaluados en una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 221 nm. Los tiempos de retención obtenidos fueron los siguientes: ATZ 19,8

minutos, DIA 13,0 minutos y DEA 15,1 minutos (figura 24). Dichos tiempos están correlacionados con la investigación realizada por Gabardo *et al.* (2021), garantizando así la confianza en los picos que fueron generados para los diferentes compuestos.

Figura 24. Curva analítica estándar con la presencia de los analitos DIA, DEA y ATZ.

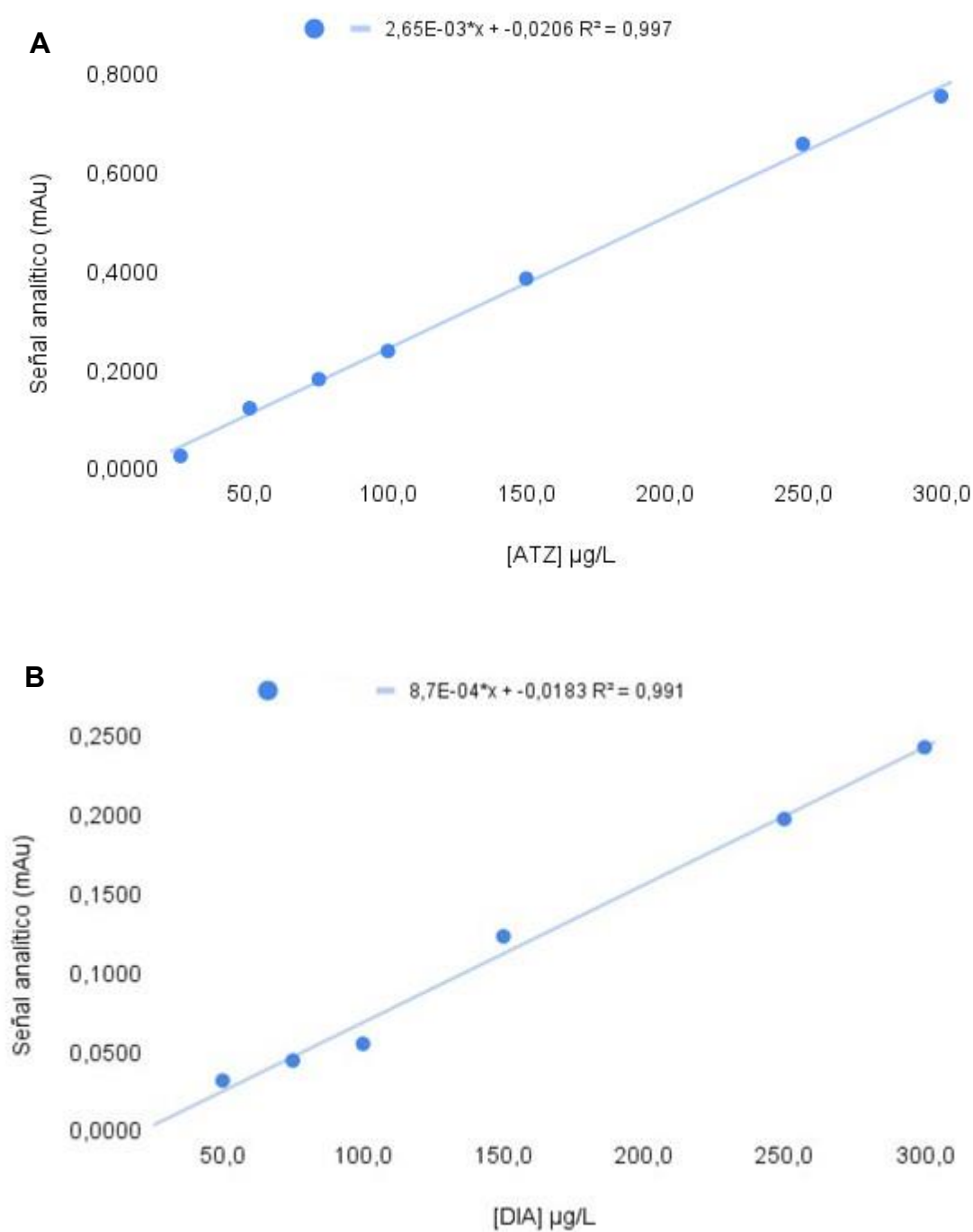


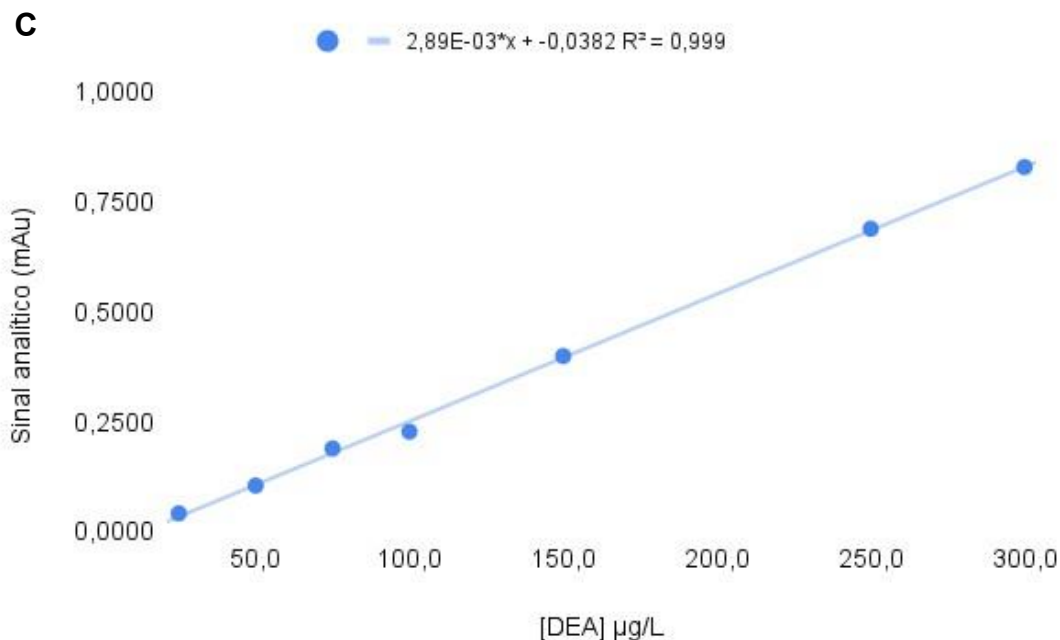
Fuente: Autoria própria, 2024

Una vez obtenidos los tiempos de retención se prosigió a hallar las áreas con el fin de determinar los valores de  $R^2$ , los cuales proporcionan información sobre la linealidad de la curva analítica y la adecuación del método para cuantificar los analitos (figura 25). Esta linealidad es la capacidad de una metodología analítica de demostrar que los resultados son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro del intervalo especificado (ANVISA, 2003), en este caso de 25  $\mu\text{g/L}$  a 300  $\mu\text{g/L}$ .

