

Validación de la determinación de picloram y ácido 2,4-diclorofenoxiacético en muestras ambientales de suelos por cromatografía de líquidos de alta resolución

López Urrutia Yolanda Gabriela¹, López Santiago Norma Ruth^{1*}, Gutiérrez Ruiz Margarita¹, Morales Zamudio Enrique²

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental. Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México. C.P. 04510, México.

²LEACSA. Alfonso Esparza Oteo 63, Guadalupe Inn, Álvaro Obregón, Ciudad de México. C.P. 01020, México.

*Autor para correspondencia: nruthls@yahoo.com

Recibido:

28/mayo/2017

Aceptado:

25/octubre/2017

Palabras clave

Herbicidas, suelo, validación

Keywords

Herbicides, soil, validation

RESUMEN

Se desarrolló y validó una metodología por CLAR que permitió llevar a cabo la determinación de 2,4-D y picloram en muestras de suelo. Los resultados muestran que el método desarrollado es adecuado para los fines previstos ya que cumplen con los criterios de aceptación establecidos. La extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido mostro ser eficiente, los parámetros de desempeño obtenidos cumplen con los criterios de aceptación y durante el análisis cromatográfico no se detectaron interferencias provenientes de la matriz. Al aplicar el método muestras ambientales no se encontró evidencia de la presencia de 2,4-D ni de picloram, sin embargo debe tomarse en cuenta que son compuestos tóxicos y que un inadecuado manejo y una exposición elevada a estos compuestos, puede generar efectos dañinos a la salud.

ABSTRACT

It was developed and validated a HPLC methodology that allowed the determination of 2,4-D and Picloram in soil samples. The results show that the developed method is suitable for the intended purposes as they meet the established acceptance criteria. The solid-fluid extraction assisted by ultrasound showed to be efficient, the performance parameters obtained comply with the criteria of acceptance and during the chromatographic analysis no interferences were detected from the matrix. When applying the environmental samples method, no evidence was found of the presence of 2,4-D or Picloram, however it should be taken into account that they are toxic compounds and that inadequate management and exposure to these compounds can cause harmful health effects.

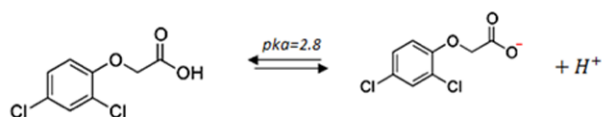
Introducción

El cultivo y cosecha de alimentos se ve constantemente afectada por organismos y plantas las cuales causan daños y pérdidas a las cosechas, situación que desde el origen de la agricultura ha sido de suma importancia debido a que se busca evitar la pérdida de la producción agrícola ya que de ella depende en gran medida la humanidad para poder sobrevivir (Asensio, 2012). Uno de los recursos más importantes ha sido y sigue siendo la utilización de plaguicidas para la protección de los cultivos (Juan, 2008).

La aplicación constante de plaguicidas a suelos agrícolas genera residuos que contaminan los suelos, cuerpos de agua, aire y biota, llegando a afectar cadenas tróficas y como consecuencia la salud humana. Para entender el comportamiento de los plaguicidas en el ambiente se deben de tomar en cuenta las características del ambiente, procesos de transporte, geografía del lugar donde se aplicó, propiedades fisicoquímicas y tiempo de vida media de los plaguicidas (Campos y González, 2011).

El picloram y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) son herbicidas empleados para el control de plantas indeseables de hoja ancha o arbustiva en cultivos de arroz, avena, caña de azúcar, cebada, maíz, sorgo, pastizales y potreros. El 2,4-D es un herbicida que pertenece al grupo químico de los fenoxiacéticos, mientras que el picloram es un compuesto de piridínico.

a. 2,4-D



b. Picloram

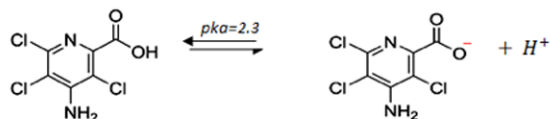


Figura 1. Equilibrios ácido-base: a) 2,4-D y b) Picloram.

