



RESUMEN EXTENDIDO

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA PARA MONITOREAR LA EVOLUCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE AGROQUÍMICOS EN CAMAS BIOLÓGICAS

Pioli, Julieta¹

¹Instituto Nacional de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química INTEC-CONICET-UNL
Director/a: Lescano, Maia
Codirector/a: Andini, Juan Carlos

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: biomezclas, extracción, cuantificación

INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos es fundamental para el éxito de las técnicas actuales de agricultura, aunque su uso es un tema de preocupación pública debido al riesgo potencial que representan para la salud humana y el ambiente. La presencia de agroquímicos en el medio ambiente surge como consecuencia de las aplicaciones y manipulación de los mismos. Éstos pueden ingresar al ambiente por contaminación difusa o puntual. En la actualidad existen diversas tecnologías de remoción de agroquímicos, como tratamientos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, estas técnicas poseen costos muy elevados y su aplicación en establecimientos agrícolas extensos es dificultosa. Las camas biológicas son una tecnología de bajo costo para minimizar los riesgos de contaminación y están diseñadas para recolectar y descontaminar derrames accidentales o residuos líquidos con alta carga de agroquímicos y de esta manera evitar la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas. (Diez et al., 2013).

Para poder evaluar la eficiencia de las biomezclas en la degradación de los diferentes agroquímicos resulta imperativo poner a punto y validar técnicas analíticas que conlleven a resultados confiables. De esta manera se podrá seguir la evolución de los diferentes contaminantes en el tiempo evaluando así la eficiencia de las camas biológicas para degradar agroquímicos a diferentes escalas. Debido a esto surge el objetivo principal de este trabajo que es el desarrollo y validación de una técnica analítica de extracción y cuantificación simultánea del 2,4-D y su principal metabolito, el ácido 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) en biomezclas (construidas con materiales propios de la región) como así también de la atrazina.

Título del proyecto: Sistemas De Biopurificación Y Combinación De Procesos Físicoquímicos Para El Tratamiento De Efluentes Con Agroquímicos

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Zalazar, Cristina Susana

OBJETIVOS

- Desarrollar una técnica analítica mediante HPLC para la determinación simultánea de atrazina, 2,4-D y su principal metabolito 2,4-DCP en muestras complejas (biomezclas) en altas concentraciones evaluando diferentes condiciones experimentales (composición de fase móvil para resolución de picos cromatográficos, tipos de solvente, relación sustrato/solvente, tiempos de extracción).
- Evaluar las condiciones experimentales empleadas través de la recuperación (%) en la extracción de los diferentes agroquímicos ensayados.
- Estudiar diferentes parámetros de validación relativos al desempeño de la técnica desarrollada (Sensibilidad, Linealidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Precisión y Exactitud).
- Evaluar la eficiencia de las camas biológicas para degradar muestras complejas de agroquímicos.

METODOLOGÍA

Construcción de biomezclas

Se prepararon siete biomezclas a escala de laboratorio. Se utilizaron rastrojos de trigo, moha, repollo, maíz y trigo-soja como materiales lignocelulósicos, resaca de río como material humidificante y suelo proveniente de un campo con fuerte actividad agrícola. Las muestras de suelo y materiales lignocelulósicos se recolectaron de un campo de la localidad de Margarita, al norte de la provincia de Santa Fe, Argentina (29° 42' 59" S and 60° 14' 5' 35" O). La resaca de río es un producto comercial que se adquirió en un vivero de la ciudad de Santa Fe (Santa Isabel).

Los distintos tipos de rastrojo se cortaron en trozos de aproximadamente 2-3 mm. Las biomezclas se prepararon mezclando los componentes en diversos porcentajes en volumen dentro de cajas de vidrio de 30 L (20×30×50 cm). La maduración se realizó en las mismas cajas durante 60 días entre los meses de febrero-abril.