Como se observa en las figuras.. A, B y C se logró obtener una recuperación satisfactoria del analito de interés utilizando la metodología QuEChERS previamente al cromatógrafo, una vez que las diferentes curvas analíticas realizadas obtuvieron valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) cercanos a 1, lo que según la ANVISA (2003) es un valor aceptable. Obteniéndose así una linealidad del 95%, esto indica que los resultados del análisis son altamente confiables y pueden considerarse válidos dentro de este rango de concentraciones con un nivel de confianza del 95%.

Figura 25. Graficos de las curvas analíticas de los analitos ATZ (A), DIA (B) y DEA (C).





Fuente: Autoría propia, 2024

Por otro lado, el LD es la concentración más baja de un analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada de manera precisa. En otras palabras, es el nivel por debajo del cual el analito es difícil de distinguir del ruido de fondo, pero aún es posible identificar su presencia. Ya el LQ es la concentración más baja de un analito que puede ser medida y cuantificada con precisión. Es decir, por encima del LQ, el método puede proporcionar resultados cuantitativos fiables y reproducibles. El LQ es importante porque establece el punto a partir del cual se pueden hacer mediciones precisas y útiles del analito (ANVISA, 2003; RIBEIRO, 2008; CAMARÓ; *et al.*, 2015).

Tabla 2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de la ATZ, DIA y DEA

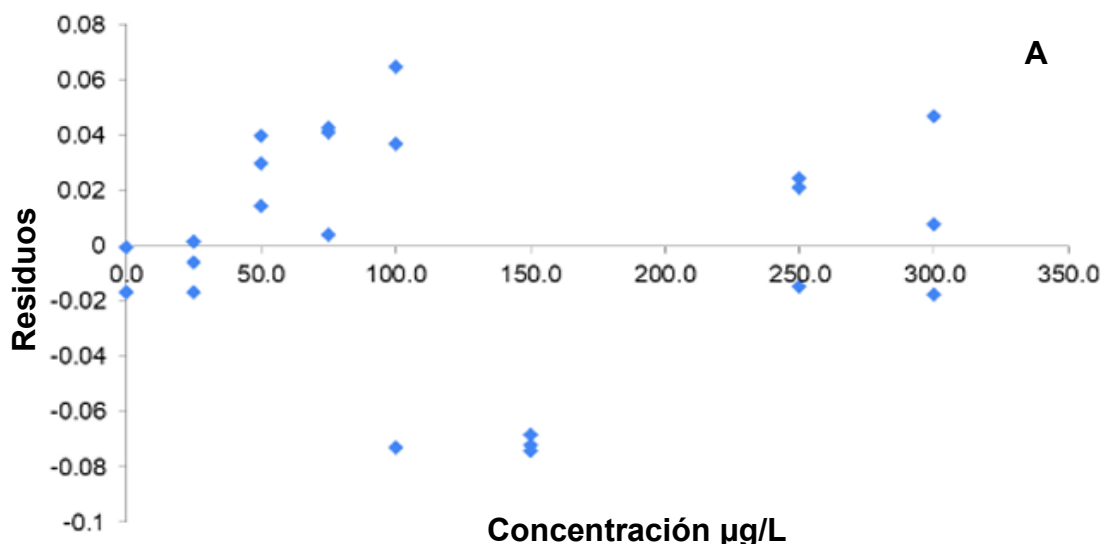
Parametros	ATZ	DIA	DEA
Longitud de onda ( $\lambda$ ) (nm)	221	221	221
LD ( $\mu\text{g/L}$ )	5,60	11,75	7,42
LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	16,98	35,63	22,49