Tanto el 2,4-D como el picloram actúan de manera sistémica, como una auxina imitadora (hormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal), son absorbidos vía foliar, edáfica y por superficies de corte; esto produce en las malezas un crecimiento más fuerte en la superficie superior que en la inferior de una planta, lo que provoca que una parte de la planta, como una hoja, se curve hacia abajo y estas caigan. La muerte de la planta ocurre típicamente dentro de tres a cinco semanas siguientes a la aplicación (Sembro, 2014).

La EPA 508 en EUA y la NOM-041-SSA1-1993 en México proponen una metodología para la determinación de plaguicidas mediante cromatografía de gases (CG) acoplado al detector de captura de electrones (Ramos, 2004), sin embargo, ambos herbicidas no son volátiles y una etapa de derivatización debe llevarse a cabo para su determinación GC. Una alternativa para superar esta limitación de detección es realizar el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), mediante detección UV.

La separación cromatográfica debe realizarse preferiblemente a pH mayor al pKa del herbicida, para garantizar la especie en su forma iónica. Por lo que el análisis debe ser a pH superior a 4.0, cuando el herbicida ácido está completamente disociado, figura 2.

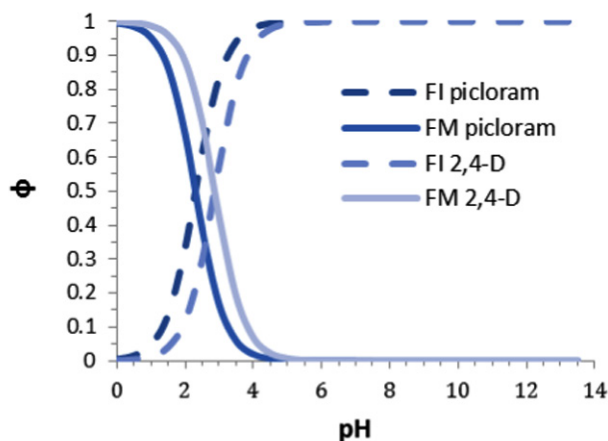


Figura 2. Diagramas de abundancia relativa de 2,4-D y picloram. Forma iónica (FI) y la molecular (FM).

Un paso esencial en el proceso de análisis de plaguicidas mediante cromatografía, es la extracción de los analitos de interés y para ello es indispensable seleccionar un método apropiado (Robles, 2014). La extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos asistida por ultrasonidos, seguida de procedimientos apropiados de limpieza, ha sido uno de los métodos más utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas en suelos, debido a la creciente necesidad de reducir las cantidades de disolventes, de aumentar el rendimiento de la extracción, reducir tiempo y asegura que no se dañe la estructura de los extractos (de Geronimo et al., 2015).

El objetivo de validar un método es demostrar que el procedimiento analítico propuesto es el adecuado para el propósito indicado. Para la validación de un método analítico se deben obtener los siguientes parámetros de desempeño: selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de linealidad, veracidad (recobro) y precisión (Morillas et al., 2016).

Metodología

Reactivos

Se utilizó acetonitrilo (ACN) grado CLAR y ácido acético glacial pureza del 99.7%. estándares de alta pureza de 2,4-D y picloram (99.5 y 98.6%, respectivamente) de la marca Chem Service Inc; metanol marca Honeywell grado CLAR, ácido sulfúrico y agua nanopura (Tipo I).

Instrumentos

Los reactivos fueron pesados en balanzas analíticas Sartorius Research, para la separación cromatográfica se utilizó una Columna Hypersil Gold C18 4.3x 150 mm, un sistema de bombeo Waters 510 HPLC Pump Modelo 510 Solvent Delivery System acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Forward Optical Scanning. Un Espectrofotómetro UV-VIS CARY3E, Varian fue empleado para obtener las características espectrofotométricas del 2,4-D y picloram. En el proceso de extracción de la muestra se utilizó Baño ultrasónico Branson Centrifuga Damon/IEC Division.

Desarrollo del método de separación

La longitud de onda de trabajo de los herbicidas se determinó a partir de un barrido entre 200 y 800 nm para obtener el espectro de absorción de para cada herbicida, esto se realizó con un estándar de 20 mg/L, Se trazó el gráfico $\log k'w = f(0\%ACN)$, realizando cinco mediciones variando la composición de la fase móvil (ACN) de 35 a 55%, completando con la fase acuosa (dis HAc pH ~4.88), con un flujo de 1.5 mL/min ajustando el detector UV a 254 nm para picloram y 280 nm para 2,4-D dejando las corridas de 20 min para poder detectar la señal de detección de cada plaguicida.

Validación del método

Para validar el método se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC), precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud (como recobro). En la Tabla 1 se resume el plan de validación y los criterios de aceptación correspondientes.

Optimización del Proceso de extracción

Se tomó como base la secuencia de extracción propuesta por Eduardo de Gerónimo y sus colaboradores (de Geronimo et al, 2015), con ajustes en el volumen de extractantes y la cantidad de suelo, se mantuvieron los tiempos de agitación, de extracción asistida por ultrasónico y las condiciones de centrifugación.

Procedimiento de extracción

Se pesan 2g de muestra de suelo (previamente homogeneizadas) en un vial de 20 mL, se añaden 2 mL de agua y 10 mL de ACN, posteriormente se agita de forma mecánica durante 1 h, seguido de una extracción asistida por ultrasonido durante 15 min. Posteriormente, se centrifuga a 4600 rpm durante 10 min. Se toma el sobrenadante y se se ajusta el volumen a 10 mL, se adicionan 30 µL de ácido sulfúrico y se diluye con 10 mL de agua. El extracto se filtra a través de una membrana de nylon de 0.22 mm. Finalmente 20µL del extracto final se inyectan para su análisis cromatográfico.

Para confirmar el método en la matriz (intervalo de trabajo), se aplicó el procedimiento descrito anteriormente a una muestra de suelo adicionada, a 3 niveles de concentración: 15, 33 y 57 mg plaguicida/kg de suelo. Estas pruebas se hicieron por triplicado de forma independiente. Se obtuvieron la repetibilidad, el recobro y la curva.

Tabla 1. Plan de validación.

Parámetro	Analizar	Obtener	Criterio
Intervalo lineal	Preparar disoluciones para una curva de calibración a partir de un estándar. Se incluye un blanco y 5-8 niveles de concentración. Realizar el ensayo por triplicado. Leer el blanco. Leer las disoluciones estándar. Realizar el ajuste de la curva por mínimos cuadrados de la respuesta del equipo en función de la concentración del analito	Coefficiente de regresión (r^2)	$r^2 \geq 0.98$
Sensibilidad Analítica		Pendiente = m	El intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero
Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)	Se prepararon y midieron 6 disoluciones independientes del nivel concentración más bajo de la curva de calibración	$LDD = \frac{3s}{m}$ $LDC = \frac{6s}{m}$ s es la desviación estándar de la medición instrumental del analito m es el valor de la pendiente obtenida por la curva de calibración	LDC debe ser menor la concentración más baja del intervalo lineal y el LDD más bajo que el LDC
Exactitud como % Recobro	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración	$\%R = \left(\frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}} \right) \times 100$	98-102% con una DER $\leq 2\%$
Repetibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración	Desviación estándar relativa	DER $\leq 2\%$
Reproducibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración. En periodos de tiempo diferentes		

Muestras ambientales

El muestreo se realizó en el mes de octubre del 2016 en Molango de Escamilla, Hidalgo, el cual presenta un clima semi-cálido en época de verano y semi-frío en invierno ambos con lluvias regulares por lo que la flora

es muy densa en la región y en su mayoría el suelo es aprovechado para su uso agrícola, principalmente para sembrar maíz.

En el laboratorio las muestras identificadas con las claves, se envasaron para evitar la contaminación exterior así como cualquier alteración y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para evitar la pérdida de los analitos.

Para la extracción y análisis se agruparon en lotes de 12 muestras, cuando fue posible se analizaron de forma duplicada y adicionada, cada lote llevo como control de calidad un blanco y un blanco adicionado. En el caso del blanco el procedimiento de extracción se aplicó pero sin muestra de suelo al igual que al blanco fortificado, a este último fue agregada una alícuota de 500 µL del estándar de la mezcla de los analitos a 242 mg/L.

Resultados y discusión

Desarrollo del método de separación

Los espectros de los herbicidas se obtuvieron con el espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo CARY3E, en los cuales se confirmó la longitud de onda para efectuar la cuantificación por CLAR del 2,4-D a 280nm y para picloram a 254 nm. Cuando se trabaja en fase reversa entre más no polar sea una analito mayor será su retención. En el caso de 2,4-D y picloram, ambas son especies polares con propiedades ácido-base, Figura 1, por lo que es importante asegurar que cada analito se encuentre en una sola forma durante el proceso de separación cromatográfico: molecular (FM) o iónica (FI). Para conocer el pH que nos asegurara que los plaguicidas se encontraban en su forma iónica se trazaron los diagramas de abundancia relativa de estos compuestos, Figura 2; en ellos se observa que para esto se debe trabar con un pH ácido de 4 o mayor donde las especies se encuentran en su forma iónica. Para asegura esto uno de los componentes de la fase móvil es una disolución acuosa de ácido acético de pH de ≈4.88.

A partir de la experimentación descrita, se obtuvieron los parámetros de retención, y se trazó la curva $\log k' = f(0\%ACN)$, Figura 3. Se seleccionó la proporción de la fase móvil en ACN: dis. AcOH, 40:60 v/v debido a que con esta proporción el tiempo de retención de cada analito es satisfactorio, el análisis es tan prolongado en comparación a otras proporciones. Cabe resaltar que en caso de picloram dada su alta polaridad, hay muy poca retención. A la composición seleccionada los tiempos de retención para los analito son 1.75 min para picloram y 6.17 min para 2,4-D, como se muestra el cromatograma de la Figura 3, lo cual facilito la validación del método, ya

que para los análisis posteriores se manejaron tiempos de corrida de máximo 10 min.

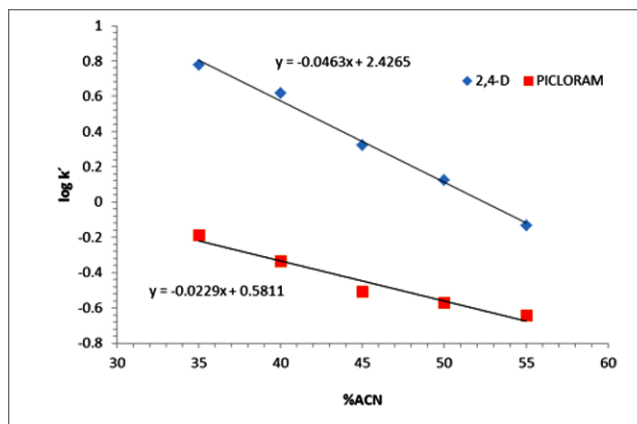


Figura 3. Curvas $\log k' = f(\% ACN)$.

Se obtuvieron los valores de K_w . El factor de retención en agua, K_w , de una sustancia está relacionado con su capacidad de adsorción o su potencial para bioconcentrarse en tejidos grasos. Un valor bajo de K_w indica la probable movilidad y transporte de ese material por su buena solubilidad, y fácil metabolización y biodegradación, es decir, hay que esperar una escasa bioacumulación. Por el contrario, un valor alto de K_w indica posible adsorción en tejidos grasos, suelo y sedimentos. Por tanto, es probable la bioconcentración o bioacumulación. Su escasa movilidad favorece la toxicidad de estas sustancias. Dichos valores se obtuvieron del cálculo de la ordenada al origen del gráfico de $\log k' = f(\% ACN)$, Figura 3. En el caso de picloram se obtuvo un valor de $\log K_w$ de 0.58 y 2,4-D de 2.42. El picloram es un compuesto con un potencial de acumulación muy bajo en los tejidos grasos, y el 2,4-D es de baja potencialidad.

Validación del método

Para validar el método se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal, sensibilidad analítica, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (como recobro), límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC) y se realizó la confirmación en matriz. En las Tabla 2 y 3 se presentan los parámetros de desempeño obtenidos de las validaciones para 2,4-D y picloram, respectivamente.

De manera general con los parámetros de desempeño obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección experimental para 2,4-D y picloram mostrados en las tablas anteriores, se concluye que el método empleado para la detección y cuantificación de estos plaguicidas es confiable debido a que tienen valores que cumplen con los criterios de aceptación.

Tabla 2. Parámetros de Validación: 2,4-D.

Parámetro	Sistema	Confirmación en matriz	
λ (nm)		280	
IL (mg/L)	2.5-9.5	IL (mg/kg)	15-57
Sensibilidad analítica	5135		
r^2	0.9920		
LD (mg/L)	0.08	LD (mg/kg)	0.004
LC (mg/L)	0.17	LC (mg/kg)	0.009
% Recobro (5.5 mg/L)	101.6	% Recobro (15 mg/kg)	104.1
Rep. DER (%) (5.5 mg/L)	1.0	Rep. DER (%) (15 mg/kg)	7
Reprod. DER (%)	1.1		

Tabla 3. Parámetros de Validación: picloram.

Parámetro	Sistema	Confirmación en matriz	
λ (nm)		254	
IL (mg/L)	2.5-9.5	IL (mg/kg)	15-57
Sensibilidad analítica	18814		
r^2	0.9932		
LD (mg/L)	0.16	LD (mg/kg)	0.002
LC (mg/L)	0.33	LC (mg/kg)	0.004
% Recobro	100.4	% Recobro (15 mg/kg)	115.5
Rep. DER (%)	1.3	Rep. DER (%) (15 mg/kg)	4.9
Reprod. DER (%)	1.4		

Optimización del Proceso de extracción

Para realizar este procedimiento se fortificó una muestra de suelo con una disolución de una mezcla de 2,4-D y picloram, para quedar en 15, 33 y 57 mg de cada plaguicida por kg de suelo, respectivamente, a las cuales se les aplico el método de extracción descrito en la sección experimental. En cada análisis se buscaron que las señales cromatográficas correspondieran a los tiempos de retención de 2,4-D y picloram con base en estos valores se determinaron las concentraciones correspondientes con la finalidad de obtener el porcentaje de recobro y la precisión y así determinar que tanto afecta este procedimiento de extracción para determinación y cuantificación de los analitos. En la Tabla 3 indica la repetibilidad y recobro. Los criterios de aceptación establecidos son: Recobro $100 \pm 20\%$ con una $DER \leq 20\%$. Como se trata de muestras ambientales esto suelen ser un poco más en comparación con los criterios de validación de la separación cromatográfica.

Con valores de recobro obtenidos a tres niveles diferentes de concentración cercanos al 100% y una $DER < 20\%$ para ambos analitos, con lo que se demuestra que el método de extracción empleado no genera interferencias y cumple con los criterios de aceptación.

Para confirmar el método en la matriz se trazó la curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada figuras 4 y 5. En la Tabla 4 se presentan los estadísticos de Cantidad

adicionada vs Cantidad recuperada, los criterios de aceptación establecidos fueron de $r^2 > 0.98$, y el Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad. Con base en estos resultados se puede decir que el método de extracción empleado es sensible para la detección de 2,4-D y picloram cuya concentración se encuentre entre 15 y 57 mg/kg, el criterio de aceptación cumple para ambos casos al ser > 0.98 siendo 0.9999 para 2,4-D y 0.9825 para picloram, Tabla 4.

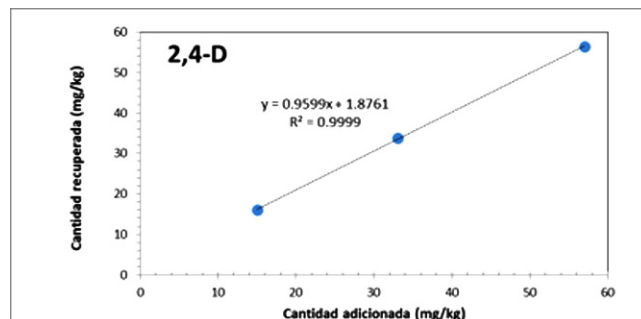


Figura 4. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, 2,4-D

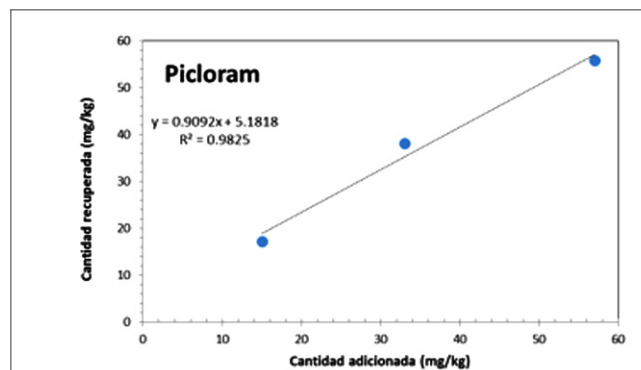


Figura 5. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, picloram.

Tabla 4. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

Parámetro	2,4-D		Picloram	
Intervalo de concentraciones (mg/kg)	15-57		15-57	
Coefficiente de correlación r	0.9999		0.9912	
Coefficiente de determinación r^2	0.9999		0.9825	
Pendiente	1.0		0.91	
Intervalos de confianza al 95 %	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Pendiente	0.83	1.09	-0.6	2.5

Aplicación a muestras ambientales

Las muestras se colectaron en la región de Molango, en la Tabla 5 se presentan los resultados de la aplicación del método propuesto a las muestras, como se puede observar en las muestra analizadas no hay la presencia de 2,4-D y picloram esto se puede atribuir a que cuando

se llevó a cabo el muestreo ya habían pasado meses de la aplicación del 2,4-D y Picloram, debido a que la aplicación de estos herbicidas es recomendada en los meses donde apenas la planta de la cosecha ha comenzado a crecer, evitando el tiempo de floración, de acuerdo con la conversaciones con los pobladores estas se aplican en abril-mayo, y las muestras fueron colectadas en octubre.

Tabla 5. Resultados generales del análisis de las muestras de suelo de Molango de Escamilla, Hidalgo.

Clave	2,4-D mg/kg	Picloram mg/kg
628-16	ND	ND
629-16	ND	ND
630-16	ND	ND
631-16	ND	ND
632-16	ND	ND
633-16	ND	ND
634-16	ND	ND
635-16	ND	ND
636-16	ND	ND
637-16	ND	ND
638-16	ND	ND
639-16	ND	ND

En la Figura 6 se muestran cromatogramas del extracto de la muestra 635-16, sin adicionada con el cual no presentar ninguna señal indica que el método empleado es confiable ya que no presenta la señal de algún interferente y adicionada con los plaguicidas y el cromatograma de las muestras adicionadas sólo muestra las señales de 2,4-D y picloram.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados son las siguientes:

Los parámetros de desempeño obtenidos de la validación método cumplen con los criterios de aceptación establecidos y demuestran que el método es adecuado para el alcance propuesto: la extracción y cuantificación simultánea de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram en muestras ambientales de suelos por CLAR con detección Ultravioleta.

La extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido mostro ser eficiente, y la confirmación en matriz mostro que no hay interferencias provenientes de la matriz.

Se obtuvo experimentalmente el valor de $\log K_w$ de 0.58 para picloram y de 2.42 para 2,4-D, lo cual nos indica que el picloram es un herbicida con un potencial de acumulación muy bajo en los tejidos grasos y materia

orgánica del suelo, mientras que el 2,4-D presenta baja potencialidad de acumulación.

En las muestras analizadas no se detectaron ni cuantificaron los herbicidas de estudio.

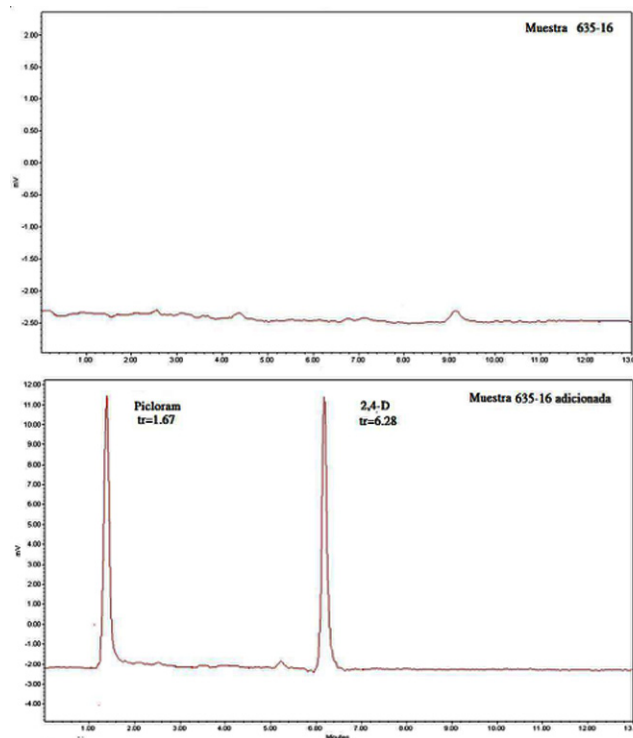


Figura 6. Cromatogramas de la inyección de a) Muestra ambiental y b) Muestra ambiental adicionada con 2,4-D y picloram.

Agradecimientos

A la minera Autlán por las facilidades para llevar a cabo este trabajo.

Referencias

- Asensio R. M. (2012). Nuevos procedimientos de extracción y determinación de plaguicidas en muestras ambientales. Tesis de Doctorado, Universidad de Laguna, España.
- de Geronimo et al. (2015). A simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina. *Analytical Methods*, 7: 9504-9512.
- Juan G. A. (2008). Análisis de contaminantes orgánicos en alimentos por técnicas cromatográficas. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España.

Morillas P. et al. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Madrid: Eurolab España.

Ramos G. O. (2004). Determinación de plaguicidas organoclorados en el agua potable de Cd. Victoria Tamps. y su potencial riesgo a la salud Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Robles M. J. (2014). Desarrollo de metodologías analíticas mediante cromatografía/espectrometría de masas para el control de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en aguas emergentes residuales y superficiales. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, España.

Sembro (18 de Marzo de 2014). Carval Corporation. Recuperado el 27 de Mayo de 2017, de http://www.carvalcorp.com/wp-content/imagenes/agricola/herbicidas/ficloram_folleto_tecnico.pdf.

Sembro (18 de Marzo de 2014).Folleto técnico del ficloram Carval Corporation.6-7. Recuperado el Mayo de 27 de 2017, de http://www.carvalcorp.com/wp-content/imagenes/agricola/herbicidas/ficloram_folleto_tecnico.pdf.