Optimización del proceso cromatográfico

La técnica de cuantificación de agroquímicos se puso a punto mediante un cromatógrafo líquido Waters ® HPLC/UV equipado con una columna C18 YMC-Triart (5 µm de tamaño de partícula y longitud y diámetro interno de 4,6×250 mm) y un detector Ultravioleta Waters ® 2489. Se evaluaron fases móviles empleando diferentes relaciones Acetonitrilo/Agua (ACN/H₂O) (50:50, 60:40 y 70:30) acidificadas al 1% con ácido acético a fin de resolver los picos correspondientes a los tres analitos de interés. La resolución óptima se obtuvo con la fase móvil de relación 60:40. Se trabajó a una longitud de onda de 230 nm para la detección de 2,4-D y 2,4-DCP, y de 221 nm para atrazina (longitudes de onda determinadas mediante espectrofotometría UV correspondientes a la máxima absorción de cada uno de los analitos de interés). Se emplearon 6 estándares de cada agroquímico de concentraciones de 5, 10, 20, 30, 50 y 80 mg/L para 2,4-D; 1, 5, 10, 20, 30 y 80 mg/L para 2,4-DCP; y 0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 30 mg/L para atrazina.

Desarrollo de técnica de extracción y cuantificación de agroquímicos

Una vez completado el período de maduración, se tomaron muestras de las siete biomezclas las cuales se contaminaron con 2,4-D (Asi Max 50 Chemotecnica -50% v/v-), Atrazina 50 Nufarm ® (50% v/v) y 2,4-DCP (Aldrich, 99%) a fin de obtener una concentración de 200, 100 y 10 mg herbicida/kg de biomezcla seca para llevar a cabo el proceso extractivo y evaluar las recuperaciones de cada uno de los herbicidas para los diferentes sustratos.

Extracción de 2,4-D y 2,4-DCP

La técnica de extracción para el 2,4-D y 2,4-DCP se adaptó de bibliografía (Gupta et al., 2012; Devi, 2001). Para la puesta a punto se llevaron a cabo ensayos de recuperación (variando relación sustrato/solvente y tiempo de ultrasonido). Se colocaron 5 g de biomezcla contaminada en tubos de 50 mL y se agregaron 10 y 20 mL (relaciones 1:2 y 1:4, respectivamente) de Acetonitrilo/Agua/Ácido Acético (ACN/H₂O/HAc) en relaciones 80:20:2,5. Sin embargo, se decidió optar por la relación sustrato/solvente 1:4 por razones prácticas; la posibilidad de trabajar con mayores volúmenes y obtener extractos más limpios conlleva también a una mayor repetitividad de los resultados obtenidos

Las muestras se agitaron por 30 minutos a 250 rpm en un agitador orbital y luego se colocaron en un ultrasonido por 1 y 2 horas. Finalmente, se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se filtró con filtros de jeringa de Nylon de 0,45 µm.

Extracción de atrazina

Para la extracción de atrazina se evaluaron diferentes solventes en relación 1:4: ACN/H₂O/HAc 80:20:2,5 (Devi, 2001), Acetonitrilo acidificado con 1% de ácido acético (ACN) (Alonso et al., 2018), y Metanol (MeOH) (Parada et al., 2018; Bastos et al., 2009). Se empleó el mismo procedimiento de extracción que para 2,4-D y 2,4-DCP. Las mayores recuperaciones para cada muestra se obtuvieron con la mezcla ACN/H₂O/HAc, por lo que se seleccionó este solvente para el proceso de extracción.

Por último, se calcularon los parámetros de validación del procedimiento analítico (Tabla 1): Linealidad, Sensibilidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Precisión (en términos del coeficiente de variación %) y Exactitud (en términos de los porcentajes de recuperación) según Quattrocchi, 1992.