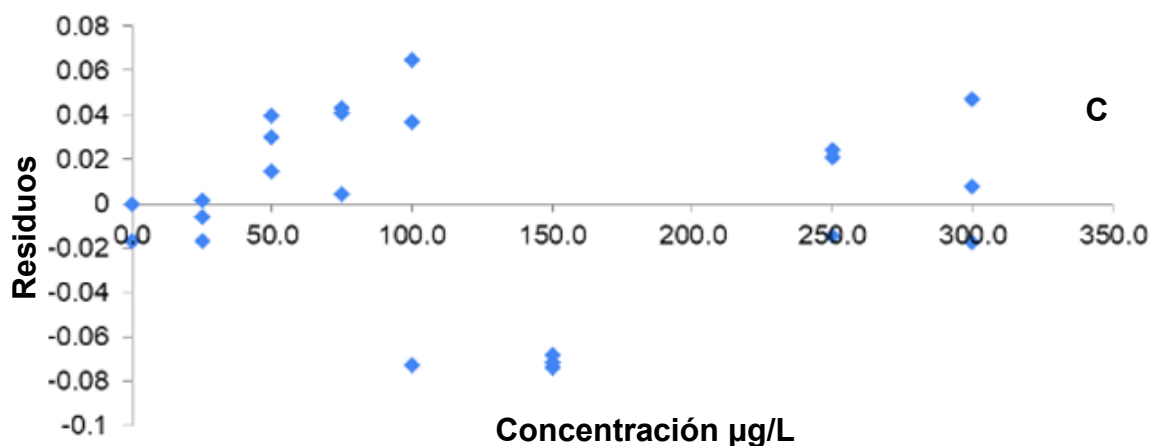
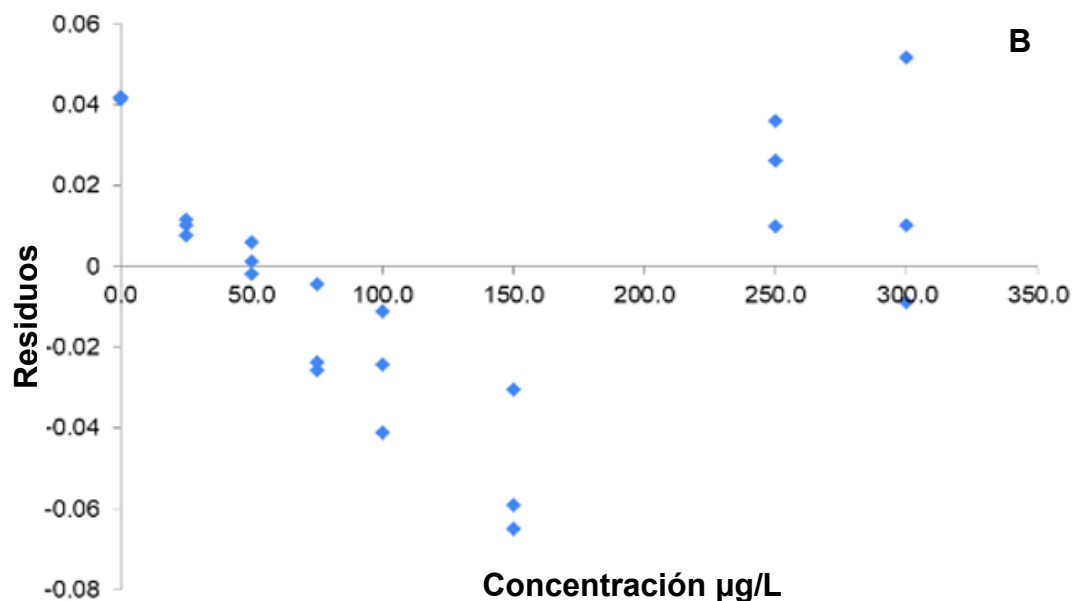
Fuente: Autoría propia, 2024.

Los valores obtenidos son relativamente bajos, lo que sugiere que el método analítico es sensible y puede detectar y cuantificar el analito en concentraciones relativamente bajas. Existen además varios estudios sobre la evaluación de la ATZ, como es el caso de PIOLI (2015) en el cual evaluaron la degradación de la ATZ por medio de camas biológicas y obtuvieron valores de LD 0,77 y LQ 2,34 mg/L. En la investigación de Peressutti y Zorzoli (2023) se monitoreo la presencia de contaminantes en el Río de la Plata, entre ellos la ATZ con un LD de 0,0003 y un LQ de 0,001 mg/kg. Así podemos decir que el LD y LQ su sensibilidad va a depender del tipo de estudio que se este realizando, en el caso del presente trabajo son valores bajos, que nos permiten evaluar a fondo el cambio en la concentración de la ATZ, para así evaluar su degradación en investigaciones futuras.

En la figura 26 se pueden observar gráficos de dispersión de los residuos, los cuales muestran homocedasticidad. Para que un modelo de regresión sea efectivo, los residuos deben mostrar una varianza constante a medida que aumentan los valores predichos. Por lo tanto, la dispersión de los residuos a lo largo del eje y de estos gráficos no muestra cambios significativos a medida que los valores aumentan. Esto sugiere que el modelo puede hacer interpretaciones y estimaciones sólidas sobre la relación entre las variables (RIBEIRO, 2008).

Figura 26. Dispersión de residuos de ATZ (A), DIA (B), DEA (C).





Fuente: Autoría propia, 2024

En cuanto a la repetibilidad, teniendo en cuenta los estándares de aceptación para la repetibilidad de la AOAC (2023) con fines comparativos, los resultados que implican concentraciones en el rango de 25 o 50 ppb (partes por mil millones, microgramos por kilogramo) no deben exceder el 21% de desviación estándar relativa (DPR). Mientras tanto, para concentraciones en los rangos de 100, 150 y 300 ppb (µg/kg), la DPR no debe superar el 30%. Estos resultados aseguran la confiabilidad de la repetibilidad del método basado en una fuente oficial de legislación internacional.

Tabla 3. Repetibilidad y Precisión intermedia para ATZ, DIA y DEA.

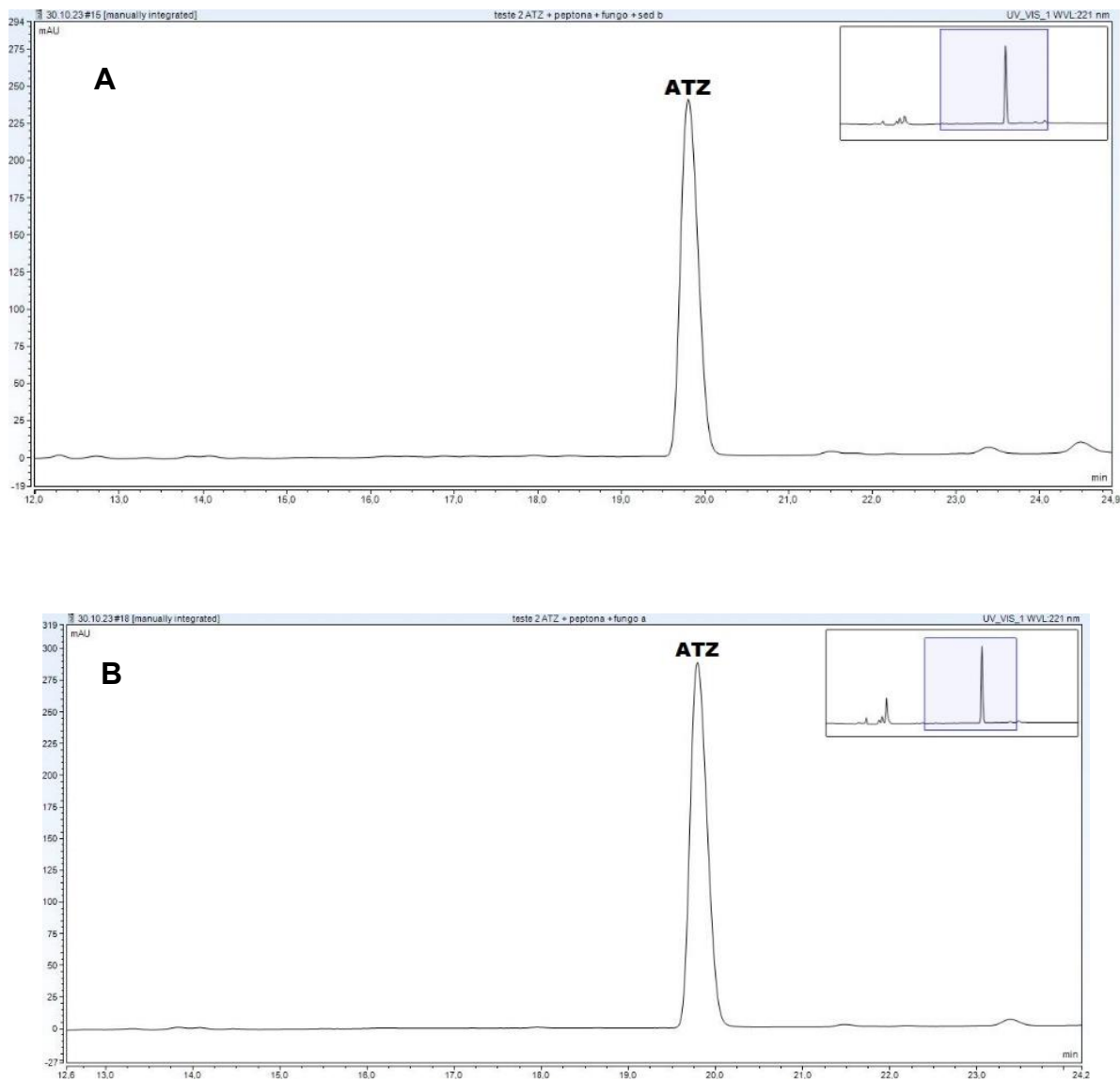
<b>Analitos</b>	<b>Concentración de Referencia</b>	<b>Repetibilidad de (DPR%)</b>	<b>Precisión intermedia de (DPR%)</b>
<b>ATZ</b>	Mínima (25 µg/L)	6,15	6,15
	Media (100 µg/L)	3,74	3,74
	Alta (300 µg/L)	1,55	1,55
<b>DIA</b>	Mínima (50 µg/L)	13,17	13,17
	Media (150 µg/L)	10,73	10,73
	Alta (300 µg/L)	6,17	6,17
<b>DEA</b>	Mínima (25 µg/L)	18,43	18,43
	Media (100 µg/L)	11,02	11,02
	Alta (300 µg/L)	2,56	2,56

Fuente: Autoría propia, 2024

Las muestras, tanto las que contenían medio ATZ con presencia de hongo como las que no, mostraron una recuperación adecuada del analito como se puede observar en las figuras 27 a y b. Este resultado sugiere que la metodología QUECHERS es efectiva para la extracción del analito de interés en este contexto. Este hallazgo proporciona una base sólida para continuar con la evaluación de la capacidad de los hongos para degradar la ATZ en futuros estudios.

Se puede evidenciar también la ausencia de DIA y DEA, ya que esta evaluación inicial fue para determinar si se puede recuperar con precisión la ATZ, así una vez se realicen muestras con los hongos con un crecimiento durante diversos días se pueda realizar el análisis y comparación de la posible disminución de ATZ y el aumento en DIA y DEA.

Figura 27. Cromatogramas evaluando la recuperación de la ATZ.



A. Muestra del medio ATZ, B. Muestra del medio ATZ con la presencia de un hongo. Fuente: Autoría propia, 2024

Un punto a destacar del proceso en general es que el lavado de vidriería fue de vital importancia en el trabajo, ya que las propiedades de la ATZ la hacen una sustancia persistente y de esta manera se adhiere a los materiales donde fueron aplicados, lo cual hacía que en pruebas donde se quería realizar la lectura en el cromatógrafo de los medios adicionales usados como el medio MA2 aparecieran picos de ATZ en donde solo debería aparecer picos de por ejemplo malte o peptona, interfiriendo de esta manera en los resultados.

## 6. CONCLUSIONES

El hongo que demostró mayor potencial de degradación de ATZ fue *Clonostachys* sp. CCMIBA 225, aislado del punto P2. Sus consistentes resultados en las pruebas demostraron una alta tolerancia a la ATZ, posicionándolo como un candidato prometedor para futuros ensayos de degradación y análisis de esta sustancia mediante HPLC-DAD. Estos hallazgos sugieren que *Clonostachys* sp. CCMIBA 225 podría desempeñar un papel significativo en la biorremediación de ATZ y en la mejora de las estrategias de tratamiento de efluentes contaminados.

La elección de realizar el test de enriquecimiento en una placa de 96 pozos se mostró como una estrategia eficiente y viable para futuros ensayos. Esta metodología permitió reducir el uso de reactivos, optimizar el espacio y agilizar el proceso, en comparación con la realización de ensayos en triplicado a una mayor escala. Además, se demostró su eficacia en la selección de hongos capaces de tolerar la ATZ. Estos resultados respaldan la utilidad de esta metodología y sugieren su aplicación en investigaciones futuras sobre la degradación de contaminantes por microorganismos.

El proceso de liofilización garantizó una buena conservación de las muestras y en conjunto con la metodología QuEChERS dieron resultados certeros con respecto a la recuperación de la ATZ, permitiendo así un análisis cromatográfico eficiente.

Para posteriores estudios se recomienda el uso de una fuente de carbono alterna como el malte, una vez que como ya fue discutido la ayuda de una fuente de carbono disminuye ciertas condiciones de estrés, pudiendo llevar a una mayor resistencia a la ATZ y por ende una mayor probabilidad de degradarla. También podría ser realizado variaciones en la concentración de la ATZ, aumentando o disminuyéndola proporcionalmente a la fuente de carbono alterna que podría ser proporcionada, así como otras variables de cultivo (como pH, temperatura, rpm) con el fin de optimizar el proceso de degradación.

## 7. REFERENCIAS

ABATENH E.; GIZAW B.; TSEGAYE Z.; WASSIE M. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. Open Journal Environmental Biology. Etiopia. v. 1, n.1, p. 038-046. 20 de octubre 2017. Acceso el: 21 mayo 2023.

AGGELOPOULOS, C.A.; TATARAKI, D.; RASSIAS, G. Degradation of atrazine in soil by dielectric barrier discharge plasma, Potential singlet oxygen mediation. Chemical Engineering Journal. v. 347, p. 682-694, 2018. Disponible en: [Degradación de la atrazina en el suelo por plasma de descarga de barrera dieléctrica – Posible mediación con oxígeno singlete - ScienceDirect](#). Acceso el: 04 abril 2024.

ALMEIDA, Ana Clara. Efeitos da exposição ao herbicida Atrazina degradado por fotocatalise e dos seus metabólitos: análise por biomarcadores em *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). 2018. 65 f. Dissertação (Doutorado), Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018. Disponible en: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/6937>. Acceso el: 08 mayo 2023.

ANASTASSIADES, Michelangelo; LEHOTAY, Steven J.; STAJNBAHER, Darinka; SCHENCK, Frank J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. Journal of AOAC INTERNATIONAL, V. 86, p. 412–431 1 marzo 2003. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>. Acceso el: 5 junio 2023.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa N° 176 de 12/08/22 (dou de 17/08/22): Atrazina. Brasil: Gov.Br Ministério da Saúde, 2022. 2 p. Disponible en: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1/view>. Acceso el: 19 marzo 2023.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE N°899, 29 de maio de 2003. Disponible en: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899\\_29\\_05\\_2003.html](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html) Acceso el: 26 marzo 2024.

-AOAC, Association of Analytical Communities. Official methods of analysis, 22<sup>nd</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Rockville, EEUU, 2023.

ARANDA, Elisabet. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. ScienceDirect. Current Opinion in Biotechnology. v. 38, p. 1-8, 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166915001652?via%3Dihub>. Acceso el: 04 marzo 2024.

ARANTES, Flávio, et al. Degradação fotocatalítica de atrazina na presença de catalisadores nanoparticulados. Química Nova 40.1, 2017, 36-41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160148>. Acceso el 14 de marzo 2023.

BARBOSA BRAVIM, Nara Priscila; et al. Selection of filamentous fungi that are resistant to the herbicides atrazine, glyphosate and pendimethalin. Acta Scientiarum Agronomy. v. 43, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.51656>. Acceso el: 19 abril 2024.

BETTIOL, Wagner; et al. Control biológico de enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. p. 404, 2014. Disponible en: [https://repositorio.inta.gov.ar/bitstream/handle/20.500.12123/13103/INTA\\_CIRN\\_InstitutodeFloricultura\\_Rivera\\_Control\\_Biologico\\_de\\_Enfermedades\\_de.pdf?sequence=2&isAllowed=y#page=287](https://repositorio.inta.gov.ar/bitstream/handle/20.500.12123/13103/INTA_CIRN_InstitutodeFloricultura_Rivera_Control_Biologico_de_Enfermedades_de.pdf?sequence=2&isAllowed=y#page=287). Acceso el: 19 abril 2024.

BRASIL. Lei 7802 de 11 de julio de 1989, regulamentada por el Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002. Ministério de la Agricultura y Pecuária. Disponible en: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/lei-7802-1989-lei-dos-agrotoxicos/view>. Acceso el: 16 enero 2024.

BUTREDDY, A.; et al. Lyophilization of Small-Molecule Injectables: an Industry Perspective on Formulation Development, Process Optimization, Scale-Up Challenges, and Drug Product Quality Attributes. AAPS PharmSciTech. v. 21, article 252, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01787-w>. Acceso el 18 febrero 2024.

CABRAL RAMOS, Edumar; DI BERNARDO Luiz. Presença e Remoção de Atrazina, Desetilatrazina, Desisopropilatrazina e Desetilhidroxiatrazina em Instalação piloto de Ozonização e Filtração Lenta." Engenharia Sanitaria E Ambiental 22.4, p. 789-96, 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522017147638>. Acceso el: 15 de marzo 2023.

CAMPOS, Marco Antonio Ramírez. El uso de pesticidas en la agricultura y su desorden ambiental. Revista Enfermería La Vanguardia. v. 6, n. 2, p. 40-47, 2018. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Disponible en: <https://doi.org/10.35563/revan.v6i2.210>. Acceso el: 05 mayo 2023.

CAMARÓ SALA, María Luisa; et al. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. v. 33, p. 31-36, 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>. Acceso el: 19 abril 2024.

CHAN CUPUL, Wilberth; et al. Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: dose-response bioassays. Revista Argentina de Microbiología. v. 46, p. 348-357, 2014. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70094-X](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70094-X). Acceso el: 10 abril 2024.

CECILIA, Daniele; MAGGI, Federico. Kinetics of atrazine, deisopropylatrazine, and deethylatrazine soil biodecomposers. *Journal of Environmental Management*. v. 183, p. 673-686, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.012>. Acceso el: 05 junio 2023.

CHAN CUPUL, Wilberth; HEREDIA ABARCA, Gabriela; RODRÍGUEZ VÁZQUEZ. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. v. 51, n. 5, p. 298-308, 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2015.1128742>. Acceso el: 06 marzo 2024.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005 e Resolução N° 396, de 3 de abril de 2008. Brasil. Disponible en: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conam\\_a\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfca\\_altrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2\\_009\\_430\\_2011.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conam_a_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfca_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2_009_430_2011.pdf) y <https://portalpnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20396.pdf>. Acceso el: 01 mayo 2023.

COLASURDO, Diego D. Estudio de la adsorción de los pesticidas Pendimetalina y Metolaclor sobre materiales carbonosos y silíceos para su eliminación de aguas contaminadas. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química. La Plata-Argentina. 2020. Disponible en: [https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/106589/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/106589/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acceso el: 05 abril 2024.

CORREA, L. O.; *et al.* Amazonian soil fungi are efficient degraders of glyphosate herbicide; novel isolates of *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma*. *Brazilian Journal of Biology*. Brasil, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242830>. Acceso el: 19 abril 2024.

DA SILVA, Gessyca Fernanda. Diversidade de fungos em solo contaminado com atrazina: dinâmica da comunidade fúngica em microcosmos. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Neotropical. Brasil. 2020. Disponible en: [https://portal.unila.edu.br/programas-pos-graduacao/biodiversidade-neotropical/copy\\_of\\_GessycaSilva\\_Dissertao\\_2020\\_PPGBN.pdf](https://portal.unila.edu.br/programas-pos-graduacao/biodiversidade-neotropical/copy_of_GessycaSilva_Dissertao_2020_PPGBN.pdf). Acceso el: 16 abril 2024.

DA SILVA, S.S. *et al.* Estudo da contaminação da água superficial e subterrânea de um lixão desativado: Arroio Dourado Foz do Iguaçu P R Rev. Tecnol. Soc., Curitiba, v. 19, n. 55, 2023. Disponible en: <https://revistas.utfpr.edu.br/rts/article/view/13939>. Acceso el: 01 mayo 2023.

DAUNFENBACK, Vanessa; *et al.* Agrotóxicos, desfechos em saúde e agroecologia no Brasil: uma revisão de escopo. Scielo Brasil. Saúde debate. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/0103-11042022E232>. Acceso el: 16 enero 2024.

DELLA FLORA, A. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atrazina e seus principais produtos de transformação nas águas superficiais da bacia hidrográfica do paraná 3. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2018. Disponible en: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/179624/001069973.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acceso el: 31 enero 2024.

DOUGLASS, James, RADOSEVICH, Mark., TUOVINEN, Olli. Microbial attenuation of atrazine in agricultural soils: Biometer assays, bacterial taxonomic diversity, and catabolic genes. *Chemosphere*, v. 176, p. 352-360, 2017, Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.102>. Acceso el 31 mayo 2023.

ESKANDER, Samir; HOSAM Saleh. Biodegradation and Bioremediation. *Environmental Science and Engineering*. Publisher: Studium Press LLC. Giza, Egypt. v. 8, capítulo 1, p.1-31, 2017. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/312491332\\_Biodegradation\\_Process\\_Mechanism](https://www.researchgate.net/publication/312491332_Biodegradation_Process_Mechanism). Acceso el: 22 mayo 2023.

FAO, Food and Agriculture Organization. The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point. Synthesis report 2021. Rome. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cb7654en>. Acceso el: 26 enero 2024.

FAO, Food and Agriculture Organization. Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators – Global, regional and country trends, 1990–2020. FAOSTAT Analytical Briefs. Rome. n. 46. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc0918en> y <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acceso el: 25 enero 2024.

FAO, Food and Agriculture Organization; DRECHSEL, P.; MARJANI, Z. S.; PEDRERO, F. Water quality in agriculture: Risks and risk mitigation. Rome, FAO & IWMI. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc7340en>. Acceso el: 26 enero 2024.

FAO, Food and Agriculture Organization. The impact of pesticide residues on the gut microbiome and human health – A food safety perspective. Food Safety and Quality Series. Rome. n. 19. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc5306en>. Acceso el: 29 enero 2024.

FAO, Food and Agriculture Organization; WHO. The International Code of Conduct on Pesticide Management. Rome, p. 6, 2014. Disponible en: <https://www.fao.org/3/I3604E/i3604e.pdf>. Acceso el 31 enero 2024.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Statistical Database, . Pesticides Use, visualize data 2000 to 2021. 2024. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acceso el: 25 enero 2024.

FERNANDES, Ana Flavia Tonelli. Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo. 2018. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biociências Aplicada À Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade do São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponible en: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-22052019-135938/publico/Tese\\_Completa\\_corrigida.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-22052019-135938/publico/Tese_Completa_corrigida.pdf). Acceso el: 07 mayo 2023.

FERREIRA, Thiara do Amaral. Degradação do herbicida atrazina por consórcios de bactérias formadoras de biofilme. Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Ambientais, p. 64, 2016. Disponible en: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/31282>. Acceso el: 28 mayo 2023.

FHB, Fundación Heinrich Böll; AT, Amigos de la Tierra; PAN, Pesticide Action Network Europe. Atlas de los Pesticidas. Hechos y cifras sobre químicos tóxicos en nuestra agricultura. Creative Commons. Europa, v. 1, 2023. Disponible en: <https://www.tierra.org/wp-content/uploads/2023/04/Atlas-pesticidas-Amigos-Tierra.pdf>. Acceso el: 12 abril 2024.

GABARDO, Renata Prussak; *et al.* Determination of atrazine and main metabolites in natural waters based on a simple method of QuEChERS and liquid chromatography coupled to a diode-array detector. *Microchemical Journal*. Elsevier. n. 168, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106392>. Acceso el: 29 enero 2024.

GAGNETEN, Dra. Ana María *et al.* Informe técnico-científico sobre el uso e impactos del herbicida atrazina en Argentina. Buenos Aires-Argentina: Copyright © Programa de Las Naciones Unidas Para El Desarrollo. p. 304, 2021. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/09/informe\\_tecnico\\_-\\_atrazina.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/09/informe_tecnico_-_atrazina.pdf). Acceso el: 19 marzo 2023.

GHIM HOCK, Ong; *et al.* Isolation of atrazine-tolerant fungi from soil. *Current Topics in Toxicology*. v. 16, 2020. Acceso el: 20 abril 2024.

GILANI, Razia Alam; RAFIQUE, Mazhar; REHMAN, Abdul; MUNIS, Muhammad Farooq Hussain; REHMAN, Shafiq Ur; CHAUDHARY, Hassan Javed. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal Of Basic Microbiology*. v. 56, n. 2, p. 105-119, 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jobm.201500336>. Acceso el: 25 mayo 23.

HERRERA GALLARDO, Brenda Elena. Proceso de degradación de atrazina en un suelo agrícola por actividad enzimática de *Aspergillus niger*. Universidad Autónoma

Metropolitana. Azcapotzalco. Tesis Posgrado en Ingeniería de Procesos. 2019. Disponible en: <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/6115>. Acceso el: 04 marzo 2024.

HUIJUN, He; *et al.* A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019. Disponible en: [IJERPH | Free Full-Text | A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment \(mdpi.com\)](https://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/1115). Acceso el: 04 marzo 2024.

IBAMA. Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002. 2021. Disponible en: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acceso el: 19 marzo 2023.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Nota pública acerca do posicionamento do instituto nacional de câncer sobre o projeto de Lei Nº 6.299/2002. 2018. Disponible en: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/nota-publica-inca-pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>. Acceso el: 25 febrero 2024.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre a Validade Técnica dos Resultados de Ensaios. Brasil. 2020. Disponible en: [http://inmetro.gov.br/credenciamento/eventos-cgcre/13-14-15Workshop/15-Workshop\\_ISO\\_IEC\\_17025\\_-\\_7.7\\_-\\_Garantia\\_da\\_validade\\_dos\\_resultados.pdf](http://inmetro.gov.br/credenciamento/eventos-cgcre/13-14-15Workshop/15-Workshop_ISO_IEC_17025_-_7.7_-_Garantia_da_validade_dos_resultados.pdf). Acceso el: 25 febrero 2024.

JI-DONG Gu. On Environmental Biotechnology of Bioremediation. Applied Environmental Biotechnology, Environmental Engineering, Guangdong Technion Israel Institute of Technology, China, 21 diciembre 2020 v. 5, p. 28-33. Disponible en: <http://doi.org/10.26789/AEB.2020.02.002>. Acceso el 22 mayo 2023.

KUMAR, Anup; SINGH, Neera. Atrazine and its metabolites degradation in mineral salts medium and soil using an enrichment culture. Environmental Monitoring and Assessment. v. 188, 2016. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-016-5144-3>. Acceso el: 12 abril 2024.

LATGÉ, Jean Paul; CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* y aspergilosis en 2019. Clinical Microbiology Reviews. 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/cmr.00140-18>. Acceso el: 19 abril 2024.

LEAL, Daniela Piaç Barbosa; DICK, Deborah Pinheiro; STAHL, Anna Meike; KÖPPCHEN, Stephan; BURAUDEL, Peter. Atrazine degradation patterns: the role of straw cover and herbicide application history. *Scientia Agricola*, Scielo. v. 76, n. 1, p. 63-71, 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2017-0230>. Acceso el: 06 mayo 2023.

LIMA, Agata Cristina; et al. Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. *Revista Internacional de Ciências*. v. 8, n. 2, p. 234-253, 2019. Disponible en: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/ric/article/view/34202/26996>. Acceso el: 18 marzo 2023.

LIMACHI MAMANI, Jimena. Extracción e identificación de multi-residuos de plaguicidas en suelos por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas (LC-MS/MS). Universidad mayor de San Andrés. Facultad de ciencias puras y naturales. La Paz-Bolivia. 2016. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18151/M-289.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acceso el: 5 junio 2023.

LIU, Xiaowei; et al. Shift in Bacterial Community Structure Drives Different Atrazine-Degrading Efficiencies. *Frontiers, Sec. Microbiotechnology*. v. 10, 2019. Acceso el 06 marzo 2024.

LOUCA, S.; POLZ, M.; MAZEL, F. Function and functional redundancy in microbial. *Nature Ecology & Evolution*, v. 2, p. 936-943, 2018. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0519-1>. Acceso el: 07 mayo 2023.

MACHADO, Kelly C.; et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of The Total Environment*. v. 572, p. 138-146, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.210>. Acceso el: 17 abril 2024.

MADARIAGA NAVARRETE, Alfredo; et al. Biorremediation model for atrazine contaminated agricultural soils using phytoremediation (using *Phaseolus vulgaris* L.) and a locally adapted microbial consortium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. p. 367-375, 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1292092>. Acceso el: 17 abril 2024.

MAQBOOL, Zahid; et al. Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 23, p. 16904–16925, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7003-8>. Acceso el: 06 marzo 2024.

MESQUITA BRAGA, Raíssa; PADILLA, Gabriel; ARAUJO, Wellington Luiz. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secundar metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>. Acceso el: 16 abril 2024.

NIGHAT, Fatima; *et al.* Epicoccum sp., an emerging source of unique bioactive metabolites. Acta Poloniae Pharmaceutica. Pakistan, v. 73, p. 13-21, 2016. Disponible en: [https://ptfarm.pl/pub/File/Acta\\_Poloniae/2016/acta1\\_2016.pdf#page=15](https://ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2016/acta1_2016.pdf#page=15). Acceso el: 16 abril 2024.

OMS, Organización Mundial de la Salud. Residuos de plaguicidas en los alimentos. 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. Acceso el 12 abril 2024.

PANIURA CUCHILLO, Luis Ivan. Métodos de Degradación por Procesos Biológicos, Físicoquímicos y Químicos de la Atrazina en el Recurso Suelo y Medios Acuáticos: Revisión Sistemática. Universidad César Vallejo. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Lima-Perú. 2022. Disponible en: [https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/91970/Paniura\\_CLI-SD.pdf;jsessionid=A6F4F2B881B1838E3A776FA0C10BEB9A?sequence=1](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/91970/Paniura_CLI-SD.pdf;jsessionid=A6F4F2B881B1838E3A776FA0C10BEB9A?sequence=1). Acceso el: 12 abril 2024.

PEVASPEA., Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado de Paraná. Vigilância Ambiental de resíduos de agrotóxicos em água para consumo humano no Paraná 2017-2019. Paraná, Governo de Estado, Secretaria da Saúde. Paraná, Brasil, 2019. Disponible en: [https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2022-04/02.03.2022\\_arquivo-final\\_vigilancia\\_ambiental\\_de\\_residuos\\_de\\_agrotoxicos\\_em\\_agua\\_para\\_consumo\\_humano\\_no\\_parana\\_2017\\_-\\_2019.pdf](https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-04/02.03.2022_arquivo-final_vigilancia_ambiental_de_residuos_de_agrotoxicos_em_agua_para_consumo_humano_no_parana_2017_-_2019.pdf). Acceso el: 02 febrero 2024.

PEVASPEA, Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado de Paraná. Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná/Secretaria de Saúde. Curitiba: SESA. 2021. Disponible en: <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Saude-e-agrotoxicos-PEVASPEA>. Acceso el: 04 marzo 2024.

PIGNATI, Wanderlei Antonio; *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Ciências da Saúde coletiva, Rio de Janeiro. v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/csc/a/grnBRDjmtcBhm6CLprQvN/?format=pdf&lang=pt>. Acceso el: 02 febrero 2024.

PIOLI, Julieta. Desarrollo y validación de una técnica analítica para monitorear la evolución de la degradación de agroquímicos en camas biológicas. Encuentro de Jóvenes investigadores, Resumen extendido. 2015. Disponible en: [https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5290/Resumen\\_Pioli\\_CienciasNaturales.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5290/Resumen_Pioli_CienciasNaturales.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acceso el: 19 abril 2024.

PIRSAHEB, Meghdad; MORADI, Negin. Sonochemical degradation of pesticides in aqueous solution: investigation on the influence of operating parameters and degradation pathway a systematic review. Royal Society of Chemistry, RSC advances. p. 7396–7423, 2020. Disponible en: [10.1039/c9ra11025a](https://doi.org/10.1039/c9ra11025a). Acceso el: 06 febrero 2024.

PRASANNA, H.N.; RAMANJANEYULU, G.; RAJASEKHAR, R. B. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. 3 Biotech v. 6, p. 162, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0483-x>. Acceso el: 19 abril 2024.

QU MENGJIE; *et al.* Phytoextraction and biodegradation of atrazine by *Myriophyllum spicatum* and evaluation of bacterial communities involved in atrazine degradation in lake sediment. Chemosphere. v. 209, p. 439-448, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.055>. Acceso el: 5 junio 2023.

RAHMEIER BONASSA, Giuliana. Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante para a biorremediação de solos agrícolas impactados com ATZ. Universidade Federal da Integração Latino-americana. Foz do Iguaçu, 2021. Disponible en: <http://dspace.unila.edu.br/123456789/6227?locale-attribute=en>. Acceso el: 17 abril 2024.

RDC. Resolución de la Dirección Colegiada N° 294, del 29 de julio de 2019. Ministerio de Salud. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria-ANVISA. Disponible en: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/RDC\\_294\\_2019\\_.pdf/c5e8ab56-c13d-4330-a7a4-153bed4c5cda](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/RDC_294_2019_.pdf/c5e8ab56-c13d-4330-a7a4-153bed4c5cda). Acceso el: 04 marzo 2024.

RENTON, Michael; SINGH CHAUHAN, Bhagirath. Modelling crop-weed competition: Why, what, how and what lies ahead?. Crop Protection. v. 95, p. 101-108, 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.003>. Acceso el: 28 mayo 2023.

ROSADO FLORES, Maria Fernanda. Identificación y caracterización de microorganismos con aplicación potencial en biorremediación. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. 2019. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/30607/Identificaci%c3%b3n%20y%20caracterizaci%c3%b3n%20de%20microorganismos%20con%20aplicaci%c3%b3n%20potencial%20en%20biorremediaci%c3%b3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acceso el 5 de junio 2023.

RIBEIRO LIMA, Fabiana Alves; *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/qn/a/mcn8ZnCWphHhbsvWZ3pdFmQ/>. Acceso el 19 febrero 2024.

ROSTAMI, Saeid; *et al.* Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review. Environmental Technology & Innovation. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102019>. Acceso el: 20 abril 2024.

SAGASTA, Javier Mateo; ZADEH, Sara Marjani; TURRAL, Hugh. More people, more food, worse water? A global review of water pollution from agriculture. Rome: FAO,

Colombo: IWMI. 2018. Disponible en: <https://www.fao.org/documents/card/en?details=CA0146EN>. Acceso el: 26 enero 2024.

SHARDA. Bula Atrazina SD 500 SC. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA sob o nº 31818, 2018. Disponible en: [https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-10/atrazinasd500sc.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/atrazinasd500sc.pdf). Acceso el: 04 marzo 2024.

SCHREINER, Verena, *et al.* Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. *Science of The Total Environment*, v. 573, p. 680-689, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.163>. Acceso el: 31 mayo 2023.

SINGH, Simranjeet; *et al.* Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. Springerlink: *Environmental Chemistry Letters*, Brasil. n. 16, p. 211-237, 2017. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-017-0665-8#citeas>. Acceso el: 19 marzo 2023.

SINGH, S.N.; JAUHARI, N. Atrazine degradation by plants and microbes. Springer International Publishing. *Environmental science and engineering*. Suiza. 2016. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45156-5\\_10](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45156-5_10). Acceso el: 4 junio 2023.

SOL, Z. B.; *et al.* Biología y aplicaciones de *Clonostachys rosea*. *Journal of applied Microbiology*. v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jam.14625>. Acceso el: 16 abril 2024.

SWANTHY, Kannan; *et al.* Biodegradation of pesticide in agricultural soil employing entomopathogenic fungi: Current state of the art and future perspectives. *Heliyon*. v. 10, 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23406>. Acceso el 06 marzo 2024.

SZEWCZYK, Rafał; *et al.* Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. *Journal of Environmental Management*. v. 262, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110304>. Acceso el: 07 marzo 2024.

TAVERNA, María Eugenia; *et al.* Microparticles based on ionic and organosolv lignins for the controlled release of atrazine. *Journal of Hazardous Materials*. v. 359, p.139-147, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.010>. Acceso el: 09 enero 2024.

TOLLER, Nathalia; GUIMARÃES Elisete; BRAVO Claudia. Biodegradação do Herbicida Atrazina por *Saccharomyces Cerevisiae*. *Engenharia Sanitária E Ambiental* 26.4, 2021, 651-58. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1413-415220190089>. Acceso el: 15 de marzo 2023.

VITERI, Alexa Luzmila Castro. Enfoques y Métodos para la Aplicación de Biorremediación en la Degradación de Contaminantes Ambientales. *High Tech-*

Engineering Journal, Moche-Perú, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2022. Disponible en: <https://revista.uct.edu.pe/index.php/hightech/article/view/315>. Acceso el: 21 mayo 2023.

VONBERG, David; et al. Atrazine Soil Core Residue Analysis from an Agricultural Field 21 Years after Its Ban. Journal of Environmental Quality. v. 43, p. 1450-1459, 2014. Disponible en: <https://doi.org/10.2134/jeq2013.12.0497>. Acceso el: 11 abril 2024.

XIAOWEI, Liu, *et al.* Shift in Bacterial Community Structure Drives Different Atrazine-Degrading Efficiencies. Frontiers in Microbiology. v.10, 2019. Disponible en: URL=<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00088>. Acceso el: 28 mayo 2023.