Tabla 1: parámetros de validación

Analitos	Parámetros				
	r	S _{x/y}	LD(mg/L)	LQ (mg/L)	Sensibilidad
2,4-D	0,9998	44839.23	2.55	7.74	57954
2,4-DCP	0,9999	29102.82	1.75	5.32	54751
Atrazina	0,9999	53664.89	0.77	2.34	229751

Para cada una de las determinaciones, se aplicó un test de análisis de la varianza, ANOVA, y no se observaron diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas con cada sustrato para un mismo contaminante.

Con los resultados obtenidos, la técnica desarrollada se valida satisfactoriamente ya que el coeficiente de variación no supera el 12% para ninguna concentración ni sustrato empleado y las recuperaciones alcanzadas varían de 60 a 89%.

Monitoreo de la degradación de agroquímicos

A fin de evaluar la eficiencia de las camas biológicas para la degradación de agroquímicos se contaminó cada biomezcla con 250 mg/kg de 2,4-D y atrazina. Se tomaron muestras a los días 0, 3, 5, 9, 15, 20, 30 y 45 posteriores a la contaminación y se determinó la concentración de cada agroquímico en las biomezclas, por duplicado, empleando la técnica desarrollada.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló y validó satisfactoriamente un método analítico de extracción y cuantificación simultánea de 2,4-D, 2,4-DCP y atrazina para diferentes biomezclas. En primer lugar, se lograron resolver los picos de interés de cada uno de los analitos de manera adecuada. Luego, de acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la mezcla Acetonitrilo/Agua/Ácido Acético 80:20:2,5 como solvente de extracción. De acuerdo a los parámetros de validación obtenidos ($r \geq 0,999$, $RSD < 12\%$, recuperaciones entre 60 y 89%, límites de detección y cuantificación de 2,55 y 7,74 mg/L para 2,4-D, 1,75 y 5,32 mg/L para 2,4-DCP y 0,77 y 2,34 mg/L para atrazina) se concluye que el método desarrollado es confiable para el propósito buscado que es la evaluación de la eficiencia de camas biológicas para degradar mezclas complejas de agroquímicos en altas concentraciones (en este caso 2,4-D y atrazina) empleando diferentes biomezclas construidas con materiales locales.

Por otro lado, se pudo comprobar la eficiencia de las camas biológicas para degradar mezclas complejas de agroquímicos, obteniéndose una degradación mayor al 90% para 2,4-D y atrazina al finalizar el ensayo de degradación

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alonso, L.L., Demetrio, P., Etchegoyen, M.A, Marino, D.J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment* 645, 89-96.
- Bastos, A.C, Magan, N. (2009). *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 389-394.
- Devi, K.M.D., Abraham, C., Chinnamma, N., 2001. Standardization of procedure for residue analysis of 2,4-D in soil. *Journal of Tropical Agriculture* 39, 175–177.
- Diez, M.C; Cifuentes, G.P; Quijada Altamirano, C.; Briceño Muñoz, G.; Calderón Ramirez, C.; Diaz Sánchez, J.; Rubilar Araneda, O.; Tortella Fuentes, G. (2013) Primera Edición. Manual de construcción y operación de lechos biológicos. Ediciones Universidad de la Frontera.
- Gupta, M., Garg, N.K, Himanshu, J., Sharmac, M.P. (2012). Persistence and mobility of 2,4-D in unsaturated soil zone under winter wheat crop in sub-tropical region of India. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 146, 60-72.
- O.P de Amarante, Brito, dos Santos, Nunes, Ribeiro (2003). Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta* 60, 115-121.
- Parada, J., Rubilar, O., Diez, M.C, Sant Ana da Silva, A., Rodriguez-Rodriguez, C., Tortella, G.R (2019). Combined pollution of copper nanoparticles and atrazine in soil: effects on dissipation of the pesticide and on microbiological community profiles. *Journal of Hazardous Materials* 361, 228-236.

Quattrocchi O.A., Andrizzi S.A, Laba R.F. 1aed. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica.